

УДК 541(18+6):547.9:577.1

## ПАРАМАГНИТНОЕ ГИДРОФИЛЬНОЕ ЗОНДИРОВАНИЕ КОЛЛОИДНЫХ СИСТЕМ СПЕКТРОСКОПИЕЙ ЯМР

*Шапаро Ю. Е.*

Рассмотрены основные результаты применения метода гидрофильного парамагнитного зонда в ЯМР спектроскопии  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  и  $^{31}\text{P}$  для изучения структуры, стабильности и локальной плотности упаковки коллоидных систем. Рассмотрены магнитные свойства ионов металлов  $f$ - и  $d$ -элементов, используемых в качестве сдвигающих и релаксационных зондов. Изложены методы оценки стабильности мицелл и конформации полярных фрагментов молекул ПАВ на поверхности мицелл и везикул. Особое внимание удалено изучению динамики, композиционной асимметрии липидных мембран, анализу их взаимодействия с физиологически активными соединениями, а также структуре биоколлоидных систем.

Библиография — 134 ссылки.

### ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Парамагнитные ионы в спектроскопии ЯМР . . . . .	1253
II. Гидрофильное зондирование мицеллярных дисперсий . . . . .	1255
III. Гидрофильное зондирование липосом . . . . .	1259
IV. Структура биоколлоидных систем . . . . .	1268

### I. ПАРАМАГНИТНЫЕ ИОНЫ В СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР

Спектроскопия ЯМР является одним из наиболее эффективных методов определения структуры органических соединений, а также надмолекулярных образований типа мицелл, липосом и других сложных коллоидных агрегатов. Однако информативность спектров ЯМР, особенно протонных, существенно снижается из-за того, что ядра алифатических групп, не имеющих рядом электроотрицательных атомов, дают сигналы с близкими значениями химических сдвигов. Кроме того, существует ряд причин, приводящих к уширению и взаимному перекрыванию сигналов в ЯМР-спектрах коллоидных систем. Основные из них: наличие спиновых мультиплетов, диполь-дипольная релаксация при взаимодействии непосредственно связанных ядер, и межмолекулярных ассоциаций, низкая фрагментарная подвижность алифатических цепей, микротерогенность и значительная вязкость дисперсий [1].

Для преодоления этих трудностей и повышения информативности спектров ЯМР коллоидных систем советские авторы предложили [2–9] метод гидрофильных сдвигающих и релаксационных парамагнитных зондов — ионов металлов  $f$ - и  $d$ -элементов, имеющих неспаренный электрон.

Влияние парамагнетизма на характеристики ядерного резонанса было обнаружено авторами работы [10]. Особенности ЯМР в парамагнитных системах обобщены в ряде обзоров и монографий [11–16]. Взаимодействие между парамагнитным центром и ядром, магнитный резонанс которого наблюдается, проявляется в изотропном сверхтонком сдвиге [17], изменении времен ядерной релаксации  $T_1$  и  $T_2$  [18] и в ядерной поляризации спинов вследствие эффекта Оверхаузера [19]. Эти явления дают информацию об электронной и геометрической структуре лигандов, связанных с парамагнитными центрами.

## 1. Парамагнитный сдвиг

Изотропный сдвиг сигналов в спектрах ЯМР парамагнитных веществ является суммой двух типов взаимодействия: контактного и псевдоконтактного.

Контактный сдвиг Ферми имеет место, если спиновая плотность неспаренного электрона делокализуется и по системе химических связей переносится на ядро. Контактный сдвиг подчиняется закону Кюри и в случае односпинового состояния с изотропным  $g$ -тензором описывается уравнением [10]:

$$\frac{\Delta H}{H_0} = - \frac{Ag\beta^2}{g_N\beta_N} \frac{s(s+1)}{3kT}$$

где  $A$  — постоянная сверхтонкого взаимодействия,  $g_N$  — ядерный  $g$ -фактор,  $\beta_N$  — ядерный магнетон,  $H_0$  — напряженность внешнего магнитного поля,  $\beta$  — магнетон Бора,  $g$  — множитель Ланде,  $k$  — постоянная Больцмана,  $T$  — абсолютная температура,  $s$  — спиновое число электрона.

Контактный сдвиг сигнала наблюдается при условии  $T_{1e}^{-1} \gg A$ , где  $T_{1e}$  — время электронной спин-решеточной релаксации. Контактные сдвиги велики для ядер кислорода и азота, непосредственно координированных парамагнитным центром, а также для химически связанных с этими атомами углерода. Для более удаленных атомов и, зачастую, для всех протонов, контактный вклад мал и наблюдаемые парамагнитные сдвиги имеют псевдоконтактную природу [11–16].

Псевдоконтактный сдвиг сигнала определяется диполь-дипольным взаимодействием спинов неспаренного электрона и ядра. Он зависит от электронной конфигурации парамагнитного иона, магнитной анизотропии поля лигандов и температуры. В случае аксиальной симметрии комплекса псевдоконтактный сдвиг определяется уравнением Мак-Конела — Робертсона [17]:

$$\frac{\Delta H}{H_0} = - \frac{\beta^2 s(s+1)}{9kT} (g_{\parallel}^2 - g_{\perp}^2) \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{r^3} \quad (1)$$

где  $g_{\parallel}$  и  $g_{\perp}$  — компоненты  $g$ -тензора магнитной анизотропии параллельно и перпендикулярно главной оси комплекса,  $r$  — расстояние от парамагнитного центра до ядра,  $\theta$  — угол между радиусом-вектором  $\vec{r}$  и главной осью комплекса.

Зависимость псевдоконтактного сдвига от геометрии комплекса, описываемая уравнением (1), позволяет отнести сигналы в спектре лиганда известной структуры и решить обратную задачу — по известному отнесению получить информацию о геометрии молекулы [5, 11–17].

## 2. Парамагнитное уширение

В присутствии парамагнитного центра наблюдается уширение сигналов ЯМР, обусловленное ускорением релаксации ядерного спина и влиянием обмена между связанными и свободными молекулами субстрата. Времена спин-решеточной  $T_1$  и спин-спиновой  $T_2$  релаксации для ядер со спином  $1/2$  в присутствии парамагнитного центра определяются уравнениями (2) и (3) Соломона — Бломбергена [18]:

$$\frac{1}{T_1} = \frac{2}{15} \frac{(\beta_N g_N \beta g)^2 s(s+1)}{r^6} \left( \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{7\tau_c}{1 + \omega_s^2 \tau_c^2} \right) + \frac{2}{3} s(s+1) \left( \frac{A}{\hbar} \right)^2 \frac{\tau_e}{1 + \omega_s^2 \tau_e^2} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \frac{1}{T_2} = & \frac{1}{15} \frac{(\beta_N g_N \beta g)^2 s(s+1)}{r^6} \left( 4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1 + \omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{13\tau_c}{1 + \omega_s^2 \tau_c^2} \right) + \\ & + \frac{1}{3} s(s+1) \left( \frac{A}{\hbar} \right)^2 \left( \frac{\tau_e}{1 + \omega_s^2 \tau_e^2} + \tau_e \right) \end{aligned} \quad (3)$$

где  $\omega_I$  и  $\omega_s$  — частоты лармовой прецессии ядра и электрона,  $\hbar = h/2\pi$  — постоянная Планка.

