

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

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.03.02 Физика

Профиль: Физика

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
ИЗУЧЕНИЕ ПОДВИЖНОСТИ ОСНОВНОЙ ЦЕПИ ЦИКЛОСПОРИНА G

Студент 4 курса группы 06-711

«18» июня 2021 г.



(Габасова А.И.)

Научный руководитель

д.х.н., профессор

«18» июня 2021 г.



(Ключков В.В.)

Научный консультант

аспирант каф. медицинской физики

«18» июня 2021 г.

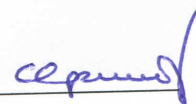


(Кобчикова П.П.)

Научный консультант

к.ф.-м.н., ст. научный сотрудник

«18» июня 2021 г.

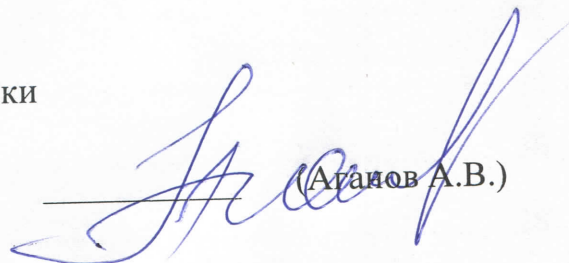


(Ефимов С.В.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

«18» июня 2021 г.



(Аганов А.В.)

Оглавление	
ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. Литературный обзор.....	6
1.1. ЯМР спектроскопия.....	6
1.1.1. Химический сдвиг.....	7
1.1.2. Интегральная интенсивность.....	8
1.1.3. Косвенное спин-спиновое взаимодействие (КССВ).....	9
1.2. Релаксация.....	10
1.2.1. Диполь-дипольное взаимодействие.....	12
1.2.2. Анизотропия химического сдвига.....	13
1.2.3. Диффузия.....	14
1.2.4. Химический обмен.....	15
1.2.5. Квадрупольное взаимодействие.....	15
1.3. Время корреляции молекулярного движения.....	16
2. Материалы и методы.....	18
2.1. Циклические полипептиды.....	18
2.2. Циклоспорин G.....	18
2.3. Основы метода 1D спектроскопии ЯМР.....	20
2.4. Основы метода 2D спектроскопии ЯМР.....	20
2.4.1. 2D COSY.....	22
2.4.2. 2D HSQC.....	23
2.4.3. 2D TOCSY.....	24
2.4.4. 2D NOESY и 2D ROESY.....	26
3. Практическая часть.....	28
3.1. Релаксация для частоты 700 МГц.....	28

3.2. Релаксация для частоты 500 МГц .....	30
3.3. Вычисление времени корреляции.....	32
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ .....	37
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	38

## ВВЕДЕНИЕ

Современная междисциплинарная физико-математическая наука стоит перед вопросом о модификации и поиске способов применения молекул биологически активных соединений, для этого постоянно требуются новые знания о свойствах этих молекул. С помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) можно узнать много параметров, полезных при изучении активности молекул. Так, из экспериментов по ЯМР высокого разрешения, кроме состава и структуры вещества, можно узнать значения времен релаксации, времен корреляции, а также впоследствии изучить подвижность отдельных участков молекулы.

Разработка и введение в практику иммунодепрессивных препаратов сыграло значительную роль в медицине, особенно в области трансплантологии [1]. Именно тогда сформировалось представление, что биологические свойства вещества зависят не только от его химического состава, но и от структуры, равно как от подвижности цепи биомакромолекул. Циклоспорины являются иммунодепрессантами, которые позволяют подавить иммунитет путём воздействия на Т-лимфоциты. На данный момент из множества аналогов в медицине широко применяется циклоспорин А (CsA). Данный полипептид является наиболее безопасным и эффективным по сравнению с другими представителями циклоспоринов [2, 3]. Из множества аналогов циклоспориноидов на данный момент наиболее многообещающим является циклоспорин G (CsG) [4]. По эффективности данный циклоспорин имеет сильное сходство с циклоспорином А, при этом является менее нефротоксичным [5]. Объектом исследования в данной работе является циклоспорин G (CsG).

**Целью** данной работы является изучение подвижности пептидной цепи молекулы циклоспориноидов G.

### **Задачи:**

- Получить значения времён релаксации для некоторых ядер  $^1\text{H}$  циклоспорина G (CsG) на частотах ЯМР 700 и 500 МГц.
- Рассчитать времена корреляции молекулярного движения на разных участках цепи циклоспорина G.
- Сравнить времена релаксации в разных полях и найти корреляцию экспериментальных и расчётных значений.

Исследования проводились на оборудовании ФЦКП ФХИ Казанского Федерального университета (спектрометр ЯМР Bruker Avance III HD 700).

# 1. Литературный обзор

## 1.1. ЯМР спектроскопия

Описание ядерного магнитного резонанса впервые было выполнено Исидором Раби в 1938 году [6] на основе эксперимента Штерна-Герлаха, а в 1944 году Раби удостоен Нобелевской премии по физике за эту работу [7]. Феликс Блох и Эдвард Миллс Парселл в 1946 году модифицировали эту технику для использования с жидкостями и твердыми телами, за что в 1952 году также получили Нобелевскую премию по физике [8]. Евгений Завойский наблюдал ядерный магнитный резонанс в 1941 году, задолго до Феликса Блоха и Эдварда Миллса Парселла, но отклонил результаты.

Спектроскопия ЯМР – это физико-химический метод исследования структуры и состава вещества. Сигнал от образца, помещенного в магнитное поле, регистрируется при возбуждении радиочастотным электромагнитным сигналом с частотой прецессии ядерного спина и затем обрабатывается при помощи Фурье-преобразования [9]. Для анализа молекулярной структуры на атомном уровне также можно использовать электронные микроскопы и рентгеновские дифракционные приборы, но преимущества ЯМР заключаются в том, что измерения образцов являются неразрушающими и требуется меньшая подготовка образцов. Возможность изучения образца в растворе является одним из главных преимуществ метода ЯМР перед другими методами исследований, так как изучение белка в растворе более близко к физиологическим условиям [10].

Для получения сигнала требуется ядро, обладающее магнитным моментом, магнитное поле и электромагнитное излучение правильной частоты. Частота электромагнитного излучения подбирается так, чтобы она совпадала с частотой прецессии ядра.

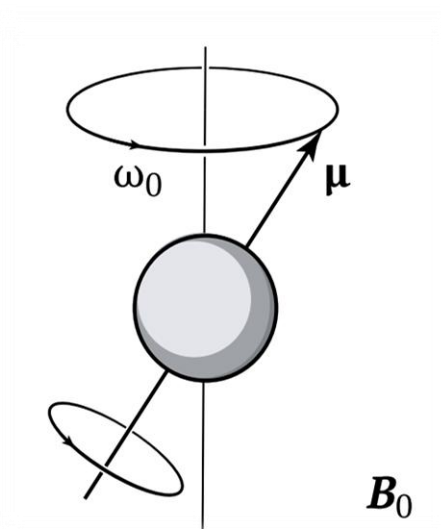


Рисунок 1 – Ядро с ненулевым спином прецессирует вокруг направления магнитного поля, где  $\omega_0$  – угловая частота (ларморова частота),  $\mathbf{B}_0$  – внешнее магнитное поле,  $\boldsymbol{\mu}$  – магнитный момент

Условие магнитного резонанса – условие (1), при котором возможно наблюдать сигнал ЯМР:

$$\nu = \nu_L = \left| \frac{\gamma}{2\pi} \right| B_0 . \quad (1)$$

Частота, которая входит в данную формулу, называется ларморовой частотой. Основной задачей для успешного проведения опыта является подбор частоты электромагнитной волны: она должна совпадать с частотой прецессии ядер [11].

При анализе спектра источником информации служит химический сдвиг, интенсивность пиков, а также константы косвенного спин-спинового взаимодействия (КССВ).

### 1.1.1. Химический сдвиг

Химический сдвиг – это смещение сигнала из-за наличия дополнительного экранирования в молекуле. Химический сдвиг можно описать следующей формулой:

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{эт}}{\nu_0} \cdot 10^6 \quad (2),$$

где  $\delta$  – химический сдвиг,  $\nu_{эт}$  – частота эталонного сигнала,  $\nu_0$  – частота спектрометра. Значение химического сдвига – величина безразмерная [9, 11].

Химический сдвиг обуславливается наличием дополнительного экранирования в молекуле. Эффект экранирования представляет из себя уменьшение расстояния между энергетическими уровнями. Это влечёт за собой уменьшение резонансной частоты, так как кванты энергии, благодаря которым происходят переходы между уровнями, становятся меньше. Поэтому химический сдвиг вносит вклад в получаемые спектры.

Для определения необходимого положения сигнала используют эталонное соединение (внутренний стандарт), которое вводят в изучаемый образец. Обычно эталоном служит тетраметилсилан (TMS). В результате своего симметричного строения и сильному экранированию протонов вещество, являющееся внутренним стандартом, в спектрах ЯМР резонирует в стороне от большинства сигналов, и положение его сигнала принимают за 0 м.д. Оставшиеся резонансные частоты ядер, которые входят в состав образца, отклоняются от частоты эталонного соединения, поэтому говорят, что химический сдвиг – это относительная величина.

### **1.1.2. Интегральная интенсивность**

Интегральной интенсивностью принято называть площадь под пиком в ЯМР спектрах. В случае, когда присутствует симметрия молекул, либо ядра в составе группы очень быстро вращаются вокруг одинарной связи, они являются эквивалентными. Эквивалентность обозначает то, что ядра имеют одно и то же значение химического сдвига  $\delta$  и испытывают одинаковое спин-спиновое взаимодействие с другими ядрами. В спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР величина сигналов прямо пропорциональна количеству эквивалентных ядер.



Интегральная интенсивность пиков в спектре ЯМР даёт информацию об относительном количестве протонов, дающих каждый отдельный сигнал.

В качестве примера можно рассмотреть интегральную интенсивность сигнала  $\text{CH}_3$  и  $\text{CH}$  в одной и той же молекуле: интегральная интенсивность сигнала группы  $\text{CH}$  будет в три раза меньше, чем интегральная интенсивность метильной группы  $\text{CH}_3$  [12]. На рисунке 2 изображены сигналы для групп  $\text{CH}_2$  и  $\text{CH}_3$ .

