

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

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

(магистерская диссертация)

УСТАНОВЛЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ЛОВАСТАТИНА В  
КОМПЛЕКСЕ С МИЦЕЛЛАМИ ДОДЕЦИЛФОСФОХОЛИНА И  
ДЕЦИЛСУЛЬФАТА НАТРИЯ МЕТОДАМИ СПЕКТРОСКОПИИ ЯДЕРНОГО  
МАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА

Студентка 2 курса  
группы 06-719

« 14 » июня 2019 г.



Д.А.Шарапова

подпись

**Работа допущена к защите:**  
Научный руководитель:

д.х.н, профессор

« 14 » сентября 2019 г.

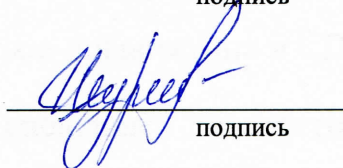


В.В.Ключков

подпись

Консультант

« 14 » сентября 2019 г.



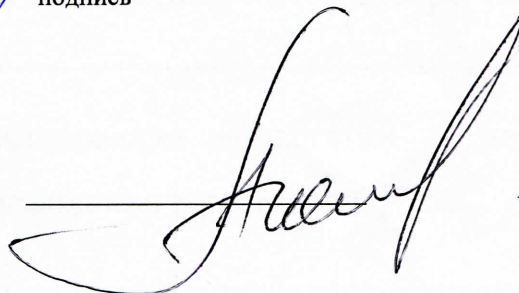
Г.С. Шуршалова

подпись

**Заведующий кафедрой:**

д.х.н., профессор

« 14 » июня 2019 г.



А.В. Аганов

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ .....	4
1.1 Параметры спектров ЯМР высокого разрешения.....	6
1.1.1 Химический сдвиг .....	6
1.1.2 Косвенное спин-спиновое взаимодействие .....	7
1.1.3 Интегральная интенсивность .....	9
1.2 Двумерная спектроскопия ЯМР .....	10
1.2.1 Двухмерная корреляционная спектроскопия ЯМР .....	12
1.2.2. Гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия .....	14
1.2.3. Гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия .....	16
1.3 Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера .....	18
1.3.1 Ядерный эффект Оверхаузера .....	18
1.3.2 Ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера.....	21
1.4 Диффузионный эксперимент ЯМР.....	24
2 ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ .....	27
2.1 Материалы, методы и объекты исследования.....	27
2.2 Анализ ЯМР спектров ловастатина в CD <sub>3</sub> OD .....	34
2.3 Анализ ЯМР спектров ловастатина в растворе с мицеллами додецилфосфохолина.....	42
2.4 Исследование комплексообразования ловастатин – додецилсульфат натрия и ловастатин -додецилфосфохолин в растворе D <sub>2</sub> O.....	45
3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ .....	56
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	57

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших проблем современной науки является определение структуры молекул, взаимного расположения атомов в ней. Эффективным методом для решения этой задачи является метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Благодаря ЯМР высокого разрешения, по мультиплетности и положению резонансных линий в спектрах, мы можем исследовать как в молекуле располагаются атомы или их группы. Данный метод отличается от других подобных методов высокой информативностью [1]. Это позволило сделать качественный скачок в области фармакологии, биомедицине и многих других областях науки. В настоящее время в медицине остается большим вопросом причины появления тромбов, механизмы, ответственные за их формирование и развитие. Решение этой задачи помогло бы спасти огромное количество людей, так как самый большой процент смертности в большинстве экономически развитых странах именно из-за сердечно-сосудистых заболеваний.

Поэтому разработка новых подходов ЯМР исследований новых лекарств, и поиск модельных систем, соответствующих целям и задачам исследования являются актуальными задачами. Лишь при наличии информации о химической и трехмерной структуре соединений и их поведения в растворе целесообразен синтез лекарственных препаратов.

Объектом данного исследования являлось соединение, называемое ловастатин, имеющий широкий спектр биологического действия и поэтому представляющий интерес в качестве лекарственного препарата.

Ловастатин (Lovastatin) — гиполипидемический препарат, являющийся ингибитором 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермента А редуктазы (ГМГ-КоА редуктазы). Он регулирует уровень холестерина, предотвращает появление атеросклероза за счет влияния на липопротеины низкой плотности (ЛПНП) [2].

Синтез ловастатина был произведен практически в одно и то же время сразу в нескольких местах, а именно в фармакологической компании Merck из грибов (*Aspergillus terreus*). Изначальное найденное вещество называли мевинолин (сейчас мы знаем его под именем ловастатин). В июне 1979 г. американская компания Merck отправила запрос на получение патента. Интересным фактом является то, что структура монаколина, открытая Акира Эндо (Япония), и ловастатина, который получил Alberts, оказались одинаковыми. Получается, что было найдено уже как минимум два вида микроорганизмов, которые могли синтезировать ловастатин [3-6].

Ловастатин интересен тем, что обладает рядом плеiotропных свойств. Например, его влияние на факторы воспаления, на функциональное состояние эндотелия достаточно высоки. Также за ловастатином замечен антиоксидантный эффект и антиишемическое действие [7]. Есть предположение, что в зависимости от того, где находится статин в мицелле, как взаимодействует с клеточной мембраной, от этого зависят и фармакологические свойства [8], однако пока недостаточно ясно то, как взаимодействует ловастатин с поверхностью клеточной мембраны в жидких средах, недостаточно изучен механизм.

**Целью дипломной работы** являлось исследование пространственной структуры ловастатина с модельными мембранами на основе мицелл додецилфосфохолина (ДФХ) и додецилсульфата натрия (ДСН) в растворе D<sub>2</sub>O на основании ЯМР спектров. Были решены **следующие задачи**, помогающие достичь цели:

- запись одномерных <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C и двумерных 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC, DOSY ЯМР спектров ловастатина с мицеллами ДФХ и ДСН и в растворе CD<sub>3</sub>OD;
- соотнесение сигналов в полученных ЯМР спектрах;
- вычисление коэффициента диффузии для ловастатина в CD<sub>3</sub>OD и ловастатина в растворе с мицеллами ДФХ и ДСН;

## 1 ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

В 1945 г. Э. Парселл и Ф. Блох впервые наблюдали явление ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Их открытие послужило основой нового вида спектроскопии. В сегодняшние дни метод ЯМР - один из наиболее информативных способов. Благодаря нему мы можем исследовать динамические преобразования молекул и ее структуры, узнать о характере протекания химических реакций, о межмолекулярных взаимодействиях.

Из основ квантовой механики известно, что угловой момент всегда квантуется и кратен  $\frac{1}{2} \hbar$ , где  $\hbar$  - постоянная Планка, деленная на  $2\pi$ . Спин электрона равен  $1/2$ , но значения спинов разных ядер отличается друг от друга. Если через символ  $I$  обозначим значение ядерного спинового квантового числа (или просто ядерного спина), мы можем записать для углового момента следующее соотношение:

$$p = I\hbar = \frac{Ih}{2\pi} \quad (1)$$

Тогда мы можем классифицировать ядра по их ядерным спинам. Есть ряд ядер, которые имеют  $I = 0$  и, следовательно, не имеют момента импульса. Этот класс ядер включает в себя все те, которые имеют четное атомное число и четное массовое число; например, изотопы  $^{12}\text{C}$ ,  $^{16}\text{O}$  и  $^{32}\text{S}$ . Эти ядра, как мы увидим, не могут испытывать магнитный резонанс ни при каких обстоятельствах. В качестве примера посмотрим спины некоторых наиболее распространенных яде. Спин  $I = \frac{1}{2}$  у ядер  $^1\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{31}\text{P}$  и других. Спин  $I = 1$  у ядер  $^2\text{H(D)}$ ,  $^{14}\text{N}$ .

Ядра, имеющие  $I > 1/2$ , имеют несферическое распределение ядерного заряда и, следовательно, имеют электрический квадрупольный момент  $Q$ . Но сейчас мы рассмотрим ядра, имеющие  $I \neq 0$ , потому что именно они обладают магнитным дипольным моментом или магнитным моментом  $\mu$ . Здесь будет уместно представление об этом моменте как о вращающемся движении заряженной частицы. Это упрощенная картина, но она, тем не менее, дает

правильные результаты. А именно то, что ядра, имеющие спин (или, по другому, собственный момент количества движения, угловой момент)  $\mathbf{P}$ , имеют и магнитный момент:

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{P}, \quad (2)$$

где  $\gamma$  – гиромагнитное отношение, являющееся уникальной характеристикой отдельно взятого ядра [9].

## 1.1 Параметры спектров ЯМР высокого разрешения

### 1.1.1 Химический сдвиг

Обычно протоны находятся в молекуле в разных химических окружениях, следовательно, имеют различные локальные магнитные поля (Рисунок 1).

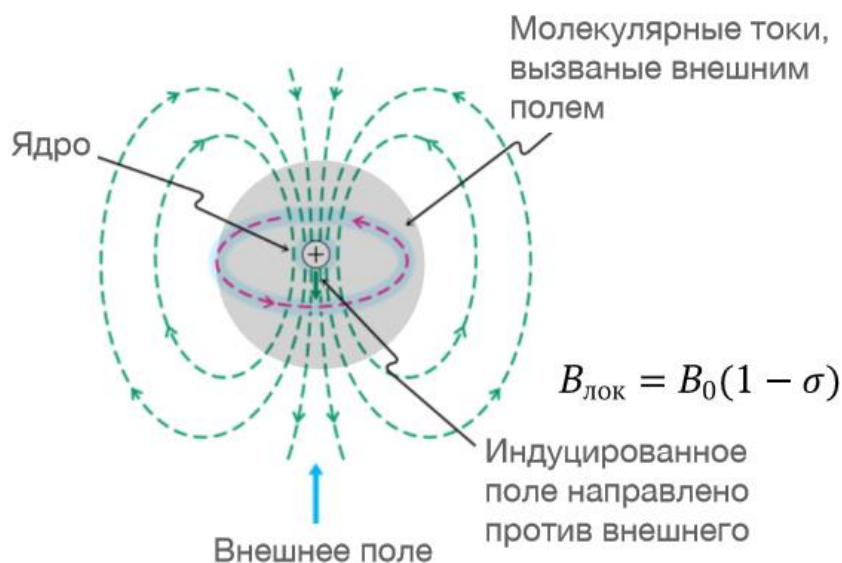


Рисунок 1 — появления химического сдвига из-за электронного экранирования

Химический сдвиг появляется из-за магнитного экранирования, создаваемого электронами. Ядро испытывает не магнитное поле, которое прикладывается к образцу  $B_0$ , а поле, измененное экранированием электронов окружающих ядро. Поскольку электроны также являются магнитными частицами, на их движение влияют внешние поля. Движение

электронов, вызванное внешним полем, направлено против этого поля (закон Ленца). Таким образом, в ядре магнитное поле будет следующее:

$$B_{\text{nucleus}} = B_0 - \sigma B_0 = B_0(1 - \sigma) \quad (3)$$

Константа ядерного магнитного экранирования оказывается небольшой (примерно  $10^{-5}$  для протонов и  $<10^{-3}$  для большинства других ядер). Уравнение 2 подчеркивает, что химический сдвиг полностью является результатом эффекта, вызванного помещением молекулы в магнитное поле. В отсутствие этого поля химического сдвига не существует. Константа ядерного магнитного экранирования является свойством молекулы, но способность магнитного поля влиять на движение электронов зависит от ориентации молекулы относительно  $B_0$  [9].

Как мы знаем, линии ЯМР в жидкостях обычно очень узкие, и резонансные частоты в диапазоне десятков или сотен МГц могут быть определены с точностью до небольшой доли Гц. Химические сдвиги измеряются относительно некоторого согласованного эталонного вещества. В качестве эталона для ЯМР был выбран сигнал от тетраметилсилана (ТМС).

Разработка шкал для выражения химических сдвигов и отображение большинства спектров ЯМР основаны на этой фундаментальной роли для сигнала от ТМС. Данные ЯМР измеряются в единицах частоты (герцах). Однако это неудобно в связи с разными значениями частот для разных спектрометров и необходимостью постоянных пересчетов для приборов, так как с ростом  $B_0$  увеличивается и абсолютный химический сдвиг  $\nu$  в связи с этим ввели новую единицу, названную миллионными долями (м.д.)  $\delta$ :

$$\delta = \frac{\nu_1 - \nu_{\text{эт}}}{\nu_{\text{эт}}} * 10^6 \quad (4)$$

### 1.1.2 Косвенное спин-спиновое взаимодействие

Косвенное (скалярное) спин-спиновое взаимодействие – еще одна причина, из-за которой происходит изменение дискретных уровней спиновой системы:

$$E = J_{12} \mathbf{I}_1 \mathbf{I}_2, \quad (5)$$

где  $\mathbf{I}_1, \mathbf{I}_2$  – вектора ядерного спина,  $J_{12}$  - константа спин-спинового взаимодействия (КССВ). Как следствие, возникают новые уровни энергии (не зависящие от значения индукции магнитного поля  $B_0$ ) и переходы между ними, поэтому возникает мультиплетность спектра ЯМР. [10] Причиной расщепления линий поглощения является взаимодействие магнитных моментов между соседями атомными ядрами. Появляется дополнительное магнитное поле из-за воздействия магнитного диполя  $\mu_1$  на находящийся рядом диполь; находящийся по соседству ядерный спин ядра ведет себя так, словно он находится во внешнем магнитном и локальном полях  $B_0$  и  $B_{loc}$ . Компонента локального поля параллельна полю  $B_0$ ,  $B_{loc}$ , найдем из выражения:

(6)

$$B_{loc} = \frac{\mu_0 \mu_z (3 \cos^2 \theta - 1)}{4\pi r^3}$$

где  $\mu_z$  — компонента магнитного момента  $\mu_I$ , направленная параллельно  $B_0$ ,  $r$  — расстояние между диполями,  $\theta$  - угол между вектором магнитного поля  $B_0$  и  $r$ , соединяющий оба диполя. Из уравнения видно, уменьшение диполь-дипольного взаимодействия происходит как третья степень расстояния между магнитными диполями, что достаточно быстро.

Когда есть быстрое молекулярное движение, локальное магнитное поле (создаваемое ближними магнитными ядрами) усредняется. Для эффективного усреднения, частота прецессии спинов вокруг направления локальных магнитных полей должна быть меньше частоты молекулярных переориентаций. У таких полей напряженность порой достигает десятки Гс,



отсюда следует, что частоты молекулярных перескоков должны быть больше, чем  $\gamma h \approx 2,675 \cdot 10^5 \text{ с}^{-1}$  для магнитного резонанса протонов. Так как угловой множитель  $(1-3\cos^2\theta)$  поле усреднения равен:

$$\langle (1 - 3\cos^2\theta) \rangle = \int_0^\pi (1 - 3\cos^2\theta) \frac{1}{2} \sin\theta d\theta = 0 \quad (7)$$

Следовательно, когда есть быстрое броуновское поступательное и вращательное движение молекул в маловязких жидкостях, локальные магнитные поля полностью усредняются до нуля.

Мы может сделать вывод, что в жидкостях диполь-дипольное взаимодействие оказывает малое влияние на вид спектров.

### 1.1.3 Интегральная интенсивность

По химическому сдвигу протонов в эксперименте ЯМР определяется относительное число эквивалентных частиц. То есть методом ЯМР можем узнать количество протонов, «ответственных» за наблюдаемый сигнал. Площадь пика находится в прямой зависимости от числа протонов отдельного типа, ею и измеряется интенсивность сигнала. У различных сигналов относительные интенсивности в спектре представлены ступенчатой интегральной кривой. Но высота ступеньки, хоть и пропорциональна количеству протонов, ответственных за данный сигнал, все же не позволяет определить точное число, ответственных за данный пик. Сравнив высоты ступенек, отвечающих различным сигналам в спектре, определяют относительное число протонов, ответственных за этот сигнал. Так, если наблюдается две ступеньки на интегральной кривой с интенсивностями 2 и 3, мы может сказать, что протоны, которые отвечают этим пикам, находятся в отношении 2 : 3 соответственно. Возможен и такой вариант при данном отношении: 8 одного типа и 12 – другого.

Площадь мультиплета показывает количество протонов, ответственных за наблюдаемый сигнал, а мультиплетность – за число протонов, которые взаимодействуют с данным протоном (или протонами). Следовательно, благодаря спектру ЯМР узнаем три важнейшие величины, помогающие понять, как устроена молекула – мультиплетность, химический сдвиг сигнала и интегральную интенсивность. Благодаря измерению интегральной интенсивности сигналов, появляется возможность количественно определить состав смесей органических веществ, применяя спектроскопию ЯМР.

## 1.2 Двумерная спектроскопия ЯМР

У сложных органических молекул с спектрах ЯМР большое количество линий, это делает их анализ весьма сложным. Если проведем двумерное Фурье-преобразование сигнала, полученного в виде функции двух временных переменных, то мы существенно облегчим анализ. Разработанные методы называются двумерной Фурье спектроскопией ЯМР.

Вследствие использования двумерных методик ЯМР спектроскопии, процесс определения пространственной и химической структуры исследуемого образца стал гораздо проще. Вместе с тем, сильно усложнились задачи, решаемые с помощью двумерной и многомерной спектроскопии ЯМР. Таким образом, появилась возможность определять структуру различных биомолекул, таких как белки, РНК и ДНК при помощи двумерной и трехмерной спектроскопии. До появления многомерных методов ЯМР подобные исследования больших молекул были совершенно невозможны. 1971 год можно считать началом двумерной ЯМР спектроскопии, основоположником которой был Дж. Джинером [11]. Им была предложена схема эксперимента, у которой, в отличие от одномерного эксперимента, интенсивность поглощения зависела уже не от

одной частоты. То есть в двумерном ЯМР эксперименте сигнал является функцией двух переменных: времени  $t_1$  и  $t_2$ . И если дальше производить преобразование Фурье по этим двум переменным, то получим спектр, который является функцией уже двух частот.