Первые члены этих уравнений обусловлены диполь-дипольным взаимодействием и зависят от расстояния  $r$  между наблюдаемым ядром и парамагнитным центром. Это взаимодействие определяется временем корреляции дипольного электронно-ядерного взаимодействия  $\tau_c$ . Вторые члены, не зависящие от  $r$ , характеризуются временем корреляции контактного взаимодействия  $\tau_e$ . Времена корреляции определяются как

$$\begin{aligned}\tau_c^{-1} &= \tau_R^{-1} + \tau_s^{-1} + \tau_M^{-1} + \tau_D^{-1} \\ \tau_e^{-1} &= \tau_s^{-1} + \tau_M^{-1}\end{aligned}$$

где  $\tau_R$ ,  $\tau_s$ ,  $\tau_M$ ,  $\tau_D$  — времена корреляции, соответствующие вращательному движению, релаксации электронного спина, химическому и диффузионному обмену соответственно.

На времена релаксации влияют лишь переменные воздействия, времена корреляции которых совпадают по порядку величины с периодом лармовой прецессии ядерных спинов.

## II. ГИДРОФИЛЬНОЕ ЗОНДИРОВАНИЕ МИЦЕЛЛЯРНЫХ ДИСПЕРСИЙ

Быстрое уменьшение вклада диполь-дипольного взаимодействия в скорости релаксации  $T_1^{-1}$  (2) и  $T_2^{-1}$  (3) с расстоянием до парамагнитного центра ( $r^{-6}$ ) и отсутствие его угловой зависимости делают ионы с большими значениями  $A$  и  $T_e$  ( $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Gd^{3+}$  и др.) ценными зондами при структурных исследованиях. Эти ионы использованы в качестве гидрофильных релаксационных зондов как для характеристики стабильности и локальной плотности упаковки мицелл из различных ПАВ, так и для оценки пространственной ориентации полярных фрагментов в их структуре.

### 1. Оценка стабильности мицелл

Стабильность мицеллярных агрегатов представляет принципиальный интерес как для решения задач мицеллярного катализа, так и биохимии клетки. В основе оценки стабильности мицелл методом гидрофильного релаксационного парамагнитного зонда [2–9] лежит статистическая решеточная модель мицеллы Дила – Флори [20].

Парамагнитные катионы способны давать динамические комплексы с полярными группами ПАВ, ориентированными в мицеллах в водную фазу. Релаксация протонов определенных фрагментов молекулы ПАВ происходит только при столкновении гидратированного иона и фрагмента молекулы. В связи с этим представляется возможным определить, входят ли гидрофильные парамагнитные ионы в контакт с определенными частями молекул. В работах [7, 21–23] на основании анализа спектров ПМР мицелл из додецилсульфата натрия, меди, кобальта и ванадила показано, что не только протоны групп  $CH_2-SO_4^-$ , но и протоны  $(CH_2)_{10}$ -цепей и групп  $CH_3$  эффективно сталкиваются с ионами  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $VO^{2+}$  и редкоземельных элементов. Подобные столкновения могут происходить либо при проникновении ионов внутрь мицеллы, либо при выходе углеводородных цепей в штерновский слой вследствие их диффузионного движения [20, 23, 24].

Факт проникновения гидрофильных ионов в гидрофобное ядро мицеллы можно было допустить в рамках модели [25], содержащей воду в гидрофобном ядре. Однако несостоятельность этой модели «водных каналов и полостей» внутри мицеллы была доказана адекватностью механизмов гашения флуоресценции пирена на ионах в растворе и в мицеллярной дисперсии додецилсульфата натрия в воде [26], а также различием экспериментальных отношений значений времен спин-решеточной релаксации  $T_1$  ядер  $^{13}C$  и рассчитанных на основании модели «водных полостей» [27]. В работах [28, 29] убедительно доказано, что

в мицелле гидратируются только 3–4 метиленовые группы углеводородной цепи ПАВ, считая от полярной головки. Следовательно, вода способна проникнуть в гидрофобное ядро мицеллы лишь на 0,4–0,5 нм. Уточнение места локализации воды в микроэмulsionях (твин-81 – н-гексадекан –  $H_2O$ ) проведено ЯМР-спектроскопией  $^1H$ ,  $^2H$  и  $^{13}C$  методом парамагнитного зондирования ионами  $Tb^{3+}$  и  $Fe(CN)_6^{3-}$  [30]. Показано, что молекулы воды не внедряются в гидрофобные области микроэмulsionий. Действительно, спектроскопией ЭПР гидратированные ионы  $Mn^{2+}$  обнаружены только в штерновском слое водных мицелл додецилсульфата марганца [31].

Эти экспериментальные данные служат надежным обоснованием метода оценки стабильности мицелл с помощью релаксационного зонда [32–36]. Различие в уширении сигналов от разных молекулярных фрагментов ПАВ в присутствии гидрофильных релаксационных зондов характеризует степень стабильности мицеллы. Величина приращения разности полуширины сигналов от групп вблизи штерновского слоя (например,  $\alpha\text{-CH}_2$ ) и концевых  $CH_3$ -групп молекул ПАВ при введении в дисперсию парамагнитных ионов ( $Mn^{2+}$ ) может служить критерием стабильности мицелл [32, 34]. Это подтверждается экспериментально установленным фактом увеличения на два порядка разности скоростей релаксации  $\Delta T_1^{-1}$  ядер  $^{13}C$  групп  $\alpha\text{-CH}_2$  и  $CH_3$  додецилсульфата натрия при повышении его концентрации в воде выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ) в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  [27]. Отличие механизмов релаксации объясняется ростом константы комплексообразования ионов  $Mn^{2+}$  с молекулами додецилсульфата натрия при переходе от раствора к мицеллярной системе.

Таблица 1  
Разность полуширина сигналов ПМР  $\alpha\text{-CH}_2$ - и  $CH_3$ -групп дисперсий ПАВ (0,1 моль/л в  $D_2O$ ) [34] и значения критерия стабильности

ПАВ	$(\Delta v_{1/2}^{\alpha\text{-CH}_2} - \Delta v_{1/2}^{CH_3})$ , Гц		Приращение $(\Delta v_{1/2}^{\alpha\text{-CH}_2} - \Delta v_{1/2}^{CH_3})$ при введении $Mn^{2+}$ , Гц
	без $Mn^{2+}$	$10^{-5}$ моль/л $Mn^{2+}$	
Стеарат калия	0,70	2,70	2,00
Пальмитат калия	0,23	0,71	0,48
Миристат калия	0,65	0,86	0,21
Олеат калия	0,50	1,70	1,20
Линолеат калия	0,08	0,40	0,32
Линоленоат калия	0,07	0,32	0,25
Смесь синтетических жирных кислот	0,83	2,57	1,74
Алкилсульфонат натрия	3,1	4,4	1,3

В табл. 1 даны значения критерия стабильности для ряда мицелл из калиевых солей жирных кислот [34]. Наиболее стабильные мицеллы, как видно из табл. 1, образуют стеарат калия, а также смесь синтетических жирных кислот и алкилсульфонат натрия, используемые в промышленности в качестве эмульгаторов при полимеризации [32]. По мере уменьшения длины углеводородной цепи и увеличения ее непредельности стабильность мицелл уменьшается. В работах [33, 34] рассмотрено влияние лейканола на стабильность мицелл из калиевых солей алкилзамещенных бензилбензойных и жирных кислот. С помощью ионов  $Mn^{2+}$  показано, что сам лейканол не образует в воде мицелл и разрывает мицеллы из других ПАВ.

С другой стороны, если молекулы ПАВ способны образовывать агрегаты в структуре мицелл, стабильность мицелл увеличивается. Подобные агрегаты со средним временем жизни  $\sim 10$  мс и стехиометрией, зависящей от температуры, обнаружены в смешанных мицеллах алкилсульфоната натрия и дегидроабиетата калия [32]. Влияние стабильно-

сти слоя ПАВ, адсорбированного полимерно-мономерными частицами, на микроблочность эмульсионных сополимеров показано в работах [34, 37, 38], а на константу скорости реакции сополимеризации — в работе [33].