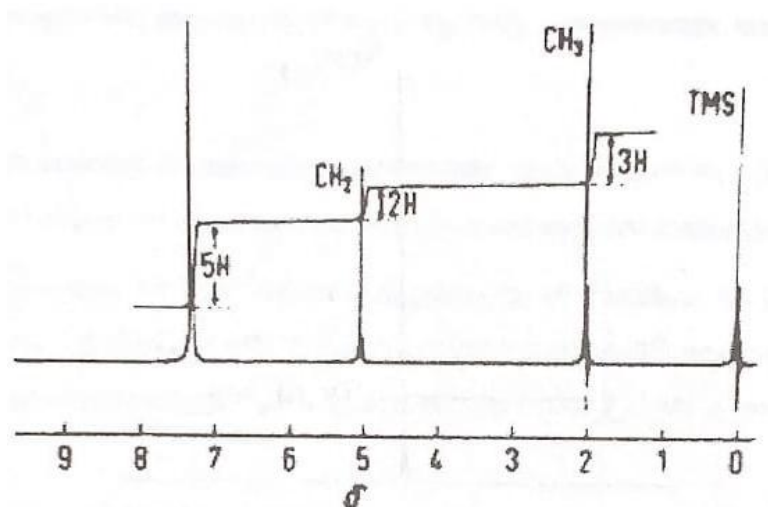


Рисунок 2 – Спектр ЯМР  $^1\text{H}$ . Над сигналами приведены соответствующие значения интегральных интенсивностей

Интегральную интенсивность сигналов редко рассматривают в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$ , так как в типичных спектрах с широкополосной развязкой  $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$  большинство из них имеют дополнительную зависимость интенсивности от числа протонов, которые связаны с атомом углерода.

### 1.1.3. Косвенное спин-спиновое взаимодействие (КССВ)

Косвенное спин-спиновое взаимодействие несёт не меньше информации, чем химические сдвиги. Зачастую по образу спектров можно сделать вывод о строении молекулы. Ядра способны взаимодействовать не только «сосед с соседом», но и благодаря химическим связям воздействовать

друг на друга через электроны [13]. Поляризация спина ядра вызывает поляризацию электронов, расположенных вокруг, в том числе электронов химической связи.

В качестве примера рассмотрим СН-группу. Магнитный момент протона поляризует электроны, из-за этого магнитное поле в месте расположения ядра  $^{13}\text{C}$  меняется. Одна из ориентаций спина  $^1\text{H}$  увеличивает поле, другая уменьшает, благодаря этому линии ядра  $^{13}\text{C}$  смещаются в стороны слабого или сильного поля. Спектр будет иметь обе эти линии (Рисунок 3).

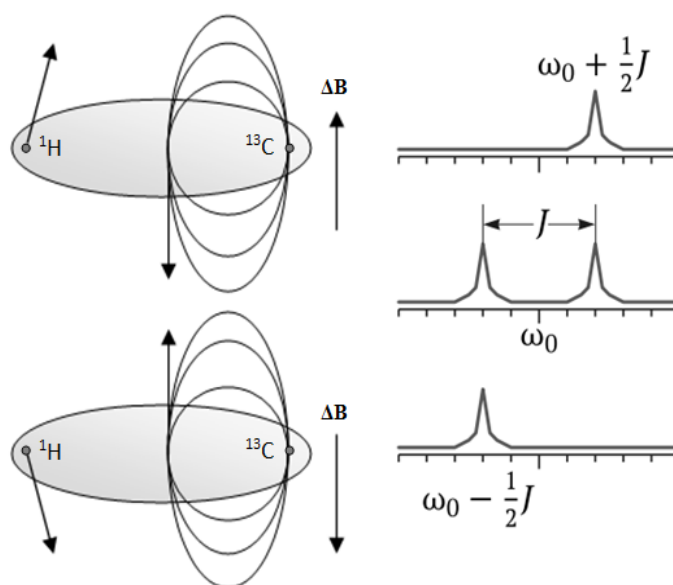


Рисунок 3 – Косвенное спин-спиновое взаимодействие

## 1.2. Релаксация

Релаксация – это процесс возвращения системы к равновесному состоянию. Равновесным состоянием называют состояние, в котором населённости уровней описываются уравнением Больцмана (3):

$$\frac{N_{\alpha}^0}{N_{\beta}^0} = \frac{W_{\beta \rightarrow \alpha}}{W_{\alpha \rightarrow \beta}} = \exp\left(\frac{\Delta E}{kT}\right) \approx 1 + \frac{\gamma \hbar B_0}{kT}. \quad (3)$$

Во время релаксации изменяется магнитный момент отдельных спинов. Обмен энергией между спиновой системой и внешней средой

называют продольной релаксацией. Для кристаллов внешней средой выступает решётка, поэтому эту релаксацию называют еще спин-решёточной. Продольная релаксация характеризуется временем  $T_1$  [14]. Изменение магнитного момента изображено на рисунках 4, 5.

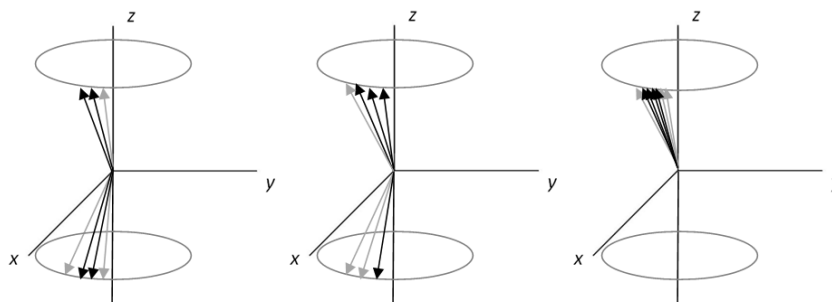


Рисунок 4 – Магнитные диполи (ансамбль спинов)

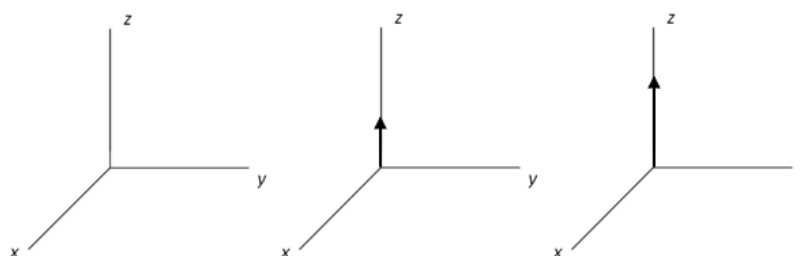


Рисунок 5 – Поведение намагниченности при продольной релаксации ( $T_1$ )

Поперечная (спин-спиновая) релаксация, характеризуемая временем  $T_2$ , обуславливает время установления равновесия в самой спиновой системе. Магнитный момент для поперечной релаксации изменяется, как показано на рисунках 6, 7.

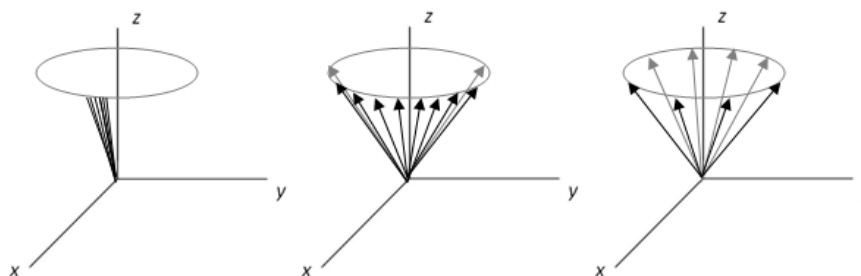


Рисунок 6 – Магнитные диполи при прецессии

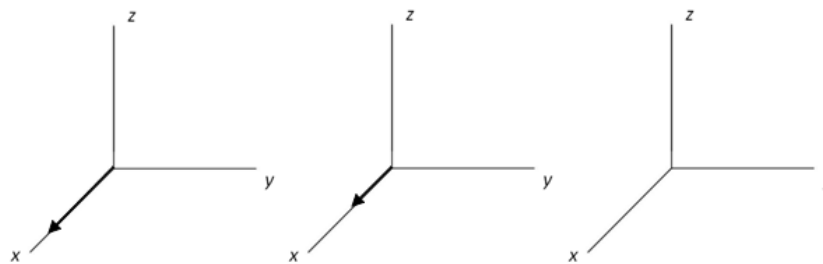


Рисунок 7 – Намагниченность для поперечной релаксации  $T_2$

Для измерения времени  $T_1$  создают инверсию намагниченности при помощи  $180^\circ$  импульса, за время задержки происходит продольная релаксация, затем, при помощи импульса поворачивают намагниченность в плоскости, и записывают спад свободной индукции (ССИ).

Измерение  $T_2$  проводят при помощи создания поперечной намагниченности путем подачи  $90^\circ$  импульса, за время задержки происходит расфазировка, возникает поперечная релаксация, затем при помощи  $180^\circ$  импульса намагниченность переворачивается в плоскости XY, и через равное время спины снова фазируются и наблюдается спад свободной индукции (ССИ).

После первоначального описания Блоха процессов релаксации прошло несколько десятилетий [15]. За это время физические механизмы, ответственные за релаксации  $T_1$  и  $T_2$ , были изучены более подробно. Теперь существует достаточно обширная теория, которая объясняет релаксацию в воде, простых растворах солей и белков, и в относительно однородных твердых материалах (коллаген, липиды, макромолекулы). Механизмы, позволяющие описать процессы релаксации, представлены ниже.

### 1.2.1. Диполь-дипольное взаимодействие

Основным из механизмов релаксации  $^1\text{H}$  является диполь-дипольное взаимодействие [14]. Взаимодействие, происходящее между магнитными полями двух соседних «диполей» (ядер или электронов), отвечает за данный

механизм. Из-за хаотического изменения поля в образце происходит ускорение поперечной релаксации. При молекулярном движении спина вблизи ларморовской частоты происходит локальная флуктуация магнитного поля, вызывающая релаксацию  $T_1$  и  $T_2$ .

Эффективность данного взаимодействия при релаксации имеет зависимость от типов спинов, их пространственного расположения и относительного движения. Дипольное взаимодействие обратно пропорционально шестой степени расстояния между диполями, из-за этого внутримолекулярные взаимодействия эффективнее межмолекулярных.

$$R_1 = \frac{1}{T_1} = \gamma_I^2 \gamma_S^2 \left(\frac{\hbar}{2\pi}\right)^2 \tau_c \sum \frac{1}{r_{IS}^6} \quad (4),$$

где  $\gamma_I$ ,  $\gamma_S$  – гиромагнитные отношения,  $r_{IS}$  – расстояние между ядрами [14]. Можно сказать, что степень релаксации и определяется молекулярным движением (в первую очередь скорость вращения) диполей.

### 1.2.2. Анизотропия химического сдвига

Ядра молекул защищены от полной напряженности внешнего магнитного поля  $\mathbf{B}_0$  при помощи электронных облаков. В зависимости от степени экранирования в их ближайшем молекулярном окружении, резонансные частоты ядер  $^1\text{H}$  будут незначительно меняться. Данное изменение называют химическим сдвигом, и оно является основой спектроскопии ЯМР [11, 16].

