

На правах рукописи

КОНОВ КОНСТАНТИН БОРИСОВИЧ

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДАМИ ЭПР ВОЗДЕЙСТВИЯ
КРИОПРОТЕКТОРОВ САХАРОЗЫ, ТРЕГАЛОЗЫ, ГЛИЦЕРИНА И
СОРБИТА НА СТРУКТУРУ И ДИНАМИКУ МОДЕЛЬНОЙ ЛИПИДНОЙ
МЕМБРАНЫ**

01.04.11 – физика магнитных явлений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Казань – 2016

Работа выполнена в лаборатории спиновой физики и спиновой химии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского Казанского научного центра Российской академии наук (КФТИ КазНЦ РАН)

Научный руководитель:

Дзюба Сергей Андреевич,
доктор физико-математических наук,
профессор, ФГБУН Институт химической кинетики и горения им. В.В. Воеводского СО РАН, заведующий лабораторией

Официальные оппоненты:

Лившиц Всеволод Аронович,
доктор химических наук, профессор, ФНИЦ «Кристаллография и фотоника РАН», главный научный сотрудник (г. Москва)
Орлинский Сергей Борисович,
кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник, Институт физики ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет", доцент (г. Казань)

Ведущая организация:

ФГБУН Институт “Международный томографический центр” Сибирского отделения Российской академии наук, (г. Новосибирск).

Защита состоится **23 декабря 2016 года в 16³⁰ часов** на заседании диссертационного совета Д 002.191.01, созданного на базе ФГБУН Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского Казанского научного центра Российской академии наук: 420029, г. Казань, Сибирский тракт, д.10/7, КФТИ КазНЦ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке КФТИ КазНЦ РАН и на сайте организации: <http://www.kfti.knc.ru/about-institute/sovety/dissertation-council/news-and-announcements.php>

Отзывы на автореферат (два заверенных экземпляра) просим направлять на имя ученого секретаря диссертационного совета Д 002.191.01 при КФТИ КазНЦ РАН по адресу: 420029, г. Казань, Сибирский тракт, д. 10/7.

Автореферат разослан “ ____ ” _____ 2016 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д 002.191.01,
кандидат физ.-мат. наук

Хайбуллин Рустам Ильдусович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Актуальность исследования криопротекторов продиктована прежде всего большим потенциалом применения криозащитных растворов в сельском хозяйстве и медицине. К примерам применения криопротекторов можно отнести процедуру сохранения клеток крови, эмбрионов, генетического материала в замороженном состоянии [1]. Диссертация посвящена экспериментальной проверке некоторых гипотез действия криопротекторов. Ожидается, что понимание механизма действия криопротекторов будет способствовать созданию эффективных криозащитных растворов в будущем.

Цель диссертационной работы состояла в установлении механизма защитного действия криопротекторов на модельную клеточную мембрану. Для достижения поставленной цели необходимо было решить **следующие задачи**:

1. Получить ответ на вопрос о способе прохождения молекул глицерина (проникающий криопротектор) внутрь клеточной мембраны.
2. Методом ЭПР подтвердить или опровергнуть гипотезу вытеснения воды для дисахаридов сахарозы и трегалозы (непроникающие криопротекторы), а также получить профиль проникновения сахарозы и трегалозы внутрь модельной клеточной мембраны.
3. Методами ЭПР исследовать воздействие глицерина на динамические свойства модельной липидной мембраны.
4. Методами ЭПР исследовать воздействие сахарозы, трегалозы и сорбита на динамические свойства модельной липидной мембраны.

Научная новизна работы состоит в следующем:

Впервые с использованием метода электронного спинового эха установлен механизм проникновения глицерина внутрь модельной липидной мембраны. Впервые методами электронного спинового эха измерена локальная концентрация сахарозы и трегалозы, как на поверхности, так и внутри модельной клеточной мембраны, проведены исследования влияния глицерина, сахарозы, трегалозы и сорбита на динамические свойства модельной липидной мембраны.

Научная и практическая значимость:

Полученные в работе результаты способствуют развитию научных основ криобиологии и криомедицины и могут быть использованы для создания новых технологий криосохранения и криозащиты органических тканей и клеток.

На защиту выносятся следующие результаты и положения:

1. Профиль проникновения глицерина внутрь модельной липидной мембраны, показывающий наличие глицерина в центре мембраны.
2. Особенности процесса адсорбции дисахаридов на поверхности модельной липидной мембраны, подтверждающие гипотезу вытеснения воды.
3. Профиль распределения концентрации дисахаридов внутри модельной липидной мембраны, носящий пиковый характер.
4. Изменение динамических характеристик модельной липидной мембраны (амплитуды и частоты либрации молекул липидов) под действием криопротекторов (сахарозы, трегалозы, сорбита и глицерина).

Достоверность результатов работы Достоверность результатов работы обеспечена использованием современного научного оборудования и новых экспериментальных методик, воспроизводимостью данных, сопоставлением результатов с существующими теоретическими моделями.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на следующих научных конференциях:

1. XVI международная молодежная научная школа “Actual problems of magnetic resonance and its application” (Казань, 2013),
2. III школа для молодых ученых "Магнитный резонанс и магнитные явления в химической и биологической физике" (Новосибирск, 2014),
3. Международная конференция “Modern development of magnetic resonance” (Казань, 2014),
4. XVII международная молодежная научная школа “Actual problems of magnetic resonance and its application” (Казань, 2014),
5. Российская конференция “Структура и динамика молекулярных систем” (Яльчик, Республика Марий-Эл, 2014),

6. Международная конференция “Spin physics, spin chemistry and spin technology” (Санкт-Петербург, 2015),

7. Международная конференция “Modern development of magnetic resonance” (Казань, 2015).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы изложены в 4-х научных статьях [A1-A4], опубликованных в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и в 7-ми тезисах докладов международных и российских конференций [A5-A11].

Личный вклад автора:

Основные результаты, изложенные в работе, получены автором лично. Он активно участвовал во всех этапах исследований: от планирования экспериментов до обсуждения результатов, в анализе литературы и подготовке материала статей.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, списка авторской литературы и списка цитируемой литературы, содержащего 215 наименований. Работа изложена на 137 страницах и содержит 36 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении подчеркивается актуальность темы диссертации, описана научная и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи, научная новизна, дано краткое описание структуры и содержания диссертации.

Первая глава диссертации посвящена обзору представленных в литературе теоретических моделей и экспериментальных исследований в области защиты биологических клеток от повреждающего действия низких температур. Рассмотрена роль воды в поддержании структуры биологических клеток, а также основные механизмы защитного действия криопротекторов.

Во второй главе дано теоретическое описание основных экспериментальных методик электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), с помощью которых проводились исследования. Рассмотрен метод определения полярности среды из анализа формы линии спектра ЭПР. Также рассмотрен метод определения

концентрации магнитных ядер в окрестности парамагнитной спиновой метки (метод модуляции огибающей амплитуды электронного спинового эха).