И теперь, пик или спектральная линия определяется уже не одной, а двумя частотами в спектрах двумерного ядерного магнитного резонанса. Наличие такой спектральной линии указывает на то, что спины взаимодействуют друг с другом через химическую связь с помощью спин-спинового взаимодействия или через пространство (диполь-дипольный механизм). Положение спектральной линии определяется резонансными частотами или химическим сдвигом взаимодействующих спинов. Например, если ядра связаны взаимодействием, то в двумерном спектре появятся соответствующие кросс пики.

Ядра У и В могут быть как гомоядерные, так и гетероядерные, то если либо принадлежать к одному типу, либо быть различными. Различия могут быть и в типе взаимодействия: спин-спиновое взаимодействие, диполь-дипольное взаимодействие (в анизотропных средах), кросс-релаксация. Кросс-релаксация – это релаксация, которая в многоспиновой системе включает изменение спиновых состояний для разных типов спинов. Поэтому используют различные постановки эксперимента, зависящие от типа взаимодействия.

Любой двумерный эксперимент включает три основные части (Рисунок 2):

- Подготовка (переводим систему в неравновесное состояние)
- Эволюция — поведение спинов в неравновесном состоянии, рассматриваемых под воздействием межспиновых взаимодействий.
- Смешивание (обмен намагниченностями между спинами, то есть КССВ, химический обмен и другие)
- Детектирование (регистрируем сигнал ССИ)

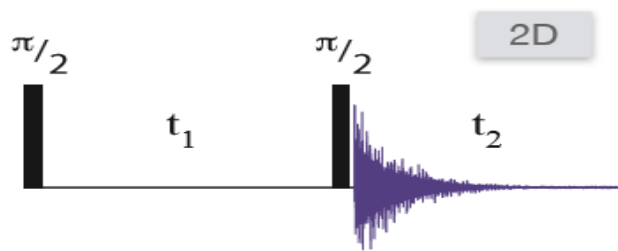


Рисунок 2 — Схема двумерного эксперимента.

### 1.2.1 Двухмерная корреляционная спектроскопия ЯМР

В современной науке стала крайне распространена двумерная спектроскопия корреляции химических сдвигов, или, по-другому, корреляционная спектроскопия (COSY, сокращение с английского Correlation Spectroscopy). В 2D спектрах есть информация о наличии взаимодействия между различными ядрами. Так, например, в двумерном спектре появляются кросс пики от ядер Y и B, если они связаны косвенным спин-спиновым взаимодействием [1].

На рисунке 3 показана импульсная последовательность для COSY эксперимента. Из всех многомерных экспериментов ЯМР, COSY является самым простым. Для его осуществления необходим импульс возбуждения, затем период мечения частоты, второй импульс, служащий для передачи намагниченности от одного спина к другому. В течении импульсной программы за время  $t_1$  производится накопление  $n$  сканов. Затем увеличивают задержку  $t_1$  на  $\Delta t_1$ , и вновь происходит регистрация  $n$  сканов в течении нового времени  $t_1 + \Delta t_1$ . Описанный процесс повторяется в общей сложности  $p$  раз.

Импульсная последовательность эксперимента COSY состоит включает в себя два  $90^\circ$  импульсов, которые разделены временем эволюции  $t_1$ . В общей сложности делается  $p$  экспериментов с разным временем задержки  $t_1$ , каждый из которых состоит из  $n$ -сканов.

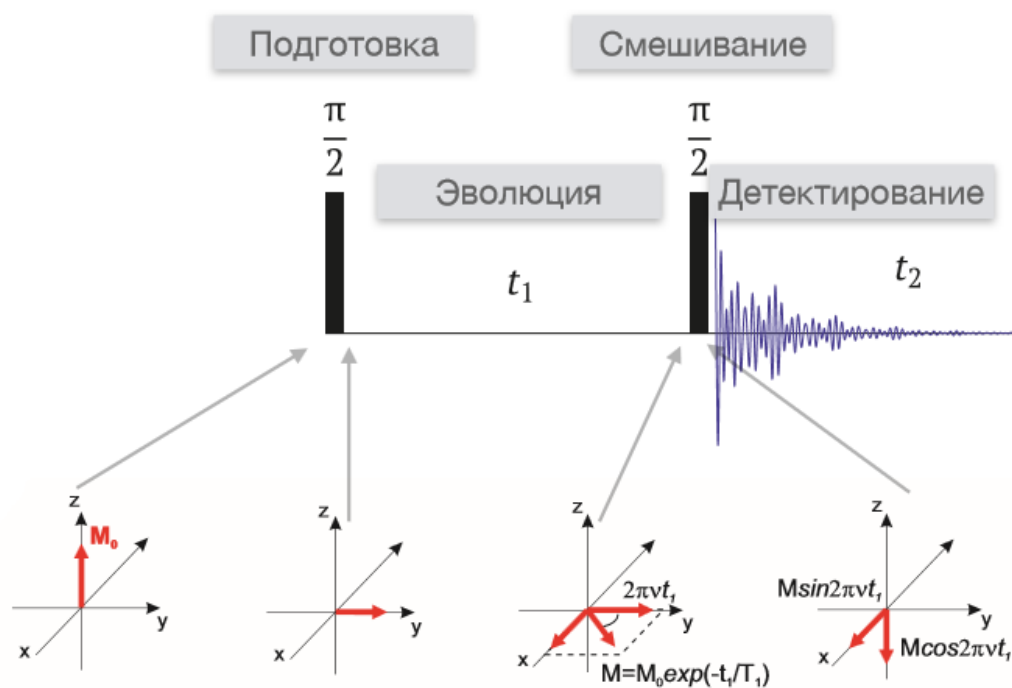


Рисунок 3 — Импульсная последовательность эксперимента COSY.

Черными прямоугольниками изображены  $90^\circ$  импульсы

В двухмерном спектре, который получаем в эксперименте COSY, по обеим осям мы видим частоты единичного изотопа, как правило, водорода ( $^1\text{H}$ ). В спектры COSY видны два вида пиков:

- Диагональные пики. На каждой оси они имеют одинаковую частотную координату и выстраиваются по диагонали спектра;
- Кросс-пики. Они находятся вне диагональной линии, то есть имеют разное значение для каждой частотной.

В спектре диагональные пики соответствуют пикам в экспериментах одномерной ЯМР (1D-NMR). Кросс-пики показывают связывание между парой атомных ядер.

Причина появления кросс-пика связана с феноменом, называемый «Перенос намагниченности» (англ. magnetization transfer). Их присутствие говорит о том, что два атомных ядра связаны, при этом имеют два разных

значения химического сдвига, вследствие чего появляются координаты кросс-пики. Кросс-пики расположены симметрично относительно диагональных пиков. Следовательно, появление кросс-пики связано с появлением корреляции между сигналами спектра для каждой из двух осей в данных значениях. Исходя из этого мы можем, посмотрев на кросс-пики между разными сигналами, определить, какие атомы соединены друг с другом (в диапазоне небольшого количества химических связей) [9].

### 1.2.2. Гетероядерная одноквантовая корреляционная спектроскопия

Как мы можем получить заметное увеличение чувствительности? Для этого мы будем регистрировать ядро, у которого «неблагоприятное» гиромагнитным отношением, например  $^{13}\text{C}$ , через его влияние на более чувствительные ядра  $^1\text{H}$ . Впервые регистрировать подобным образом предложил Мюллер. Идея корреляционного эксперимента в регистрации через гетероядерную мультиквантовую когерентность (HMQC) [8]. Протоны, не связанные с ядрами  $^{13}\text{C}$ , вызывают проблемы динамической области, которые требуют дополнительных действий в виде подавления таких сигналов. Это привело к тому, что изначально эксперимент не приобрел ожидаемой популярности.

Подавляя сигналы протонов, не связанных с ядрами с низким гиромагнитным отношением (например,  $^{13}\text{C}$ ), задача в итоге была решена [21]. Heteronuclear Single Quantum Coherence – эксперимент, в котором через прямое спин-спиновое взаимодействие ( $^1\text{J}$ ) между ядрами наблюдаются корреляции между химическими сдвигами протонов и химическими сдвигами некоторых ядер Y (как правило,  $^{13}\text{C}$  или  $^{15}\text{N}$ ). В этой методике детектируемыми ядрами являются протоны, данный факт позволят заметно уменьшить время эксперимента, по сравнению с традиционным гетерокорреляционным экспериментом, за счет более высокой чувствительности. Требования к точности настройки гораздо

выше. Зато, в отличие от HMQC позволяет достичь более высокого разрешения по оси ядра В [12].

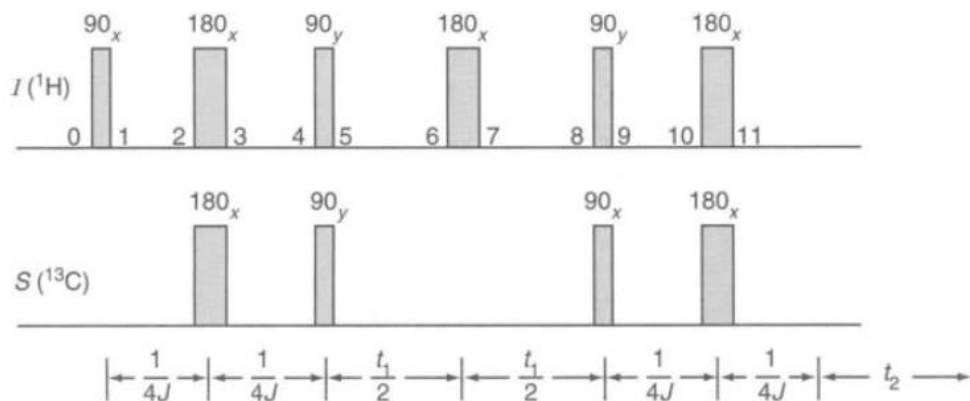


Рисунок 4 — Импульсная последовательность  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC ЯМР

эксперимента: вначале идут импульсы INEPT. И последняя часть является обратной последовательностью INEPT, в которой поляризация переносится с  $^{13}\text{C}$  обратно на  $^1\text{H}$ .

«На рисунке 4 показана импульсная последовательность такого эксперимента. Мы видим, что вначале происходит перенос намагниченности с ядер  $^1\text{H}$  на ядра  $^{13}\text{C}$ , для осуществления переноса используют последовательности INEPT. Далее следует задержка  $\tau$ , в течение которой протоны насыщаются. То есть задержку выбирают таким образом, чтобы успевало осуществиться следующее: инвертированная намагниченность протонов, не связанных с  $^{13}\text{C}$ , проходила через точку, в которой амплитуда сигнала примерно равна нулю, то есть, в течение периода она меняет свою ориентацию с отрицательной на положительную. Длительность  $\tau$  выбрана так, что сигналы несвязанных протонов в этот момент имеют нулевую интенсивность. Между последующими накоплениями время  $T$  выбирается коротким (примерно  $1.3T_1$  самых быстро релаксирующих протонов), а  $\tau$  соответствует примерно  $0.35T_1$ . Так как присутствуют связанные ядра  $^{13}\text{C}$ , то есть расположенные рядом с

интересующими протонами, наблюдаем значительное укорочение времени релаксации. Эффективная релаксация рассматриваемых ядер позволяет сделать короткой период задержки между экспериментами без нежелательного влияния на чувствительность. В течение  $t_1$  времена выборки чаще приблизительно равно 20-30 мс. Фаза первого  $90^\circ$  импульса  $^{13}\text{C}$  циклически меняется:  $x, y, -x, -y$ . В это же время фаза приемника в последующих сканах:  $+, +, -, -$ . Обработка для получения фазочувствительного спектра поглощения требует, чтобы данные, полученные из нечетных и четных сканов, записывались отдельно [1].

В сравнении с классическим гетерокорреляционным экспериментом вышеописанный эксперимент заметно более чувствителен. Так эксперимент HSQC в 16 или 100 раз чувствительнее для  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  (если учитывать влияние различных факторов), соответственно. Кроме того, появляется новый, дополнительный фактор 2 для  $\text{CH}_2$  или  $\text{NH}_2$  групп и 3 для  $\text{CH}_3$  или  $\text{NH}_3$  групп соответственно по сравнению с «классическим» HETCOR экспериментом».

### 1.2.3. Гетероядерная многосвязная корреляционная спектроскопия

HMBC представляет собой слегка модифицированную версию HMQC, которая предназначена для обнаружения связей через более чем одну. На рисунке 5 показана импульсная последовательность HMBC ЯМР эксперимента. «Так, в начале происходит перенос намагниченности с ядер  $^1\text{H}$  на ядра  $^{13}\text{C}$ , причем за счет подбора задержек  $\Delta$  и  $\Delta'$  перенос происходит только за счет дальних (непрямых) констант КССВ (используется фильтрация по значению  $J_{\text{CH}}$ . После эволюции системы в течение времени  $t_1$  происходит обратный перенос намагниченности на ядра водорода, после чего сигнал регистрируется. В результате двумерного фурье-преобразования получается спектр, кросс-пики в котором соответствуют наличию спин-спинового взаимодействия между ядрами  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$ , связанных непрямыми константами.»



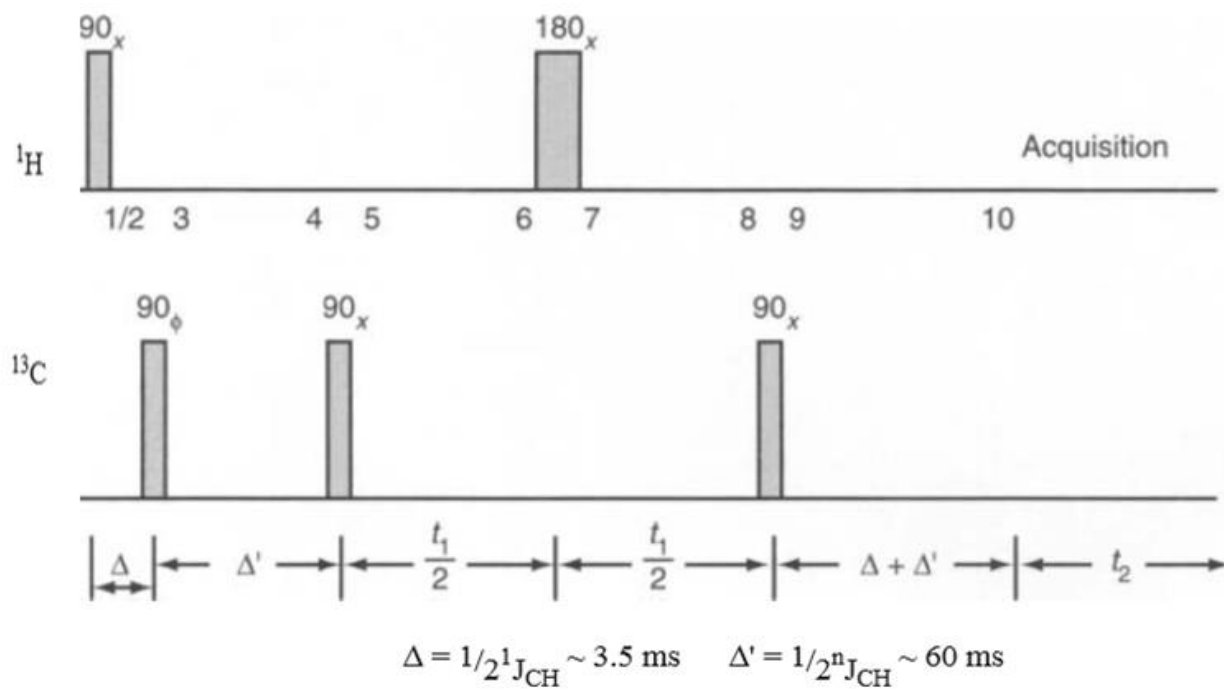


Рисунок 5 — Импульсная последовательность НМВС ЯМР эксперимента

## 1.3 Спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера

### 1.3.1 Ядерный эффект Оверхаузера

Один из самых эффективных способов исследовать конформационную структуру в ЯМР спектроскопии является метод NOESY, основанный на регистрации ядерных эффектов Оверхаузера (яэО). Суть яэО заключается в том, что интенсивность одного сигнала ЯМР изменяется при возбуждении другого.

Простейшей системой, которая может достаточно наглядно продемонстрировать ЯЭО, является молекула с двумя спинами А и В, связанные между собой диполь-дипольным взаимодействием, при этом

$$I^A = I^B = \frac{1}{2}.$$

Если усреднить по большому количеству таких молекул, то выделяют 4 возможных состояния для каждой молекулы. Эти состояния характеризуются определенными населенностями. То есть появляется возможность установить вероятность заселения каждого состояния (Рисунок 6).

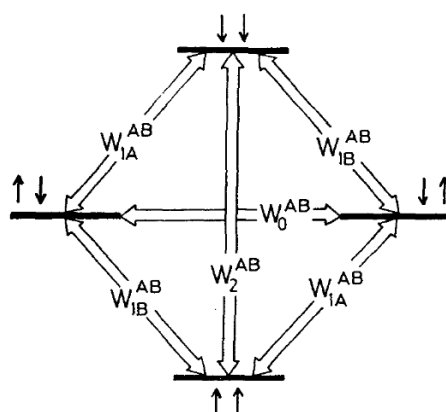


Рисунок 6 -- Вероятности переходов в двухспиновой системе.

Схематическое представление различных возможных ориентаций

магнитного момента в двухспиновой системе.  $W_0$ ,  $W_1$  и  $W_2$  обозначают вероятности переходов между различными уровнями (состояниями).