Экранирование ядер от воздействия внешнего поля ( $\mathbf{B}_0$ ) не является постоянной во времени из-за вращения молекул. Электроны притягиваются к электроотрицательным атомам (например, к кислороду), изменяя тем самым степень экранирования. Резонансные частоты разных ядер немного различаются в зависимости от их локального молекулярного окружения. Химический сдвиг в свою очередь зависит от ориентации молекулы относительно  $\mathbf{B}_0$ . Значительное изменение химического сдвига в разных

направлениях говорит о том, что существует анизотропия химического сдвига. При быстром вращении молекулы (например, в растворе) и усреднении асимметрии направления, анизотропия не имеет значения. Когда движение является ограниченным (как в жидких кристаллах), влияние анизотропии может играть достаточно важную роль. Данное явление может частично объяснить более короткие значения  $T_2$ , которые наблюдаются в биологических тканях. Это можно было бы предсказать, исходя только из скорости вращения молекул. Так как релаксация анизотропии химического сдвига зависит от квадрата напряженности поля ( $B_0^2$ ), она является преобладающей в более высоких полях.

### 1.2.3. Диффузия

Любые физические процессы, под действием которых молекула перемещается между различными локальными средами в ходе ЯМР эксперимента, могут приводить к релаксации. Смещение может быть связано с перемещением молекулы под действием химического, электрического или гравитационного градиента. Это может быть организованное массовое перемещение множества молекул, как в кровотоке или спинномозговой жидкости, либо совершенно случайный процесс, вызванный из-за микроскопической диффузии, термически вызванного смещением молекул из-за броуновского движения [17].

Если внешнее магнитное поле, через которое движется молекула, является однородным, то резонансная частота ядра останется постоянной и релаксации не произойдет. Однако, если внешнее поле неоднородно, тогда ядро будет резонировать на разных частотах и при движении в образце приобретать случайные фазовые сдвиги, что приведет к потере поперечной когерентности. Подобные локальные неоднородности поля обычно возникают из-за скачков восприимчивости на макроскопических или микроскопических объектах (границы раздела воздух-жидкость или близость

твердых инородных тел). Уменьшение суммарной поперечной намагниченности по причине спин-спиновой релаксации и описанной здесь неоднородности поля характеризуют временем  $T_2^*$ .

#### **1.2.4. Химический обмен**

Атомы водорода часто участвуют в процессах химического обмена при физической передаче от одной молекулы к другой. В качестве альтернативы протон водорода может претерпевать «эквивалент химического обмена», находясь на молекуле, которая изменяет свою структуру или перемещается между химически различными компартментами в ткани (например, изнутри клетки наружу). Скорости релаксации, вызванные процессами химического обмена, пропорциональны квадрату приложенного магнитного поля [18, 19]. При медленном обмене ширина линии обратно пропорциональна времени поперечной релаксации и описывается формулой:

$$\Delta\omega = \frac{1}{T_2} + k . \quad (5)$$

#### **1.2.5. Квадрупольное взаимодействие**

Ядра со спином, большим или равным единице, имеют несферическое (эллипсоидальное) распределение заряда (рисунок 8) и взаимодействуют с локальными электрическими полями. Хотя среднее расстояние между квадрупольным ядром и неподелённым зарядом не меняется, ориентация ядра влияет на уровни энергии и вызывает релаксацию [20].

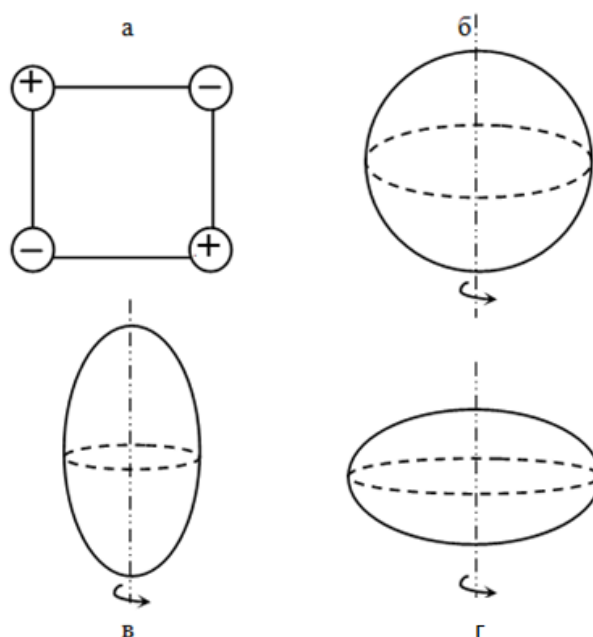


Рисунок 8 – Возникновение квадрупольного электрического момента ядра; а) система зарядов, не обладающая квадрупольным моментом; б) ядро с нулевым квадрупольным моментом; в) ядро с положительным квадрупольным моментом; г) ядро с отрицательным квадрупольным моментом

Квадрупольными являются, например, ядра  $^{14}\text{N}$ ,  $^2\text{H}$ ,  $^{35}\text{Cl}$ ,  $^{37}\text{Cl}$ . Сами по себе они обычно не наблюдаются в спектрах ЯМР, а также не приводят к появлению разрешённых мультиплетов в соседних магнитных ядрах (например,  $^1\text{H}$ ).

### 1.3. Время корреляции молекулярного движения

Броуновское вращение частицы в растворе имеет характерную постоянную времени, которую называют временем корреляции вращения ( $\tau_c$ ). Это характерное время, за которое частица успевает повернуться на один радиан, и оно зависит от размера частицы [21]. Для глобулярных белков можно использовать сферическое приближение, а время корреляции вращения определяется законом Стокса (6), где  $\mu$  – магнитная



проницаемость,  $r$  – расстояние между частицами,  $k$  – постоянная Больцмана,  $T$  – абсолютная температура.

$$\tau_c = \frac{4\pi\mu r^3}{3kT} \quad (6)$$

Времена релаксации в рамках диполь-дипольной модели связаны со временем корреляции следующим образом:

$$\frac{1}{T_1} = K \left( \frac{\tau_c}{1+\omega_0^2\tau_c^2} + \frac{4\tau_c}{4\omega_0^2\tau_c^2} \right), \quad (7)$$

$$\frac{1}{T_2} = \frac{K}{2} \left( 3\tau_c + \frac{5\tau_c}{1+\omega_0^2\tau_c^2} + \frac{2\tau_c}{1+\omega_0^2\tau_c^2} \right), \quad (8)$$

$$K = \frac{3\mu_0^2}{160\pi^2} \frac{\hbar^2\gamma^4}{r^6}, \quad (9)$$

где  $\tau_c$  – время корреляции,  $\mu_0$  – магнитная проницаемость вакуума ( $4\pi \cdot 10^{-7}$  Гн·м<sup>-1</sup>),  $\hbar$  – приведенная постоянная Планка ( $1,055 \cdot 10^{-34}$  Дж·с),  $\gamma$  – гиромагнитное отношение (для <sup>1</sup>Н это  $2,675 \cdot 10^8$  рад·с<sup>-1</sup>·Т<sup>-1</sup>),  $\omega_0$  – частота прецессии.

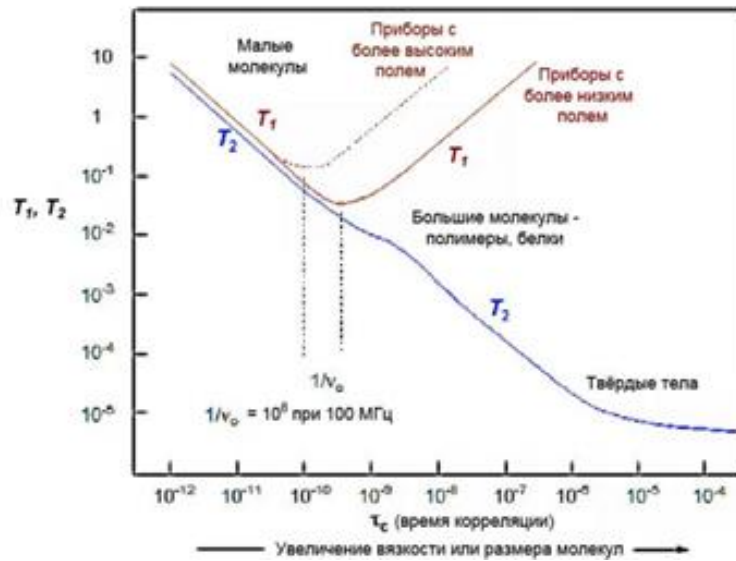


Рисунок 9 – Зависимость времен релаксации от времени корреляции

Короткое время корреляции (т.е. высокая подвижность молекул) приводит к длинному времени релаксации  $T_2$ , и на спектре наблюдают узкую линию. Время продольной релаксации достигает минимума при  $\tau_c = \frac{1}{2\pi\nu_0}$ .

## **2. Материалы и методы**

### **2.1. Циклические полипептиды**

Циклические полипептиды являются интересными для науки из-за своих разнообразных структур и множества полезных функций. Эстрогенная активность, иммуносупрессивная активность, цитотоксичность, сосудорасширяющая активность и многие другие свойства делают циклические полипептиды привлекательными объектами при изучении лекарственных соединений [22].

### **2.2. Циклоспорин G**

Циклоспорин в 1971 году был выделен из гриба *Tolypocladium inflatum* и стал использоваться в медицине в 1983 году. Он входит в список основных лекарственных средств ВОЗ.

Циклоспорин представляет собой циклический нерибосомный полипептид, состоящий из 11 аминокислот (Рисунок 10). Механизм действия циклоспоринона G заключается в подавлении цитотоксического созревания Т-клеток и их активности путем связывания лимфоцитарного белка циклофилина. Циклофилин и циклоспорин образуют комплекс, нацеленный на кальцинейрин, который отвечает за активацию Т-лимфоцитов. Кроме того, циклоспорины исследуются на предмет их способности предотвращать повреждение нормально функционирующих клеток при аутоиммунных заболеваниях.