В третьей главе описаны результаты исследования профиля проникновения

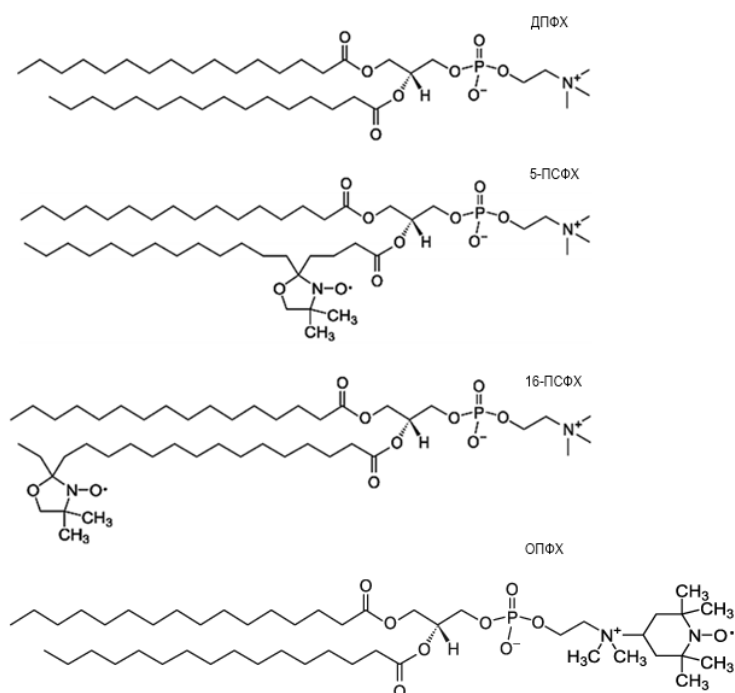


Рисунок 1 — Структура молекул фосфолипидов ДПФХ, 5- ПСФХ, 16- ПСФХ, ОПФХ.

глицерина внутрь модельной липидной мембраны. Глицерин — один из наиболее распространенных криопротекторов. На данный момент известно, что глицерин способен проникать внутрь клетки и его эффективность как криопротектора связывают с действием глицерина не только в межклеточной среде, но и во внутриклеточной жидкости [2].

Хотя факт проникновения глицерина сквозь клеточную

мембрану уже был установлен экспериментально, вопрос о механизме прохождения глицерина сквозь мембрану остается открытым. Пассивное прохождение сквозь мембрану в результате диффузии считается наиболее вероятным способом прохождения для таких малых полярных молекул. Однако, согласно некоторым исследованиям, глицерин может проникать внутрь клетки по специальным каналам.

На сегодняшний день известно, что криозащитное действие глицерина сводится к нескольким факторам. Во-первых, глицерин мешает кристаллизации межклеточной и внутриклеточной жидкости. Известно, что основным повреждающим клетку фактором при замораживании является кристаллизация окружающей мембрану жидкости. Водно-глицериновые растворы при определенной концентрации не кристаллизуются, а стеклуются, что значительно уменьшает повреждающее действие низких температур. Во-вторых, глицерин способен изменять температуру главного фазового перехода липидного бислоя. Известно, что клеточная мембрана способна выполнять свои физиологические функции только

находясь в жидкокристаллической фазе. При наличии глицерина липидная мембрана способна оставаться в жидкокристаллической фазе даже при низких температурах.

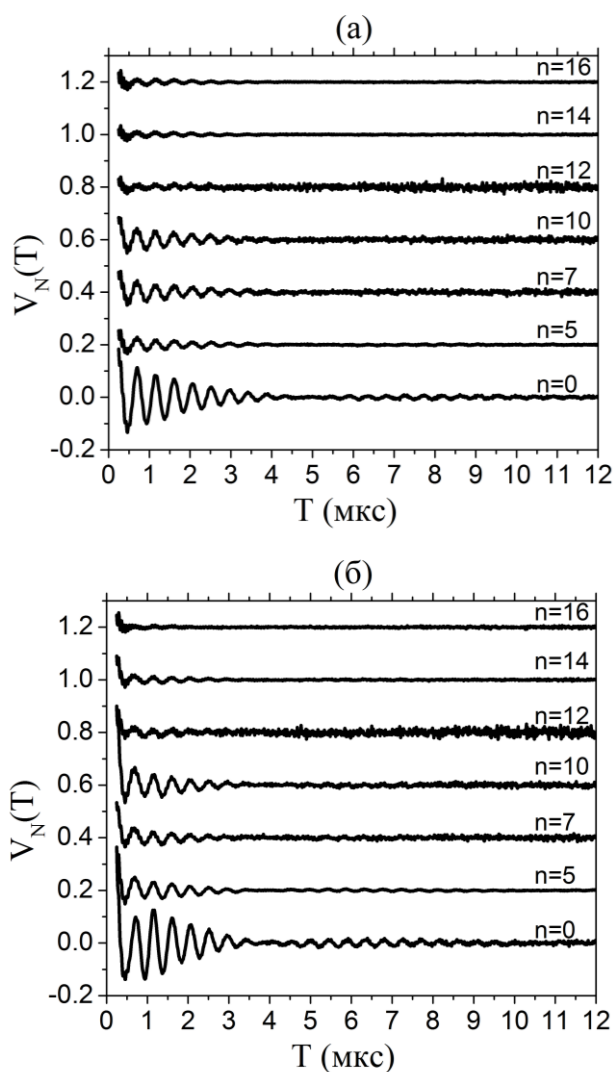


Рисунок 2 — Модуляции огибающей сигнала электронного спинового эха для образцов, гидратированных водой (а) и водно-глицериновым раствором (б). Положения спиновой метки в фосфолипиде n-ПСФХ соответствует значениям $n=5, 7, 10, 12, 14, 16$. Образцы с использованием спин-меченного фосфолипида ОПФХ отмечены как $n=0$.

Для проведения исследований создавалась модельная мембрана из молекул фосфолипида 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) и молекул спин-меченого фосфолипида 1-пальмитоил-2-(*n*-ДОКСИЛ)-стероил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (*n*-ПСФХ, $n = 5, 7, 10, 12, 14, 16$), где n — номер атома углерода вдоль ацильной цепи, к которому прикреплялась спиновая метка ДОКСИЛ. Также были проведены исследования с использованием липида 2-олеоил-1-пальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфо(ТЕМПО)холин (ОПФХ), в котором спиновая метка прикреплена к полярной части липида (рисунок 1).

С помощью метода модуляции огибающей электронного спинового эха определялась локальная концентрация дейтерированных молекул глицерина на различной глубине внутри мембраны (дейтерирование использовалось для выделения сигнала молекул глицерина в спектре частот модуляции).

На рисунке 2 показаны кривые модуляции амплитуды электронного спинового эха для липидов, гидратированных водой (а) и водно-глицериновым раствором (б), в котором глицерин был дейтерирован. На рисунке 3 приведены соответствующие спектры частот модуляции.

