

УДК 539.199:543.429.23

doi: 10.26907/2542-064X.2019.1.56-65

СРАВНЕНИЕ ЦИКЛОСПОРИНОВ А И D С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

П.П. Кобчикова, Ю.О. Згадзай, С.В. Ефимов, В.В. Клочков

Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, 420008, Россия

Аннотация

Изучен природный вариант циклоспорина А – циклоспорин D – методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения в неполярном растворе (хлороформе). Проведено полное отнесение полученных сигналов ЯМР ^1H и ^{13}C , сравнительный анализ которых с данными по циклоспорину А позволил выявить определенные различия между этими двумя пептидами, наиболее заметные по химическим сдвигам атомов основной цепи остатков 5, 8 и по появлению водородной связи в остатке 1. Циклоспорин D по спектральным параметрам отличается от CsA незначительно, но при этом практически не имеет иммунологической активности. Представленные результаты заполняют пробел в данных ЯМР для вариантов циклоспорина, отличных от CsA, и дают информацию о различиях между вариантами пептидов, которые могут быть ответственны за их различную биологическую активность.

Ключевые слова: ЯМР, циклоспорин, CsA, CsD, химические сдвиги основной цепи, водородная связь

Введение

Семейство циклоспоринов включает более 30 циклических пептидов, встречающихся в природе в качестве метаболитов почвенных грибов. Впервые он был выделен из *Tolypocladium inflatum* Gams [1], также известного как *Tolypocladium niveum* (O. Rostr.) Bissett [2]; телеоморфная форма этого организма известна как *Cordyceps subsessilis* Petch [3] или *Elaphocordyceps subsessilis* (Petch) [4] и является паразитом жесткокрылых.

Циклоспориновая цепь состоит из 11 аминокислотных остатков и замкнута в кольцо. Остаток Bmt (4-methyl-4-[(E)-2-butenyl]-4,N-methyl threonine) или его производные являются уникальным признаком циклоспоринов, его обычно считают первым в цепи; D-Ala находится в позиции 8; остаток 2 является наиболее вариабельным среди всего семейства этих пептидов. Другие различия между возможными вариантами пептидов могут включать замену аминокислот, наличие или отсутствие N-метилирования амидной группы и изменения оптических изомеров отдельных остатков. Синтез этой необычной молекулы не является рибосомным [5–7], поэтому состав синтезируемой смеси зависит от содержания исходных молекул, присутствующих в клетке.

На основе вышесказанного можно заключить, что все циклоспорины схожи по составу и свойствам в отношении их молекулярной массы и гидрофобности,

но имеют разное воздействие на организм. Циклоспорин D демонстрирует иммуноподавляющие свойства, хотя значительно менее выраженные, чем для варианта А. Таким образом, возникает вопрос о влиянии отдельных аминокислотных замен на физические и биологические свойства циклоспоринов, а также практический вопрос контроля состава лекарственных препаратов.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса, как правило, используется для изучения структуры органических соединений в растворах, в том числе пептидов. Анализируя информацию о межатомных расстояниях [8, 9] и об ориентации межатомных связей [10, 11], можно определить структуру молекул различными методами ЯМР.

1. Экспериментальная часть

Составы циклоспоринов А и D представлены в табл. 1. CsD содержит валин в положении 2 вместо α -аминомасляной кислоты (Abu2).

Табл. 1

Состав циклоспоринов

	Аминокислотная последовательность	Брутто-формула	CAS no.
CsA	cyclo[N(Me)Bmt(E)- <i>Abu</i> -Sar-N(Me)Leu-Val-N(Me)Leu-Ala-D-Ala-N(Me)Leu-N(Me)Leu-N(Me)Val]	C ₆₂ H ₁₁₁ N ₁₁ O ₁₂	59865-13-3
CsD	cyclo[N(Me)Bmt(E)- <i>Val</i> -Sar-N(Me)Leu-Val-N(Me)Leu-Ala-D-Ala-N(Me)Leu-N(Me)Leu-N(Me)Val]	C ₆₃ H ₁₁₃ N ₁₁ O ₁₂	63775-91-7

ЯМР-спектры регистрировались при температуре 25 °С на спектрометре Bruker Avance III HD 700. В качестве внутреннего стандарта химического сдвига использовался ТМС. Отнесение сигналов проводилось с использованием методик двумерной корреляционной спектроскопии DQF-COSY, TOCSY, HSQC и НМВС.