При термодинамическом равновесии наблюдается распределение Больцмана. В случае необходимости изменения населенности уровней энергии, облучают спиновую систему на частоте, соответствующей резонансной частоте  $\omega_B$  спина, вследствие диполь-дипольного взаимодействия произойдет изменение населенностей всех спиновых состояний. При условии, что облучение проводится в течение длительного времени, в системе установится стационарное состояние. Возникающие при этом релаксационные процессы в зависимости от изменения суммарного квантового числа  $m$  ядер  $A$  и  $B$  обозначаются как нульквантовые ( $\Delta m = 0$ ), одноквантовые ( $\Delta m = \pm 1$ ) и двухквантовые ( $\Delta m = \pm 2$ ) [13].

Изменения населенностей приводят также к изменению  $z$ -компоненты  $M_z^A$  намагниченности спина  $A$ , величину которой к моменту времени  $t$  можно определить с помощью  $90^\circ$ -ного импульса. После фурье-преобразования находим изменение интенсивности соответствующей резонансной линии на частоте  $\omega_A$ .

Эти изменения намагниченности во времени можно описать с помощью дифференциальных уравнений:

$$\frac{dM_z^A}{dt} = -\rho_A(M_z^A - M_0^A) - \sigma_{AB}(M_z^B - M_0^B), \quad (8)$$

$$\frac{dM_z^B}{dt} = -\rho_B(M_z^B - M_0^B) - \sigma_{BA}(M_z^A - M_0^A). \quad (9)$$

В этих уравнениях  $\rho_A$  и  $\rho_B$  обозначают скорости спин-решеточной релаксации ядер  $A$  и  $B$ ,  $M_0$  – намагниченность в состоянии термодинамического равновесия. Скорости релаксации определяются следующим образом:

$$\rho_A = W_0^{AB} + 2W_{1A}^{AB} + W_2^{AB} + R_{ext}^A, \quad (10)$$

$$\rho_B = W_0^{AB} + 2W_{1B}^{AB} + W_2^{AB} + R_{ext}^B, \quad (11)$$

$$\sigma_{AB} = \sigma_{BA} = W_2^{AB} - W_0^{AB}, \quad (12)$$

где  $W_0$ ,  $W_1$ ,  $W_2$  – вероятности нуль-, одно- и двухквантовых переходов,

а  $R_{ext}^{A,B}$  обозначает дополнительные каналы релаксации для спинов А и В.

Ядерный эффект Оверхаузера измеряется отношением интенсивности сигнала S после возбуждения к интенсивности сигнала  $S_0$  в отсутствие возбуждения или отношению  $M_z/M_0$ , поскольку интенсивность сигнала пропорциональна величине z-компоненты намагниченности.

Вероятности переходов для продольной релаксации даются следующими формулами:

$$\begin{aligned} W_0^{AB} &= \frac{1}{2} q^{AB} J(\omega_0^A - \omega_0^B), \\ W_{1A}^{AB} &= \frac{3}{4} q^{AB} J(\omega_0^A), \\ W_{1B}^{AB} &= \frac{3}{4} q^{AB} J(\omega_0^B), \\ W_2^{AB} &= 3q^{AB} J(\omega_0^A + \omega_0^B). \end{aligned} \quad (13)$$

Если движение, влияющее на релаксационные процессы изотропно, как например вращательная диффузия, то коэффициент  $q^{AB}$ , который пропорционален интенсивности взаимодействия, имеет вид:

$$q^{AB} = \frac{1}{10} \left( \frac{\mu_0}{4\pi} \right) \frac{\hbar^2 \gamma_A^2 \gamma_B^2}{r_{AB}^6}, \quad (14)$$

где  $\mu_0$  – магнитная проницаемость вакуума,

$r_{AB}$  – расстояние между спинами А и В.

Соответствующая функция спектральной плотности есть:

$$J(\omega) = \frac{2\tau_{rot}^{AB}}{1 + (\omega\tau_{rot}^{AB})^2}. \quad (15)$$

Если подставить эту функцию в выражения для  $\rho$  и  $\sigma$ , то получим зависимость величины стационарного эффекта Оверхаузера от вращательного времени корреляции  $\tau_{rot}$ ; на рисунке 7 эта зависимость показана для различных ядер. При расчете приведенных кривых не учитывалась внешняя релаксация, наличие которой приведет к уменьшению наблюдаемого эффекта [13].

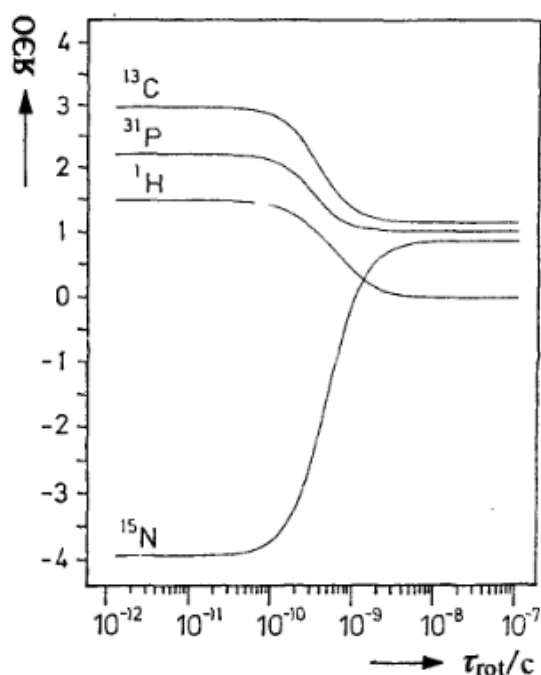


Рисунок 7— Величина ЯЭО как функция времени вращательной релаксации  $\tau_{rot}$ . Зависимость  $M_z^A/M_z^0$  от времени корреляции вращательных движений  $\tau_{rot}$  при условии, что резонансная частота для  $^1\text{H}$  равна 500 МГц, приведена для различных ядер, связанных с протонами дополнительным взаимодействием.

### 1.3.2 Ядерная спектроскопия с эффектом Оверхаузера

Таким образом, благодаря эксперименту NOESY мы можем определить ядра, находящиеся на расстоянии до 5 Å, и появляется

возможность установить пространственную структуры органических соединений в растворе. Рассмотрим импульсную последовательность эксперимента NOESY (Рисунок 8)

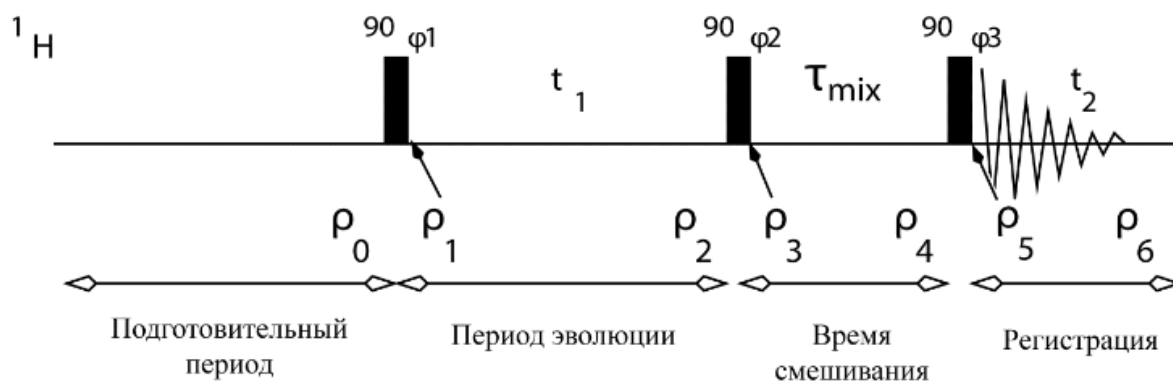


Рисунок 8 – Импульсная последовательность NOE ЯМР эксперимента

Интенсивность кросспика в NOESY спектре зависит от относительного размера из коэффициента собственной релаксации (зависимость показана на рисунке 9). Для больших молекул функция спектральной плотности мала при  $\omega$  и  $2\omega$ , поэтому  $W_2 < W_1 < W_0$ ,  $\rho \approx W_0$ ,  $\sigma \approx -W_0$ . При этом кросспики будут иметь положительный знак и их интенсивность возрастает с увеличением молекулярной массы. Для малых молекул кросспики в NOESY спектре противоположны по знаку диагонали пика, и слабее по интенсивности. Когда  $\omega\tau_c \approx 1$ , кросспики в NOESY имеют нулевую интенсивность, и таким образом не возможно получить какую-либо информацию о межпротонных расстояниях с использованием этой методики

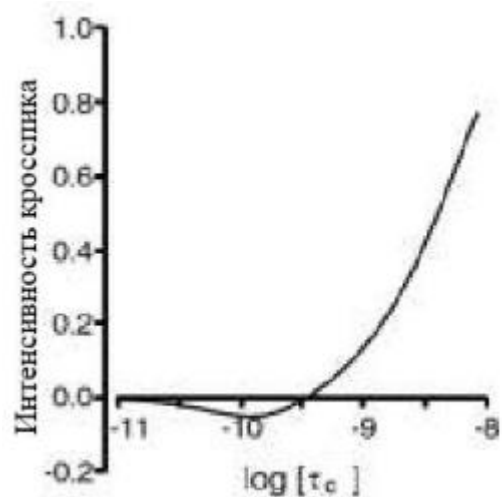


Рисунок 9 —Интенсивность кросспика как функция времени вращательной корреляции. График соответствует измерениям для кросспика между протонами отстоящими на  $2 \text{ \AA}$  и частоте спектрометра 500 МГц

## 1.4 Диффузионный эксперимент ЯМР

Диффузионно-упорядоченная спектроскопия (DOSY – Diffusion Ordered Spectroscopy) используется для разделения сигналов ЯМР в зависимости от коэффициента диффузии компонентов смеси. Трансляционное движение молекул в растворе (диффузия или самодиффузия) зависит от множества физических параметров, таких как вязкость, температура, размер и формы молекулы. В приближении сферической формы коэффициент самодиффузии молекул описывается уравнением Стокса-Эйнштейна [14]:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta r_s}, \quad (16)$$

где  $k$  – константа Больцмана,  $T$  – температура,  $\eta$  – вязкость,  $r_s$  – гидродинамический радиус молекулы.

ЯМР спектроскопия с импульсными градиентами поля (ИГП) может быть применена для исследования трансляционной диффузии молекул. Приложение градиента позволяет «пометить» молекулы в зависимости от их пространственного положения. Их новая позиция после движения в течение времени диффузии  $\Delta$  может быть декодирована приложением второго градиента.

Измеряемый сигнал представляет собой интеграл по всему объему образца и интенсивность сигнала ослабляется в зависимости от времени диффузии  $\Delta$  и параметров градиента ( $g$ ,  $\delta$ ). Изменение интенсивности описывается формулой:

$$I = I_0 e^{-D\gamma^2 g^2 \delta^2 (\Delta - \frac{\delta}{3})}, \quad (17)$$

где  $I$  – наблюдаемая интенсивность,  $I_0$  – исходная интенсивность,  $D$  – коэффициент диффузии,  $\gamma$  – гиромагнитное отношение наблюдаемого ядра,  $g$  – мощность градиента,  $\delta$  – длительность градиента,  $\Delta$  – время диффузии.



Простейшая импульсная последовательность для измерения диффузии была предложена Стейскалем и Таннером [15] в 1965 г. Последовательность градиентного спинового эха приведена на рисунке 10.

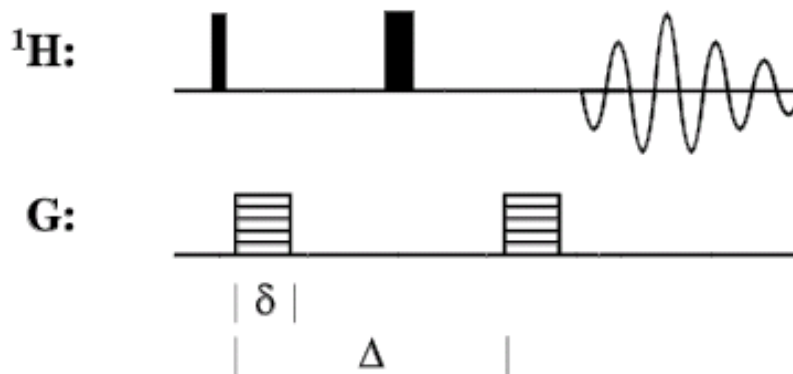


Рисунок 10. Последовательность градиентного спинового эха.

Подгонка изменения интенсивности пика как гауссовской функции от величины градиента магнитного поля позволяет рассчитать коэффициент диффузии и стандартное отклонение для каждого пика в спектре (рисунок 11).

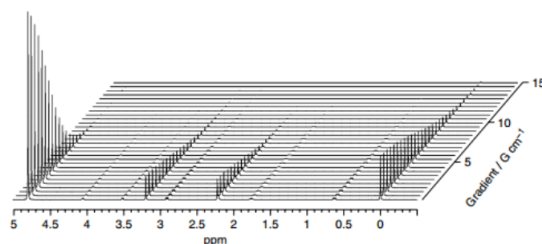


Рисунок 11 –<sup>1</sup>H спектр сигнала спинового эха с импульсным градиентом магнитного поля для смеси ацетона (А, 2.2. м.д.), холина (С, 3.2 м.д.), ДСС (D, 0 м.д.) в присутствии остаточного сигнала HDO(W, 4.8 м.д. )

Для каждого пика  $j$  в одномерном спектре (для удобства выберем спектр с наименьшим  $G$  ) конструируется двумерный пик, который имеет по одной оси ту же форму и объем, пропорциональный высоте пика, что и

в изначальном спектре,  $S_j(F)$ . В свою очередь, вдоль диффузионной оси получается гауссова линия, центрированная на коэффициент диффузии  $D_j$  и имеющая ширину, определяемую стандартным отклонением  $\sigma_j$ . Окончательный спектр 2D DOSY ( $S(D,F)$ ) представляет собой сумму  $N$  таких пиков:

$$S(D, F) = \sum_{j=1}^N \frac{S_j(F)}{\sqrt{2\pi\sigma_j^2}} \exp\left[-\frac{(D-D_j)^2}{2\sigma_j^2}\right] \quad (18)$$

## 2 ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Материалы, методы и объекты исследования

Объектом данного исследования являлось соединение, называемое ловастатин, имеющий широкий спектр биологического действия и поэтому представляющий интерес в качестве лекарственного препарата.

Ловастатин (Lovastatin) (Рисунок 20) — гиполипидемический препарат, представляющий собой ингибитор ГМГ-КоА редуктазы, регулирующий уровень холестерина, липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) - основного фактора риска атеросклероза.

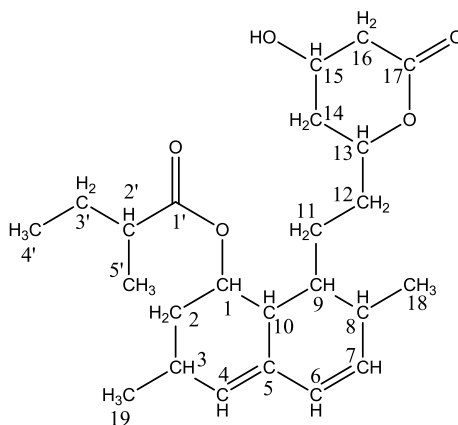


Рисунок 12— Структурная формула ловастатина.

Также есть исследования, доказывающие, что ловастатин действует как противораковый препарат [16].

Ловастатин по структурной формуле очень похож на симвастатин и правастатин (рисунок 13 ).

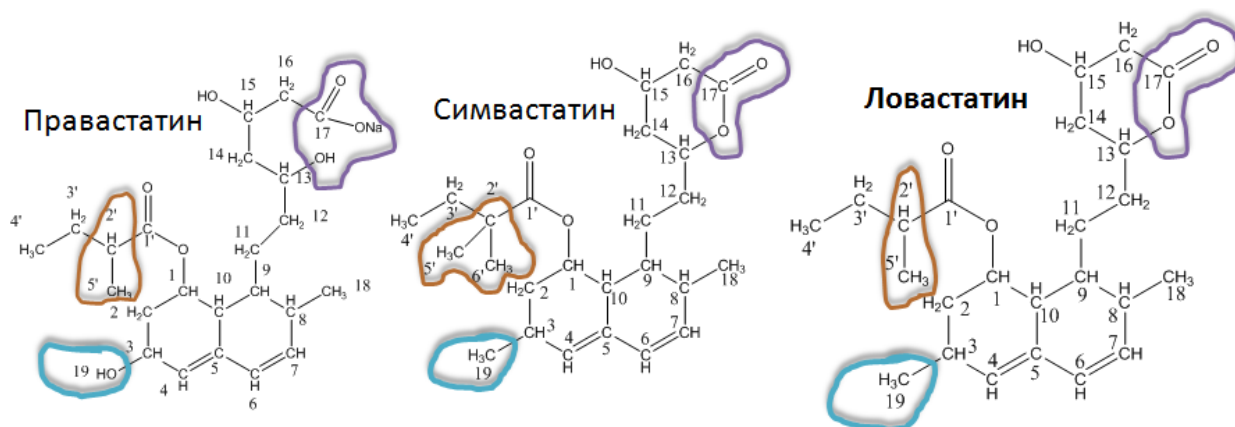


Рисунок 13 – Структурные формулы статинов с отличными друг от друга в выделенных частях местами

Фактически, ловастатин получен из грибкового источника, а симвастатин и правастатин являются химическими модификациями ловастатина [17]. Когда сравниваются открытые гидроксид-формы этих лекарств, ловастатин и симвастатин отличаются от правастатина тем, что они содержат метил вместо гидроксильной группы в положении 19. Кроме того, симвастатин отличается от двух других, поскольку он имеет дополнительную метильную группу в положении 2' на боковой цепи бутаноата. В то время как правастатин вводится в виде легко активной открытой гидроксикислотной формы, ловастатин и симвастатин вводятся в виде неактивных лактонов (рис. 13), которые должны метаболизироваться до их соответствующих открытых гидроксикислотных форм, чтобы ингибировать HMG-CoA редуктазу [17-18]. Будь то лактоновые пролекарства или активные открытые оксикислоты, все три ингибитора ГМГ КоА-редуктазы снабжены бициклической кольцевой системой, которая вместе с боковой цепью обязательна для закрепления в активной форме ГМГ КоА. Описанные структурные характеристики тесно связаны с физико-химическими свойствами ингибиторов ГМГ КоА. Таким образом, пролекарства лактона, ловастатин и симвастатин, почти на три порядка более липофильны, чем их соответствующие активные гидроксикислотные формы, которые, в свою очередь, примерно в 100 раз более липофильны, чем правастатин [19]. Различия в липофильности

отражаются в способности этих различных веществ неселективно пересекать клеточные мембраны путем пассивной диффузии, и объясняет, почему правастатин нелегко пересекает клеточные мембраны, в отличие от ловастатина и симвастатина [20]. Поэтому было высказано предположение, что эта молекула из-за своего амфифильного характера может образовывать внутримолекулярные водородные связи, тем самым увеличивая ее кажущуюся липофильность и проницаемость клеточной мембраны. Тем не менее, правастатин, не проникает через гематоэнцефалический барьер в значительной степени в отличие от более липофильных соединений лактона, ловастатина и симвастатина [21].