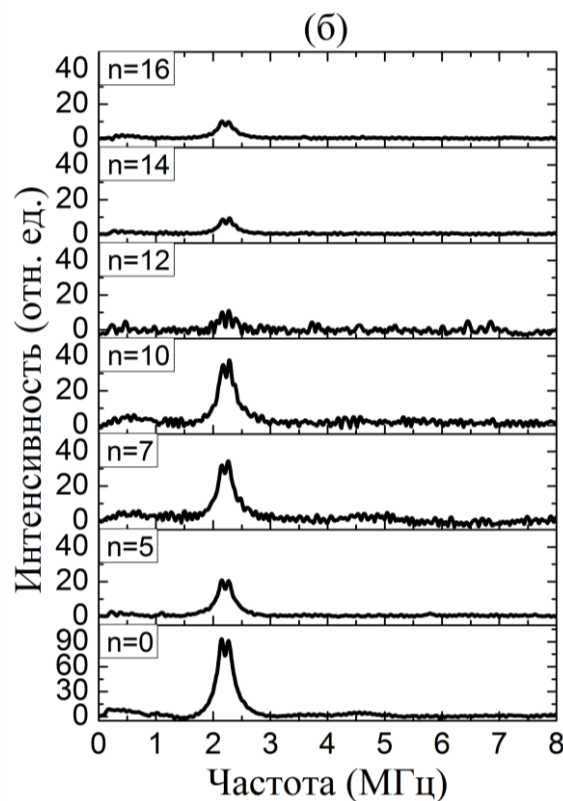
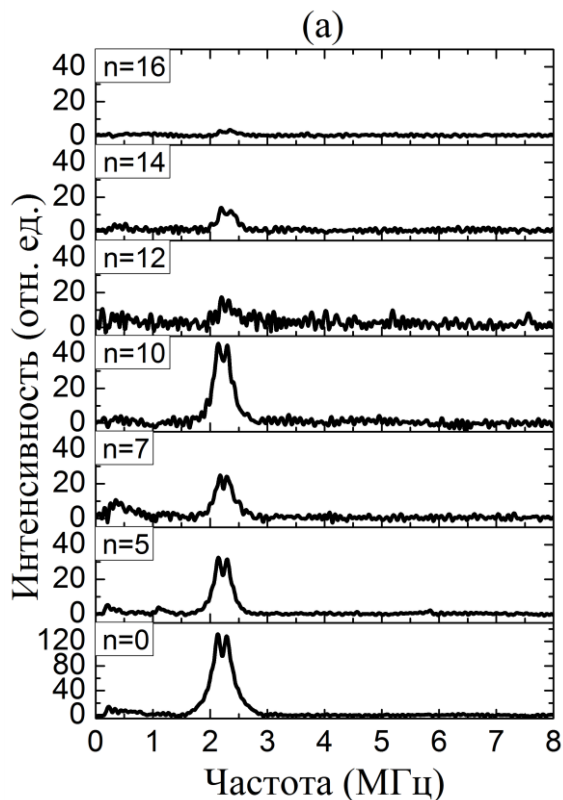


Рисунок 3 — Амплитудные Фурье-спектры огибающей сигнала электронного спинового эха для образцов, гидратированных дейтерированной водой (а) и водным раствором глицерина (б). Положения спиновой метки в фосфолипиде *n*-ПСФХ соответствует значениям $n=5, 7, 10, 12, 14, 16$. Образцы с использованием спин-меченного фосфолипиды ОПФХ отмечены как $n=0$.

Пик на частоте 2.2 МГц соответствует сигналу от ядер дейтерия. По амплитуде этого пика определялась локальная концентрация молекул дейтерированного глицерина на различной глубине внутри мембраны. Глубина проникновения глицерина определялась по положению спиновой метки от которой детектировался сигнал. В литературе часто высказывается сомнение относительно соответствия положения спиновой метки вдоль ацильной цепи фосфолипида и ее реальной глубиной внутри липидного бислоя. Другими словами, ацильные цепи фосфолипидов, содержащие спиновые метки, могут значительно изгибаться, в результате метка оказывается локализована не в глубине липидного бислоя, а ближе к поверхности. Вопрос локализации спиновых меток может быть изучен, если исследовать взаимодействие спиновой метки с магнитным ядром атома фосфора аналогично тому, как это было сделано с ядрами атомов дейтерия. Атомы фосфора содержатся в полярных участках молекул фосфолипидов и при построении липидного бислоя оказываются на поверхности бислоя. На рисунке 4 представлена зависимость амплитуды линии фосфорной модуляции от положения спиновой метки вдоль ацильной цепи молекулы фосфолипида. Чем больше амплитуда модуляции — тем ближе спиновая метка к поверхности бислоя. Количественно

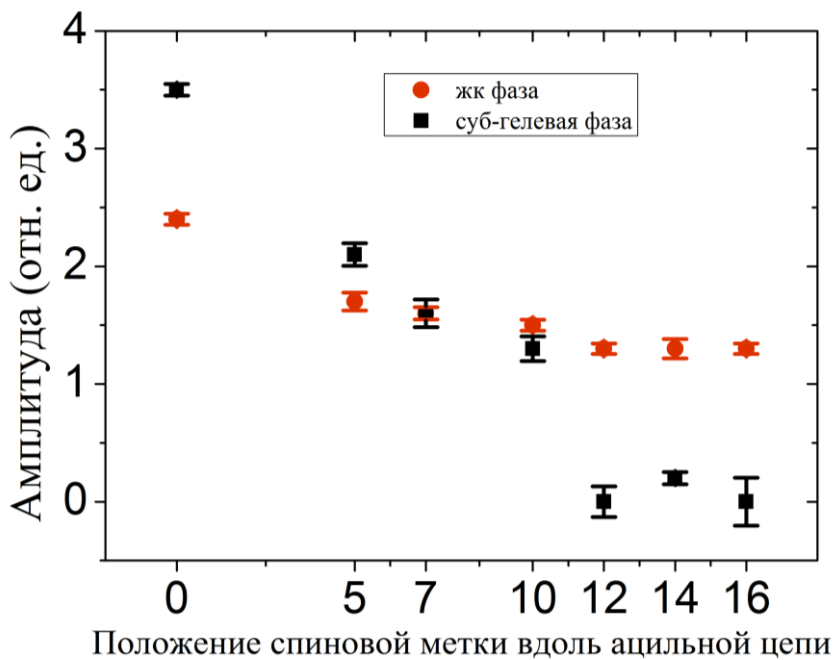


Рисунок 5 — Амплитуда фосфорной линии Фурье спектра для образцов с различным положением спиновой метки. Образцы перед заморозкой находились либо в жидкокристаллической фазе (●), либо в суб-гелевой фазе (■).