Области сильного перекрытия сигналов затрудняли идентификацию некоторых атомов, в том числе Me4 Ha и двух протонов при двойной связи в Bmt1 (~5.4 м.д.); атомы Bmt1 H η , H γ и CH₂ δ также имели близкие сигналы в одной и той же области вместе с некоторыми неэквивалентными протонами CH₂ других остатков (1.6–1.7 м.д.). Гетероядерные спектры были необходимы для разрешения этих областей перекрытия, соотнесения групп NCH₃ и определения места каждого остатка в 11-членной цепи по сигналам карбонильных атомов углерода.

Гомоядерные 2D-спектры были записаны в спектральном окне 10×10 м.д. с числом точек по временному измерению 2048×512. HSQC-спектр имел спектральную ширину 10×140 м.д. (с центром на 65 м.д.) с 2048×512 точками; у НМВС-спектра были следующие параметры: ширина 10×200 м.д. (с центром на 95 м.д.) и число точек 4096×512. Спектр НМВС был оптимизирован для дальнего КССВ между ядрами ¹H и ¹³C 6 Гц.

2. Результаты

Циклоспорин А был исследован методом ЯМР в различных растворителях. Структурные данные в хлороформе и бензоле были получены Х. Кесслером с соавторами [12, 13].

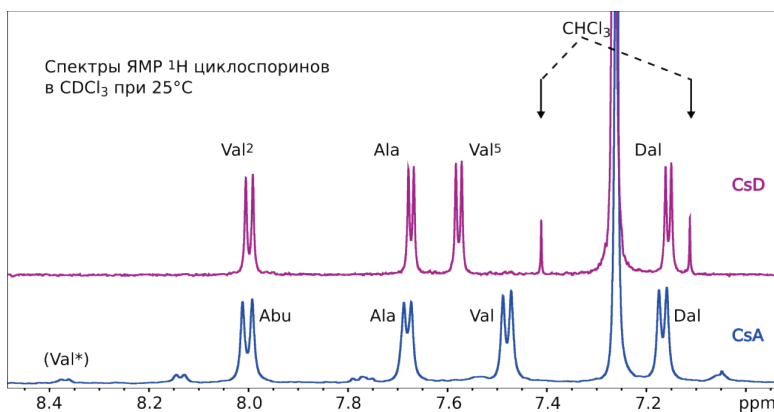


Рис. 1. Амидная область ЯМР-спектров циклоспоринов CsA (500 МГц) и D (700 МГц) в CDCl_3 . Стрелки показывают сателлиты ^{13}C -сигнала хлороформа; в нижнем спектре они меньше, так как образец CsA имел более высокую концентрацию. Dal обозначает D-Ala8. Метка Val* показывает пик одного из минорных конформеров CsA

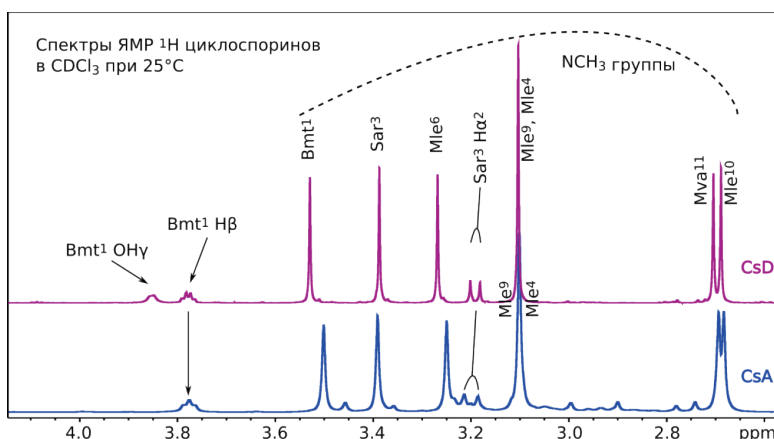


Рис. 2. Часть ЯМР-спектров циклоспоринов CsA (500 МГц) и D (700 МГц) в CDCl_3 , показывающая сигналы N-метильных групп и некоторые сигналы треонина (Bmt) и саркозина (Sar)