Анализ особенностей связывания парамагнитных ионов с мицеллами додецилсульфата натрия в воде [23, 39] позволил предложить метод измерения ККМ по индуцированным кобальтом сдвигам ЯМР-сигналов ПАВ [40]. При росте концентрации ПАВ выше ККМ в присутствии ионов  $\text{Co}^{2+}$  наблюдается резкое увеличение химического сдвига сигналов от алкильных цепей относительно сигнала ацетона, введенного в систему в качестве стандарта. Это явление можно объяснить сорбцией ионов  $\text{Co}^{2+}$  в штерновском слое при мицеллообразовании.

Аналогичные исследования, проведенные для неионогенных ПАВ [41], дают возможность зондирования их водных мицелл [42]. Например, обнаруженная анизотропия индуцированного ионами  $\text{Tb}^{3+}$  сдвига в спектрах ЯМР  $^1\text{H}$  Тритона-Х-100 и Тритона-Х-305 в воде (рис. 1) была связана с наличием градиента концентрации соли по толщине оксиэтильного слоя, зависящего от противоиона. Эти результаты согласуются с флуоресцентными измерениями [43] и свидетельствуют о том, что проникающая способность электролитов в мицеллы неионогенных ПАВ определяется электростатическими взаимодействиями на границе мицелла — вода.

В работах [21, 22, 44] с помощью ионов  $\text{VO}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  изучен мицеллярный катализ обмена протонов воды в первой координационной сфере катионов. Подобный мицеллярный катализ связан с наличием электростатического потенциала на поверхности мицеллы из додецилсульфата натрия [21]. Микроэмульгирование указанной системы с толуолом приводит к ускорению обмена [22, 44].

В качестве парамагнитных центров для анализа коллоидных систем можно использовать иминоксильные метки подобно тому, как это сделано для мицелл из ионных ПАВ, содержащих феноксигруппы [45]. Наконец, можно проводить ЯМР-зондирование мицелл за счет сдвигов, индуцированных магнитно-анизотропными (обычно ароматическими) веществами и растворителями [46, 47]. Однако эти методы по эффективности значительно уступают методу гидрофильного парамагнитного зонда и не получили развития.

## 2. Определение конформации молекул ПАВ в структуре коллоидных систем

Благодаря зависимости скоростей релаксации ядер и индуцированного сдвига их сигналов в спектрах ЯМР от расстояния  $r$  до парамагнитного центра (уравнения (1)–(3)), можно оценить предпочтительную конформацию и пространственную ориентацию полярного фрагмента молекулы ПАВ в структуре коллоида [5, 35, 36, 48, 49]. Для малых молекул ПАВ можно определить также конформацию алкильных цепей [50, 51]. Конформация полярного фрагмента при переходе от мономеров ПАВ в воде к мицеллам, как правило, не изменяется [35, 49]. Так, введение  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$  или  $\text{Eu}^{3+}$  в дисперсию N-карбоалкилоксиметилен-2-метил-5-винилпиридиний бромидов при их концентрации в воде ниже и выше критической концентрации мицеллообразования (ККМ<sub>1</sub>) показало, что конформация молекулы ПАВ относительно связи  $\text{CH}_2\text{—COO}$

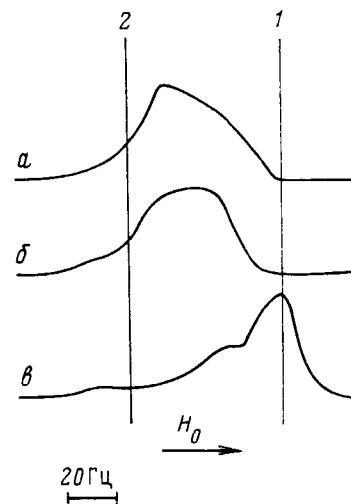


Рис. 1. Форма сигнала ЯМР  $^1\text{H}$  оксиэтильных протонов в 5%-ном растворе Тритона-Х-100 в воде в присутствии  $\text{TbCl}_3$  (а),  $\text{Tb}(\text{NO}_3)_3$  (б) и  $\text{Tb}(\text{ClO}_4)_3$  (в); 1 — положение сигнала свободного полиэтиленгликоля 1000 в присутствии этих солей, 2 — положение сигнала в отсутствие солей [42]

остается заслоненной. Однако при переходе от сферических мицелл к асимметричным выше ККМ<sub>2</sub> торсионный угол увеличивается, заслоненность нарушается и пиридиниевое ядро выходит из плоскости монослоя [35].

Подобные изменения конформации при полиморфных переходах обнаружены в водных дисперсиях солей моно-, ди- и триаллиламмония общей формулы  $(CH_2=CH-CH_2)_n^+ (CH_3)_{3-n}CH_2COORBr^-$ , где  $n=1-3$  и мономеров на основе солей метакрилоилоксиэтиламмония  $CH_2=C(CH_3)COOC_2H_4^+ (CH_3)_2CH_2COORBr^-$ , где  $R=C_{10}H_{21}-C_{16}H_{33}$  [36].

Значения селективных уширений сигналов в спектрах ЯМР <sup>1</sup>Н анизотропных мицелл, а также анализ структуры молекул ПАВ с помощью моделей позволили оценить по уравнению (3) предпочтительные конформации полярного фрагмента (рис. 2). Рассчитанные для таких кон-

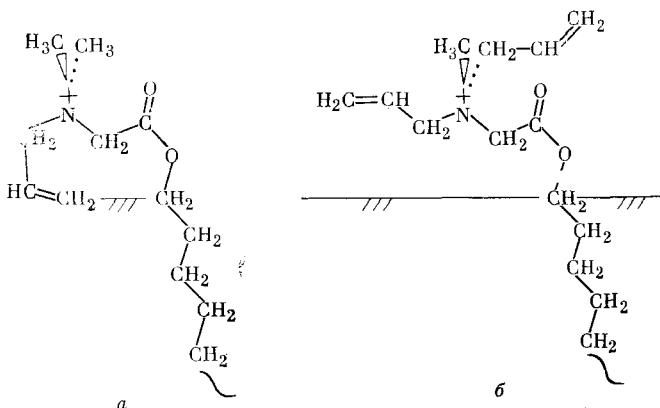


Рис. 2. Конформация аллиламмонийных ПАВ в асимметричных мицеллах: *a* —  $n=1,3$ ; *b* —  $n=2$  [36]

формаций площади, приходящиеся на молекулу, хорошо согласуются с экспериментально определенными на границе раздела вода — воздух [36]. Стабилизация монослоя при переходе от асимметричных мицелл к ламеллярной структуре сопровождается выходом метакрилатных и N-метильных групп в водную фазу [36, 48]. Об этом свидетельствует увеличение уширения сигналов от соответствующих фрагментов при введении ионов Mn<sup>2+</sup> (табл. 2). Полученные выводы о связи конформации и пространственной ориентации полярных фрагментов поверхностью-актив-

Таблица 2

Значения индуцированных катионами Mn<sup>2+</sup> уширений  
ПМР-сигналов дисперсий N-цетил-,  
N,N-диметилметакрилоилоксиэтиламмоний бромидов в воде [36]

Группа протонов	$\Delta\Delta\nu_{1/2}$ , Гц *	
	асимметричные мицеллы	ламеллы
CH <sub>3</sub> (концевой)	0,01	0,02
(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub>	4,28	0,60
CCH <sub>3</sub>	1,04	1,50
<sup>+</sup> NCH <sub>3</sub>	1,50	2,45
$\alpha\text{-CH}_2$	8,06	уширен
$=\text{CH}(\text{транс})$	5,18	уширен
$=\text{CH}(\text{цик})$	5,18	уширен

\*  $\Delta\Delta\nu_{1/2} = \Delta\nu_{1/2}([Mn^{2+}] \neq 0) - \Delta\nu_{1/2}([Mn^{2+}] = 0)$

ных мономеров с их полиморфизмом в воде позволили понять закономерности их эмульсионной полимеризации [35, 36, 48, 52].