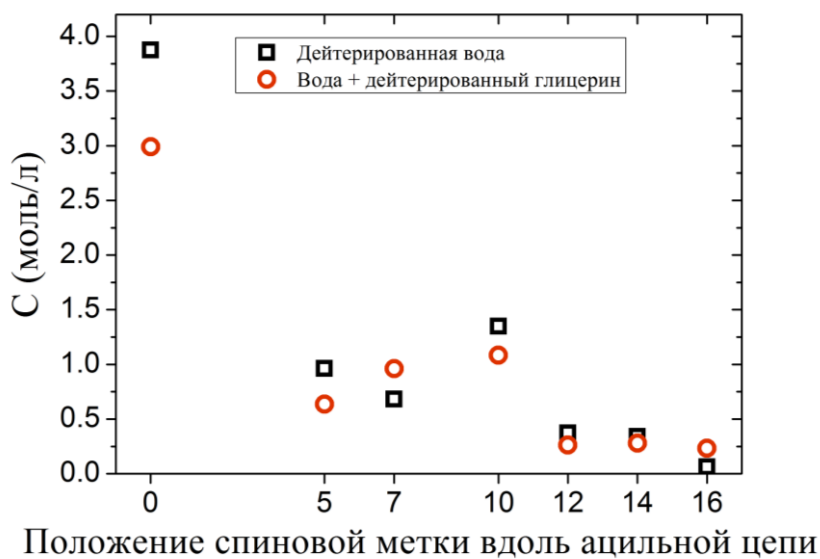


Рисунок 4 — Профиль проникновения воды (□) и глицерина (○) внутрь модельной клеточной мембраны. Положения спиновой метки в фосфолипиде n-ПСФХ соответствует значениям n=5, 7, 10, 12, 14, 16. Спин-меченный фосфолипид ОПФХ соответствует n=0. По оси ординат отложена концентрация воды и глицерина соответственно.

измерить расстояние между поверхностью липидного бислоя и спиновой меткой используя только метод ЭПР не представляется возможным. Из рисунка 4 видно, что глубина локализации спиновой метки внутри липидного бислоя коррелирует с номером атома углерода ацильной цепи фосфолипида, к которому прикреплялась спиновая метка.

Было уделено внимание тому, в какой фазе находился липидный бислой непосредственно перед заморозкой. Обнаружено, что если липидный бислой находился в суб-гелевой фазе, то после заморозки молекулы фосфолипидов были более упорядочены. Из рисунка 4 видно, что в случае, когда образцы переводились

в суб-гелевую фазу, спиновые метки 12, 14 и 16 положений оказывались за пределами эффективного радиуса метода и поэтому приводили к появлению модуляций с очень малой амплитудой. В настоящей работе все эксперименты проводились с образцами, которые перед замораживанием переводились в суб-гелевую фазу.

На рисунке 5 показан профиль проникновения глицерина внутрь липидного бислоя. Видно, что в центре бислоя концентрация глицерина составляет 0.2-0.3 моль/л. Такой результат не противоречит гипотезе диффузионного прохождения молекул глицерина внутрь клетки.

В четвертой главе представлено исследование взаимодействия молекул сахарозы и трегалозы с модельной липидной мембраной. Мотивацией к этому исследованию послужило то, что сахараиды, к которым относятся сахароза и трегалоза, являются широко распространенными природными криопротекторами [3].

Как известно, кристаллизация межклеточной и внутриклеточной воды является одним из повреждающих факторов влияния низких температур на живые клетки. Хотя водные растворы дисахаридов препятствуют кристаллизации воды, их концентрация в клетках живых существ недостаточна для стеклования всего объема воды. Тем не менее, дисахариды проявляют криозащитную активность даже при таких сравнительно низких концентрациях. Такую ситуацию можно объяснить тем, что криозащитная активность дисахаридов во многом обусловлена их специфическим взаимодействием с клеточной мембраной. Наибольшее распространение получила гипотеза вытеснения воды, которая объясняет криозащитное действие дисахаридов прямым взаимодействием молекул

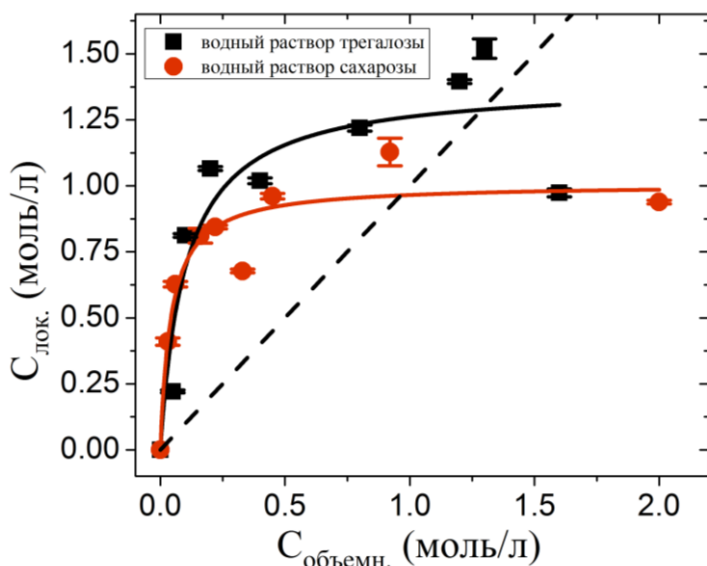


Рисунок 6 — Зависимость локальной концентрации молекул сахарозы (●) и трегалозы (■) $C_{лок.}$ около поверхности липидной мембраны от концентрации сахарозы и трегалозы в водном растворе $C_{объемн.}$. Линии соответствуют аппроксимации в рамках модели адсорбции Ленгмюра. Пунктиром показана линия, соответствующая равенству значений $C_{лок.}$ и $C_{объемн.}$.

дисахаридов и клеточной мембраны посредством образования множества водородных связей. При этом молекулы воды вытесняются с поверхности клеточной мембраны и заменяются молекулами дисахаридов. Проверить гипотезу вытеснения воды можно измерив концентрацию дисахаридов у поверхности липидной мембраны. Это можно осуществить с помощью метода модуляции огибающей

электронного спинового эха, используя спин-меченные фосфолипиды и дейтерированные молекулы сахарозы и трегалозы.

На рисунке 6 приведена зависимость локальной концентрации молекул сахарозы и трегалозы на поверхности липидного бислоя от концентрации молекул дисахаридов в буферном объеме раствора. В обоих случаях наблюдается преимущественное осаждение молекул дисахаридов на поверхности липидного бислоя. Такая выраженная зависимость свидетельствует в пользу гипотезы вытеснения воды.