На рис. 1 приведены резонансы протонов NH исследованных пептидов в хлороформе. Сигналы остатков 2, Ala7 и Dal8 появляются почти в одних и тех же областях, в то время как пик Val5 немного смещается, отличаясь на 0.1 м.д. Сигналы малой интенсивности относятся к дополнительным конформерам, имеющим незначительную концентрацию в равновесии [14], однако в спектре CsD эти второстепенные сигналы практически незаметны.

На рис. 2 представлена средняя область спектров, содержащая семь интенсивных линий групп NCH_3 . Здесь также не наблюдается никаких дополнительных

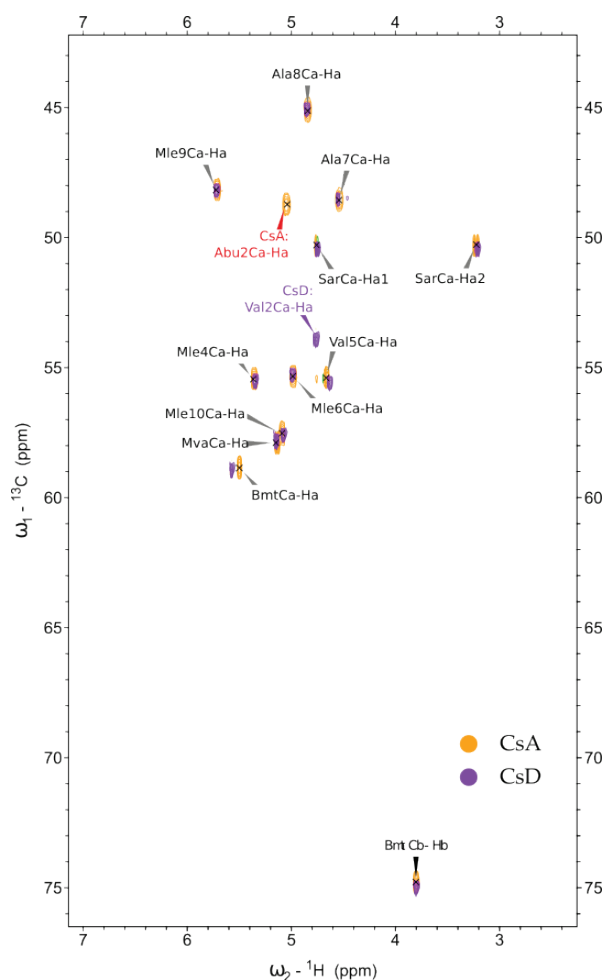


Рис. 3. Спектр $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC циклоспоринов А (500 MHz) и D (700 MHz) в CDCl_3 и 25°C . Показана область сигналов CH_α , а также пик Bmt1 CH_β

сигналов, которые означали бы присутствие минорных конформеров для CsD. Следовательно, этот вариант циклоспорина присутствует в виде одной молекулярной конформации.

Заметное различие в спектрах, обнаруженное для CsD, заключается в наличии дополнительных сигналов около 3.8 м.д., которые нельзя идентифицировать по экспериментам $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC. Однако они имеют корреляцию с β -протонами Bmt1 в COSY и TOCSY, поэтому были отнесены к гидроксильной группе в γ -положении. Пиков такого типа в спектре CsA не наблюдается; однако спектр ядерного эффекта Оверхаузера этого пептида содержит широкий сигнал в высокопольной области (около 1.8 м.д.), который был отнесен к группе OH, обменивающейся с остаточной водой [14].