Анализ конформаций алкильных фрагментов дибутилфосфата натрия в растворе и в мицелле с помощью ионов  $\text{Ni}^{2+}$  и  $\text{VO}^{2+}$  [50] позволили выбрать наиболее вероятные конформации цепи РОСССС. Как видно из табл. 3, вероятность ряда конформеров при переходе от раствора ПАВ к мицеллам возрастает. Использование ионов  $\text{Mn}^{2+}$  в качестве парамагнитного зонда показало, что алкильные фрагменты ПАВ не

Таблица 3

Вероятности конформеров алкильных цепей дибутилфосфата натрия [50]

Конформер	<i>P</i>	
	мономер	мицелла
<i>TTT</i>	0,132	0,200
<i>TTG<sup>+</sup>+TTG<sup>-</sup></i>	0,067	0,086
<i>TG<sup>+</sup>T+TG<sup>-</sup>T</i>	0,057	0,086
<i>G<sup>+</sup>TT+G<sup>-</sup>TT</i>	0,057	0,062
<i>TG<sup>+</sup>G<sup>+</sup>+TG<sup>-</sup>G<sup>-</sup></i>	0,029	0,037

Примечание: *P* — вероятность конформера, *T* — транс- и *G* — гаис- ротамеры

попадают в водную фазу. При этом первый сегмент цепи имеет почти трансoidную конформацию, хотя конформация последнего сегмента та-кая же, как и в жидким углеводороде [51].

Таким образом, полиморфные переходы в коллоидных системах вызывают изменение конформации не только гидрофильных, но и гидро-фобных фрагментов молекулы ПАВ.

### III. ГИДРОФИЛЬНОЕ ЗОНДИРОВАНИЕ ЛИПОСОМ

Метод гидрофильного парамагнитного зондирования открывает широкие перспективы для изучения структуры и молекулярной динамики липидных мембран, являющихся замкнутыми ламелами. Он позволяет дифференцированно наблюдать сигналы от молекул, расположенных на внешней и внутренней поверхностях бислойной везикулы [2—6, 8, 9]. По соотношению интегральных интенсивностей этих сигналов можно оценить размеры мембранных частиц, а также обнаружить асимметрию молекулярного состава, т. е. различия в распределении липидов, белков и других компонентов между внешней и внутренней поверхностями мембраны. Метод позволяет судить о конформации и пространственной ориентации полярных фрагментов молекул липидов, обращенных в водную фазу. Он дает возможность изучать процессы транс- и межмембранных переноса ионов, молекул липидов, белков, всевозможных биологически активных соединений.

Некоторые аспекты применения метода гидрофильного парамагнитного зондирования везикул и биологических мембран рассмотрены в обзора [9, 53—58].

#### 1. Дифференциация поверхностей мембранны спектроскопией ЯМР и оценка размеров липосом

Тестиование бислойности липосом из амфотерных липидов в воде можно проводить с использованием парамагнитных ионов лантанидов [3—5, 8, 9, 59—73], а из анионных липидов — с помощью двухвалентных ионов марганца [2, 3, 6, 9, 74—82] или неорганических анионов [46, 80—83], не вызывающих флокуляцию коллоидной системы.

При введении сдвигающих ионов во внешний объем обработанной ультразвуком дисперсии фосфатидилхолина (ФХ) в воде в спектре ПМР (рис. 3, *в*) наблюдается по два сигнала от протонов полярной группы. Один из этих сигналов совпадает по химическому сдвигу с сигналом от

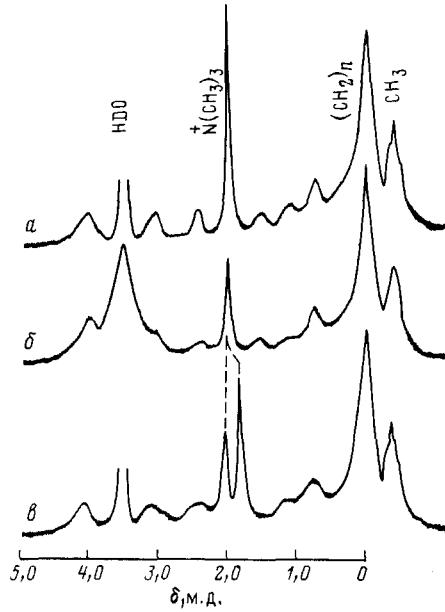


Рис. 3

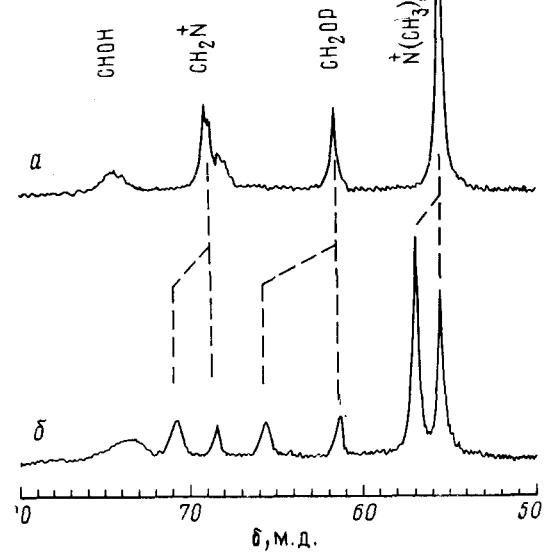


Рис. 4

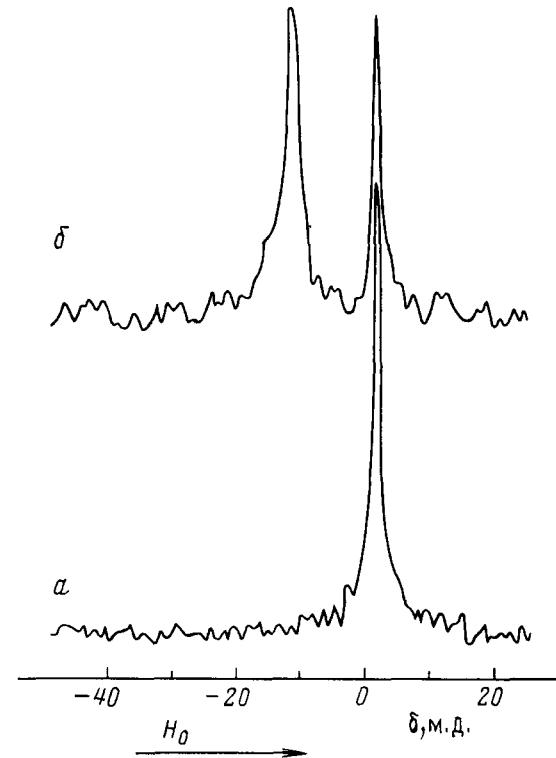


Рис. 5

Рис. 3. Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  5%-ной обработанной ультразвуком дисперсии яичного ФХ: *а* — в  $\text{D}_2\text{O}$ ; *б* — после добавления  $10^{-3}$  моль/л  $\text{MnSO}_4$  или  $10^{-2}$  моль/л  $\text{Eu}(\text{NO}_3)_3$  во внешний объем образца [3]

Рис. 4. Область холиновых сигналов спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$   $\{^1\text{H}\}$  20%-ной обработанной ультразвуком дисперсии СМ: *а* — в  $\text{D}_2\text{O}$ ; *б* — после добавления  $5 \cdot 10^{-2}$  моль/л  $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$  во внешний объем образца [8]

Рис. 5. Спектры ЯМР  $^{31}\text{P}$   $\{^1\text{H}\}$  10%-ной обработанной ультразвуком дисперсии яичного ФХ: *а* — в  $\text{D}_2\text{O}$ ; *б* — после добавления  $10^{-2}$  моль/л  $\text{Pr}(\text{NO}_3)_3$  во внешний объем образца [4]

«чистой» дисперсии (рис. 3, *a*) и соответствует полярным группам, обращенным внутрь везикулы. Другой обусловлен наружными полярными группами, координирующими с ионами лантанида [3, 9, 59, 60]. Направление сдвига сигналов противоположно по знаку, а уширяющее действие иона определяется абсолютной величиной фактора анизотропии магнитной восприимчивости [9, 60].