Данные были аппроксимированы в рамках модели адсорбции Ленгмюра:

$$C_{\text{лок.}} = C_{\text{лок.}}^{\text{макс.}} \frac{KC_{\text{объемн.}}}{1 + KC_{\text{объемн.}}} \quad (1)$$

В формуле 1 $C_{\text{лок.}}$ — локальная концентрация дисахаридов вблизи спиновой метки, $C_{\text{объемн.}}$ — концентрация дисахаридов в объеме воды, K — отношение скоростей адсорбции и десорбции, $C_{\text{лок.}}^{\text{макс.}}$ — максимальное значение локальной концентрации. Путем аппроксимации экспериментальных данных в рамках Ленгмюровской адсорбции было получено значение коэффициентов для трегалозы $C_{\text{лок.}}^{\text{макс.}} = 1.4 \pm 0.1 \text{ моль / л}$, $K = 9.8 \pm 4.6 \text{ моль}^{-1}$, для сахарозы $C_{\text{лок.}}^{\text{макс.}} = 1.0 \pm 0.1 \text{ моль / л}$, $K = 23.2 \pm 8.3 \text{ моль}^{-1}$. Приведенные выше данные показывают преимущественное накопление молекул дисахаридов у поверхности мембраны и, таким образом, подтверждают гипотезу вытеснения воды. Также эти данные не противоречат тому, что окружающая мембрану сольватная оболочка находится в стеклообразном состоянии.

Также было проведено исследование профиля проникновения сахарозы и трегалозы внутрь липидного бислоя. Для исследования профиля проникновения дисахаридов внутрь липидной мембраны использовались спин-меченные фосфолипиды n-ПСФХ, где n=5,7,10,12,14,16. Проведенные эксперименты были во многом такими же как те, что использовались для исследования профиля проникновения глицерина.

Полученные профили проникновения рисуют похожую картину для трегалозы и сахарозы (рисунок 7). Максимум концентрации наблюдается для 10-го положения спиновой метки вдоль ацильной цепи молекулы фосфолипида. Максимальная концентрация сахарозы внутри мембраны 0.6

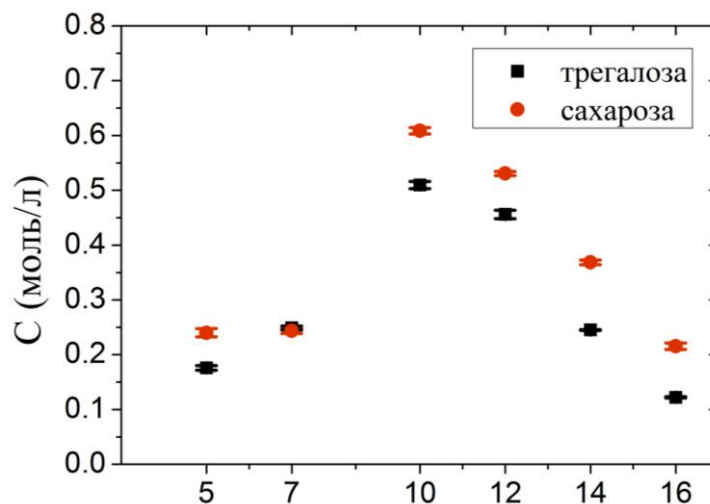


Рисунок 7— Профиль проникновения сахарозы (●) и трещалозы (■) внутри липидной мембраны. По оси ординат отложена концентрация дисахаридов внутри мембраны.

моль/л, трещалозы — 0.5 моль/л. Такая высокая концентрация дисахаридов внутри мембраны может служить аргументом в пользу некоторых гипотез криозащитного действия дисахаридов.

Как уже было сказано, в некоторых случаях спиновая метка может выталкиваться из объема липидной мембраны и локализоваться на ее поверхности. Для подтверждения достоверности полученных результатов необходимо убедиться в том, что спиновая метка находится там, где ее местонахождение и предполагается.

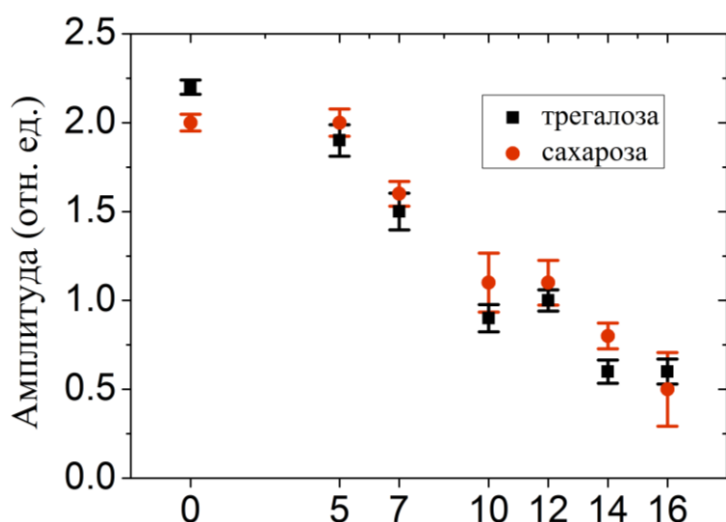


Рисунок 8— Амплитуда фосфорной линии Фурье-спектров модуляций огибающей амплитуды электронного спинового эха для образцов, гидратированных растворов трещалозы (■) и сахарозы (●). Положения спиновой метки в фосфолипиде n-ПСФХ соответствует значениям n=5, 7, 12, 16. Значение n=0 соответствует образцам, содержащим спин-меченный фосфолипид ОПФХ.

На рисунке 8 представлены зависимости амплитуд фосфорных линий Фурье-спектров модуляции огибающей амплитуды электронного спинового эха для образцов, гидратированных в водных растворах нейтральной трещалозы и сахарозы (0.8 моль/л). Видно, что реальная глубина локализации спиновой метки внутри мембраны коррелирует

с ее положением вдоль ацильной цепи. Углеродные цепочки спин-меченных фосфолипидов не находятся в полностью выпрямленном положении, тем не менее этот результат показывает, что спиновые метки в присутствии дисахаридов не выталкиваются из объема липидной мембраны.

В пятой главе представлены результаты исследования влияния глицерина на подвижность липидного бислоя. Метод электронного спинового эха обладает чувствительностью к малоамплитудным движениям спиновых зондов и меток [4]. В этой главе с помощью спектроскопии электронного спинового эха исследовалось влияние глицерина на динамические характеристики модельной липидной мембраны. Фосфолипид 1,2-дипальмитоил-3-глицерофосфохолин (ДПФХ) и спин-меченный фосфолипид 1-пальмитоил-2-стероил-(n-ДОКСИЛ)-глицеро-3-фосфохолин (n-ПСФХ, где n – положение спиновой метки вдоль ацильной цепи липида, использовались образцы 5-ПСФХ и 16-ПСФХ) смешивались в соотношении 100:1 и гидратировались водой или водно-глицериновой смесью (объемное отношение воды к глицерину 1:1). Для изучения влияния молекул криопротекторов на подвижность липидного бислоя использовался метод электронного спинового эха. Использовалась последовательность $\frac{\pi}{2}-\tau-\pi-\tau-\text{эхо}$ с длительностью импульсно 16 нс и 32 нс соответственно. Время задержки между импульсами τ сканировалось от 120 нс до 920 нс с шагом 4 нс.