Отнесение сигналов было выполнено на основе гомоядерной и гетероядерной корреляционной спектроскопии (DQF-COSY, TOCSY, HSQC и HMBC). Гомоядерные спектры позволили определить отдельные спиновые системы лейцина, аланина, валина и других аминокислот. Отдельные остатки одного и того же типа различались с помощью спектров HSQC и HMBC, которые позволяли

Табл. 2

Химические сдвиги атомов основной цепи и значения RMSD относительно циклоспоринона А, м.д. Остаток 2 не был включен в расчеты RMSD

№ остатка	CsA			CsD		
	Ca	Ha	C'	Ca	Ha	C'
1	58.97	5.461	170.6	59.00	5.555	170.7
2	48.94	5.021	174.0	59.97	4.748	173.9
3	50.50	4.725	171.4	50.52	4.722	171.2
		3.198			3.183	
4	55.63	5.334	170.2	55.57	5.322	170.0
5	55.56	4.646	174.0	55.63	4.614	173.8
6	55.48	4.973	171.8	55.34	4.972	171.5
7	47.77	4.511	171.4	48.58	4.532	171.0
8	45.33	4.820	173.7	45.12	4.835	173.4
9	48.35	5.687	170.5	48.25	5.698	170.3
10	57.69	5.069	170.3	57.64	5.060	170.1
11	58.06	5.119	173.7	57.86	5.131	173.6
RMSD				0.042	0.0101	0.08

отслеживать аминокислотную последовательность по сигналам углерода ^{13}C ; они также были полезны для нахождения перекрывающихся сигналов и концевых групп CH_3 боковых цепей. Спектры HSQC двух видов циклоспоринона (область сигналов CH_α -групп) показаны на рис. 3. Как видно, положение большинства сигналов изменяется незначительно.

Полученные спектры HSQC для циклоспоринонов А и D оказались близки. Замена второго остатка другой аминокислотой влияет главным образом на химические сдвиги основной цепи в положениях 2, его соседях 1 и 3 и в более отдаленных положениях Val5 и D-Ala8. Общее отличие между конформациями может быть описано среднеквадратичным отклонением RMSD между химическими сдвигами атомов основной цепи (Ca, Ha, C'), исключая остаток 2:

$$\text{RMSD} = \left(\sum \frac{(\delta_i - \delta(\text{CsA}))^2}{n(n-1)} \right)^{0.5},$$

где $i = 1, 3, 4, \dots, n$, и $n = 10$ (для углеродов) или 11 (для α -протонов). Химические сдвиги атомов и соответствующие значения RMSD, рассчитанные с использованием CsA, взятого в качестве эталона, приведены в табл. 2.

Согласно исследованиям методом инфракрасной спектроскопии [15], циклоспориноны А и D демонстрируют очень похожее поведение. Их спектры в неполярных средах выглядят почти одинаково; Н-связи постепенно ослабляются по мере того, как растворитель становится более полярным (ацетонитрил, ДМСО), но общая β -структура молекулы остаётся неизменной. Наши исследования подтверждают, что конфигурация пептидных цепей основного конформера CsA и CsD в неполярной среде должна быть одинакова – на это указывают совпадающие химические сдвиги ядер ^1H и ^{13}C .

Однако корреляция между химическим составом и структурными свойствами (наличие определенных аминокислот, общая молекулярная укладка, тип

изгибов β -структуры и т. д.), с одной стороны, и биологическим действием, с другой, не является прямой. Прежде всего, циклоспорины проявляют широкий спектр активности, который не ограничивается подавлением активности лимфоцитов. В иммуносупрессорных тестах (ингибирование пролиферации лимфоцитов и реакция «трансплантат против хозяина») CsA показал заметную активность в отличие от CsD [16].

Заключение

Циклоспорин А и его природный вариант CsD были исследованы методом ЯМР-спектроскопии. Они проявляют различное биологическое действие: CsA является наиболее эффективным в подавлении лимфоцитов, в то время как CsD обладает более слабым иммуноподавляющим эффектом. Поскольку молекулярная структура должна быть ключевым фактором, определяющим биологическое действие, мы попытались выявить сходства или различия между молекулами циклоспорины, которые могли бы объяснить их свойства.