Подобная дифференциация внутренней и наружной поверхностей везикулы может быть проведена по спектрам  $^{13}\text{C}$  [8] (рис. 4) и  $^{31}\text{P}$  [4] (рис. 5). Полученные отношения интегральных интенсивностей наружного и внутреннего сигналов от полярных групп ( $I_{\text{нар}}/I_{\text{вн}}$ ) составляют 2,09 для ФХ и 2,03 для сфингомиелина (СМ) в воде [9].

В работах [61–63] ионы  $\text{Nd}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$  использованы для тестирования бислойности липосом из синтетических насыщенных ФХ ( $\text{C}_{10}$ – $\text{C}_{16}$ ) и фосфолипидов, содержащих полимеризуемые фрагменты итаконовой кислоты. Увеличение длины алкильных цепей в молекулах ФХ способствует формированию более стабильных везикул [61]. Добавлением дипальмитоиллецитина, *бис*(2,4-октадиеноил)-ФХ или холестерина в нестабильные везикулы из итаконатсодержащих фосфолипидов формируют два сорта стабильных бислойных липосом диаметром 40 и 140 нм [62, 63].

Помещая внутрь везикул и в наружную среду разные парамагнитные зонды (например,  $\text{Pr}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$ ), сдвигающие сигналы от полярных групп соответственно в слабое и сильное поля, можно добиться большей чувствительности метода и одновременно следить за процессами, протекающими на наружной и внутренней поверхностях бислоя [64, 65].

Влияние парамагнитных зондов на термические фазовые переходы в водных дисперсиях липидов рассмотрено в работах [59, 67–70]. Например, для дипальмитоиллецитина введение ионов  $\text{Pr}^{3+}$  повышает точку фазового перехода на 3–5° [59, 67].

Систематическая ошибка определения отношения  $I_{\text{нар}}/I_{\text{вн}}$  на ядрах  $^{31}\text{P}$  [73], возникающая из-за уменьшения ядерного эффекта Оверхаузера (ЯЭО) на сигнале от ядер, находящихся в контакте с парамагнитным зондом, при развязке от протонов не превышает для ФХ 10% [9]. Для получения более точного результата предложено титровать дисперсии релаксационным зондом ( $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ), записывая ЯМР-спектры  $^1\text{H}$  [2, 3, 74, 75] или  $^{31}\text{P}$  [74–77]. Надо, впрочем, заметить, что измерение отношения интенсивностей, проведенное в работе [74],— некорректно, вместо пиковых следует измерять интегральные интенсивности [76].

Из рис. 6 видно, что зависимости интенсивности сигнала  $^{31}\text{P}$  от содержания  $\text{Mn}^{2+}$  во внешнем объеме выходят на плато, соответствующее интенсивности сигнала от внутренних фосфатных групп [76, 77]. Для фосфатидилинозита (ФИ)  $I_{\text{нар}}/I_{\text{вн}}$  составляет 2,50.

Поскольку толщина бислоя по данным рентгеноструктурного анализа равна 3,6 нм [78], внешние диаметры везикул из ФХ и СМ составляют 24 нм, а из ФИ – 19 нм ( $\pm 1$  нм) [9]. Полученные значения совпадают с данными других методов [79].

Система, содержащая бислойные везикулы из ФХ, при титровании дает два ПМР-сигнала от групп  $\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$ , (спектры записаны при 250 МГц) [80]. Сигнал от внутренних групп  $\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$  на 0,01–0,02 м. д. сдвинут в сильное поле. Величина сдвига увеличивается со временем обработки дисперсии ультразвуком. Как показало измерение времен релаксации  $T_1$  ядер  $^{13}\text{C}$  наружных и внутренних групп  $\overset{+}{\text{N}}(^{13}\text{CH}_3)_3$  обогащенного ФХ, [71], этот сдвиг обусловлен различием в упаковке и подвижности молекул, находящихся на внешней и внутренней поверхностях бислоя. На это указывалось ранее в работе [81], авторы которой использовали ионы  $\text{Mn}^{2+}$ , а не ионы  $\text{Yb}^{3+}$ , как в [71]. Двухкомпонентные также сигналы  $^{13}\text{CO}$  [8] и  $^{31}\text{P}$  [77, 82] в спектрах фосфолипидных везикул. Обнаруженное влияние плотности упаковки молекул на величину химического сдвига [80, 81] позволило дискриминировать сигналы ЯМР (500 МГц) от мономеров, мицелл и везикул ФХ, фосфатидилэтанолами-

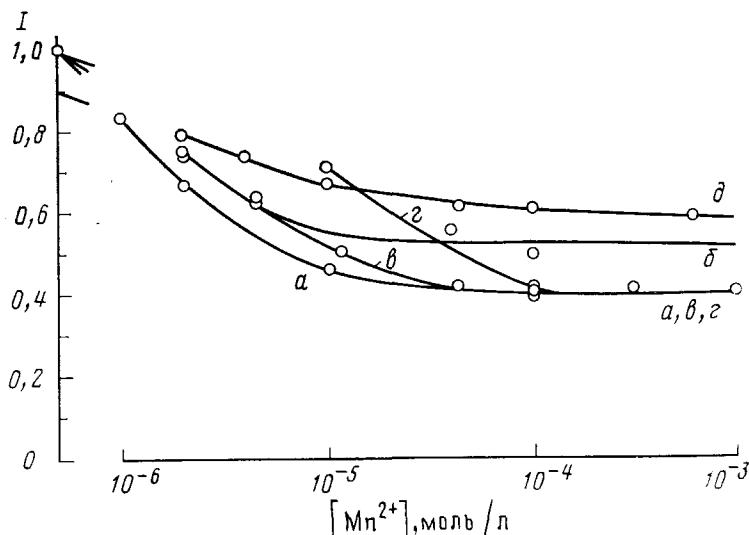


Рис. 6. Зависимости интегральной интенсивности ( $I$ ) сигнала ЯМР  $^{31}\text{P}$  для дисперсий 0,08 моль/л ФИ ( $a$ ) [73]; 0,05 моль/л смеси ( $\text{ФХ} + \text{ФГ}$ ) 1 : 1 моль/моль,  $\text{б}$  —  $\text{ФХ}$ ,  $\text{в}$  —  $\text{ФГ}$ ; сигнала ЯМР  $^1\text{H}$   $\text{N}(\text{CH}_3)_3$  0,05 моль/л  $\text{ФХ}$  ( $г$ ) и смеси ( $\text{ФХ} + \text{ФГ}$ ) 1 : 1 моль/моль ( $\delta$ ) [71] в  $\text{D}_2\text{O}$  от концентрации  $\text{Mn}^{2+}$

на (ФЭ) и СМ с помощью катионов  $\text{Pr}^{3+}$  [72]. В этих системах везикулы получали без обработки ультразвуком при добавлении короткоцепных фосфолипидов.