При быстром (время корреляции $\tau_c < 10^{-9} \text{ с}$) ограниченном ориентационном движении компоненты анизотропного тензора СТВ частично усредняются. При этом среднее значение компоненты тензора A_{zz} можно легко определить из стационарного спектра ЭПР как разницу между крайними линиями спектра. В случае ориентационных движений с малой угловой амплитудой α , усредненная компонента A_{zz} в лабораторной системе координат пропорциональна $\langle \alpha^2 \rangle$:

$$\langle A_{zz} \rangle = A_{zz} + (A_{yy} - A_{zz}) \langle \alpha^2 \rangle \quad (2)$$

Таким образом, стационарный ЭПР можно использовать для оценки амплитуды быстрых ограниченных движений молекул спиновой метки. Характер таких движений определяется в основном свойствами окружающей матрицы и не зависит от типа спиновой метки.

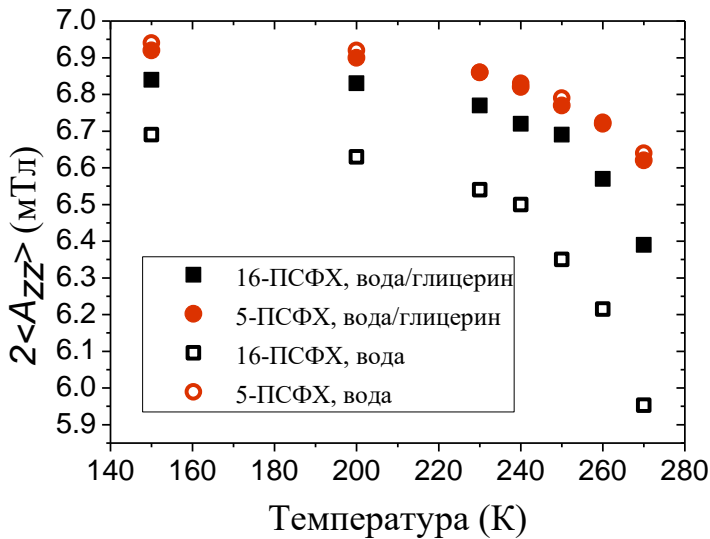


Рисунок 9 — Температурная зависимость параметра $2\langle A_{zz} \rangle$ для образцов со спин-мечеными липидами в 5 положении (5-ПСФХ) и в 16 положении (16-ПСФХ). Гидратация производилась либо водой, либо водно-глицериновым раствором.

Из рисунка 9 видно, что параметр $2\langle A_{zz} \rangle$ для липидов, спин-меченых в 5 положении, значительно больше, чем для липидов, спин-меченых в 16 положении. Это можно объяснить разной полярностью окружения спиновой метки, локализованной в различных частях бислоя. Вблизи поверхности бислоя присутствует значительное количество молекул воды, которые повышают полярность окружения

спиновой метки, что в свою очередь увеличивает значение компоненты тензора СТВ спиновой метки. Параметр $2\langle A_{zz} \rangle$ для липида, спин-меченого в 16 положении и гидратированного в водно-глицериновом растворе, принимает заметно бóльшие значения, чем для того же липида, гидратированного в воде. Это можно объяснить повышением полярности окружения спиновой метки за счет проникновения глицерина вглубь мембраны.

Спад сигнала спинового эха обусловлен главным образом взаимодействием электронного спина с ядерными спинами окружающей матрицы. Поскольку в стеклах эти взаимодействия усредняются по ориентациям, то их вклад в поперечную релаксацию не зависит от внешнего магнитного поля.

Молекулярные движения также приводят к поперечной релаксации спинового эха. В отличие от других этот вклад в релаксацию существенно анизотропен и может быть выделен путем деления спадов сигнала спинового эха, записанного в разных участках спектра ЭПР. На рисунке 10 представлена температурная зависимость скорости анизотропной релаксации для образцов, содержащих спин-меченые липиды и для образцов, содержащих спиновый зонд в водно-глицериновом растворе. Видно, что для всех образцов при температурах выше 200 К скорость анизотропной релаксации начинает заметно возрастать, что связано с увеличением

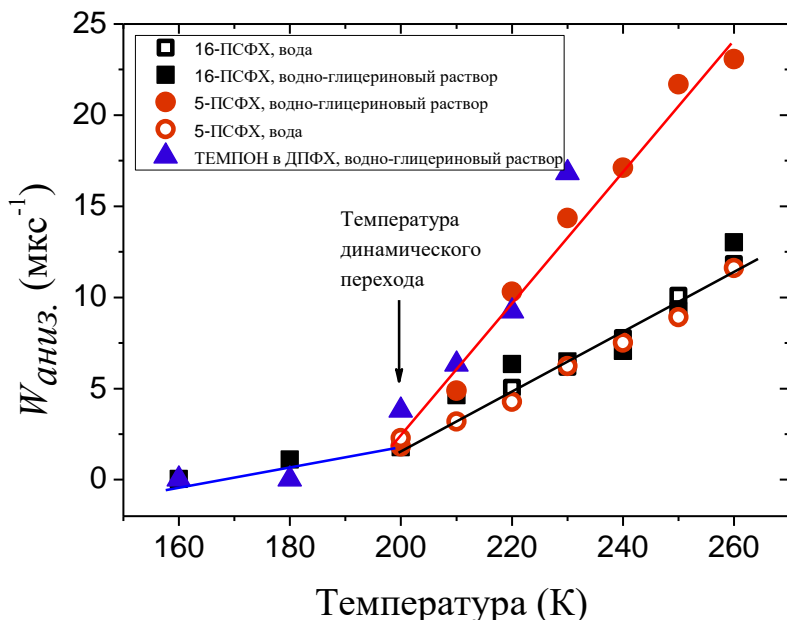


Рисунок 10 — Температурная зависимость параметра анизотропной релаксации $W_{аниз}$ для образцов со спин-мечеными липидами в 5 положении (5-ПСФХ) и в 16 положении (16-ПСФХ). Гидратация производилась либо водой, либо водно-глицериновым раствором. Нитроксильный радикал ТЕМПОН, добавленный к фосфолипидам ДПФХ, гидратированным в водно-глицериновом растворе. Стрелкой указана температура динамического перехода.

среднеквадратичной угловой амплитуды $\langle \alpha^2 \rangle$. Увеличение подвижности при температурах 200-220 К наблюдалось во множестве неупорядоченных образцов, этот эффект получил название динамического перехода.

Подвижность поверхностного слоя мембраны в случае гидратации водой и водно-глицериновым раствором полностью определяется подвижностью окружающей

мембрану сольватной оболочки, в то время как подвижность внутренних слоев мембраны от сольватной оболочки зависит заметно слабее. Присутствие глицерина увеличивает подвижность поверхностного слоя, при этом не сдвигая температуру динамического перехода. Увеличение подвижности в присутствии глицерина можно объяснить либо стеклованием сольватной оболочки, либо тем, что глицерин вблизи поверхности бислоя встраивается между молекулами липидов, увеличивая площадь, приходящуюся на одну молекулу липида. Подтверждение этой гипотезы требует дополнительных исследований.