Было установлено, что химические сдвиги в основных и боковых цепях пептидов близки с небольшими относительными различиями. Остатки 1 и 5 были наиболее чувствительными к аминокислотному замещению в положении 2. Среднеквадратичное отклонение химических сдвигов $\text{C}\alpha$ CsD от соответствующих значений для CsA составляет примерно 0,04 м.д., а все индивидуальные различия находятся в пределах уровня 0.25 м.д. (за исключением остатка 2). RMSD для $\text{H}\alpha$ не превышает 0.01 м.д. Таким образом, структуры двух пептидов различаются незначительно, и более слабое биологическое действие CsD можно отнести к потере аминокислоты Abu в положении 2.

Другие различия, которые можно обнаружить по спектрам ЯМР, заключаются в относительной конформационной чистоте CsD в хлороформе при комнатной температуре, а также в появлении отчетливых сигналов гидроксильных групп (в Vmt1 в CsD). Дополнительная Н-связь делает протон ОН-группы недоступным для растворителя, благодаря чему он наблюдается в спектре ЯМР; она же может стабилизировать структуру. Дополнительная жёсткость цепи, выражающаяся в отсутствии минорных конформеров, может быть также причиной сниженной биологической активности этого пептида. Однако необходимо учитывать, что конформационная подвижность зависит не только от свойств самого соединения, но и от используемого растворителя [17]. Необходимо дополнительная подробная информация о пространственной структуре, чтобы прояснить, как изменяются ориентации основной и боковых цепей и как это может повлиять на физиологическое действие циклоспорины.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 18-73-10088). Использовано оборудование Федерального центра коллективного пользования (ФЦКП ФХИ).

Литература

1. *Gams W. Tolypocladium, eine Hyphomycetengattung mit geschwollenen // Phialiden. Persoonia. – 1971. – V. 6. – P. 185–191.*