Одной из основных трудностей, возникающих при биофизических исследованиях взаимодействий белков и пептидов с мембраной, является сложность самих биологических мембран. Типичная биологическая мембрана представляет собой сложную динамическую структуру, основными компонентами которой являются липиды, относящиеся к различным классам, такие как глицерофосфолипиды, сфинголипиды, стеролы и гликолипиды. Эти амфифилы составляют основной структурный элемент мембраны, липидный бислой, в который, кроме того, встроено множество различных мембранных белков. Точный состав белков и липидов зависит от конкретной рассматриваемой мембраны, и редко, внешние и внутренние слои имеют одинаковый состав [22]. Эта сложность ограничивает применение большинства стандартных биофизических методов *in vitro* для исследования структуры и функций мембранных белков и пептидов, что вынуждает использовать чрезвычайно упрощенные модели мембран. Одной из наиболее часто используемых мембранных моделей является мицелла, также называемая пузырьком (Рисунок 14).

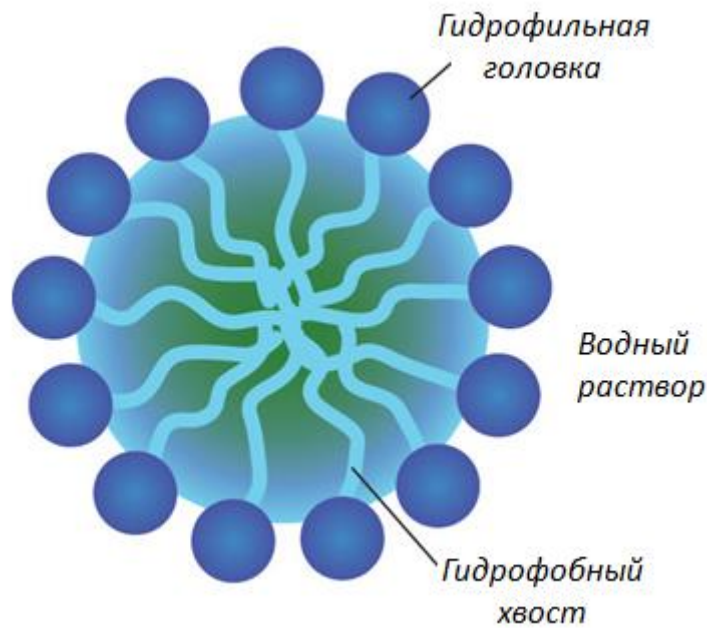


Рисунок 14 – Схематическое представление мицеллы

Мицеллы поверхностно-активных веществ являются хорошим компромиссом между необходимостью получения относительно быстрой и подходящей мембранной моделью для изучения структуры белка / пептида и получения, тем не менее, физиологически значимых результатов [23-24]. Поверхностно-активные вещества представляют собой, амфипатические молекулы, состоящие из полярной головной группы и гидрофобного хвоста. В этом отношении они очень похожи на липиды, но вместо того, чтобы образовывать двухслойные структуры в растворе, они спонтанно образуют компактные структуры при достижении критической концентрации. В мицелле гидрофильные группы контактируют с внешним водным растворителем, тогда как гидрофобные хвосты направлены в ядро мицеллы. Таким образом, по сравнению с липосомами, мицеллы не имеют водного ядра, не разделены бислоем, и имеют меньший размер, типичный диаметр менее 10 нм [25]. Среди различных известных и охарактеризованных поверхностно-активных веществ отрицательно заряженный додецилсульфат натрия (ДСН) и цвиттерионный додецилфосфохолин (ДФХ)

Важно отметить, что оба этих поверхностно-активных вещества коммерчески доступны, даже в дейтерированной форме, по относительно низкой цене по сравнению с фосфолипидами, что особенно подходит для  $^1\text{H}$  ЯМР исследований. Их использование особенно широко распространено в области антимикробных пептидов. Поскольку последние обычно заряжены положительно, в то время как бактериальные мембраны обычно содержат более высокое содержание отрицательно заряженных липидов, чем эукариотические, электрические заряды явно играют фундаментальную роль во взаимодействии частицы с мембраной. В частности, чистые мицеллыДФХ используются для имитации эукариотических мембран, посколькуДФХ имеет точно такую же головную группу, что и фосфатидилхолины, которые являются преобладающим классом липидов у эукариот. С другой стороны, чистые мицеллыДСН используют томитные бактериальные мембраны, даже если и состоят только из отрицательно заряженных фосфолипидов [26-28].

Таким образом, в качестве модельных мембран использовались мицеллы додецилфосфохолина (ДФХ) (Рисунок 15, а) и мицеллы додецилсульфата натрия (ДСН) (Рисунок 15, б).

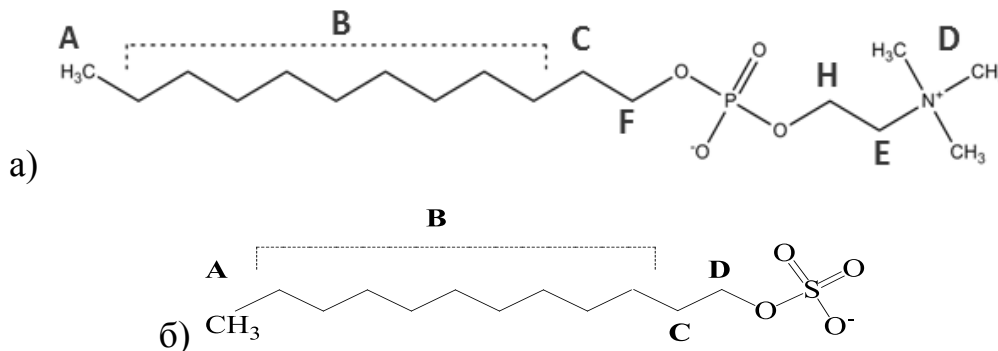


Рисунок – 15. Структурная формула а) ДФХ и б) ДСН.

В работе использовались недейтерированные и дейтерированные ДФХ и ДСН. Это связано с тем, что использование исключительно недейтерированного вещества привело бы к высокой интенсивности сигналов от водорода, что помешало бы увидеть сигналы от ловастатина. Добавление дДФХ и дДСН позволило избежать данной проблемы, но при

этом достичь критической концентрации, способствующей мицеллообразованию.

Все вещества, а именно ловастатин, ДФХ и ДСН были приобретены у компании Sigma-Aldrich Rus (Москва, Россия). Для приготовления смеси использовались дейтерированные (>98%) и недейтерированные ДФХ и ДСН. Концентрация мицелл в растворе D<sub>2</sub>O была выше критической и равнялась 2 ммоль/л для недейтерированного и 15 ммоль/л для дейтерированного ДФХ (дДФХ), такие же концентрации и для ДСН. После растворения поверхностно-активного вещества в D<sub>2</sub>O, растворы были перемешаны и помещены в ультразвуковую ванну на 5 мин. После приготовления исходного раствора, было добавлено необходимое количество ловастатина, далее образец после отстаивался в течение 12 часов при комнатной температуре. Ловастатин был растворен в D<sub>2</sub>O+ДФХ и D<sub>2</sub>O+ДСН с концентрацией 2 ммоль/л.

Регистрация ЯМР <sup>1</sup>H спектров ловастатина проводилась на ЯМР-спектрометре "AVANCE II™-700" и "AVANCE II™-500" фирмы "Bruker" в лаборатории ЯМР Института физики КФУ. Спектрометры оснащены 5 мм Z-градиентным инверсным датчиком и системой термостатирования образца с точностью установки температуры 0,1К. В качестве образцов применялись растворы соединения ловастатина в CD<sub>3</sub>OD, а также в растворе D<sub>2</sub>O с добавлением ДФХ, дДФХ и ДСН, дДСН.

Метанол был выбран в качестве растворителя в связи с тем, что при добавлении ловастатина в воду без мицелл, он выпадал в осадок, то есть не растворялся. Однако для снятия ЯМР спектра необходим именно раствор. В связи с этим появилась необходимость выбора другого растворителя. Этим растворителем оказался метанол, в нем ловастатин не выпал в осадок, после ультразвуковой ванны полностью растворился, и мы смогли снять спектры. Немаловажным фактором выбора метанола является то, что в экспериментах по изучению других статинов (правастатина, аторвостатин и т. д.) был выбран также CD<sub>3</sub>OD [29]. С одинаковыми растворителями дальнейшее



сравнение и анализ статинов будет более удобен и корректен. Концентрация ловастатина в растворе  $CD_3OD$  – 4 мМ.

При записи спектров ЯМР  $^1H$  использовали  $90^\circ$ -ные импульсы; ширина спектра была 7 м.д.; число накоплений от 16 и более. Все данные регистрировались при температуре  $30^\circ C$ . Для отнесения сигналов в  $^1H$  спектрах ЯМР использовали подход, основанный на совместном применении 2D  $^1H$ - $^1H$  COSY,  $^1H$ - $^1H$  NOESY,  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC,  $^1H$ - $^{13}C$  HMBC экспериментов ЯМР. Химические сдвиги в миллионных долях (м.д.) отсчитывались от соответствующих сигналов остаточных протонов растворителя (4,72 м.д. для  $^1H$  в  $D_2O$  и в  $CD_3OD$ ).

Для вычисления коэффициентов диффузии для ловастатина в  $CD_3OD$  и ловастатина в растворе с мицеллами использовалась спектроскопия DOSY. Для подбора параметров для 2D DOSY экспериментов были записаны также два одномерных DOSY спектра. Градиенты импульсов увеличивались от 5 до 95% от максимальной силы градиента в линейной рампе. При записи спектров DOSY ширина спектра была выбрана 7 м.д.; число накоплений - 16. Длительность градиента была выбрана 1400 мкс для раствора ловастатина с мицеллами ДФХ и 1200 мкс для раствора ловастатина с мицеллами ДСН. Время задержки 0,24 секунды. Все данные регистрировались при температуре  $30^\circ C$ .

Эксперименты HSQC были получены с использованием адиабатических импульсов для инверсии  $^{13}C$ -последовательности и последовательности GARP для широкополосной развязки  $^{13}C$ , оптимизированной для  $J_{CH} = 135$  Гц. Спектры  $^1H$  -  $^{13}C$  HMBC на большие расстояния выполняли при  $J_{CH} = 7$  Гц.

2D NOESY эксперименты проводились с использованием методики импульсной фильтрации градиента. Задержка релаксации была установлена равной 2,5 с. Время смешивания варьировалось (0,1, 0,2, 0,3, 0,4 и 0,5 с).

В связи с очень малым содержанием  $^{13}C$  в природе, количество накоплений устанавливается намного больше, чем для спектров  $^1H$ ,

соответственно, и время, заторачиваемое на эксперимент, значительно увеличивается. Так, в нашей работе количество накоплений было установлено 192.  $^{13}\text{C}$  ЯМР эксперименты проводились с развязкой от протонов.

Все спектры ЯМР обрабатывались с помощью программного обеспечения TOPSPIN 3.2, отнесение сигналов в спектрах было выполнено в программе MestReNova.

## 2.2 Анализ ЯМР спектров ловастатина в $\text{CD}_3\text{OD}$

$^1\text{H}$  ЯМР спектр ловастатина в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$  представлен на рисунке 16. Для того, чтобы соотнести этот спектр, дополнительно мы использовали спектр COSY (рисунок 17), так мы определили, что сигналы от протонов 6, 7, 4 и 1 имеют химические сдвиги 6.00, 5.82, 5.53 и 5.39 м.д. соответственно. Точно определив хим. сдвиг 4го протона, нашли расположение 3го, так как он является единственным соседом с 4м протоном, соответственно в спектре COSY (Рисунок 17) кросс-пик наблюдается именно с 3м (2,45 м.д.). У 3го протона помимо 4го есть еще 2 соседа (2 и 19), с которыми мы также наблюдаем кросс-пики. Сигнал от 2го мы нашли, (1,99 м.д.). Подобным образом мы нашли х.с. 16, 15, 14, 13 и 12 протонов, начиная от 16. Сигнал от 16го протона расщепляется на 2 в связи с наличием рядом кислорода. Подсчитав интегральные интенсивности, выяснили, что количество протонов под каждым сигналом соответствует их найденной интегральной интенсивности, что еще раз подтверждает наше соотнесение.

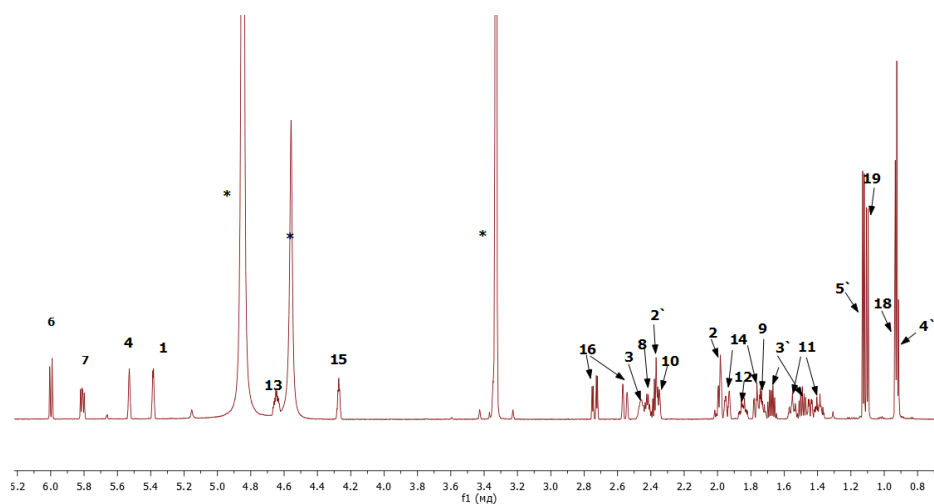


Рисунок 16 —  $^1\text{H}$  ЯМР спектр ловастатина в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $T=303\text{K}$ ,  
звездочками отмечены остаточные сигналы растворителя.

В эксперименте 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY использовали тот же раствор ловастатина в метаноле, что и в предыдущем  $^1\text{H}$  эксперименте.

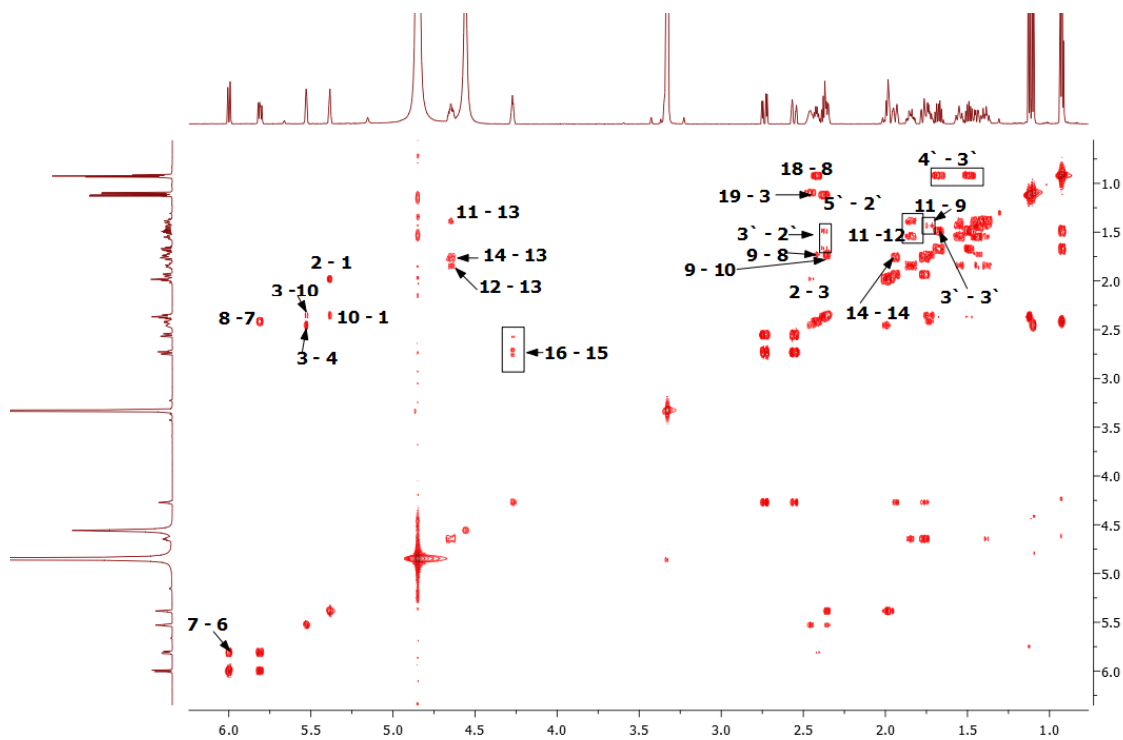


Рисунок 17 — 2D спектр  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ловастатина в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  
 $T=303\text{K}$ .