В работе [34] предложен метод оценки средних размеров и числа бислоев  $n$  в многослойных липосомах. Интегральная интенсивность сигнала от полярных групп, оставшегося при титровании ионами  $\text{Mn}^{2+}$  позволяет определить отношение  $I_{\text{пар}}/I_{\text{ин}}$ . Это отношение зависит от  $n$  и  $R/d$ , где  $R$  — наружный радиус липосомы,  $d$  — толщина бислоя. Показано, что соотношение длин алкильных цепей в липидоподобных ПАВ определяет структуру липосом. Так, липосомы из N-цетил, N,N-диаллилдодецилацетоаммонийбромида при среднем диаметре 1000 нм имеют  $n=13 \pm 1$ , а из N-додецил, N,N-диаллилцетилацетоаммонийбромида при среднем диаметре 25 нм — бислойны.

## 2. Факторы, влияющие на время жизни гидрофильного зонда в связанном состоянии

Время жизни парамагнитного зонда в связанном с мембраной состоянии определяет величину индуцированного сдвига сигналов в спектрах ЯМР. Местом связывания парамагнитных ионов является фосфатная группа молекулы фосфолипида [4, 5, 8]. Максимальное число мест связывания ионов  $\text{Mn}^{2+}$  на поверхности мембраны из  $\text{ФХ}$  составляет 0,005 на молекулу  $\text{ФХ}$  [85], а лантанидов ( $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Nd}^{3+}$ ) — 0,13 [59]. Наличие в спектрах ЯМР единственного сдвинутого сигнала при введении лантанидов в фосфолипидную дисперсию указывает на высокую скорость латерального обмена ионов между местами связывания. Время жизни ионов в связанном состоянии не зависит от их концентрации в растворе, но уменьшается при возрастании концентрации  $\text{ФХ}$  от 0,17 с (при 0,06 моль/л  $\text{ФХ}$ ) до 0,02 с (при 0,18 моль/л  $\text{ФХ}$ ) [9]. Время жизни зонда в связанном состоянии максимально при  $\text{pD}=3,5$  и уменьшается при нагревании [9].

Включение в липидный бислой анионных липидов (ФИ и фосфатидилсерина — ФС) приводит к увеличению парамагнитных сдвигов сигналов от полярных групп [8, 76, 77]. Эти липиды, придавая поверхности бислоя отрицательный заряд, влияют на распределение ионов в штерновском слое везикулы. В результате увеличивается время жизни зонда в связанном состоянии [9]. Такое же явление лежит в основе влияния

Таблица 4

Электрофоретическая подвижность липосом ФХ в растворах различных солей калия и постоянные изотерм лэнгмюровской адсорбции различных анионов (300 К, рД 6) [87]

Анион	Подвижность, мкм·с <sup>-1</sup> ·В <sup>-1</sup> ·см	Δ, м. д.	K, моль <sup>-1</sup>
Cl <sup>-</sup>	-0,45±0,01	0,45±0,01	1,67±0,45
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0,46±0,03	1,01±0,02	4,03±0,26
SCN <sup>-</sup>	-1,85±0,41	0,99±0,01	23,7±1,1
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,25±0,09	-0,43±0,01	14,9±0,2

неорганических анионов на величины индуцированных сдвигов [4, 8, 46, 53, 86, 87]. Однако в этом случае перераспределение ионов происходит в результате селективной лэнгмюровской адсорбции анионов на поверхности липидного бислоя [87]. Отношение констант связывания анионов *K* удовлетворительно коррелирует с отношением электрофоретических подвижностей липосом в присутствии этих анионов (табл. 4) [86, 87].

### 3. Определение конформации и пространственной ориентации полярных фрагментов

Диполь-дипольное уширение сигналов в спектрах ЯМР коллоидных систем препятствует прямому использованию констант спин-спинового взаимодействия для оценки конформации полярных групп. Поэтому в работах [5, 8, 49] для определения конформации и пространственной ориентации фосфорилхолиновых цвиттер-ионов на поверхности везикул

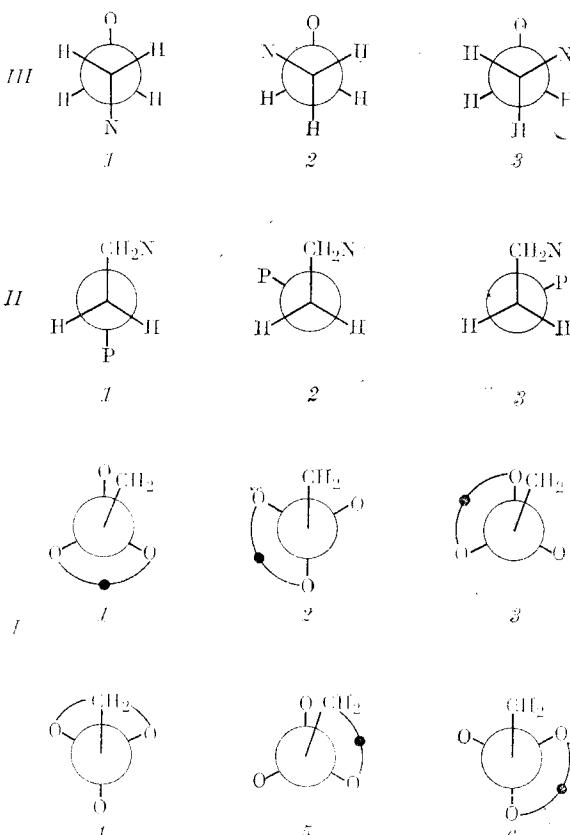


Рис. 7. Ротамеры фосфорилхолиновой группы по связям Р—О (I), О—С (II) и С—С (III) [49]

использованы индуцированные ионами  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$  относительные псевдоконтактные сдвиги сигналов в ЯМР-спектрах  $^1\text{H}$  и  $^{13}\text{C}$ . Экспериментальные значения величин сдвигов вместе с рассчитанными по уравнению (1) для всех возможных по связям  $\text{P}-\text{O}$ ,  $\text{O}-\text{C}$ ,  $\text{C}-\text{C}$  54 ротамеров (рис. 7) нанесены на карты относительных индуцированных сдвигов ядер  $^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}$  (рис. 8).

Основной вклад в конформацию цвиттер-иона вносят *транс*-формы 111, 211, 611 (70–83%) [5, 49], причем их вероятность возрастает со степенью ненасыщенности углеводородных цепей и с ростом температуры. Это, по-видимому, связано с увеличением площади, приходящейся на молекулу ПАВ [28] и согласуется с данными ЯМР D и  $^{31}\text{P}$  [88].