2. Bissett J. Notes on *Tolypocladium* and related genera // Can. J. Bot. – 1983. – V. 61. – P. 1311–1329.
3. Hodge K.T., Krasnoff S.B., Humber R.A. *Tolypocladium inflatum* is the anamorph of *Cordyceps subsessilis* // Mycologia. – 1996. – V. 88. – P. 715–719.
4. Sung G.-H., Hywel-Jones N.L., Sung J.-M., Luangsa-Ard J.J., Shrestha B., Spatafora J.W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi // Stud. Mycol. – 2007. – V. 57. – P. 5–59. – doi: 10.3114/sim.2007.57.01.
5. Lawen A., Zocher R. Cyclosporin synthetase: The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described // J. Biol. Chem. – 1990. – V. 265, No 19. – P. 11355–11360.
6. Hoppert M., Gentzsch C., Schörgendorfer K. Structure and localization of cyclosporin synthetase, the key enzyme of cyclosporin biosynthesis in *Tolypocladium inflatum* // Arch. Microbiol. – 2001. – V. 176, No 4. – P. 285–293. – doi: 10.1007/s002030100324.
7. Survase S.A., Kagliwal L.D., Annapure U.S., Singhal R.S. Cyclosporin A – A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications // Biotechnol. Adv. – 2011. – V. 29, No 4. – P. 418–435. – doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.03.004.
8. Blokhin D.S., Efimov S.V., Klochkov A.V., Yulmetov A.R., Filippov A.V., Antzutkin O.N., Aganov A.V., Klochkov V.V. Spatial structure of the decapeptide Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly in water and in a complex with sodium dodecyl sulfate micelles // Appl. Magn. Reson. – 2011. – V. 41, No 2–4. – P. 267–282. – doi: 10.1007/s00723-011-0257-x.
9. Usachev K.S., Filippov A.V., Khairutdinov B.I., Antzutkin O.N., Klochkov V.V. NMR structure of the arctic mutation of the alzheimer's A β (1-40) peptide docked to SDS micelles // J. Mol. Struct. – 2014. – V. 1076. – P. 518–523. – doi: 10.1016/j.molstruc.2014.08.030.
10. Usachev K.S., Filippov A.V., Antzutkin O.N., Klochkov V.V. A combination of the RDC method and NOESY NMR spectroscopy for structural determination of the Alzheimer's amyloid A β 10-35 peptide in solution and in SDS micelles // Eur. Biophys. J. – 2013. – V. 42, No 11–12. – P. 803–810. – doi: 10.1007/s00249-013-0928-7.
11. Klochkov A.V., Khairutdinov B.I., Tagirov M.S., Klochkov V.V. Determination of the spatial structure of glutathione by residual dipolar coupling analysis // Magn. Res. Chem. – 2005. – V. 43, No 11. – P. 948–951. – doi: 10.1002/mrc.1650.
12. Kessler H., Loosli H.-R., Oschkinat H. Peptide conformations. Part 30. Assignment of the ^1H -, ^{13}C -, and ^{15}N NMR spectra of cyclosporin A in CDCl_3 and C_6D_6 by a combination of homo- and heteronuclear two-dimensional techniques // Helv. Chim. Acta. – 1985. – V. 68, No 3. – P. 661–681. – doi: 10.1002/hlca.19850680318.
13. Loosli H.-R., Kessler H., Oschkinat H., Weber H.-P., Petcher T.J., Widmer A. Peptide conformations. Part 31. The conformation of cyclosporin a in the crystal and in solution // Helv. Chim. Acta. – 1985. – V. 68, No 3. – P. 682–704. – doi: 10.1002/hlca.19850680319.
14. Efimov S.V., Karataeva F.Kh., Aganov A.V., Berger S., Klochkov V.V. Spatial structure of cyclosporin A and insight into its flexibility // J. Mol. Struct. – 2013. – V. 1036. – P. 298–304. – doi: 10.1016/j.molstruc.2012.11.005.
15. Bodack L.A., Freedman T.B., Chowdhry B.Z., Nafie L.A. Solution conformations of cyclosporins and magnesium-cyclosporin complexes determined by vibrational circular dichroism // Biopolymers. – 2004. – V. 73, No 2. – P. 163–177. – doi: 10.1002/bip.10513.
16. Sadeg N., Pham-Huy C., Claude J.-R., Rucay P., Bismuth H., Righenzi S., Halle-Pannenko O., Duc H.-T. In vitro and in vivo comparative studies on immunosuppressive properties of cyclosporines A, C, D and metabolites M1, M17 and M21 // Immunopharmacol. Immunotoxicol. – 1993. – V. 15, No 2–3. – P. 163–177.

17. *Khodov I.A., Efimov S.V., Klochkov V.V., Alper G.A., Batista de Carvalho L.A.E.* Determination of preferred conformations of ibuprofen in chloroform by 2D NOE spectroscopy // *Eur. J. Pharm. Sci.* – 2014. – V. 65. – P. 65–73. – doi: 10.1016/j.ejps.2014.08.005.

Поступила в редакцию
28.01.19

Кобчикова Полина Павловна, студент Института физики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *pollymoon@ya.ru*

Згадзай Юрий Олегович, аспирант Института физики, младший научный сотрудник НИИ «Реологические и термохимические исследования»

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *yurchubuk@yandex.ru*

Ефимов Сергей Владимирович, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник научной лаборатории ЯМР

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *Sergej.Efimov@kpfu.ru*

Клочков Владимир Васильевич, доктор химических наук, профессор кафедры медицинской физики

Казанский (Приволжский) федеральный университет
ул. Кремлевская, д. 18, г. Казань, 420008, Россия
E-mail: *Vladimir.Klochkov@kpfu.ru*