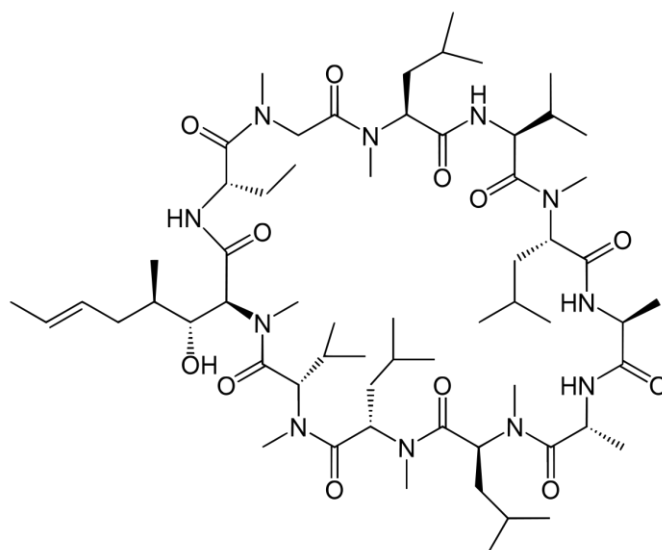


Рисунок 10 – Химическая структура циклоспорина А

Были произведены и изучены многочисленные аналоги циклоспорина А (CsA). Хотя эти аналоги позволили лучше понять взаимосвязь между структурой и активностью, ни один из них не обладает такой же безопасностью и эффективностью, как CsA. Наиболее многообещающим из этих аналогов является циклоспорин G (CsG) [10, 23], в котором альфа-аминомасляная кислота во 2 положении заменена на норвалин, как показано на рисунке 11. Сравнительные исследования CsG и CsA на животных дали противоречивые результаты как с точки зрения нефротоксичности, так и эффективности CsG как иммунодепрессивного агента. Из этих исследований очевидно, что существуют видовые и штаммовые различия в метаболизме CsG, чувствительности к его токсическим эффектам и, возможно, к его иммунологической эффективности.

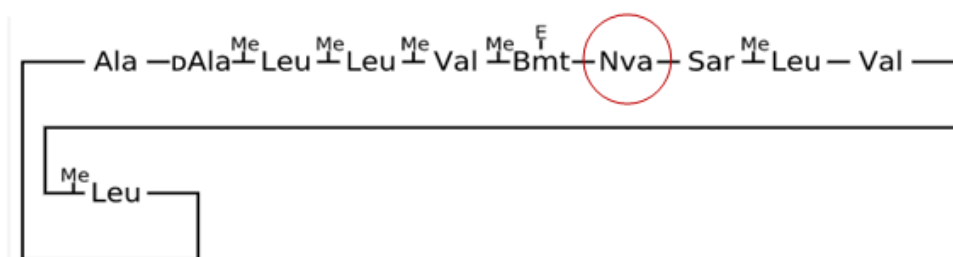


Рисунок 11 – Химическая структура циклоспорина G, альфа-аминомасляная кислота (Abu) во 2 положении заменена на норвалин (Nva)

### 2.3. Основы метода 1D спектроскопии ЯМР

Одномерная спектроскопия протекает в два этапа: подготовка и детектирование (Рисунок 12). На этапе подготовки спиновая система возбуждается благодаря последовательности импульсов. Зачастую действуют  $90^\circ$  импульсом с фазой  $x$  для поворота намагниченности к оси  $y$ . После чего каждый спин начинает прецессировать со своей собственной ларморовой частотой вокруг оси  $z$ . Затухание сигнала происходит из-за поперечной (спин-спиновой) релаксации: происходит спад свободной индукции (ССИ). Регистрация конечного сигнала происходит на этапе детектирования.

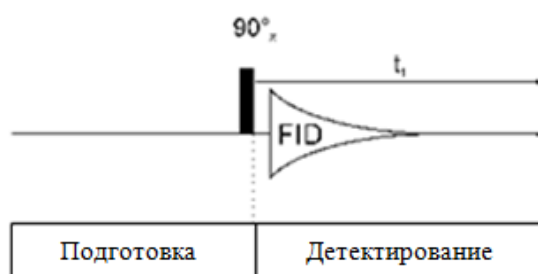


Рисунок 12 – Одномерная ЯМР спектроскопия

Для уменьшения шума эксперимент повторяют несколько раз, суммируют полученные значения и обрабатывают при помощи Фурье-преобразования, чтобы получить окончательный результат – спектр.

### 2.4. Основы метода 2D спектроскопии ЯМР

ЯМР эксперименты позволяют получать информацию двумя путями: селективного возмущения и селективного насыщения определенных атомов. Любой двумерный ЯМР эксперимент состоит из четырех частей: подготовки, эволюции, смешивания и регистрации. Принцип работы 2D или многомерных экспериментов один и тот же – это серии одномерных экспериментов, в которых меняется длина одной задержки в импульсной программе.

Результатом такого эксперимента является спектр, в котором расположение спектральной линии, или пика, определяется двумя или более частотами. Такие пики указывают на то, что спины, участвующие в процессе, связаны друг с другом при помощи косвенного спин-спинового взаимодействия через химическую связь или диполь-дипольным взаимодействием через пространство.

Эволюция и детектирование – периоды времени  $t_1$  и  $t_2$ , в течение которых происходит эволюция спиновой системы, связанная с химическим сдвигом и КССВ. В процессе смешивания когерентность передаётся от одного спина, который был закодирован при определенной частоте, к другому, сигнал которого был записан в течение времени  $t_2$ . Если два спина различны, будут наблюдаться кросс-пики.

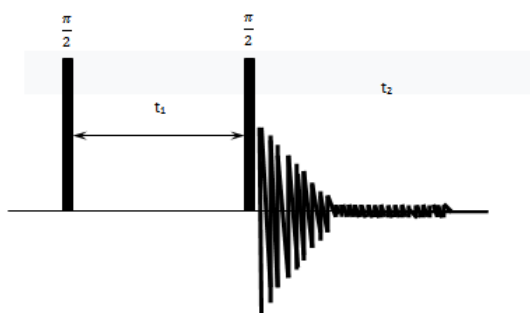


Рисунок 13 – Двумерная ЯМР последовательность (эксперимент COSY)

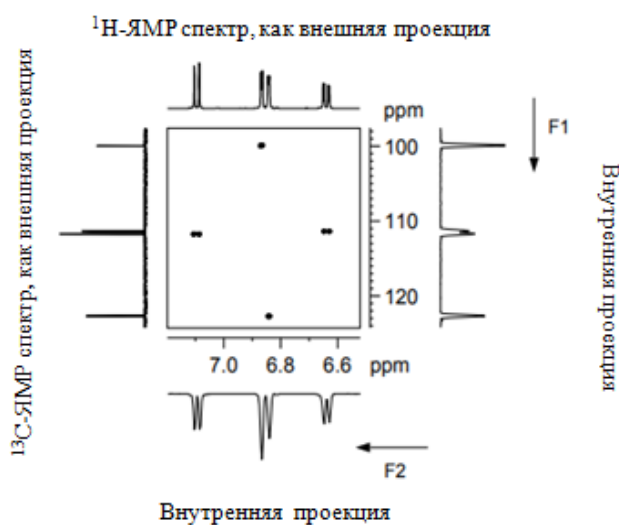


Рисунок 14 – Пример гетероядерного 2D спектра

По краям 2D спектров могут быть нанесены одномерные, внутренние проекции, получаемые путем проецирования всех сигналов на одну ось или внешние проекции, которые получают путем наложения отдельно записанного одномерного спектра. Примером такого спектра является рисунок 14. Внутренняя и внешняя проекции нанесены вдоль спектра. Двумерные спектры имеют меньшее разрешение, чем их одномерные аналоги. Из-за того, что сигналы распределены в двух измерениях, перекрытий сигналов в данных спектрах меньше. Следовательно, 2D спектры содержат информацию не только о корреляции между сигналами, но также с их помощью можно извлекать химические сдвиги в случае наложения сигналов [24, 25].

#### **2.4.1. 2D COSY**

Гомоядерная корреляционная спектроскопия COSY – наиболее простой и распространенный способ двумерной спектроскопии. Она состоит из двух радиочастотных импульсов. После первого импульса идет время эволюции, а после второго время измерения. В результате получают двумерные спектры, демонстрирующие два вида пиков: диагональные и кросс-пики. Диагональные пики расположены по диагонали спектра, кросс-пики – вне данной линии. Кросс-пики возникают из-за переноса намагниченности. Их наличие означает существование двух связанных атомных ядер, которые имеют различные значения химических сдвигов. Кросс-пики появляются при условии существования корреляции, следовательно, по кросс-пикам можно узнать наличие связи между атомами [25]. На рисунке 15 можно видеть кросс-пики  $\text{Sar3Na1-Na2}$ ,  $\text{Sar3Na2-Na1}$ , расположенные симметрично относительно диагонали, а также соответствующие им диагональные пики.

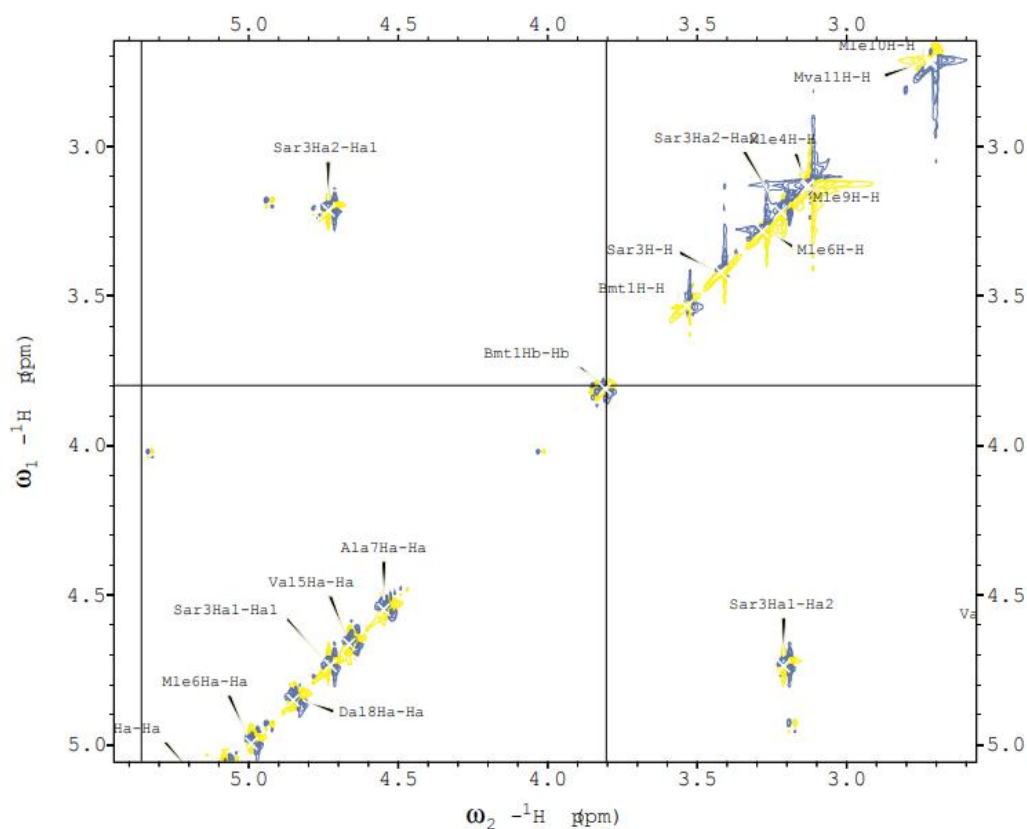


Рисунок 15 – Фрагмент COSY спектра для циклоспорина G.