На данном эксперименте видно, какие протоны связаны между собой спин-спиновым взаимодействием. В связи с тем, что  $^1\text{H}$  эксперимент не

всегда позволяет определить принадлежность тех или иных близкорасположенных сигналов к определенному ядру, был сделан эксперимент COSY, помогающий сделать более точное соотнесение. Так, мы начали соотносить COSY спектр с ядер, которые уже хорошо разрешены на  $^1\text{H}$  спектре, а именно СН -1,4,6,7,15. На структуре видно, что ядро СН -8 расположено рядом с СН -7, следовательно, они должны давать кросс-пики, который мы и наблюдали на пересечении с ядром СН-7, так определили величину химического сдвига СН-8 (2,27 м.д.). Важно обратить внимание на то, что без помощи COSY спектра мы бы не смогли узнать точное значение химического сдвига (х.с) ядра СН-8 из-за очень близкого расположение, и даже наложения друг на друга сигналов в этой области. Найдя х.с. от СН-8, по цепочки можем найти х.с. от ядра СН-9(1,63 м.д.). Изначально мы не могли определить, какой из сигналов в области от 0.8 до 1 м.д. относится к ядру СН-4', а какой к СН-18. Зная, что кросс-пики в эксперименте COSY появляются только от рядом расположенных ядер, можем с уверенностью утверждать, что кросс-пик при 0,83 м.д. принадлежит СН<sub>3</sub>-18, так как он расположен на пересечении с сигналом СН-8. Соответственно второй сигнал при 0,8 м.д. принадлежит СН-4'. Рядом с ядром СН-4' только один сосед: СН-3', следовательно, наблюдаемые на пересечении с СН-4' сигнал принадлежит именно СН-3'(1,39 и 1,59 м.д.). Видим, что сигнал от СН-3' расщепляется на 2 сигнала, что вполне ожидаемо в связи с относительной близостью с кислородом. У ядра СН-3' помимо СН-4' есть сосед СН-2'. Следовательно, наблюдаемый на пересечении с СН-3' в области 2,26 кросс-пик принадлежит СН-2'. Аналогично СН-4', ядро СН-5' располагается рядом только с одним ядром, а именно с СН-2', кросс-пик которого уже определили. Несмотря на то, что СН-2' имеет три связи, только двое из соседей имеют ядра  $^1\text{H}$ , на которых снимается спектр, таким образом на пересечении с сигналом СН-2' остался один несоотнесенный кросс-пик, принадлежащий СН-5'(1,01 м.д.).

Вернемся к соотношению с другой стороны структурной формулы ловастатина, так как рядом с  $\text{CH}_2-5'$  и  $\text{CH}_2-2'$  больше нет видимых ЯМР спектру ядер. Так, на пересечении с сигналом от  $\text{CH}_2-9$  наблюдаем два кросс-пика, что также ожидаемо: возле  $\text{CH}_2-9$  два соседа,  $\text{CH}_2-10$  и  $\text{CH}_2-11$ . Для того, что разрешить, какой из сигналов к кому относимся, вспомним про  $\text{CH}_2-1$ . Его ХС нам известен (5,27 м.д.) из предварительного соотношения  $^1\text{H}$  спектра.  $\text{CH}_2-10$  должен давать сразу два кросс-пика: с  $\text{CH}_2-1$  и  $\text{CH}_2-9$ , ХС которых мы уже знаем. Найдя такой сигнал, дающий кросс-пики: с  $\text{CH}_2-1$  и  $\text{CH}_2-9$ , определяем ХС  $\text{CH}_2-10$  равный 2,22 м.д. Следовательно, остальные сигналы с  $\text{CH}_2-9$ , которых осталось два, будут принадлежать  $\text{CH}_2-11$  (1,31; 1,43 м.д.). Получается, что сигнал от  $\text{CH}_2-11$  также расщепляется. Рядом с  $\text{CH}_2-11$  осталось только одно ядро -  $\text{CH}_2-12$  (1,45 м.д.). Однако, несмотря на отсутствие других соседей возле  $\text{CH}_2-11$ , при 4,43 м.д. на пересечении с  $\text{CH}_2-11$  виден еще один мало интенсивный сигнал, принадлежащий  $\text{CH}_2-13$ . Редко такое явление наблюдается, и появление слабо интенсивного кросс-пика говорит лишь о наличии, хоть и малом, спин-спиновом взаимодействии через более чем 2 связи. Подтверждением того, что сигнал при ХС 4,53 принадлежит  $\text{CH}_2-13$ , является наличие высоко интенсивного кросс-пика с  $\text{CH}_2-12$ .

Зная ХС  $\text{CH}_2-13$  и  $\text{CH}_2-15$ , легко определим ХС  $\text{CH}_2-14$  (1,65; 1,81), так как наблюдаем кросс-пик именно в этих областях. Вновь, как и  $\text{CH}_2-3'$ , сигнал от  $\text{CH}_2-14$  расщеплен, что связано с наличием рядом, гидроксильной группы.  $\text{CH}_2-15$  находился рядом с  $\text{CH}_2-16$ , так мы найдем его ХС.  $\text{CH}_2-16$  (2,43; 2,62) имеет достаточно сильное расщепление и причины тому две веские причины: наличие рядом гидроксильной группы -ОН и кислорода.

Для определения оставшихся трех ядер,  $\text{CH}_2-2$ ,  $\text{CH}_2-3$  и  $\text{CH}_2-13$ , обратимся к ранее уже соотношенным ядрам  $\text{CH}_2-1$  и  $\text{CH}_2-4$ . Так, в области 1,86 м.д. наблюдается сигнал с  $\text{CH}_2-1$ , который и принадлежит  $\text{CH}_2-2$ . Ядро  $\text{CH}_2-3$  предположительно должно давать кросс-пики как с  $\text{CH}_2-2$ , так и  $\text{CH}_2-4$ . И

такой сигнал мы видим в области 2,34, принадлежащий  $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-3}$ . Благодаря кросс-пику от сигналов от  $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-19}$  и  $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-3}$ , найдем ХС ядра  $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-19}$  (0,98).

Таким образом были соотнесены все ядра водорода ловастатина в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Для определения химических сдвигов ядер углерода ловастатина, связанных с ядрами водорода через одну связь, был снят спектр  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  HSQC приведенный на рисунках 18, 19. Так, например,  $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-1}$  наблюдается в области 68.39 м.д., рядом с ним на углеродном спектре  $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-13}$  и  $\underline{\text{C}}\underline{\text{H}}\text{-15}$ , имеющие ХС 76,74 и 61,99 м.д. соответственно. Большая часть сигналов расположена в области 10-50 м.д. Полученные значения химических сдвигов приведены в таблице 1.

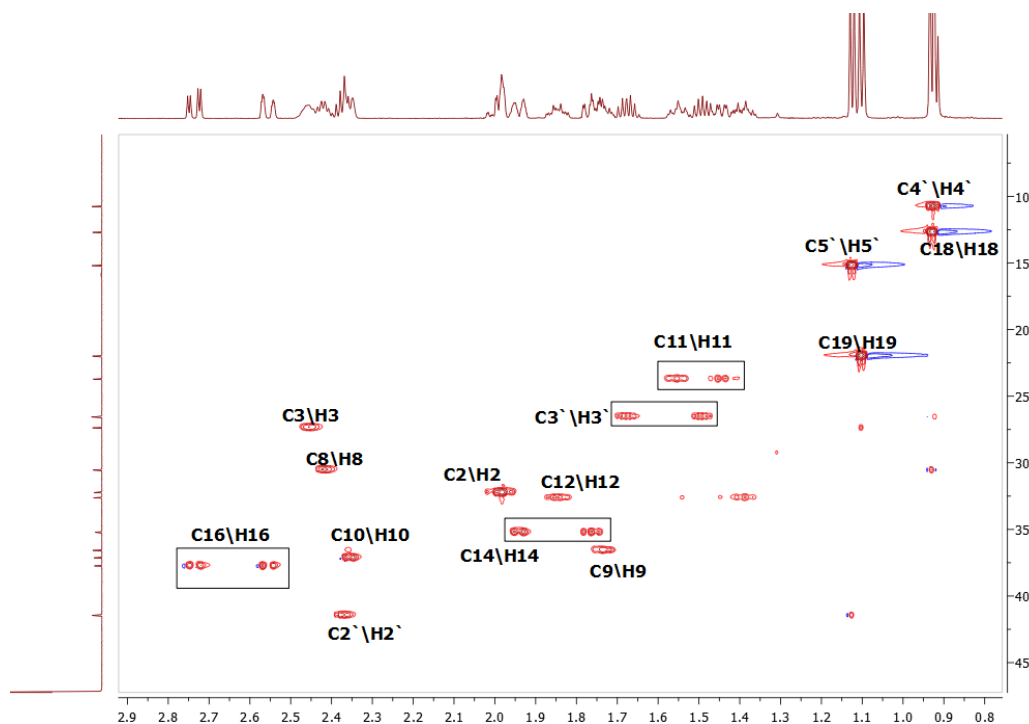


Рисунок 18 – Часть ЯМР спектра 2D  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  HSQC ловастатина в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $T=303\text{K}$  (от 0 м.д. до 2.9 м.д. по водороду и от 0 м.д. до 50 м.д. по углероду)

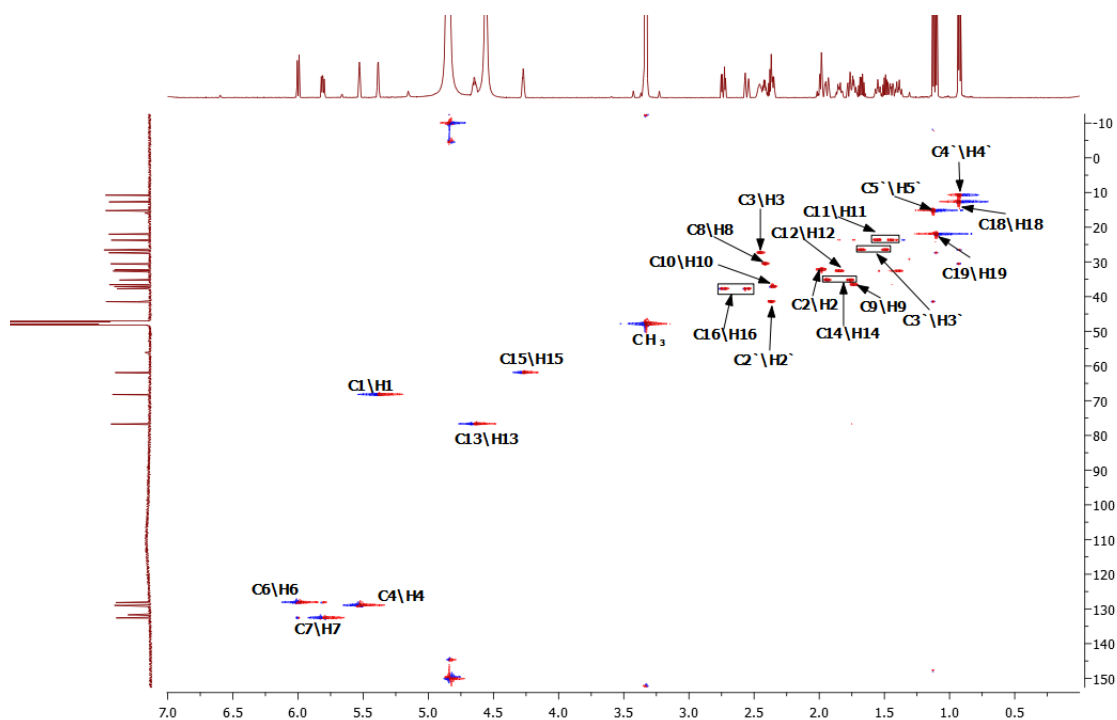


Рисунок 19 - 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC спектр ЯМР ловастати́на в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $T=303\text{K}$  (полный).

С помощью спектра HSQC были определены не все химические сдвиги ядер углерода. Те ядра углерода, не содержащие ядра водорода непосредственно, не дают кросс-пики на спектре HSQC. В связи с чем записали спектр НМВС (Рисунки 20, 21). С помощью спектра НМВС были определены химические сдвиги ядер углерода, не связанных на прямую с ядрами водорода, но влияющих на них посредством спин-спиновой через 3-4 связи. Так, например, C-5 расположен в области 131.44 м.д. Ядра C-17 и C-1' сильно смещены в область сильных полей, так как они располагаются рядом с кислородом. ХС ядра C-1' равен 177.01 м.д, рядом с ним в углеродном спектре ядро C-17 (172,76 м.д.). Спектр НМВС является дополнительным подтверждением правильности соотнесения углеродного спектра ловастати́на в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Таким образом была составлена полная таблица химических сдвигов ядер углерода (таблица 1). Сам углеродный спектр ловастати́на в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$  представлен на рисунке 22.

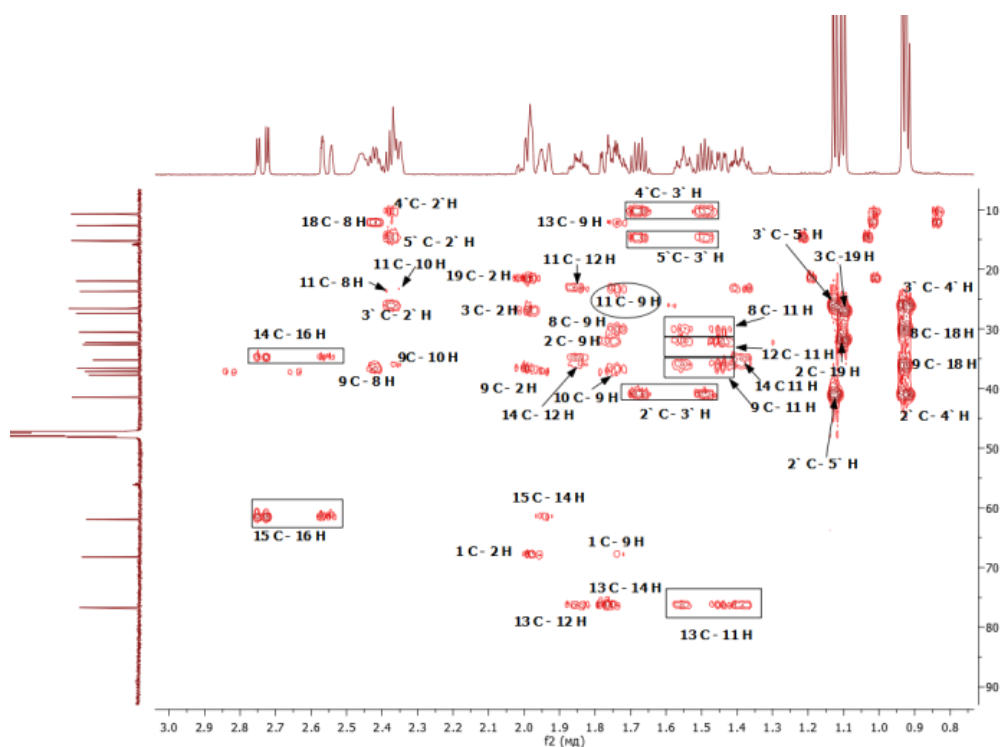


Рисунок 20 — 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМВС спектр ЯМР ловастати́на в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $T=303\text{K}$  (от 0 м.д. до 2.9 м.д. по водороду и от 0 м.д. до 90 м.д. по углероду)

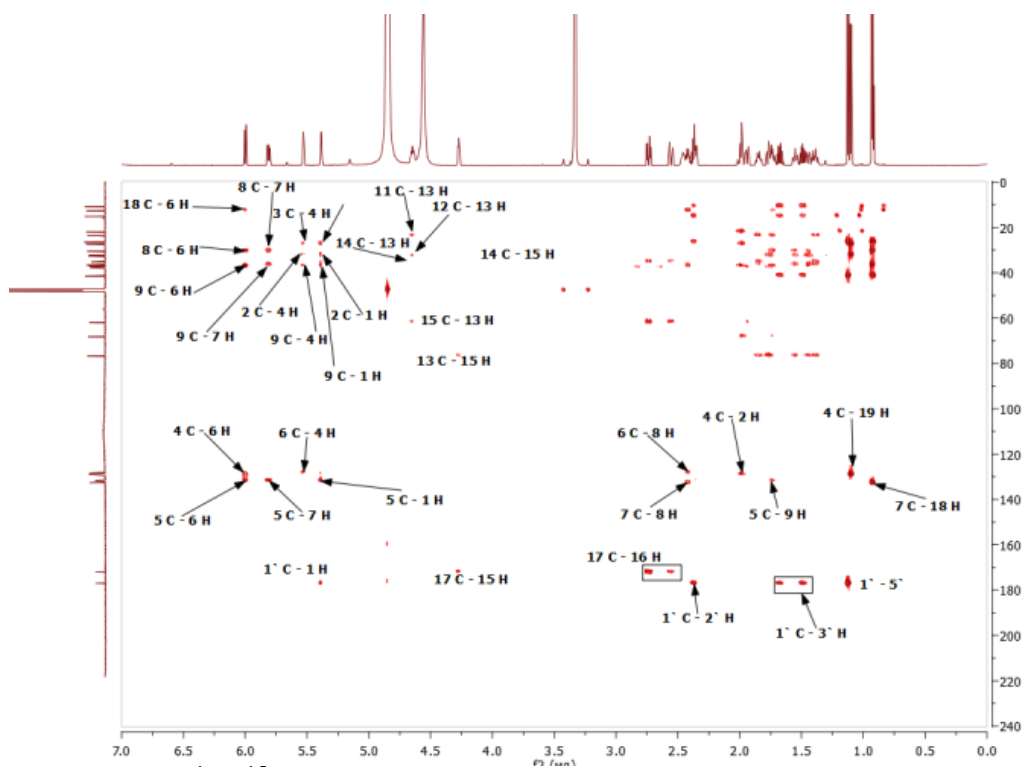


Рисунок 21 — 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМВС спектр ЯМР ловастати́на в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $T=293\text{K}$  (полный)

Видим, что характерные области углеродного ЯМР спектра расположены между 10 и 50 м.д.