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2019, vol. 161, no. 1, pp. 56–65

doi: 10.26907/2542-064X.2019.1.56-65

Comparison of the Cyclosporine Variants A and D by NMR Spectroscopy

P.P. Kobchikova^{}, Yu.O. Zgadzay^{**}, S.V. Efimov^{***}, V.V. Klochkov^{****}*

Kazan Federal University, Kazan, 420008 Russia

E-mail: ** pollymoon@ya.ru, ** yurchubuk@yandex.ru, *** Sergej.Efimov@kpfu.ru,*
***** Vladimir.Klochkov@kpfu.ru*

Received January 28, 2019

Abstract

A natural variant of cyclosporine A, cyclosporine D, has been studied using high-resolution NMR spectroscopy in a non-polar solution (chloroform). A complete assignment of the ¹H and ¹³C NMR signals has been made. A comparative analysis of the obtained spectra with the data on cyclosporine A has revealed certain differences between these two peptides, which are most noticeable in the chemical shifts of the atoms of the main chain of residues 5, 8 and the appearance of the hydrogen bond in residue 1. Cyclosporine D is slightly different from CsA in its spectral parameters, but it shows practically no immunological activity. The presented results fill in the gap in the NMR data for cyclosporine variants other

than CsA and provide more details about the differences between the peptide variants that may be responsible for their different biological activity.

Keywords: NMR, cyclosporine, CsA, CsD, backbone chemical shifts, hydrogen bond

Acknowledgements. The work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 18-73-10088). The equipment of the Center of Shared Facilities for Physical and Chemical Research of Substances and Materials was used.

Figure Captions

Fig. 1. The amide region of the NMR spectra of cyclosporines CsA (500 MHz) and D (700 MHz) in CDCl_3 . The arrows show the ^{13}C chloroform signal satellites; in the lower spectrum, they are smaller, because the CsA sample had a higher concentration. Dal is D-Ala8. The Val* mark shows the peak of one of the CsA minor conformers.

Fig. 2. Part of the NMR spectra of cyclosporines CsA (500 MHz) and D (700 MHz) in CDCl_3 showing signals from the N-methyl groups and some signals from threonine (Bmt) and sarcosine (Sar).

Fig. 3. Spectrum ^1H , ^{13}C -HSQC of cyclosporines A (500 MHz) and D (700 MHz) in CDCl_3 and 25°C. The region of CH_α signals is shown, as well as the Bmt1 CH_β peak.

References

1. Gams W. *Tolypocladium*, eine Hyphomycetengattung mit geschwollenen *Phialiden*. *Persoonia*, 1971, vol. 6, pp. 185–191.
2. Bissett J. Notes on *Tolypocladium* and related genera. *Can. J. Bot.*, 1983, vol. 61, pp. 1311–1329.
3. Hodge K.T., Krasnoff S.B., Humber R.A. *Tolypocladium inflatum* is the anamorph of *Cordyceps subsessilis*. *Mycologia*, 1996, vol. 88, pp. 715–719.
4. Sung G.-H., Hywel-Jones N.L., Sung J.-M., Luangsa-Ard J.J., Shrestha B., Spatafora J.W. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi. *Stud. Mycol.*, 2007, vol. 57, pp. 5–59. doi: 10.3114/sim.2007.57.01.
5. Lawen A., Zocher R. Cyclosporin synthetase: The most complex peptide synthesizing multienzyme polypeptide so far described. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, no. 19, pp. 11355–11360.
6. Hoppert M., Gentzsch C., Schörgendorfer K. Structure and localization of cyclosporin synthetase, the key enzyme of cyclosporin biosynthesis in *Tolypocladium inflatum*. *Arch. Microbiol.*, 2001, vol. 176, no. 4, pp. 285–293. doi: 10.1007/s002030100324.
7. Survase S.A., Kagliwal L.D., Annapure U.S., Singhal R.S. Cyclosporin A – A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. *Biotechnol. Adv.*, 2011, vol. 29, no. 4, pp. 418–435. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.03.004.
8. Blokhin D.S., Efimov S.V., Klochkov A.V., Yulmetov A.R., Filippov A.V., Antzutkin O.N., Aganov A.V., Klochkov V.V. Spatial structure of the decapeptide Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly in water and in a complex with sodium dodecyl sulfate micelles. *Appl. Magn. Reson.*, 2011, vol. 41, nos. 2–4, pp. 267–282. doi: 10.1007/s00723-011-0257-x.
9. Usachev K.S., Filippov A.V., Khairutdinov B.I., Antzutkin O.N., Klochkov V.V. NMR structure of the arctic mutation of the alzheimer's $\text{A}\beta(1-40)$ peptide docked to SDS micelles. *J. Mol. Struct.*, 2014, vol. 1076, pp. 518–523. doi: 10.1016/j.molstruc.2014.08.030.
10. Usachev K.S., Filippov A.V., Antzutkin O.N., Klochkov V.V. A combination of the RDC method and NOESY NMR spectroscopy for structural determination of the Alzheimer's amyloid $\text{A}\beta(10-35)$ peptide in solution and in SDS micelles. *Eur. Biophys. J.*, 2013, vol. 42, nos. 11–12, pp. 803–810. doi: 10.1007/s00249-013-0928-7.
11. Klochkov A.V., Khairutdinov B.I., Tagirov M.S., Klochkov V.V. Determination of the spatial structure of glutathione by residual dipolar coupling analysis. *Magn. Res. Chem.*, 2005, vol. 43, no. 11, pp. 948–951. doi: 10.1002/mrc.1650.
12. Kessler H., Loosli H.-R., Oschkinat H. Peptide conformations. Part 30. Assignment of the ^1H -, ^{13}C -, and ^{15}N NMR spectra of cyclosporin A in CDCl_3 and C_6D_6 by a combination of homo- and heteronuclear two-dimensional techniques. *Helv. Chim. Acta*, 1985, vol. 68, no. 3, pp. 661–681. doi: 10.1002/hlca.19850680318.