В шестой главе представлены результаты исследования влияния трегалозы, сахарозы и сорбита на подвижность липидного бислоя. Результаты некоторых исследований указывают на то, что присутствие дисахаридов должно существенно изменять динамические свойства липидной мембраны [5]. Импульсный ЭПР обладает высокой информативностью применительно к исследованиям подвижности молекулярных систем. В данной главе описаны результатов экспериментов, проведенных с целью установить влияние сахарозы, трегалозы и сорбита на подвижность липидной мембраны, используя методы стационарного и импульсного ЭПР.

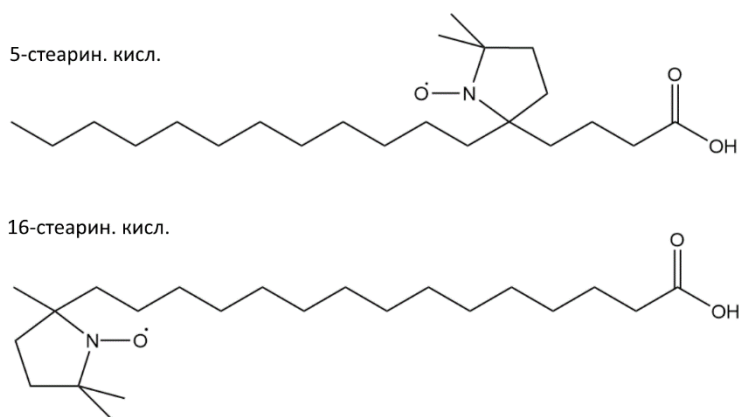


Рисунок 11 — Структура спин-меченых стеариновых кислот

Для создания модельной мембраны использовался фосфолипид ДПФХ. Спин-меченая (в 5, либо в 16 положениях по ацильной цепи) стеариновая кислота (рисунок 13) растворялась вместе с ДПФХ в молярном отношении 1:100 и

гидратировались в водном растворе сахарозы, трегалозы или сорбита концентрацией либо 0.2 моль/л, либо 1 моль/л. Для определения подвижности спинового зонда в растворе сахарозы использовался нитроксильный радикал ТЕМПОН.

Параметр анизотропной релаксации $W_{аниз}$, который определяется с помощью метода, описанного в параграфе 5.2.2, пропорционален среднеквадратичному угловому отклонению $\langle \alpha^2 \rangle$ и времени корреляции τ_c либрационного движения, совершаемого спиновой меткой. Эксперименты были проведены с образцами, состоящими из спин-меченых в 5 и 16 положениях вдоль ацильной цепи стеариновых кислот в модельной мембране из ДПФХ, гидратированных в водных растворах сахарозы, трегалозы и сорбита концентрацией 0.2 и 1 моль/л. Результаты

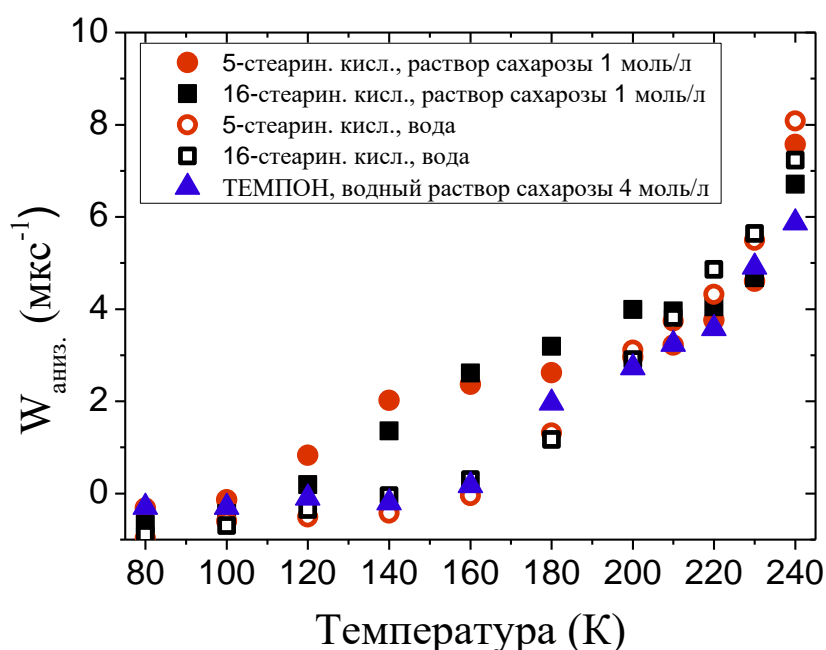


Рисунок 12 — Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации $W_{аниз}$ для образцов со спин-мечеными стеариновыми кислотами, гидратированных в воде и водном растворе сахарозы, и для спинового зонда ТЕМПОН в водном растворе сахарозы 4 моль/л.

представлены на рисунке 12. Параметр $W_{аниз}$ начинает увеличиваться уже при 120 К для образцов с сахарозой. Для трегалозы эта динамика обнаруживается только для 16 положения спиновой метки, для сорбита подобного эффекта не наблюдается. Выше температуры 200 К $W_{аниз}$ в присутствии дисахаридов

уменьшается по сравнению с гидратацией чистой водой.

Увеличение параметра $W_{\text{аниз}}$ в несколько раз в диапазоне температур 100-200 К может свидетельствовать о взаимодействии дисахаридов с липидной мембраной. Предполагается, что дисахариды взаимодействуют с поверхностью липидной мембраны, что приводит к увеличению средней площади поверхности мембраны, приходящейся на один фосфолипид. Бóльшая пространственная свобода приводит к увеличению среднеквадратичного углового отклонения молекулы спиновой метки и времени корреляции движения. При этом, вероятно, значение имеет относительно большой размер молекулы дисахарида и ее способность образовывать водородные связи, поскольку для молекул сорбита подобного увеличения подвижности мембраны не наблюдается.

Из рисунка 12 видно, что изменение подвижности связано именно со специфическим взаимодействием дисахаридов с липидной мембраной, а не со свойствами стекла, образованного водными растворами дисахаридов. Динамика спинового зонда ТЕМПОН в водном растворе сахарозы почти не отличается от динамики спиновой метки внутри мембраны. В то же время сахароза сильно влияет на подвижность липидного бислоя как вблизи его поверхности, так и внутри. Следовательно, криозащитное действие сахарозы нельзя объяснить только лишь стеклованием сольватной оболочки биомембраны. Вероятно, образование водородных связей с полярными частями липидов и прохождение дисахаридов внутрь мембраны (глава 4) приводит к увеличению среднего расстояния между молекулами липида и стабилизации структуры липидного бислоя.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

Из исследований методом модуляции огибающей амплитуды электронного спинового эха спиновых меток:

- получен профиль проникновения глицерина внутрь модельной липидной мембраны, при этом относительно высокая концентрация глицерина в центре мембраны является прямым подтверждением диффузионного прохождения глицерина сквозь липидный бислой;

- установлено, что процесс накопления дисахаридов у поверхности модельной липидной мембраны описывается в рамках модели адсорбции Ленгмюра, что свидетельствует о прямом связывании молекул сахарозы и трегалозы с поверхностью мембраны (подтверждение гипотезы вытеснения воды);
- получен профиль проникновения дисахаридов сахарозы и трегалозы внутрь модельной липидной мембраны, обнаружена их высокая концентрация в глубине мембраны.