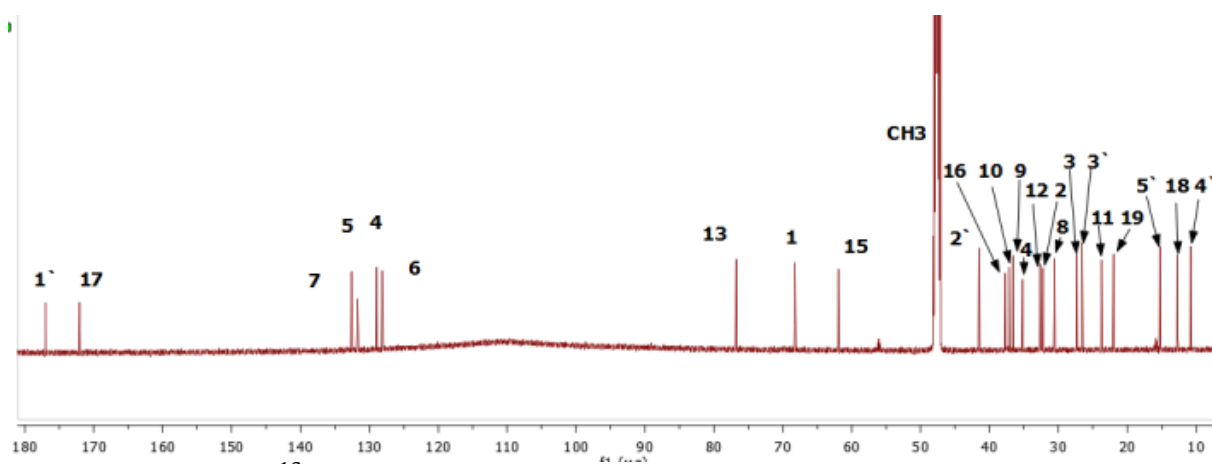


Рисунок 22 —  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектр ловастатина в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $T=293\text{K}$

Таким образом, были найдены химические сдвиги ловастатина без мицелл, что необходимо для дальнейшего анализа поведения вещества при добавлении додецилфосфохолина и додецилсульфата натрия. Сравнив результаты экспериментов чистого ловастатина в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$  и в дейтерированной воде с добавлением модельных мембран, мы сможем судить о наличии или отсутствии взаимодействия. И при наличии взаимодействия продолжить исследования более тонкими методами, например ядерной спектроскопии с эффектом Оверхаузера (NOESY) для более глубокого понимания динамики и характера комплексообразования.

## 2.3 Анализ ЯМР спектров ловастатина в растворе с мицеллами додецилфосфохолина

Снятые и соотнесенные спектры ловастатина в растворе с мицеллами ДФХ представлены на рисунках 23 - 25.

На спектре  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ловастатина в растворе с мицеллами ДФХ в  $\text{D}_2\text{O}$  наблюдаются сигналы между ядрами СН-8 и СН-7, СН-6 и СН-7, СН-2 и СН-1, СН-3 и СН-4 также как, и ловастатина в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Помимо всех тех сигналов, что были у ловастатина в растворе  $\text{CD}_3\text{OD}$ , появляются новые сигналы от мицелл, например кросс-пик от части мицеллы С и F. Также сигналы есть между А и В, Е и Н. Также прослеживаются сигналы от В и С. Химические сдвиги ядер ДФХ от частей А, В, С и D равны соответственно 0,81; 1,23; 1,56; 3,53.

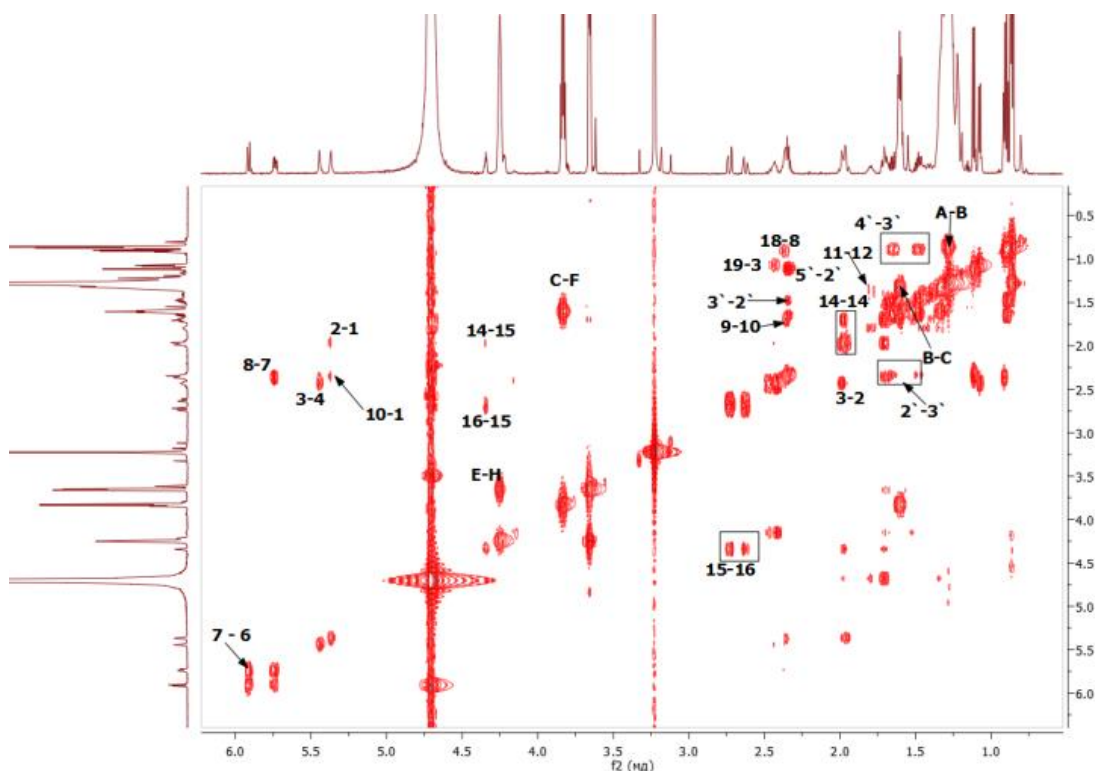


Рисунок 23 — 2D спектр  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ловастатина в растворе с мицеллами ДФХ в  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $T=303\text{K}$

При соотнесении углеродного спектра для дальнейшего сравнительного анализа, использовали ранее описанные эксперименты  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$

HSQC и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC. В связи с отсутствием углеродного спектра, по данные  $^1\text{H}$  спектра смогли найти химические сдвиги углеродов. Так, было определено, что кросс-пик, появляющийся в области 27,54 м.д. относится к  $\text{CH}$ -3.  $\text{CH}$ -2 находится в области 32,62 м.д. Также благодаря спектру HSQC подтвердили, что некоторые расщепленные сигналы, например,  $\text{CH}_2$ - 16 или  $\text{CH}_2$ - 14 действительно относятся к одному углероду. Однако без дополнительного эксперимента невозможно узнать ХС всех углеродов, так как некоторые не имеют рядом с собой водорода, например, C-5,17, 1`.

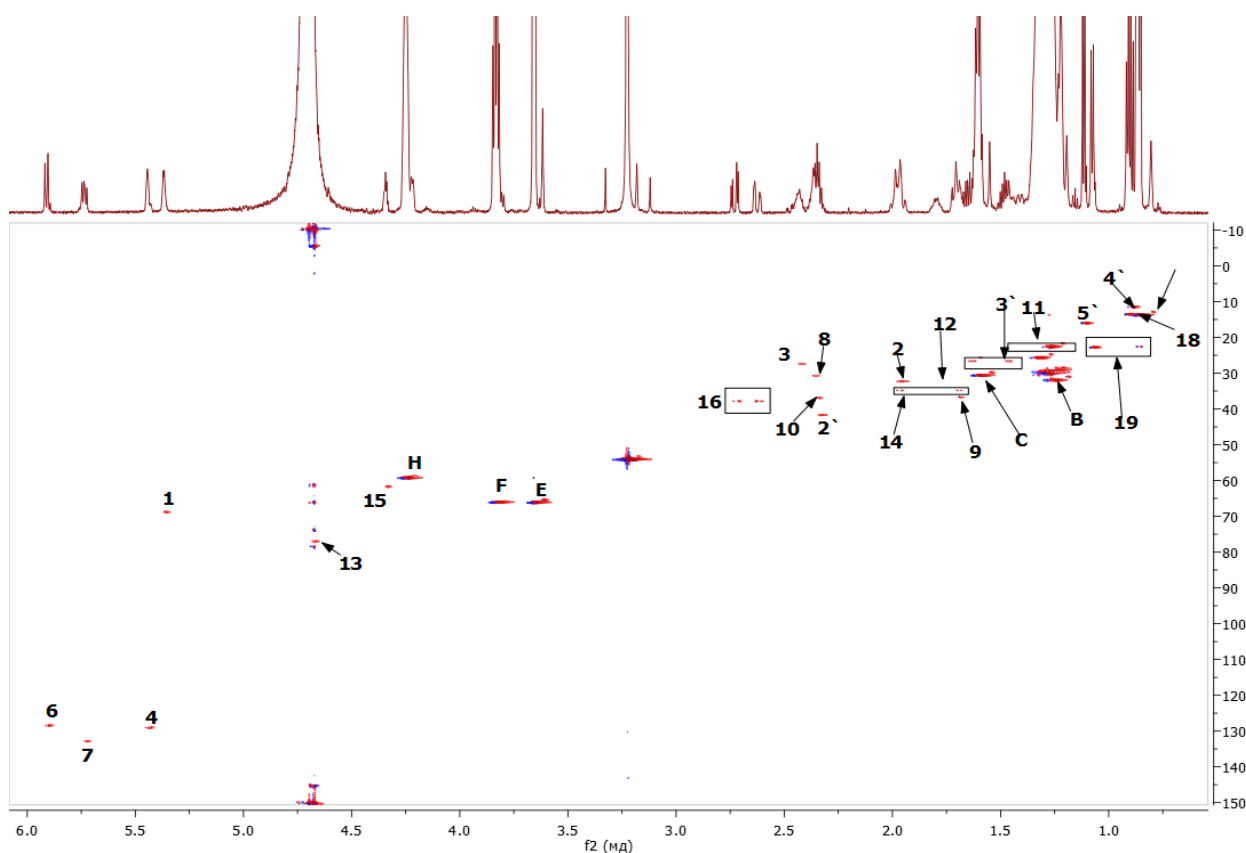


Рисунок 24 — 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC спектр ЯМР ловастатина в растворе с мицеллами ДФХ в  $\text{D}_2\text{O}$

Благодаря спектру НМВС мы определили химические сдвиги ядер углерода, не имеющие рядов ядер водорода. Так, например, ХС C-17 находится в области 173,58, так как в этой области наблюдается кросс-пик между C-17 и  $\text{CH}_2$ -16. А ядро C-5 в области 131,98 м.д, потому что наблюдаются сразу два кросс-пика: C-5 с  $\text{CH}$ -6 и C-5 с  $\text{CH}$ -7. ХС ядра C-1`

нашли благодаря наличию кросс-пиков с  $\text{CH}_2\text{-2}'$  и  $\text{CH}_2\text{-3}'$ . Так, ХС  $\text{C-1}'$  равен 178,32 м.д.

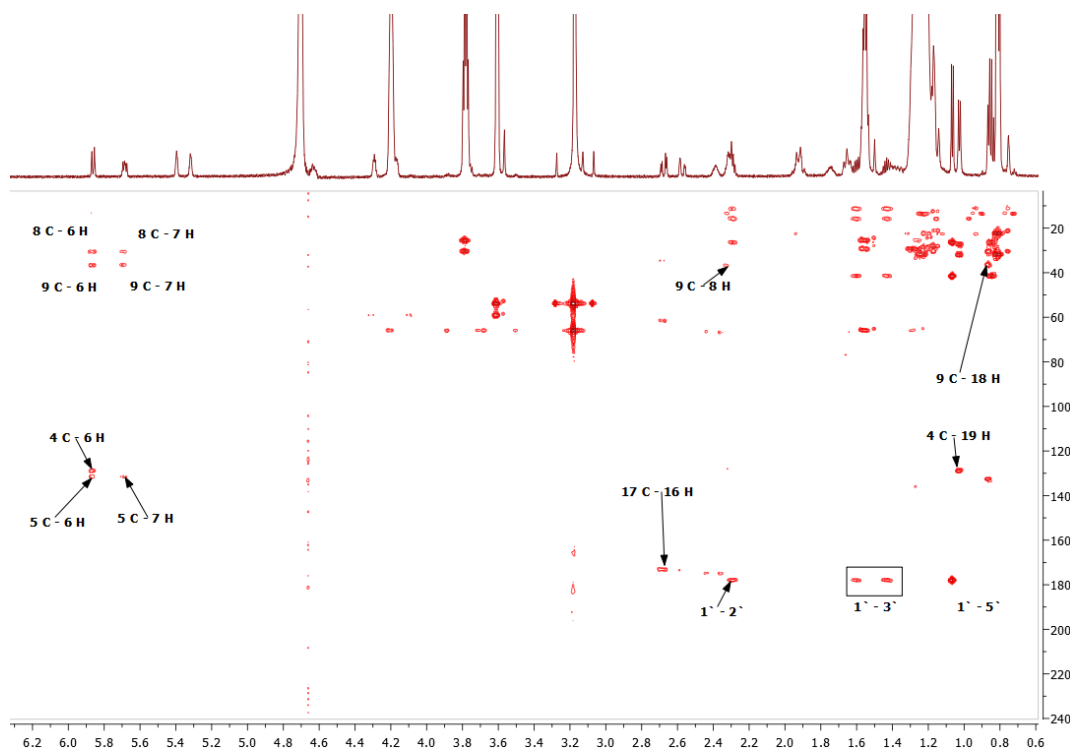


Рисунок 25 – 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  нмвс спектр ЯМР ловастатина в растворе с мицелламиДФХ в  $\text{D}_2\text{O}$

Благодаря наличию данных о ХС ядер углерода в двух растворах ловастатина, можем видеть, что некоторые сигналы изменяются. Данный факт указывает на возможность комплексообразования мицеллы и изучаемого нами вещества.

## 2.4 Исследование комплексообразования ловастатин – додецилсульфат натрия и ловастатин -додецилфосфохолин в растворе D<sub>2</sub>O

Для исследования комплексообразования ловастатин – додецилсульфат натрия и ловастатин -додецилфосфохолин в растворе D<sub>2</sub>O был проведен сравнительный анализ <sup>1</sup>H спектров в трех растворах (Рисунок 26).

Спектр ловастатина с растворе с мицеллами ДСН был соотнесен с помощью имеющихся отдельных спектров ловастатина и ДСН.

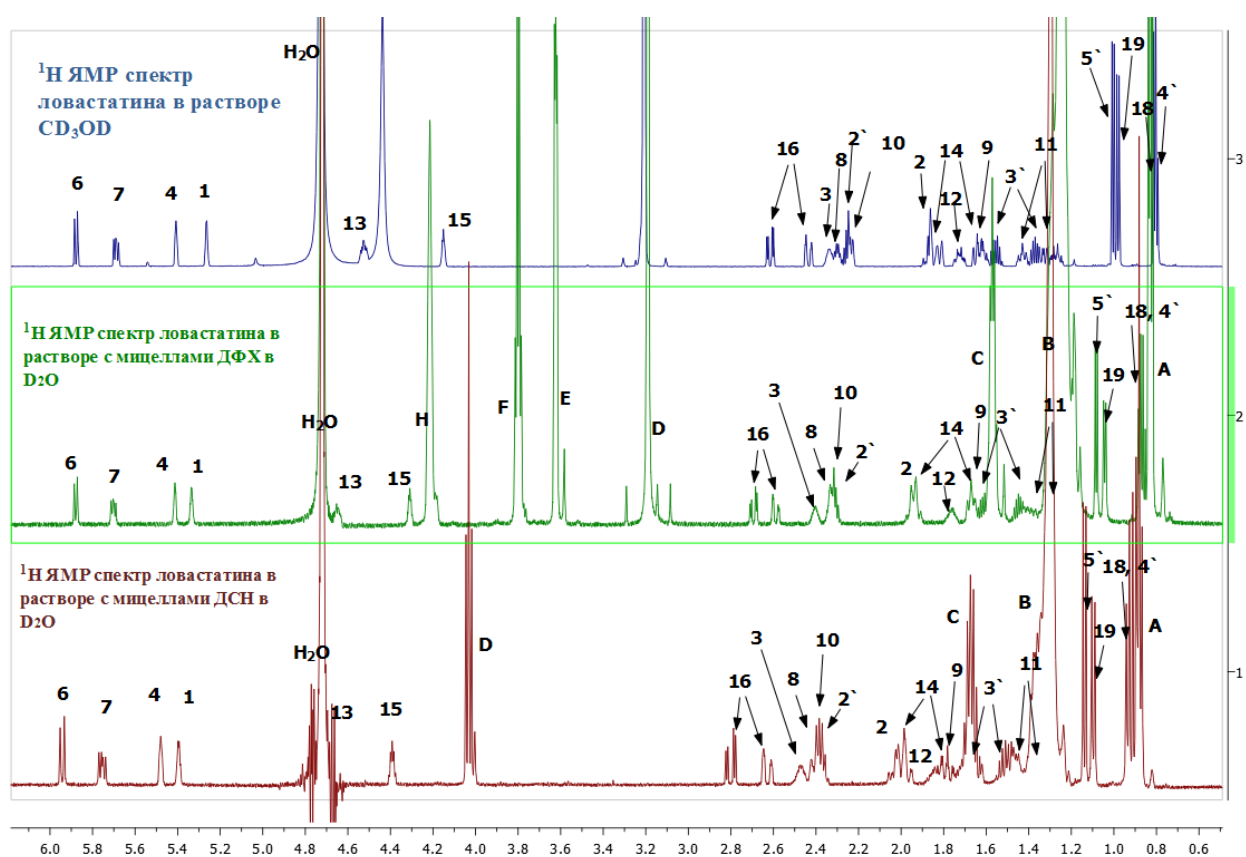


Рисунок 26 - Сравнение трех <sup>1</sup>H спектров ловастатина: а) в CD<sub>3</sub>OD; б) в растворе D<sub>2</sub>O с мицеллами ДФХ; в) в растворе D<sub>2</sub>O с мицеллами ДСН. Цифрами обозначены сигналы ловастатина, буквами сигналы мицелл ДФХ и

Можно заметить, что при добавлении мицелл химические сдвиги некоторых сигналов изменяются больше, а какие-то остаются практически без изменений. Например, сигнал от ядра СН-1 в растворе с мицеллами ДФХ

смещается в область сильных полей, также как и  $\text{CH}_2-2$  (в  $\text{CD}_3\text{OD}$  ХС был 1,86, в растворе  $\text{D}_2\text{O}$  с мицелламиДФХ стал 1,94). Сигнал от  $\text{CH}-10$  был смещен в область сильных полей на 0.8 м.д. и стал 2,30 м.д. Наибольшее смещение наблюдается у сигналов  $\text{CH}-13$ ,  $\text{CH}-15$  и  $\text{CH}_2-16$ .