Аминокислотные остатки подписаны трехбуквенным кодом, числом обозначен номер остатка в цепи от 1 до 11 (см. Рисунок 11)

По обеим осям COSY спектра наблюдаются частоты одного и того же изотопа, обычно водорода  $^1\text{H}$ .

## 2.4.2. 2D HSQC

Данный метод позволяет определить корреляцию для двух различных типов атомных ядер, разделенных одной связью. Последовательность можно разделить на четыре периода: блок INEPT, кодирование химического сдвига, обратный INEPT и получение результатов. INEPT – блок импульсов, обеспечивающий перенос намагниченности в паре протон–гетероядро (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer). Из-за переноса намагниченности происходит увеличение интенсивности сигнала в четыре раза ( $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}}$ ). В первом периоде происходит передача поляризации  $^1\text{H}$  к

гетероядру X. В течение времени эволюции  $t_1$  под действием химического сдвига развивается противофазная намагниченность  $^{13}\text{C}$ . В середине этого периода гетероядерные связи перефокусируются при помощи применения  $180^\circ$  импульса  $^1\text{H}$ . На последнем этапе последовательность обратных импульсов INEPT преобразует намагниченность X в синфазную намагниченность  $^1\text{H}$ .

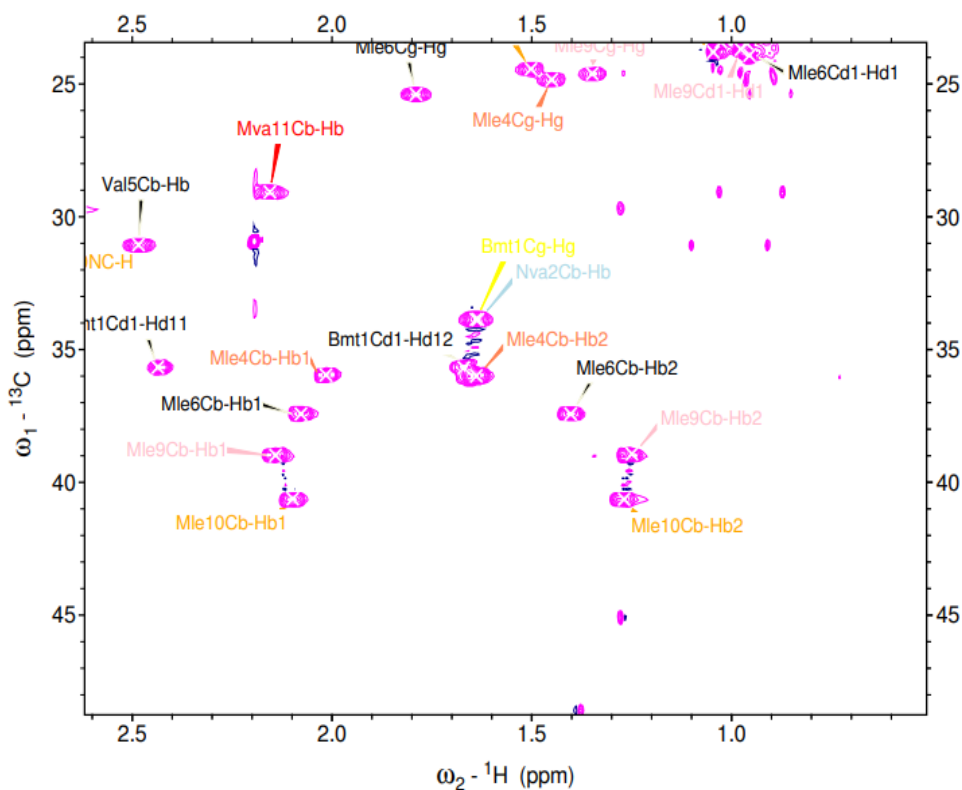


Рисунок 16 – Участок HSQC спектра циклоспорина G

По оси абсцисс мы наблюдаем частоту водорода  $^1\text{H}$ , по оси ординат – углерода  $^{13}\text{C}$ . На рисунке 16 наблюдается характерный узор для неэквивалентных ядер  $^1\text{H}$   $\beta\text{-CH}_2$  групп. В циклоспорине всего четыре лейцина, у каждого из которых есть  $\text{CH}_2$ -группа, следовательно, эти сигналы принадлежат лейцину. На каждом углероде в пределах одной аминокислоты «висит» по два водорода.

### 2.4.3. 2D TOCSY



Применяется для разделения протонных сигналов на группы. Особенную значимость имеет при схожих химических сдвигах, то есть когда происходит перекрывание мультиплетов. Спектр возникает из-за корреляции связей через спин-спиновое взаимодействие. TOCSY имеет сходство с COSY, но кросс-пики наблюдаются не только при прямой связи ядер, но могут также проявляться, если атомы разделены несколькими связями. Преимущество TOCSY проявляется при изучении более крупных спиновых систем. Введение серии повторяющихся импульсов вызывает изотропное смешивание. Увеличение времени изотропного смешивания влечёт за собой распространение поляризации через большее число связей [25].

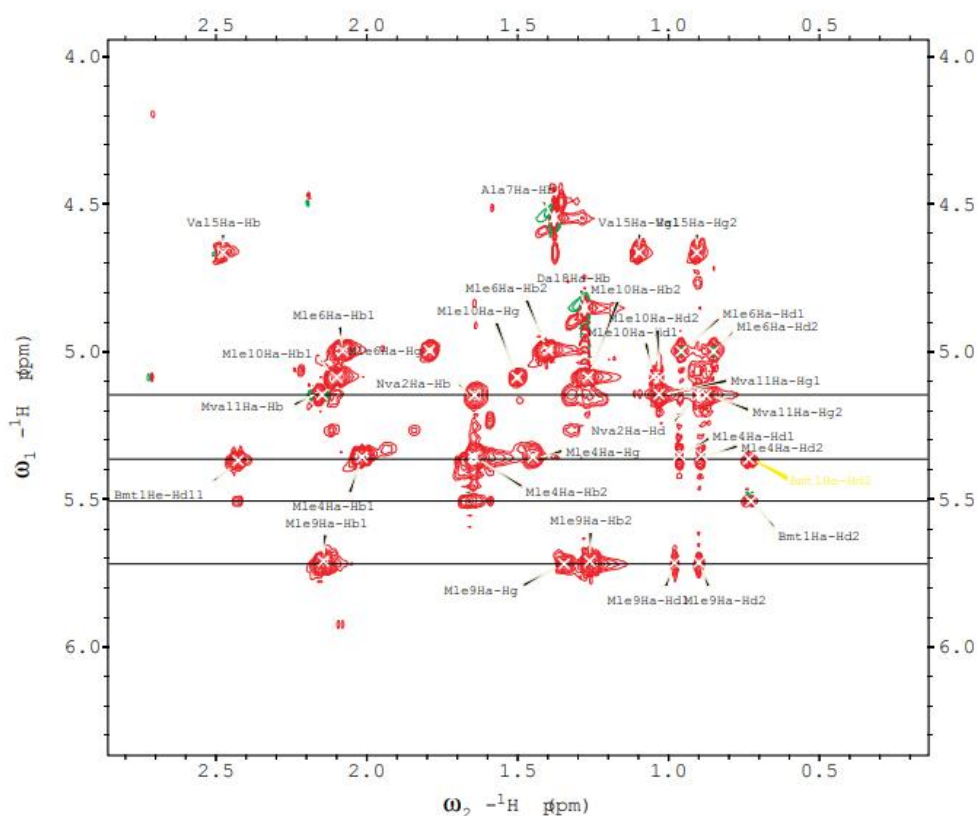


Рисунок 17 – TOCSY спектр для циклоспорина G, корреляционные пики  $\alpha$ -протонов с атомами боковых цепей

По спектру TOCSY можно проследить последовательность в пределах одной аминокислоты, например, на Рисунке 17 мы видим последовательность из следующих сигналов: Mle9Ha-Hg, Mle9Ha-Hb2, Mle9Ha-Hd1,

Mle<sup>9</sup>Ha-Hd<sup>2</sup>. Таким образом, спектры TOCSY часто оказываются полезны при расшифровке спектров, особенно когда есть сомнения, правильно ли идет приписание сигналов, чтобы исключить варианты, что сигналы принадлежат другой аминокислоте. В циклоспорине самая длинная аминокислота – это Vmt1, поэтому справедливо ожидать, что «дорожка» на спектре TOCSY будет самая длинная для этой аминокислоты. В то же время для саркозина последовательность будет самая короткая.

#### **2.4.4. 2D NOESY и 2D ROESY**

Гомоядерный процесс с использованием ядерного эффекта Оверхаузера. Данные спектры аналогичны спектрам COSY. Отличие заключается в том, что кросс-пики на NOESY спектре соответствуют атомам водорода, которые сближены в пространстве, но при этом могут быть не связаны в молекуле. Метод основан на диполь-дипольном взаимодействии.

В отличие от NOESY, эксперимент ROESY позволяет наблюдать перенос намагниченности (ядерный эффект Оверхаузера) между векторами, прецессирующими в плоскости  $xy$ . Для того, чтобы эти вектора оставались коллинеарными, используется так называемая последовательность спин-лока [25, 26].