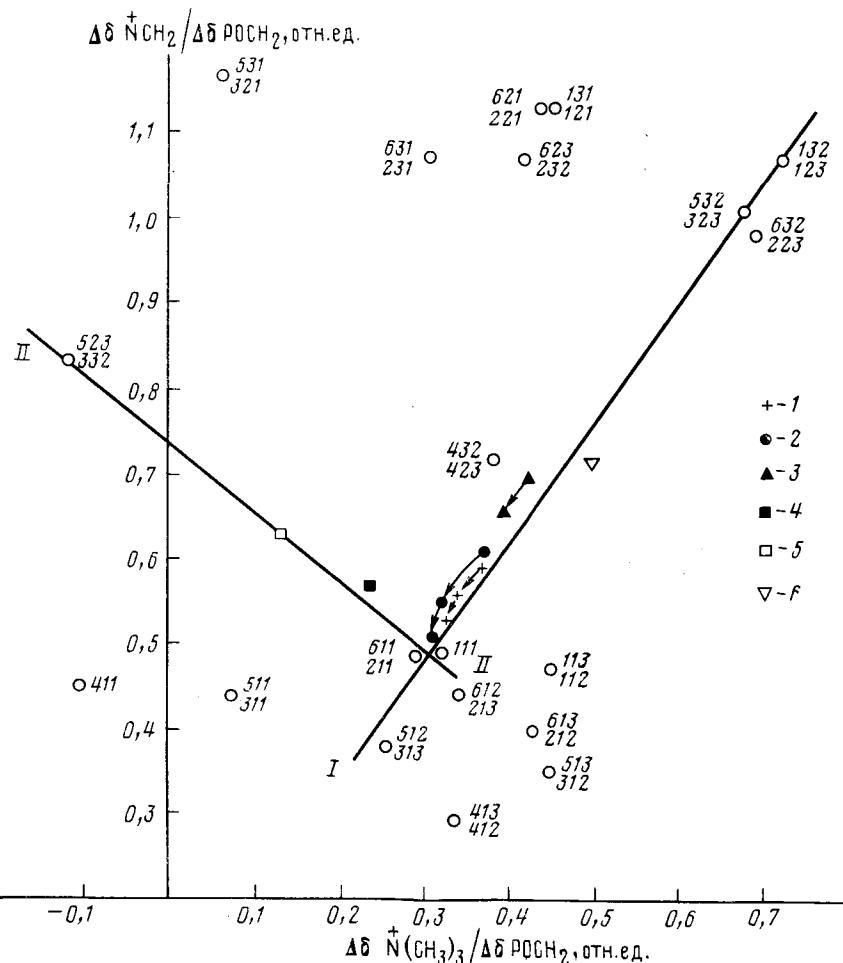


Рис. 8. Карта индуцированных сдвигов для ядер  $^1\text{H}$  цвиттер-иона; 1 — яичный ФХ, 2 — диолеоил-ФХ, 3 — дипальмитоил-ФХ, 4 — лизолецитин, 5 — диацетат глицерофосфорилхолина, 6 — стеарилфосфохолин [49]

Полученные выводы подтверждаются для ротамеров по связи  $\text{O}-\text{C}$  анализом вицинальных констант спин-спинового взаимодействия  $^3J_{\text{РОСС}}$  [49] и  $^3J_{\text{РОСН}}$  [89], найденных без введения парамагнитного зонда. Следовательно, парамагнитные ионы не оказывают заметного влияния на конформацию полярной группы на поверхности везикулы, и опасения, высказанные на этот счет авторами работ [15, 90], безосновательны.

В мицеллах лизолецитина и диацетата глицерофосфорилхолина вместо  $g_{\text{осн}}$ -форм 132 $\equiv$ 123 и 323 $\equiv$ 532 реализуется другой набор 523 $\equiv$ 332 [49], что согласуется с результатами работ [91, 92], в которых парамагнитный зонд не применяли.

То обстоятельство, что сигналы ЯМР от ядер фосфорилхолина и от группы  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$  жирнокислотных цепей имеют противоположно направленные индуцированные сдвиги, свидетельствует, в соответствии с уравнением (1), о том, что при всех выбранных конформациях фосфорилхолиновый цвиттерион расположен параллельно поверхности мембран [5, 8, 49]. Это заключение подтверждено впоследствии другими методами: измерением ЯЭО  $^{31}\text{P}$  в везикулах [93, 94], ЯМР  $^{31}\text{P}$  ориентированных бислоев [95, 96], нейтронографией (для ФХ) [97], рентгеноструктурным анализом (для ФЭ) [98], измерением анизотропии химсдвига  $^{31}\text{P}$  и ЯМР D как для ФЭ [99], так и для ФХ [100, 101], квантовохимическими расчетами [102]. Таким образом, парамагнитные ионы не меняют ориентации полярной головки на границе фазового раздела [5, 9, 49, 103].

Отсюда следует неправомерность переноса полученного для плоских бислоев вывода о нормальном расположении цвиттериона на везикулы [104, 105]. Выше отмечалось, что при переходе от незамкнутых ламеллярных структур к бислойным липосомам пространственная ориентация полярного фрагмента меняется от нормальной поверхности бислоя к планарной [36].

Основной причиной стабилизации развернутой *транс*-конформации и планарной ориентации фосфорилхолинового цвиттериона на поверхности везикулы следует считать межмолекулярное взаимодействие между фосфатными и  $\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$ -группами соседних молекул [49, 102]. Этот вывод имеет принципиальное значение для понимания молекулярной организации и функционирования биологических мембран.

#### 4. Обмен молекулами липида и композиционная асимметрия мембран

Липосомы, как и мицеллы, являются динамически устойчивыми структурами. Однако молекулы ПАВ в липосомах весьма подвижны. Они участвуют в трех типах переноса: в латеральной диффузии [106], в *транс*- [107] и межмембранных [76] переносе. Соотношение скоростей этих процессов зависит от структуры молекул липида и коллоидной системы, молекулярного состава бислоя и внешних факторов (температуры, ионной силы, наличия транспортных белков и т. д.). Это соотношение определяет возможность формирования липосом с асимметричным составом наружного и внутреннего монослоев, а также молекулярных кластеров в монослое.

Метод гидрофильного парамагнитного зонда является наиболее эффективным как при изучении трех видов молекулярного обмена [5, 65, 76, 77, 108–110], так и при анализе молекулярной топографии коллоидных систем [64, 65, 73–77, 111–114].

Скорость трансмембранного переноса молекул липида невелика. Постоянная времени процесса превышает  $2,2 \cdot 10^4$  с для яичного ФХ [107] (определен методом спин-зонда) и  $4,3 \cdot 10^4$  с для  $[\overset{+}{\text{N}}-\overset{13}{\text{C}}\text{H}_3]$  диолеоил ФХ [108] (определен по проникновению сквозь бислой ионов  $\text{Pr}^{3+}$ ) при 350 К. Однако эта скорость может быть увеличена при моделировании бислоя системой обратных мицелл [5, 109] или введением малых количеств лизолецитина (ЛФХ) и перекисей [65, 110].

В работах [5, 109] найдены скорости и термодинамические параметры обмена при использовании смеси обратных мицелл ФХ в бензole, содержащих и не содержащих ионы  $\text{Mn}^{2+}$  или  $\text{Pr}^{3+}$  в солюбилизированном водном пузырьке.

Кинетика трансмембранного переноса молекул ФХ [110] и ФИ [65] в присутствии ЛФХ или перекисей изучена введением снаружи везикул ионов  $\text{Pr}^{3+}$  или  $\text{Yb}^{3+}$ . Применение техники двойного зонда [64] показало, что при переносе молекул ФИ уменьшение индуцированного сдвига сигнала от наружных  $\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$ -групп сопровождается увеличением сдвига сигнала от внутренних. Результаты, полученные как для обратных мицелл, так и для везикул, свидетельствуют о кооперативном характере трансмембранного переноса молекул.