В растворе ловастатина с мицелламиДСН видим большие изменения. Так, например, в растворе сДФХ наибольшее смещение равнялось 0.1 м.д., то в растворе сДСН разница в ХС достигает 0.4 м.д. Так,  $\text{CH}_2-2$  в  $\text{CD}_3\text{OD}$  имел ХС 1,45м.д., то в растворе сДСН ХС стал 1,86 м.д. Эти изменения говорят о возможном образовании межмолекулярного комплекса ловастатина с мицеллами.

Таблица 1

ХС ЯМР ядер углерода и водорода.

№	Ловастатин+CD <sub>3</sub> OD		Ловастатин +ДФХ+дДФХ+D <sub>2</sub> O		Ловастатин +ДСН+дДСН +D <sub>2</sub> O
	$\delta$ <sup>1</sup> H, м.д.	$\delta$ <sup>13</sup> C, м.д.	$\delta$ <sup>1</sup> H, м.д.	$\delta$ <sup>13</sup> C, м.д.	$\delta$ <sup>1</sup> H, м.д.
1	5,27	68,49	5,32	69,99	5,39
2	1,86	32,49	1,94	32,62	2,02
3	2,34	27,54	2,39	27,54	2,47
4	5,41	129,35	5,40	129,41	5,48
5	-	131,44		131,98	
6	5,88	128,11	5,86	128,49	5,94
7	5,69	132,76	5,69	133,06	5,75
8	2,27	30,94	2,32	30,79	2,42
9	1,63	36,82	1,64	36,89	1,78
10	2,22	37,75	2,30	37,19	2,38
11	1,31 1,43	23,83	1,27 1,37	23,58	1,35 1,45
12	1,45	32,80	1,75	32,93	1,86
13	4,53	76,74	4,63	77,51	4,65
14	1,65 1,81	35,28	1,67 1,91	35,06	1,81 1,99
15	4,15	61,99	4,29	62,17	4,39
16	2,43 2,62	38,27	2,57 2,68	38,10	2,61 2,79
17	-	172,76		173,58	
18	0,83	12,79	0,88	13,93	0,94
19	0,98	22,59	1,03 0,86	22,97	1,09
1'	-	177,01		178,32	
2'	2,26	41,46	2,28	41,96	2,36
3'	1,39 1,56	26,61	1,43 1,6	26,93	1,53 1,65
4'	0,80	10,93	0,90	11,80	0,90
5'	1,01	15,57	1,07	16,70	1,14

По данным таблицы видим, что некоторые сигналы <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C действительно смещаются в область сильных полей, то есть наблюдается взаимодействие мицеллы и ловастатина. Последующие эксперименты направлены на изучение способа взаимодействия исследуемого вещества с модельными мембранами

Чтобы проверить, связывается ли ловастатин с модельными мембранными, были измерены коэффициенты диффузии ловастатина в  $CD_3OD$  и в растворе с мицеллами ДФХ и ДСН в  $D_2O$  (Таблица 2).

Измерения проводились с помощью эксперимента 2D DOSY ЯМР. Коэффициент диффузии ловастатина в растворе  $CD_3OD$  равен  $30 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ , что на порядок выше, чем ловастатина в растворах с мицеллами. Так, коэффициент диффузии ловастатина с ДФХ в  $D_2O$  –  $9,8 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ , а ловастатина с ДСН в  $D_2O$  –  $8,9 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ . Коэффициент диффузии показывает степень подвижности частицы. Соответственно, чем больше частица, тем меньше ее подвижность и меньше ее коэффициент диффузии, что мы и видим по нашим данным. Также можем утверждать, что уменьшение коэффициента диффузии ловастатина связано именно с добавлением мицелл, что видно по данным таблицы 2: порядок коэффициента диффузии ловастатина в растворе  $D_2O$  с мицеллах ДФХ и ДСН почти такой же, как порядок коэффициента диффузии молекул ДФХ ( $D=8,3 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ ) и ДСН ( $D=7,6 \cdot 10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ ). Этот факт указывает на то, что образуется молекулярный комплекс ловастатина с модельной мембраной в растворе  $D_2O$ . Для подсчета доли связанных статинов в растворе с мицеллами использовали соотношение:

$$D_{\text{л}} = x \cdot D_{\text{д}} + (1 - x)D_{\text{лд}} \quad (19)$$

где  $D_{\text{л}}$  - коэффициент самодиффузии ловастатина в  $CD_3OD$ ,  $D_{\text{д}}$  - коэффициент самодиффузии мицеллы,  $D_{\text{лд}}$  - коэффициент самодиффузии ловастатина в растворе с мицеллами,  $x$  – доля связанного ловастатина с мицеллой.

Подставив наши значения в соотношение (19), видим, что доля связанных статинов в растворе с мицеллами ДФХ составляет 93%, в растворе с мицеллами ДСН – 94%.



Коэффициенты самодиффузии ( $10^{-11} \text{ м}^2/\text{с}$ )

Ловастатин +CD <sub>3</sub> OD	Ловастатин +ДФХ+дДФХ+ D <sub>2</sub> O	ДФХ	Ловастатин +ДСН+дДСН+ D <sub>2</sub> O	ДСН
30	9,8	8,3	8,9	7,6
Доля связанных статинов в растворе с мицеллами ДФХ:				93%
Доля связанных статинов в растворе с мицеллами ДСН:				94%

Результаты экспериментов DOSY показали, что ловастатин связывается с модельными мембранами в растворе D<sub>2</sub>O.

Для установления положения ловастатина в мицеллах использовали спектроскопию Ядерного Эффекта Оверхаузера, 2D NOESY эксперименты. Данный эксперимент позволяет установить точную структуру межмолекулярного комплекса и установить точные фрагменты молекул ответственных за связывание. Была записана серия 2D NOESY экспериментов для ловастатина в растворе с мицеллами ДФХ и ДСН в D<sub>2</sub>O.

На представленных спектрах наблюдаются кросс-пики между мицеллами и ловастатином. Видно, что на рисунке (рисунок 27), выделены сигналы между группой В мицеллы и ядер водорода ловастатина СН<sub>1</sub>-1, 4, 6 и 7. Также у части мицеллы Н наблюдается кросс-пик с СН<sub>2</sub>-16. Есть несколько сигналов от взаимодействия части Е, например, с СН<sub>2</sub>-11 и СН-5. Ядра ловастатина СН<sub>3</sub>-4' и СН<sub>3</sub>-18 в пространственной близости (то есть на расстоянии менее, чем 5 Å) с частью мицеллы F.

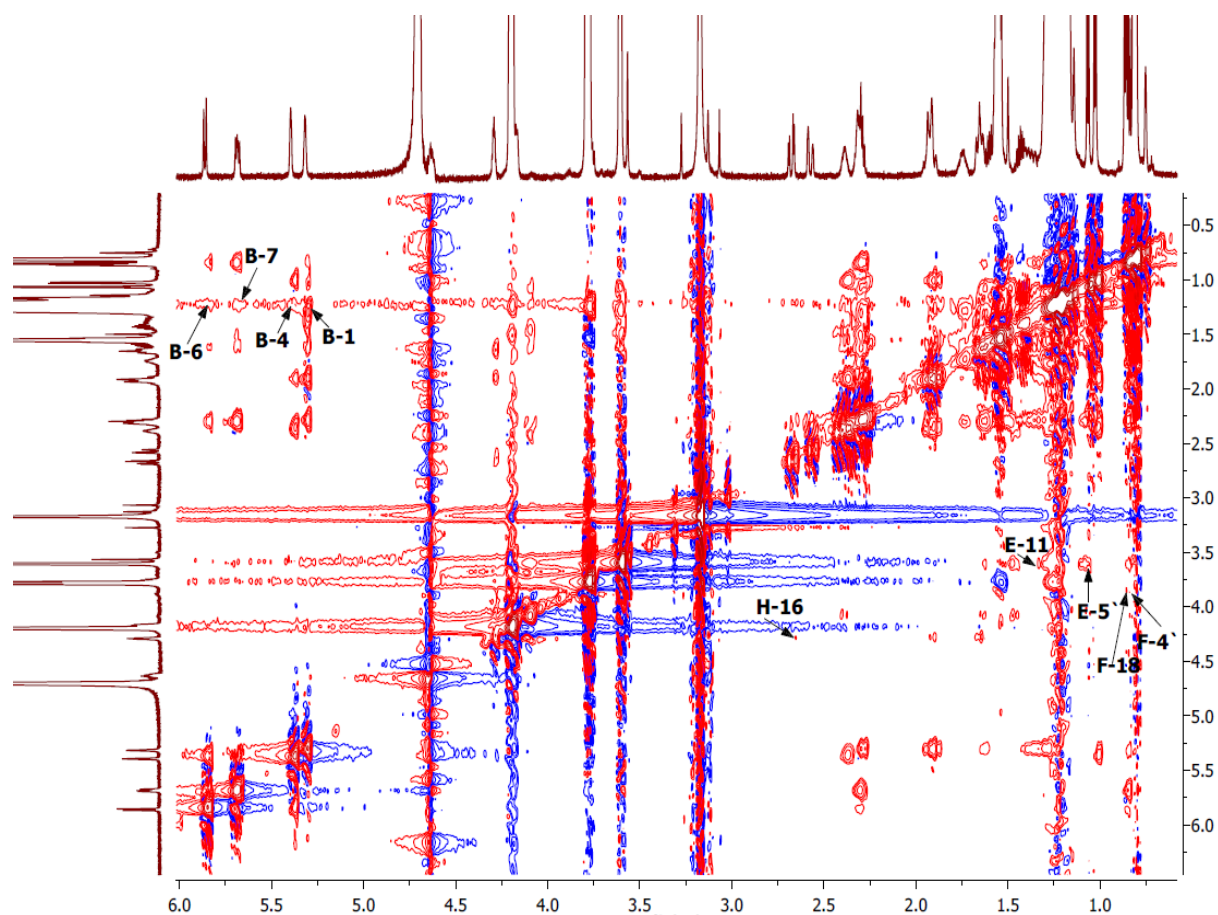


Рисунок 27 —Спектр  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY ловастатина в растворе с мицеллами ДФХ в  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\tau_m=500\text{мс}$

На спектре  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY ловастатина в растворе с ДСН в  $\text{D}_2\text{O}$  (рисунок 28) наблюдается меньше кросс-пиков от мицеллы и исследуемого вещества. Так, например, есть сигнал между частями А, В мицеллы и ядром СН-7. Есть несколько сигналов части мицеллы С с разными ядрами, например, с СН-6, 7 и СН<sub>2</sub>-2.

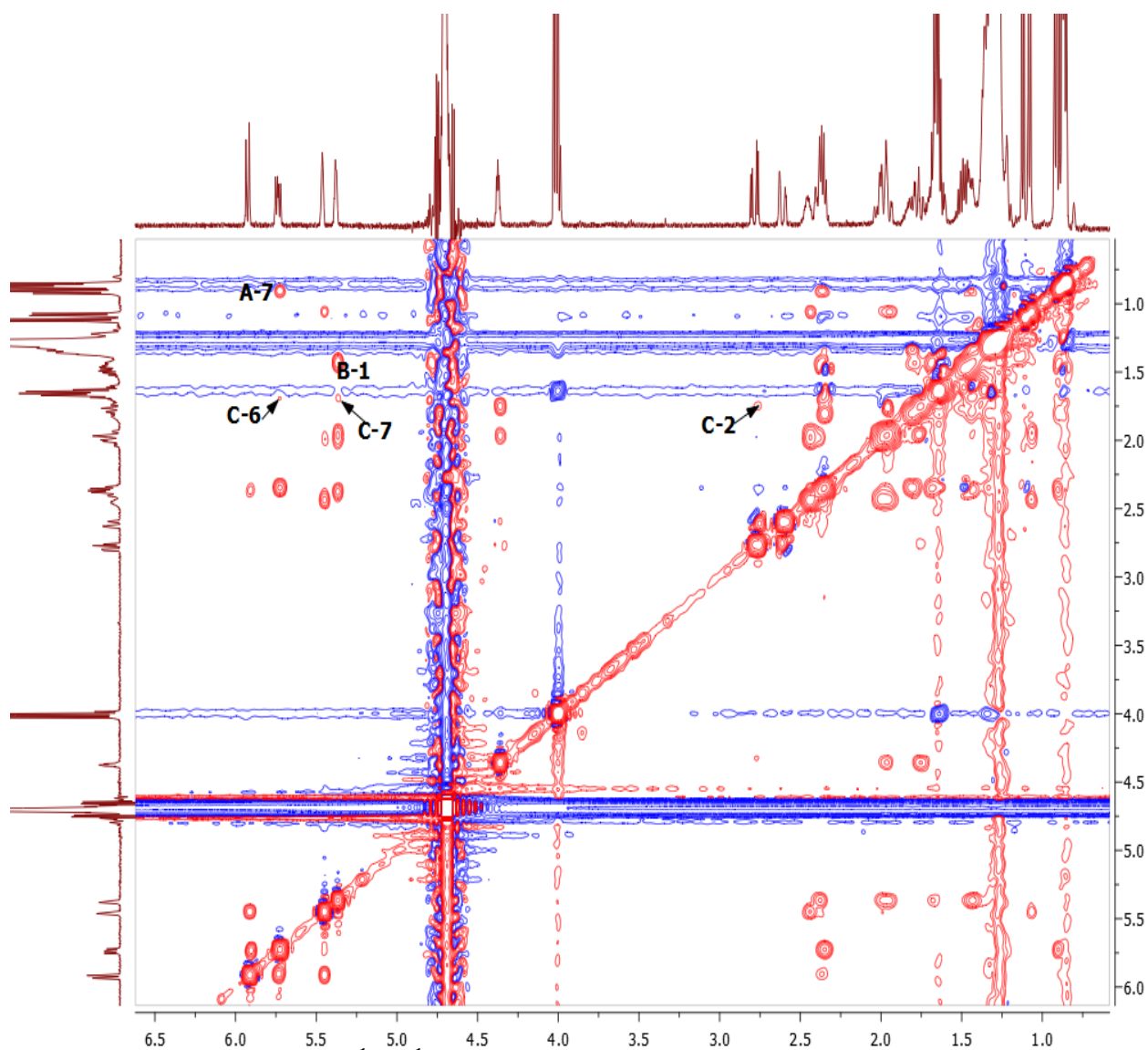


Рисунок 28 — Спектр  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY ловастатина в растворе с мицеллами ДСН в  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\tau_m=460\text{мс}$

Благодаря данным экспериментов 2D NOESY выяснили, что ловастатин проникает в пространство между углеводородными цепями мицеллы ДФХ и ДСН. На рисунке 29а, 29б показано схематичное расположение ловастатина в мицеллах. Видим, что ловастатин проникает более глубоко в мицеллу ДСН, чем ДФХ.

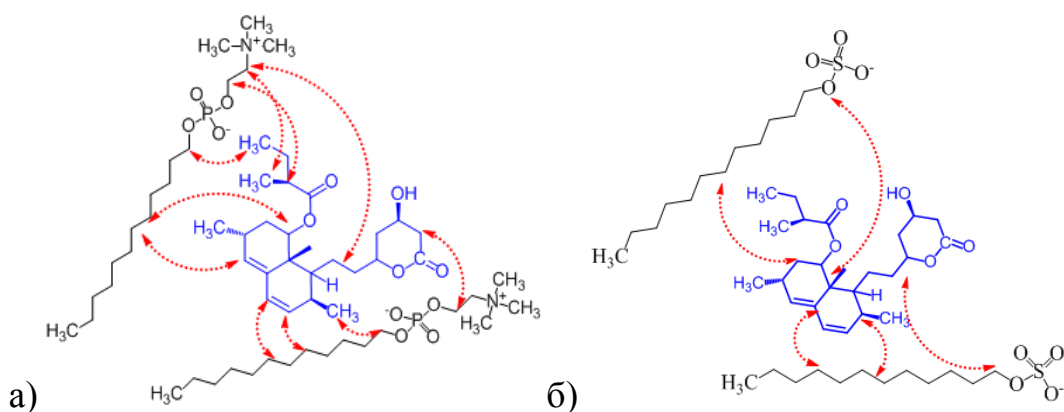


Рисунок 29. Схематическое представление нахождения ловастатина в мицеллах : а) ДФХ и б) ДСН. Стрелками обозначены межмолекулярные сигналы ЯЭО, полученные в ходе экспериментов 2D NOESY.