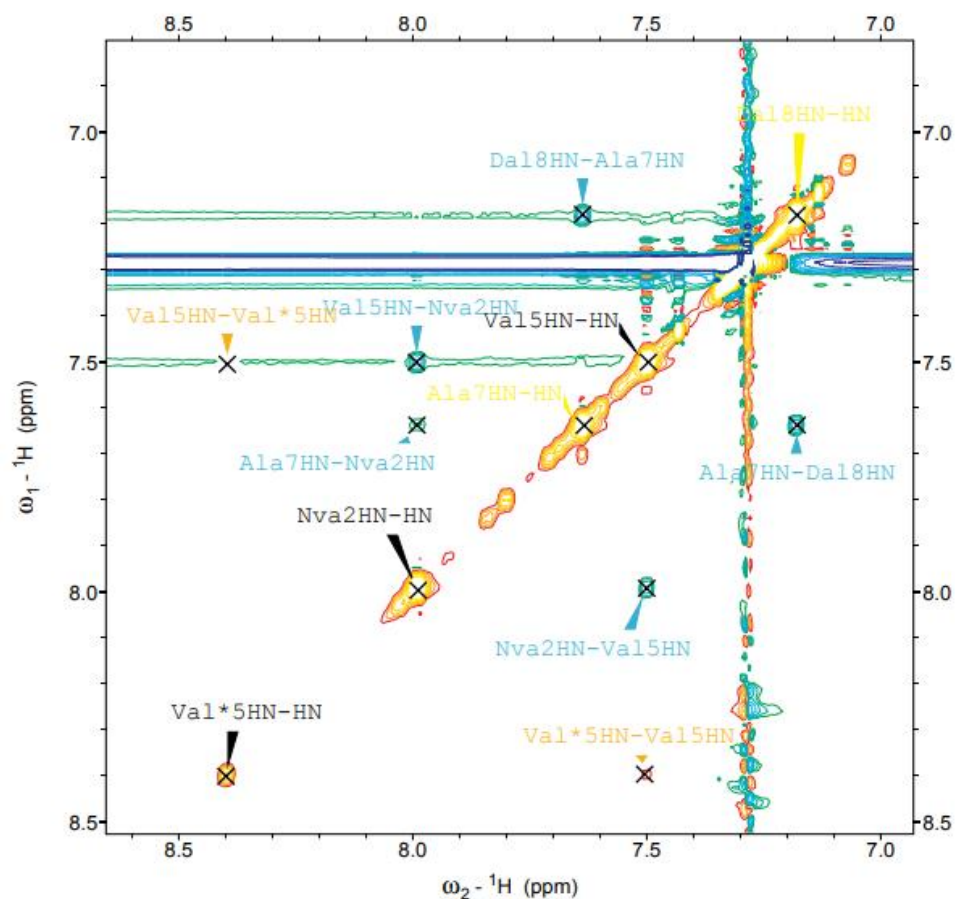


Рисунок 18 – ROESY спектр для циклоспорина G, сигналы NH-групп

В отличие от предыдущих ЯМР спектров, где мы видим сигналы от атомов, обычно принадлежащих одной и той же спиновой системе, спектры NOESY позволяют наблюдать сигналы между атомами разных спиновых систем. На данном фрагменте спектра (Рисунок 18) видны дальние контакты, например, Ala7NH-Nva2NH, а также Dal8NH-Ala7NH.

### 3. Практическая часть

Спектры были записаны на многофункциональном импульсном ЯМР спектрометре с Фурье-преобразованием Avance III HD 700 фирмы «Bruker» (Швейцария). Запись одно- и двумерных спектров производилась с использованием рекомендаций, описанных в руководстве по эксплуатации спектрометра. Обработка всех спектров проводилась в программном пакете TopSpin фирмы Bruker.

Исследуемый объект: раствор циклоспорина G (CsG) в хлороформе  $\text{CHCl}_3$ ; объемом образца 360 мкл (ампула Shigemi). При молекулярной массе CsG 1202,6 г/моль навеска 1 мг обеспечила концентрацию  $\sim 3$  ммоль/л.

#### 3.1. Релаксация для частоты 700 МГц

Для достижения поставленной цели по соотнесённым ЯМР спектрам в программном пакете TopSpin были получены интенсивности пиков выбранных сигналов в подспектрах релаксационных измерений. Эксперименты проводились по схеме инверсия-восстановление (для измерения  $T_1$ ) и perfect-CPMG (для  $T_2$ ) [27].

В программе QtiPlot провели аппроксимацию получившейся зависимости интенсивности пиков от времени по формуле

$$I(t) = A + B * e^{-\frac{t}{T}}. \quad (10)$$

Примеры получившихся графиков зависимостей интенсивности от времени  $t$  для каждой группы представлены на рисунках 19 и 20.

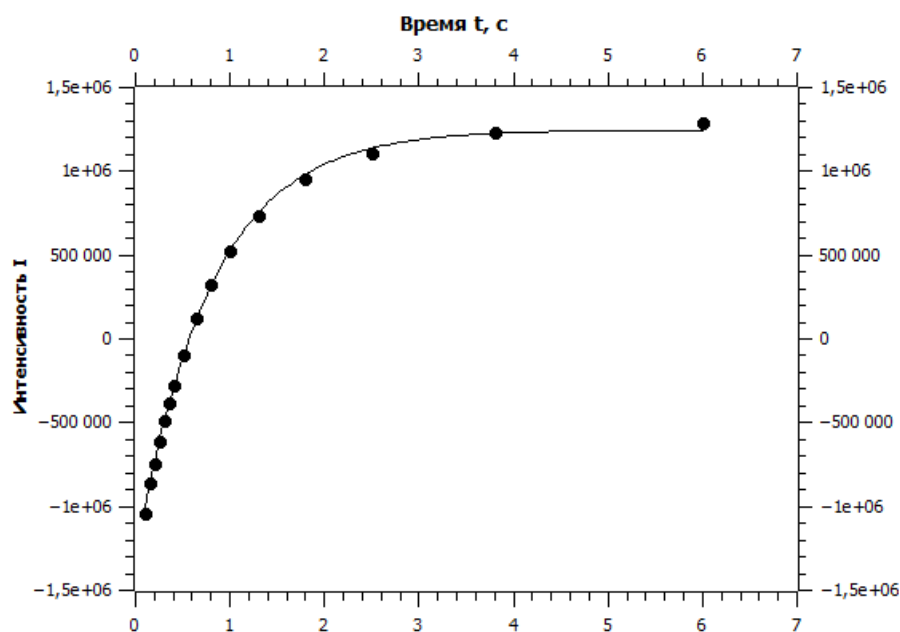


Рисунок 19 – Продольная релаксация  $T_1$  для Bmt1Na на частоте 700МГц

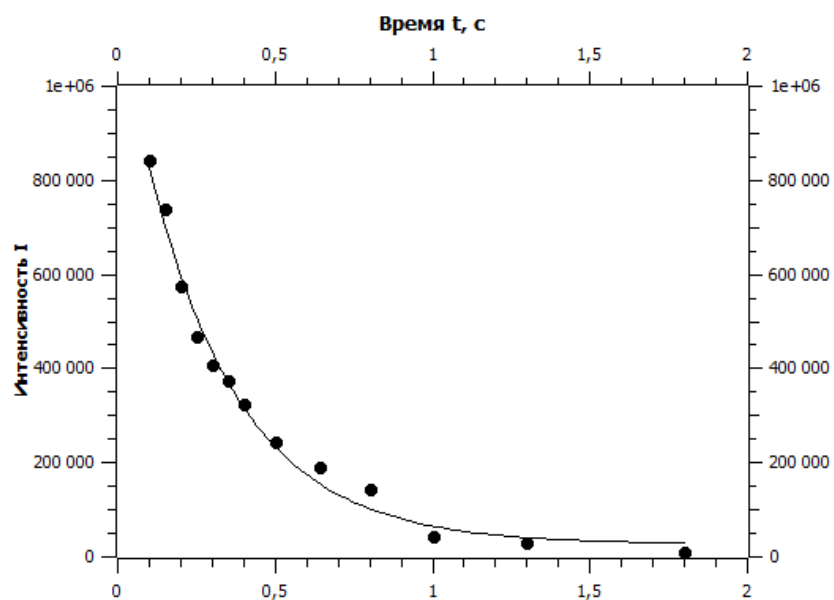


Рисунок 20 – Поперечная релаксация  $T_2$  для Dal8Na на частоте 700МГц

В процессе обработки были получены значения продольного и поперечного времен релаксации  $T_1$  и  $T_2$  определённых ядер циклоспирин G (см. Таблицу 1) на частоте 700 МГц.

Таблица 1 – Значения времён продольной и поперечной релаксации для циклоспорина G на частоте 700 МГц

<b>Частота 700 МГц</b>					
	$T_1, c$	$T_2, c$		$T_1, c$	$T_2, c$
<b>NH</b>			<b>H-alpha</b>		
2	0,550	0,272	9	0,522	0,296
5	0,632	0,365	10	0,384	0,116
7	0,735	0,286	<b>NCH<sub>3</sub></b>		
8	0,606	0,323	1	0,789	0,430
<b>H-alpha</b>			3	0,891	0,519
1	0,700	0,149	6	0,845	0,496
3(1)	0,489	0,189	10	1,056	0,532
3(2)	0,587	0,224	11	0,874	0,455
5	0,879	0,223	<b>Боковая цепь</b>		
6	0,659	0,229	Ala7 $\beta$	0,476	0,352
7	0,761	0,295	Val 5 $\gamma$ 1	0,604	0,299
8	1,123	0,312	Bmt 1 $\delta$ 2	0,466	0,232

### 3.2. Релаксация для частоты 500 МГц

По аналогии с тем, что было сделано на частоте 700 МГц, для частоты 500 МГц по полученным интенсивностям также была проведена аппроксимация в программе QtiPlot. Примеры получившихся графиков зависимостей интенсивности от времени  $t$  для каждой группы представлены на Рисунках 21 и 22.

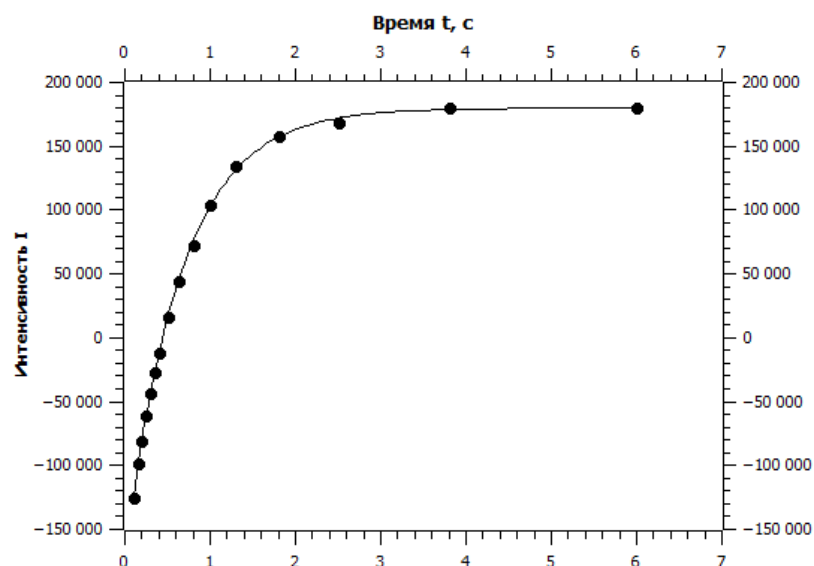


Рисунок 21 – Продольная релаксация  $T_1$  для Me6Na на частоте 500 МГц

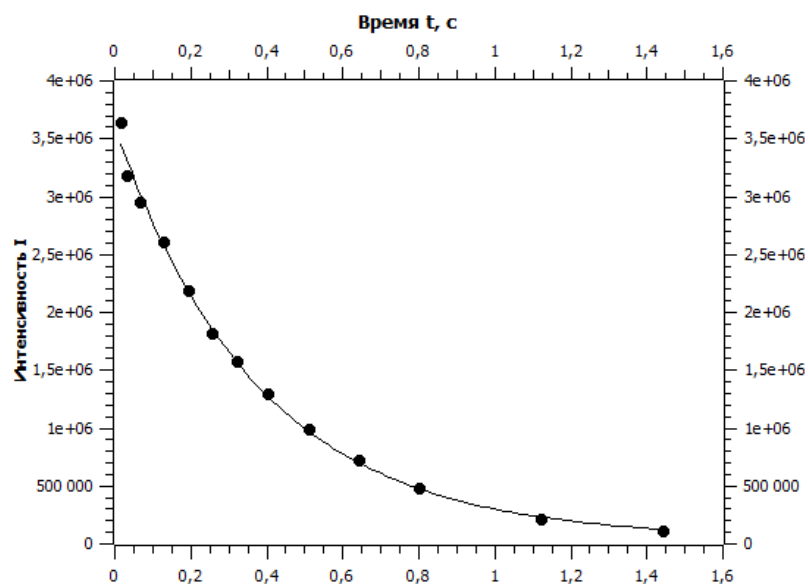


Рисунок 22 – Поперечная релаксация  $T_2$  для Me7Na на частоте 500 МГц

Аналогично были получены времена релаксации атомов в циклоsporине для частоты 500 МГц. Ниже представлена таблица с результатами.