Из исследований методом анизотропной релаксации электронного спинового эха спиновых меток:

- установлено, что присутствие глицерина в гидратной оболочке липидной мембраны значительно изменяет интенсивность низкотемпературных ограниченных ориентационных движений меток в ее поверхностных слоях, но практически не влияет на такие движения в глубине мембраны, причем движения меток на поверхности мембраны коррелируют с движениями зондов в ее сольватной оболочке;
- обнаружено влияние сахарозы, трегалозы и сорбита в гидратной оболочке липидной мембраны на низкотемпературные ограниченные ориентационные движения меток внутри мембраны. Причем если в отсутствие сахаров эти движения размораживаются при 170-200 К (что соответствует известному в литературе так называемому динамическому переходу), то в присутствии сахарозы и трегалозы эти движения размораживаются уже при 120 К, что может быть следствием расширения мембраны из-за ее прямого взаимодействия с сахарами (что можно считать еще одним подтверждением гипотезы вытеснения воды).

Цитированная литература

- [1] Fuller, B.J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state / B. J. Fuller // *CryoLetters*. – 2004. – Vol. 25, № 6. – pp. 375–388.
- [2] Westh, P. Unilamellar DMPC vesicles in aqueous glycerol: preferential interactions and thermochemistry / P. Westh // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 84. – pp. 341–349.

- [3] Fuller, B.J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state / B. J. Fuller // *CryoLetters*. – 2004. – Vol. 25, № 6. – pp. 375–388.
- [4] Dzuba, S.A. On the possible manifestation of harmonic-anharmonic dynamical transition in glassy media in electron paramagnetic resonance of nitroxide spin probes / S. A. Dzuba, E. P. Kirillina, E. S. Salnikov // *J. Chem. Phys.* – 2006. – Vol. 125. – pp. 054502–054507.
- [5] Tsvetkova, N.M. Effect of sugars on headgroup mobility in freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: solid-state ^{31}P NMR and FTIR Studies / N. M. Tsvetkova, B. L. Phillips, L. M. Crowe, J. H. Crowe, S. H. Risbud // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 75. – pp. 2947–2955.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

I. Статьи в научных журналах, рекомендованных ВАК

- [A1] **Konov, K.** Glycerol penetration profile in phospholipid bilayers measured by ESEEM of spin-labelled lipids [Text] / **К.В. Konov**, N.P. Isaev and S.A. Dzuba // *Molecular Physics* — 2013. — Vol. 111, Iss.18-19. — pp.2882-2886
- [A2] **Konov, K.B.** Low-temperature molecular motions in phospholipid bilayers in presence of glycerol as studied by spin-echo EPR of spin labels [Text] / **К. В. Konov**, N. P. Isaev, S. A. Dzuba // *Appl. Magn. Reson.* — 2014. — Vol. 45, Iss. 10. — pp.1117-1126.
- [A3] **Konov, K.B.** Low-temperature molecular motions in lipid bilayers in the presence of sugars: insights into cryoprotective mechanisms [Text] / **К. В. Konov**, N. P. Isaev, S. A. Dzuba // *J. Phys. Chem. B* — 2014. — Vol. 118, Iss. 43. — pp.12478-12485.
- [A4] Membrane–sugar interactions probed by pulsed electron paramagnetic resonance of spin labels [Text] / **К. В. Konov**, D. V. Leonov, N. P. Isaev, K. Yu. Fedotov, V. K. Voronkova, S. A. Dzuba // *J. Phys. Chem. B* — 2015. — Vol. 119, Iss. 32. — pp.10261-10266.

II. Публикации в материалах и тезисах конференции

- [A5] **Konov, K.** Glycerol penetration profile in phospholipid bilayers measured by ESEEM of spin-labeled lipids [Text] / **К. Konov**, N. P. Isaev, S. A. Dzuba // *Actual problems of magnetic resonance and its application: Proceedings of the XVI International Youth Scientific School, Kazan, Russia, 21-25 October 2013.* — Kazan: Kazan University, 2013. — pp.91-93.

[A6] **Конов, К.** Применение методов импульсного ЭПР к исследованию профиля проникновения глицерина в клеточную мембрану [Текст] / **К. Конов, Н.П. Исаев, С.А. Дзюба** // Структура и динамика молекулярных систем: сб. тезисов Российской конф., Яльчик, Республика Марий-Эл, Россия, 22-27 июня 2014. — Уфа, 2014. — с.49.

[A7] **Конov, К.** The study of sugars influence on mobility of lipid bilayer [Text] / **К. Konov, N. P. Isaev, S. A. Dzuba** // Actual problems of magnetic resonance and its application: Proceedings of the XVII International Youth Scientific School, Kazan, Russia, 22-27 June 2014. — Kazan: Kazan University, 2014. — p.108.

[A8] **Конov, К.** The study of influence of sugars on the mobility of phospholipid bilayer [Text] / **К. Konov, N. P. Isaev, S. A. Dzuba** // Magnetic resonance and magnetic phenomena in chemical and biological physics: Abstracts of Inter. Conf., Novosibirsk, Russia, 21-25 October 2014. — Новосибирск: Академиздат, 2014. — p.64.

[A9] **Конov, К.** The influence of sucrose and trehalose on a mobility of lipid bilayer [Text] / **К. Konov, N. P. Isaev, S. A. Dzuba** // Modern development of magnetic resonance: Abstracts of Inter. Conf., Kazan, Russia, 23-27 September 2014. — Kazan: Zavoisky Physical-Technical Institute, 2014. — p.77.

[A10] The study of molecular motion of lipid bilayer in presence of sugars [Text] / **К. Konov, N. P. Isaev, D.V. Leonov, S. A. Dzuba** // Spin physics, spin chemistry, spin technology: Abstracts of Inter. Conf., St. Petersburg, Russia, 1-5 June 2015. — St. Petersburg: Ioffe Institute, 2015. — p.97.

[A11] The study of interaction of disaccharides with lipid bilayer using pulsed electron paramagnetic resonance [Text] / **К. Konov, N. P. Isaev, D.V. Leonov, S. A. Dzuba** // Modern development of magnetic resonance: Abstracts of Inter. Conf., Kazan, Russia, 22-26 September 2015. — Kazan: Zavoisky Physical-Technical Institute, 2015. — pp.29-30.