Сравнивая результаты экспериментов для других статинов с мицеллами ДФХ, стоит отметить, статины по-разному расположены в модельной мембране (Рисунок 30). Церивастатин полностью проникает в ядро модельной мембраны. Симвастатин внедряется в пространство между углеводородными «хвостами» мицеллы ДФХ. Флувастатин слабо проникает на поверхность мицеллы благодаря своей липофильной циклической части, и в конечном итоге правастатин слабо связывается с полярными «головками» молекул ДФХ и не проникает под поверхность модельной мембраны [31,32]. Вещества были изучены в жидкой среде, являющейся естественной для этих соединений в организме человека. Правастатин и симвастатин изучались в комплексах с мицеллами ДСН [30]. Было установлено, что правастатин прочно связан с полярной поверхностью мембран мицелл ДСН, в то время как симвастатин глубоко проникает в их углеводородное ядро. Таким образом, несмотря на то, что качественные результаты исследования правастатина и симвастатина в мицеллах ДСН в целом такие же, как в растворе ДФХ, взаимодействие этих статинов с модельными мембранами на основе ДСН представляется более сильным, чем с мицеллами ДФХ [8, 31-32]. Недавние ЯМР исследования статинов с бислоями РОРС (рисунок 31)

показали, что статины также формируют комплекс с модельными мембранами, однако глубина проникновения зависит от типа используемого бислоя. Также положение ловастатина в данной работе установить не удалось, однако было показано, что ловастатин снижает параметр порядка в бислое [33].

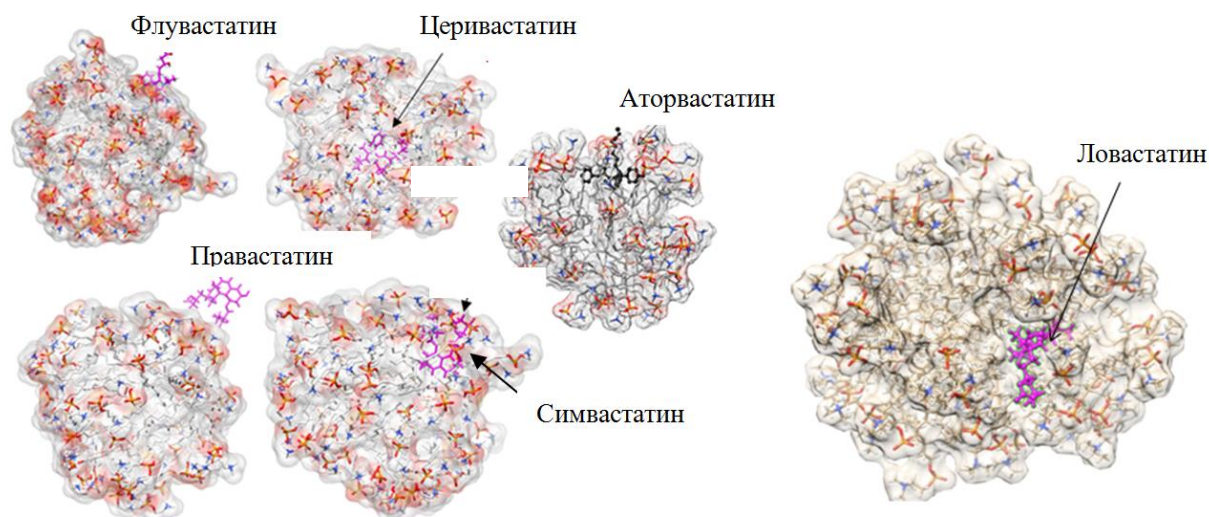


Рисунок 30 -Схематичное представление молекулярного комплекса различных статинов в мицелле

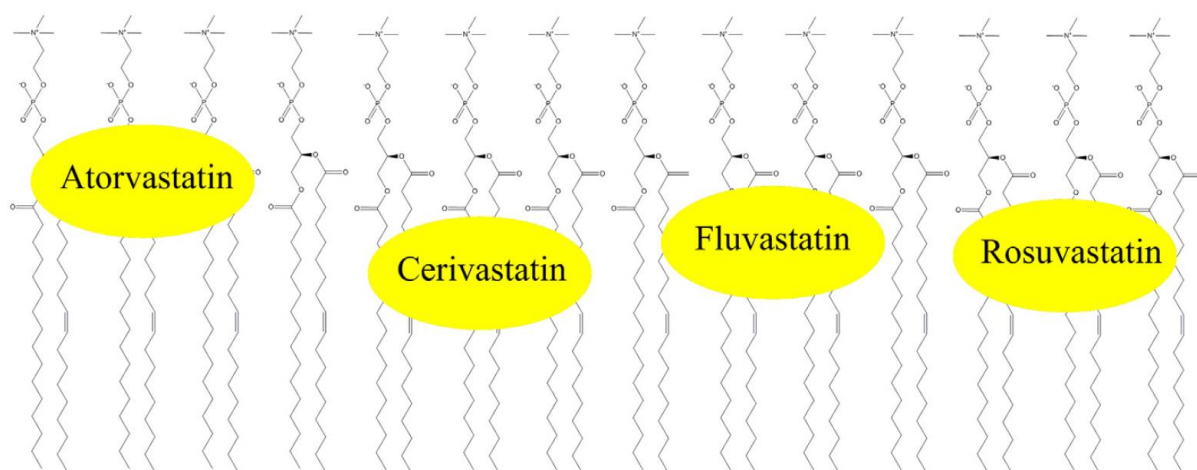


Рисунок 31 — Схематическое представление среднего положения церивастатина, аторвастатина, флувастатина и розувастатина в РОРС бислойной мембране. У правастатина только небольшая часть связывается с

мембраной. Для ловастатина определение положения было невозможным из-за перекрытия сигналов на спектрах  $^1\text{H}$  MAS ЯМР [33].

Как говорилось вначале, есть предположение, что взаимодействие статинов с клеточной мембраной коррелирует с их фармакологическими свойствами [34]. Например, флувастатин, который расположен на поверхности, имеет меньшую вероятность образования рабдомиолиза, чем симвастатин, который находится между гидрофобными хвостами мицеллы. С другой стороны, флувастатин, который в растворе  $\text{D}_2\text{O}$  с мицелламиДФХ на поверхности, снижает холестерин хуже, чем симвастатин. Проанализировав подобным образом другие статины, можно сделать предположение, что чем глубже находится статин в мицелле, тем лучше он снижает холестерин (Таблица 3) [8].

Связь между расположением статинов относительно мицеллы ДФХ и их фармакологическими свойствами [32]

		Аторвас татин	Праваст атин	Симвас татин	Флувас татин	Церивас татин	Ловаста тин
Процентное изменение концентрации холестерина ЛПНП в плазме с одобренными дозами статинов у пациентов с гиперхолестеринемией	Доза, мг/день	20	20	20	20	0.8	20
	ЛПНП холестерин, %	-46	-24	-35	-17	-45	-29
Показатели заболеваемости в миллионных долях для всех случаев заболевания рабдомиолизом в США, связанных со статинами, до 31 июля 2001 года	Год наблюдения	1997-2001	1992-2001	1992-2001	1994-2001	1998-2001	1987-2001
	Частотность заболевания на миллион	0.30	0.21	0.83	0.03	18.12	1.8
Расположение в мицелле ДФХ		Между гидрофобными хвостами	Слабо связывается с поверхностью	Между гидрофобными хвостами	На поверхности	В гидрофобном ядре	Между гидрофобными хвостами

### 3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Результаты экспериментов показали, что ловастатин формирует комплекс с модельными клеточными мембранами на основе мицеллДФХ и ДСН. Ловастатин проникает в пространство между углеводородными цепями мицеллыДФХ и ДСН (Рисунок 32). Однако ловастатин проникает более глубоко в мицеллу ДСН, чемДФХ. Расположение статинов в клеточной мембране является очень важным фактором, определяющим их фармакологические свойства. Следовательно, изучение взаимодействия статинов с модельными мембранами будет полезно для дальнейшего рационального проектирования препаратов [34-36], снижающих уровень холестерина ЛПНП, и для объяснения терапевтического эффекта используемых в настоящее время статинов.

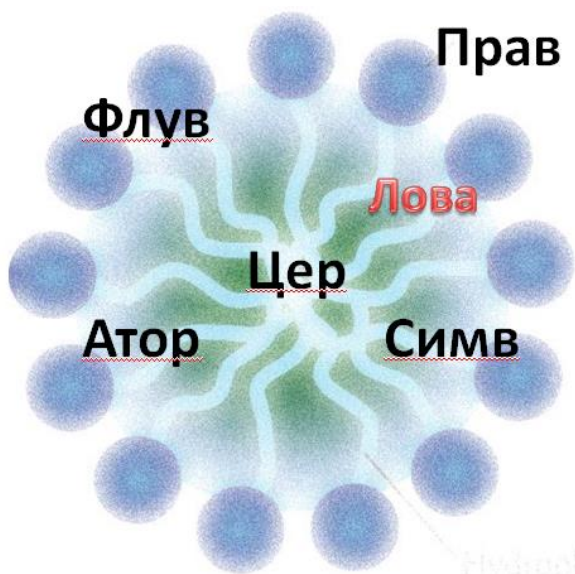


Рисунок 32 – Схематическое представление расположения разных статинов в мицелле



### Список публикаций по теме

1. Д.А. Шарапова, Г.С. Шуршалова, А.В. Аганов, В.В. Ключков. Установление структуры ловастатина в растворе с мицелламиДФХ методами ЯМР спектроскопии. // Сборник тезисов итоговой научно-образовательной конференции студентов КФУ. -Казань: Изд-во Казанского университета, 2019.

2. Д.А. Шарапова. Исследование комплекса ловастатина с мицеллами додецилфосфохолина а также в растворе  $CD_3OD$  методами ЯМР спектроскопии // Сборник тезисов докладов международного молодежного научного форума «Ломоносов-2019». –Москва. Физический факультет МГУ, 2019

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гюнтер, Х. Введение в курс спектроскопии ЯМР [Текст] / Х. Гюнтер. – М.: Мир, 1984. – 478 с.
2. Alarcón J. Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) strains. [Текст]/ Alarcón J, Aguila S, Arancibia-Avila P. et al// Z Naturforsch C 2003– 58(1-2) – 4-62
3. Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors[Текст]/ Endo A..// J Lipid Res 1992– 33 – 1569-1582.
3. Endo A., Kuroda M., Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. [Текст]/ . Endo A., Kuroda M., Tsujita Y//Tokyo 1976 – 29– 1346-1348.
5. Endo A. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML 236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. // Kuroda M., and Tanzawa K. /FEBS Letters 1976 – 72 – 323-326.
6. Alberts A.W. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. / Alberts A.W.,Chen J., Kuron G., et al //Proc Natl.Acad Sci U.S.A 1980– 77–3957-3961
7. Фесенко Э.В. Плейотропные эффекты статиноотерапии и их роль в преодолении проблемы полиморбидности [электронный ресурс]/Фесенко Э.В., Прощаев К.И., Поляков В.И. // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 2.; URL–<http://science-education.ru/ru/article/view?id=5773> (дата обращения: 10.01.2019)
8. I.A. Latfullin, L.F. Galiullina, G.S. Musabirova, O.V. Aganova, Klochkova E.A. Статины и их взаимодействие с модельными клеточными мембранами по данным спектроскопии ядерного магнитного резонанса // Rational Pharmacotherapy in Cardiology, V. 13, 2017.-P. 244-250
9. D.Becker. High Resolution NMR/D.Becker // National Institutes of Health Bethesda Maryland 2000– 32887-6777.– P. 30-35, 83-90

10. Rob kaptein/ Fundamentals of protein nmr spectroscopy 14 Jeener, J. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy [Text] / J. Jeener, B.H. Meier, P. Bachmann, R.R. Ernst // The Journal of Chemical Physics. – 1979 – V. 71 – P.4546-4553
11. Bernhard, Bl. Essential NMR for Scientists and Engineers [Text] / Bl. Bernhard. -Springer-Verlag Berlin Heidelberg.-2005.-V. 25.-P. 5-16
12. Воловенко, Ю.М. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса для химиков [Текст] / Ю.М. Воловенко, В.Г. Карцев, И.В. Комаров, А.В. Туров, В.П. Хиля -М.: Издано Международным благотворительным фондом «Научное партнерство», МБФНПб, 2011.-704с
13. Хауссер К.Х. ЯМР в медицине и биологии: структура молекул, томография, спектроскопия in-vivo / К.Х. Хауссер, К.Х. Кальбитцер. – Киев: Наукова думка, 1993. – 259 с.
14. Johnson C.S. Diffusion Ordered NMR Spectroscopy: Principles and Applications / C.S. Johnson // Prog. NMR Spectrosc. – 1999. – V. 34. - P. 203-215.
15. Stejskal E.O. Restricted Self-Diffusion of Protons in Colloidal Systems by the Pulsed-Gradient, Spin-Echo Method / E.O. Stejskal, J.E. Tanner. // J. Chem Phys. – 1965. – V. 42. - P. 288-292.
16. V´asquez-Bochm LX, Vel´azquez-Paniagua M, Castro-V´azquez SS et al./ Transcriptome-based identification of lovastatin as a breast cancer stem cell-targeting drug, Pharmacological Reports (2019),
17. Todd M. HR-MAS NMR Spectroscopy in Material Science, Advanced Aspects of Spectroscopy / M. Todd, A.E. Jenkins, J.E. Jenkins., M.A. Farrukh (ed.). – Croatia: InTech, 2012. – 536 p
18. Henwood, J. M. and Heel, R. C. (1988) Drugs 36, 429–454
19. Hofsäb C. Molecular dynamics simulations of phospholipid bilayer with cholesterol / C. Hofsäb, E. Lindahl, O. Edholm // Biophys. J. – 2003. – V. 84. – P. 2192-2206

20. Serajuddin, A. T. M., Ranadive, S. A. and Mahoney, E. M. (1991) *J. Pharmaceut. Sci.* 80, 830–834
21. Guillot, F., Misslin, P. and Lemaire, M. Hydrophilicity/ lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMGCoA reductase inhibitors // *Lehninger Principles of Biochemistry*, W.H. Freeman And Company– New York, 2008 –1993–339-346
23. E. Strandberg, A. S. Ulrich. *Concepts Magn. Reson. A* 2004, 23, 89–120.
24. P. Damberg, J. Jarvet, A. Graslund. *Methods Enzymol.* 2001, 339, 271–285
25. A. M. Seddon, P. Curnow, P. J. Booth. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1666, 105–117
26. L. Maler, A. Graslund. *Methods Mol. Biol.* 2009, 480, 129–139.
27. E. Strandberg, A. S. Ulrich. *Concepts Magn. Reson. A* 2004, 23, 89–120
28. Characterization of sodium dodecylsulphate and dodecylphosphocholine mixed micelles through NMR and dynamic light scattering *Giorgia Manzo*
29. I.A. Latfullin, L.F. Galiullina, G.S. Musabirova, O.V. Aganova, Z.F. Kim, A.V. Aganov, V.V. Klochkov. Статины и их взаимодействие с модельными клеточными мембранами по данным спектроскопии ядерного магнитного резонанса // *RationalPharmacotherapyinCardiology*, V. 13, 2017.-P. 244-250.
30. Rakhmatullin.Z., Galiullina L.F., Klochkova E.A., Structural studies of pravastatin and simvastatin and their complexes with SDS micelles by NMR spectroscopy/ *Journal of Molecular Structure.* 2016; 1105:25-9
31. L.F. Galiullina, O.V. Aganova, I.A. Latfullin, G.S. Musabirova, A.V. Aganov, V.V. Klochkov/ Interaction of different statins with model membranes by NMR data // *Biochimica et Biophysica Acta* 1859 (2017) 295-300, L. F. Galiullina, O. V. Aganova, I. A. Latfullin, G. S. Musabirova, A. V. Aganov, V. V. Klochkov/ NMR Study of Conformational Structure of Fluvastatin and Its Complex with Dodecylphosphocholine Micelles// *BioNanoSci.* (2016) 6:352–354
32. L.F. Galiullina, G.S. Musabirova, I.A. Latfullin, A.V. Aganov, V.V. Klochkov / Spatial structure of atorvastatin and its complex with modelmembrane in solution

studied by NMR and theoretical calculations//Journal of Molecular Structure 1167(2018) 69-77

33. Galiullina L.F. Interaction of statins with phospholipid bilayers studied by solid-state NMR spectroscopy/ H.A. Scheidt, D. Huster, A.V. Aganov, V.V. Klochkov // BBA – Biomembranes.2019.-V. S0005-2736(18).-P. 30363-831

34. Mason R.P, Walter MLE, Day Ch.A., Jacob R.F Intermolecular differences of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors contribute to distinct pharmacologic and pleiotropic actions / The American Journal of Cardiology. 2005; 96:1 1-23.

35. Thompson PD, Panza ., Zaleski A, Taylor B, Statin Associated Side Effects / Journal of the American College of Cardiology. 2016;67(20):2395-410.

36. Mason R.P. Molecular Basis of Differences Among Statins and a Comparison with Antioxidant Vitamins / The American Journal of Cardiology. 2006;98:34P-