Таблица 2 – Значения времён продольной и поперечной релаксации для циклоспорина G на частоте 500 МГц

<b>Частота 500 МГц</b>					
	$T_1, c$	$T_2, c$		$T_1, c$	$T_2, c$
<b>NH</b>			<b>H-alpha</b>		
2	0,371	0,2603	9	0,311	0,283
5	0,653	0,266	10	0,362	0,301
7	0,366	0,205	<b>NCH<sub>3</sub></b>		
8	0,579	0,165	1	0,566	0,363
<b>H-alpha</b>			3	0,660	0,411
1	0,475	0,238	6	0,581	0,371
3(1)	0,331	0,209	10	0,683	0,418
3(2)	0,386	0,223	11	0,585	0,372
5	0,670	0,307	<b>Боковая цепь</b>		
6	1,076	0,289	Ala7 $\beta$	0,424	0,332
7	1,242	0,389	Val 5 $\gamma$ 1	0,467	0,297
8	0,708	0,341	Bmt 1 $\delta$ 2	0,395	0,304

### 3.3. Вычисление времени корреляции

Для расчета времени корреляции была использована вычислительная система MatCad. Вычисления проводились решением системы уравнений (7) – (9).

Для решения данной системы уравнений в программе MatCad задавались значения  $T_1$  для разных частот, значения  $T_2$  для разных частот, значения  $T_1$  и  $T_2$  для частоты 500 МГц, либо значения  $T_1$  и  $T_2$  для частоты 700 МГц. По завершению вычислений получили две таблицы со значениями времени корреляции  $\tau_c$  и межатомного расстояния  $r$ .



Таблица 3 – Время корреляции и межатомное расстояние, рассчитанные решением системы уравнений по разным входным данным

	Время корреляции по паре времён релаксации на одной частоте				Время корреляции по однократным временам релаксации на разных частотах			
	Время корреляции, с		Расстояние, Å		Время корреляции, с		Расстояние, Å	
	$\tau_1, 10^{-10}$ 500 МГц	$\tau_2, 10^{-10}$ 700 МГц	$r_1, 10^{-10}$ 500 МГц	$r_2, 10^{-10}$ 700 МГц	$\tau_1, 10^{-10}$ $T_1$	$\tau_2, 10^{-10}$ $T_2$	$r_1, 10^{-10}$ $T_1$	$r_2, 10^{-10}$ $T_2$
<b><i>NH</i></b>								
2	1.584	1.968	1.745	1.754	0.8849	1.818	1.74	1.862
5	3.486	1.582	1.882	1.807	1.835	2.116	1.192	1.907
7	2.318	2.62	1.743	1.808	1.833	1.911	1.349	1.866
8	4.98	1.778	1.787	1.789	1.101	2.04	1.811	1.878
<b><i>H-alpha</i></b>								
1	2.708	4.523	1.811	1.696	1.301	1.596	1.836	1.801
3(1)	1.920	2.639	1.717	1.689	0.6958	1.498	1.678	1.800
3(2)	2.213	2.676	1.760	1.739	0.9894	1.719	1.767	1.838
5	3.035	3.932	1.907	1.791	1.765	1.602	1.913	1.837
6	5.245	2.949	1.970	1.758	1.398	1.648	1.905	1.841
7	4.568	2.631	2.047	1.818	1.679	1.723	1.952	1.875
8	2.851	2.943	1.931	1.922	2.268	1.862	1.958	1.885
9	0.7076	1.626	1.590	1.749	0.7875	1.87	1.705	1.875
10	1.038	3.375	1.696	1.586	0.2982	1.307	1.474	1.777
<b><i>NCH<sub>3</sub></i></b>								
1	1.87	1.871	1.878	1.723	1.537	2.348	1.878	1.95
3	1.965	1.913	1.927	1.561	1.788	2.829	1.914	2.003
6	1.884	1.897	1.886	1.543	1.666	2.653	1.894	1.983
10	2.022	1.957	1.938	1.920	2.132	2.911	1.946	2.011
11	1.897	1.900	1.888	1.837	1.73	2.466	1.902	1.964
<b><i>Боковая цепь</i></b>								
<i>Ala7<math>\beta</math></i>	1.236	1.013	1.764	1.713	0.6832	2.027	1.684	1.906
<i>Val 5<math>\gamma</math>1</i>	1.897	1.965	1.819	1.781	1.06	1.865	1.791	1.877
<i>Bmt 1<math>\delta</math>2</i>	1.291	1.951	1.748	1.706	0.3924	1.635	1.552	1.842

В программе QtiPlot построили диаграммы с временами корреляции для каждой аминокислоты. Рассматривалась модель диполь-дипольной релаксации. Рисунок 23 показывает результаты для частоты 700 МГц,

рисунок 24 – для 500 МГц. Черная линия соответствует времени корреляции, рассчитанному по теоретической формуле  $\tau_c = \frac{1}{2\pi\nu_0}$ . В спектрах NOESY вблизи этой линии интенсивность пиков равна нулю, следовательно, нельзя наблюдать кросс-пики. Это показывает, почему в исследованиях циклоспоринов приходится прибегать к экспериментам ROESY.

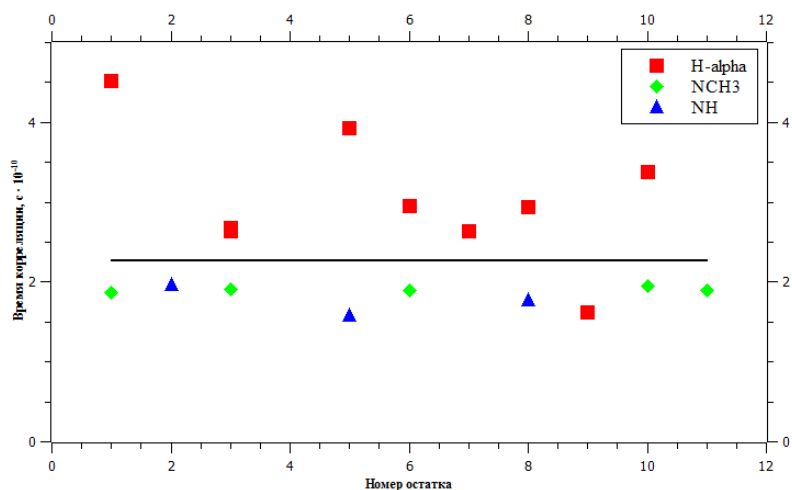


Рисунок 23 –Время корреляции на частоте 700МГц

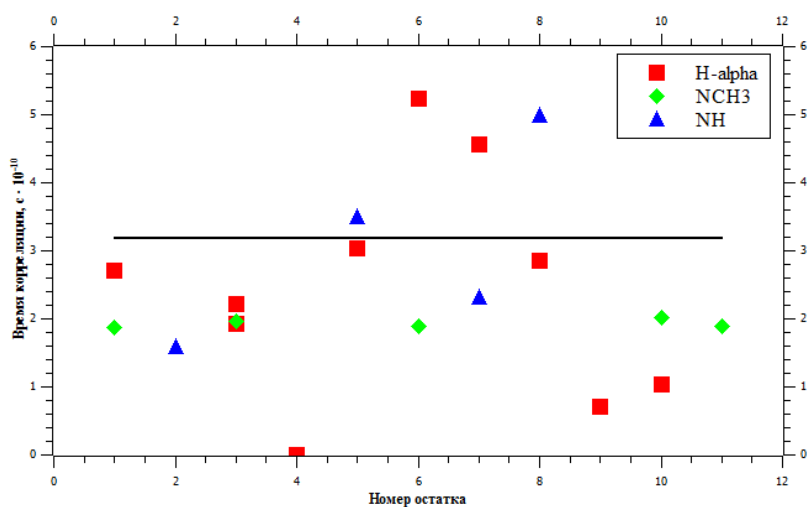


Рисунок 24 – Время корреляции на частоте 500МГц

Также по формулам (7) – (9) и полученным данным в программе MatCad нашли теоретическое время продольной релаксации  $T_{1\text{теор}}$  для частоты 700 МГц по величинам  $\tau_c$  и  $r$ , определённым по измерениям на 500 МГц. Эти значения сравнивались с найденными экспериментально временами  $T_{1\text{экспер}}$  на 700 МГц; результаты представлены в Таблице 4. По

полученным данным была проведена аппроксимация в QtiPlot. Полученный график корреляции изображён на рисунке 25.