13. Loosli H.-R., Kessler H., Oschkinat H., Weber H.-P., Petcher T.J., Widmer A. Peptide conformations. Part 31. The conformation of cyclosporin a in the crystal and in solution. *Helv. Chim. Acta*, 1985, vol. 68, no. 3, pp. 682–704. doi: 10.1002/hlca.19850680319.
14. Efimov S.V., Karataeva F.Kh., Aganov A.V., Berger S., Klochkov V.V. Spatial structure of cyclosporin A and insight into its flexibility. *J. Mol. Struct.*, 2013, vol. 1036, pp. 298–304. doi: 10.1016/j.molstruc.2012.11.005.
15. Bodack L.A., Freedman T.B., Chowdhry B.Z., Nafie L.A. Solution conformations of cyclosporins and magnesium-cyclosporin complexes determined by vibrational circular dichroism. *Biopolymers*, 2004, vol. 73, no. 2, pp. 163–177. doi: 10.1002/bip.10513.
16. Sadeg N., Pham-Huy C., Claude J.-R., Rucay P., Bismuth H., Righenzi S., Halle-Pannenko O., Duc H.-T. In vitro and in vivo comparative studies on immunosuppressive properties of cyclosporines A, C, D and metabolites M1, M17 and M21. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 1993, vol. 15, nos. 2–3, pp. 163–177.
17. Khodov I.A., Efimov S.V., Klochkov V.V., Alper G.A., Batista de Carvalho L.A.E. Determination of preferred conformations of ibuprofen in chloroform by 2D NOE spectroscopy. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 2014, vol. 65, pp. 65–73. doi: 10.1016/j.ejps.2014.08.005.

Для цитирования: Кобчикова П.П., Згадзай Ю.О., Ефимов С.В., Клочков В.В. Сравнение циклоспоринов А и D с помощью спектроскопии ЯМР // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2019. – Т. 161, кн. 1. – С. 56–65. – doi: 10.26907/2542-064X.2019.1.56-65.

For citation: Kobchikova P.P., Zgadzay Yu.O., Efimov S.V., Klochkov V.V. Comparison of the cyclosporine variants A and D by NMR spectroscopy. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennyye Nauki*, 2019, vol. 161, no. 1, pp. 56–65. doi: 10.26907/2542-064X.2019.1.56-65. (In Russian)