Таблица 4 – Теоретические и экспериментальные значения времён продольной релаксации

	$T_{I \text{экспер.}}, \text{с}$	$T_{I \text{теор.}}, \text{с}$		$T_{I \text{экспер.}}, \text{с}$	$T_{I \text{теор.}}, \text{с}$
<b>NH</b>			<b>H-alpha</b>		
2	0,371	0,513	9	0,311	0,352
5	0,653	1,093	10	0,362	0,446
7	0,366	0,559	<b>NCH3</b>		
8	0,579	1,033	1	0,566	0,8
<b>H-alpha</b>			3	0,660	0,968
1	0,475	0,753	6	0,581	0,842
3(1)	0,331	0,482	10	0,683	1,01
3(2)	0,386	0,583	11	0,585	0,849
5	0,670	1,089	<b>Боковая цепь</b>		
6	1,076	1,932	Ala7 $\beta$	0,424	0,548
7	1,242	2,183	Val 5 $\gamma$ 1	0,467	0,679
8	0,708	1,135	Bmt 1 $\delta$ 2	0,395	0,517

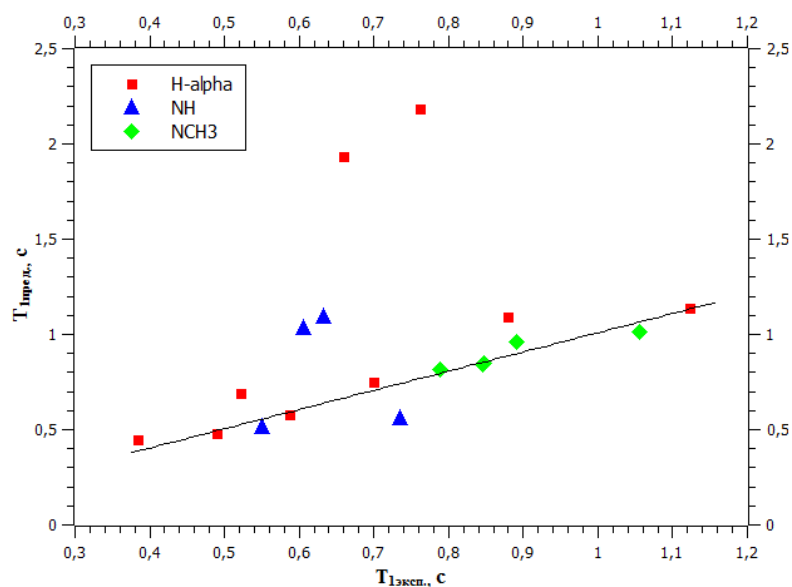


Рисунок 25 – Корреляция времени  $T_1$ , полученного экспериментально на 700 МГц и предсказанного с помощью MatCad по данным на 500 МГц

Анализ корреляции между теоретическими и экспериментальными значениями показывает удовлетворительный результат,  $R^2 = 0,728$ . Видим, что для группы  $\text{NCH}_3$  (зелёные ромбики) времена корреляции имеют одинаковые значения; исходя из этого можно сделать вывод о том, что в данном случае действительно применимы формулы для диполь-дипольного взаимодействия. Различия между остальными группами можно объяснить тем, что кроме диполь-дипольной релаксации работают другие механизмы релаксации.

Два атома группы  $\text{Na}$  – остатков Me6 и Ala7 – имеют сильное различие времён корреляции по сравнению с другими атомами циклоспорина G. Во-первых, эти сигналы выделяются относительно длинными временами  $T_1$ . Это может отражать наличие разницы между характером локального движения в области остатков 6, 7 и в остальной части молекулы. Также исказить результаты расчётов времён релаксации могут альтернативные пути релаксации – химический обмен, анизотропия химического сдвига. Циклоспорин в хлороформе может обладать медленным химическим обменом, а также наносекундной динамикой цепи [28, 29].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Для достижения поставленной цели методом спектроскопии ЯМР была исследована подвижность основной цепи циклоспорина G, а именно – следующие характеристики: время продольной релаксации  $T_1$  и время поперечной релаксации  $T_2$  на разных частотах, время корреляции  $\tau_c$ . Были получены графики зависимости интенсивности от времени, анализ которых позволил найти время корреляции. Также была попытка подтвердить справедливость выбранной модели диполь-дипольного механизма релаксации с помощью сравнения экспериментальных значений  $T_1$  и предсказанных на основе этой модели времен  $T_1$  (на частоте 700 МГц). Наилучшую сходимость показали группы  $\text{NCH}_3$ , для них также наблюдались одинаковые значения времен корреляции для разных групп на обеих частотах. Несколько худший результат наблюдался для времен корреляции для групп  $\text{Ha}$ , также это проявилось на графике корреляции экспериментального и предсказанного времён  $T_1$ , что дает нам основания полагать, что, вероятно, следует учитывать и другие механизмы релаксации помимо диполь-дипольного механизма. Тем не менее, мы считаем модель достаточно хорошей, исходя из коэффициента детерминации, который равен 0,728. Различие времен корреляции на разных участках циклоспорина G может говорить о том, что в молекуле существуют и жёсткие, и гибкие участки.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Будчанов, Ю. И. Трансплантационная иммунология / Ю. И. Будчанов. – Тверь, 2012. – 36с. – Текст : непосредственный.
2. Mikol, V. The role of water molecules in the structure-based design of (5-hydroxynorvaline)-2-cyclosporin: synthesis, biological activity, and crystallographic analysis with cyclophilin A / V. Mikol, C. Papageorgiou, X. Borer. – Текст : непосредственный // Journal of Medicinal Chemistry. – 1995. – Vol. 38. – P. 3361-3367.
3. Fang, Z. Analysis of cyclosporine A and its metabolites in rat urine and feces by liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Z. Fang, B. You, Y. Chenetal. – Текст : непосредственный // Journal of Chromatography B. – 2010. – Vol. 878. – P. 1153- 1162.
4. Jeffery, J. R. Cyclosporine analogues / J.R. Jeffery. – Текст : непосредственный // Clin. Biochem. – 1991. – Vol. 24. – P. 15-21.
5. Kawashima, H. Cyclosporine G and D in experimental autoimmune uveoretinitis in the rat / M. Mochizuki, A. Okumura, Y. Fujino, T. Tange, D. Horiuchi, E. Higashihara, H. Kaku, G. Inaba. – Текст : непосредственный // Jpn J Ophthalmol . – 1989.
6. Rabi, I. I. A New Method of Measuring Nuclear Magnetic Moment / J. R. Zacharias, S. Millman, P. Kusch. – Текст : непосредственный // Physical Review – 1938.– P. 318-32 .
7. The Nobel Prize: [Электронный ресурс]. URL: <https://www.nobelprize.org> (Дата обращения: 10.10.2020). – Текст : электронный.
8. Filler, A. The History, Development and Impact of Computed Imaging in Neurological Diagnosis and Neurosurgery: CT, MRI, and DTI / A. Filler. – Текст : непосредственный // Nature Proceedings. – 2009. – DOI 10.1038/NPRE.2009.3267.4.
9. Каратаева, Ф. Х. Изучение методом спектроскопии ЯМР (1D И 2D) структуры и характера ассоциаций гипперразветвленного полиэфира

- полиола BOLTORN H<sub>2</sub>O–OH / М. В. Резепова, А. Р. Юльметов, М. П. Кутырева, Г. А. Кутырев, Н. А. Улахович. – Текст : непосредственный // Уч. зап. Казанского гос. университета, Сер. Естественные науки. – 2009. – Т. 151, №1. – С. 37-45.
10. Соколова, О. С. Электронная микроскопия нанобиообъектов / О. С. Соколова, А. Г. Богданов, А. В. Гризель. – Москва : НОУДПО «Институт «АйТи», 2011. – 63с. – Текст: непосредственный.
  11. Сергеев, Н. М. Спектроскопия ЯМР для химиков-органиков / Н. М. Сергеев. – М. : Изд-во Моск. ун-та., 1981. – 279 с. – Текст : непосредственный.
  12. Новиков, В. В. Анализ спектров ЯМР высокого разрешения / В. В. Новиков // Москва, 2009. – 16 с. – Текст : непосредственный.
  13. Корнилов, М. Ю. Ядерный магнитный резонанс в химии / М. Ю. Корнилов, Г. П. Кутров. – Киев : ВИЦА ШКОЛА, 1985. – 199 с. – Текст : непосредственный.
  14. Bloembergen, N. Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption / N. Bloembergen, E. M. Purcell, R. V. Pound. – Текст : непосредственный // Phys Rev. – 1948. – С. 679-712.
  15. Torrey, H. C. Bloch Equations with Diffusion Terms / H. C. Torrey. – Текст : непосредственный // Phys. Rev. – 1956. – № 3. – P. 563.
  16. Каратаева, Ф. Х. Часть I. Общая теория ЯМР. Химические сдвиги <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C / Ф. Х. Каратаева, В. В. Клочков. – Казань: Казанский федеральный университет, 2013. – 130 с. – Текст : непосредственный.
  17. Carr, H. Y. Effects of diffusion on free precession in nuclear magnetic resonance experiments / H. Y. Carr, E. M. Purcell. – Текст : непосредственный // Phys Rev. – 1954. – P. 630-638.
  18. Hahn E. L. Spin echoes / E. L. Hahn. – Текст : непосредственный // Phys Rev. – 1950. – P. 580-594.

19. Кузнецов, А. Н. Метод спинового зонда (основы и применение) / А. Н. Кузнецов, Булаченко А. Л // Наука, 1976. – 210с. – Текст : непосредственный.
20. Ракобольская, И. В. Ядерная физика / И. В. Ракобольская, В. А. Петухов // Издательство Московского Университета, 1971. – С. 55-56. – Текст : непосредственный.
21. Cavanag, H. J. Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice / W. J. Fairbrother, A. G Palmer, M. Rance, N. J. Skelton. – Текст : непосредственный // Elsevier. – 2007. – P. 21.
22. Dahiya, R. Natural bioeffective cyclooligopeptides from plant seeds of Annona genus / R. Dahiya, S. Dahiya. – Текст : непосредственный // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2021. – Vol. 214, № 113221. – P. 202.
23. Попл, Дж. Спектры ядерного магнитного резонанса высокого разрешения [Текст] / Дж. Попл, В. Шнайдер, Г. Бернштейн. // Издательство иностранной литературы, Москва, 1962. – 296 с. – Текст : непосредственный.
24. 1D vs. 2D NMR spectra [Электронный ресурс]. URL: <http://www.chem.uzh.ch/zerbe/2D-NMR#:~:text=spectra> (general definitions)-, A one dimensional NMR spectra has two dimensions%3A The x (Дата обращения: 21.11.2020). – Текст : электронный.
25. Keeler, J. Understanding NMR Spectroscopy / J. Keeler. – Wiley, 2010. – Т. 2. – P. 526. – Текст : непосредственный.
26. Becker, E. D. High resolution nmr theory and chemical applications / E. D. Becker. – 2000. – P. 424. – Текст : непосредственный.
27. Parella, T. Perfect NMR: Spin-echo vs Perfect-echo NMR building blocks / T. Parella. – Текст : непосредственный // Magnetic Resonance in Chemistry. – 2018. – P. 57.



28. Conformational Flexibility Is a Determinant of Permeability for Cyclosporin / C. K. Wang, J. E. Swedberg, P. J. Harvey et al. – Текст : непосредственный // J. Phys. Chem. B. – 2018. – Vol. 122. – P. 2261-2276.
29. Comparison of cyclosporin variants B–E based on their structural properties and activity in mitochondrial membranes / S. V. Efimov, M. V. Dubinin, P. P. Kobchikova et al. – Текст : непосредственный // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2020. – Vol. 526. – P. 1054-1060.