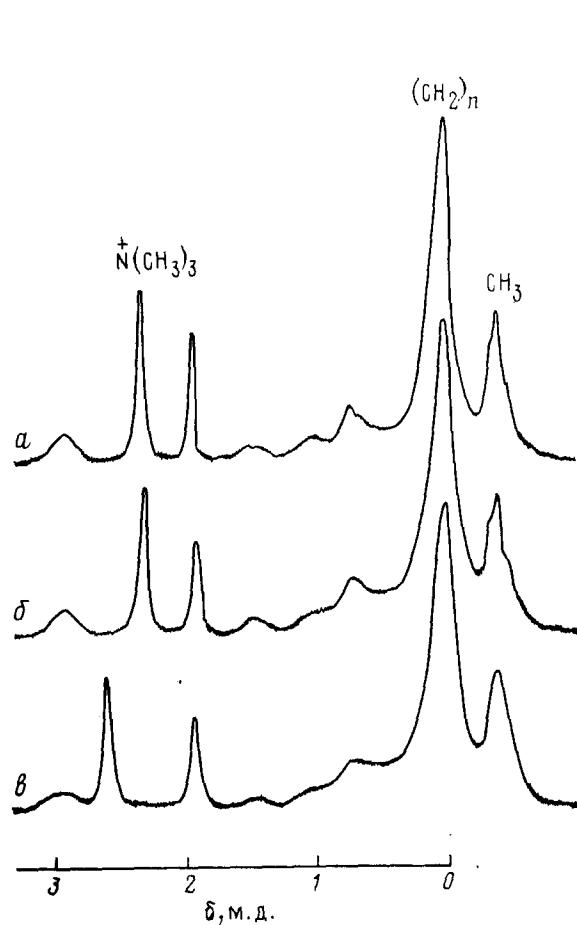


Рис. 9

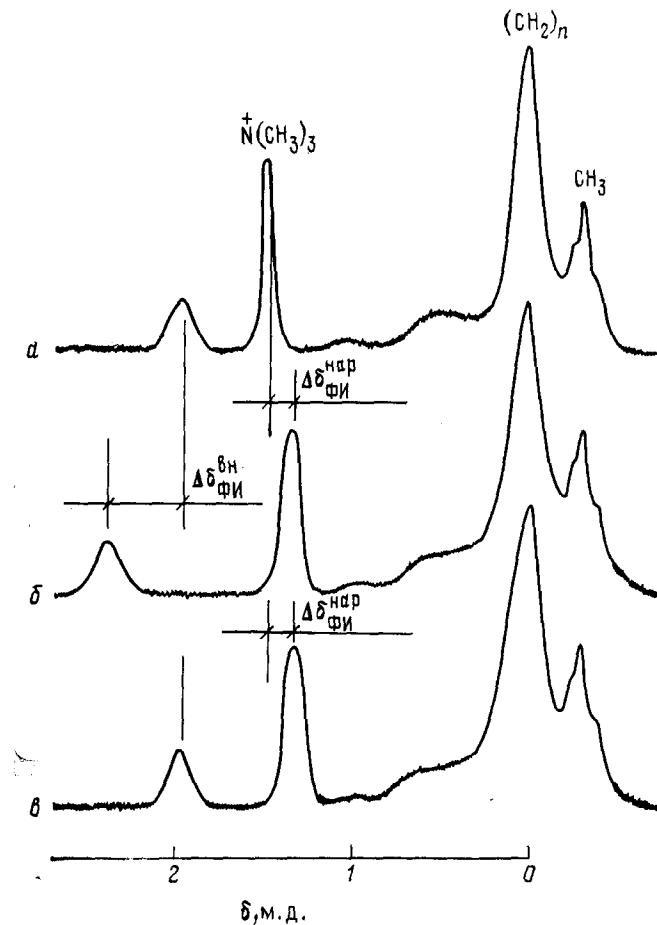


Рис. 10

Рис. 9. Спектры ЯМР  $^1H$  фосфолипидных дисперсий в  $D_2O$  после добавления  $10^{-2}$  моль/л  $Pr^{3+}$  снаружи: *а* — везикул из ФХ, *б* — смешанных везикул из ФХ и ФИ до и *в* — после обмена ФИ под действием транспортного белка (323 К) [77]

Рис. 10. Спектры ЯМР  $^1H$  фосфолипидных дисперсий в  $D_2O$ : *а* — везикулы ФХ, *б* — обработанные ультразвуком смешанные везикулы из ФХ и ФИ, *в* — везикулы ФХ со спонтанно встроенным ФИ после совместной инкубации везикул ФХ и ФИ в течение  $5,8 \cdot 10^4$  с при 296 К, содержащие  $10^{-2}$  моль/л  $Pr^{3+}$  внутри и  $10^{-2}$  моль/л  $Eu^{3+}$  снаружи [65]

Межмембранный обмен молекулами липидов инициируется либо транспортным липид-связывающим белком, либо ЛФХ [76, 77]. Анализ кинетики процесса основан на увеличении индуцированного парамагнитного сдвига сигналов от полярных групп при встраивании в бислой молекул анионного липида (ФИ) (рис. 9, 10). Изменение величины индуцированного сдвига и соотношения  $I_{\text{пар}}/I_{\text{ви}}$  позволяют судить о механизме межмембранного обмена.

При обмене формируются везикулы с асимметричным расположением липидов (рис. 11). При спонтанном обмене молекул ФХ и ФИ [65] или в присутствии ФИ-переносящего белка, ФИ встраивается исключительно в наружный монослой [77]. Если в системе присутствуют мицеллы ЛФХ, ФИ локализуется преимущественно во внутреннем монослое. В первом случае происходит мономолекулярный обмен, а во втором —

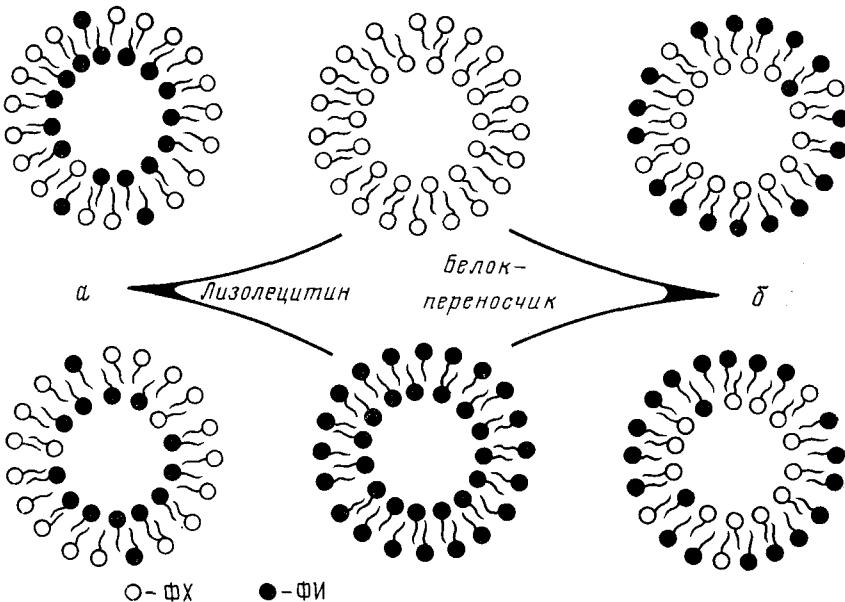


Рис. 11. Схема межмембранного обмена под действием: *а* — ЛФХ и *б* — транспортного белка [53]

кооперативный. Спектры ЯМР  $^{13}\text{C}[\text{N}-^{13}\text{CH}_3]$  пальмитоил ЛФХ, встроенного в везикулы из диолеоил-ФХ, в присутствии  $\text{Dy}^{3+}$  показали, что сам ЛФХ локализован в наружном монослое везикулы [111].

Кривизна бислой также способствует асимметричному расположению липидов. В смешанных везикулах ФХ — ФГ молекулы фосфатидилглицерина (ФГ) находятся преимущественно на внешней поверхности [74, 75], как было показано методом ЯМР  $^{31}\text{P}$  и  $^1\text{H}$  с  $\text{Mn}^{2+}$ . Подобное распределение не понятно, поскольку другие анионные липиды ФС [64, 82] и ФИ [65] преимущественно находятся во внутреннем монослое, на что указывают более точные данные с двумя зондами  $\text{Pr}^{3+}$  и  $\text{Eu}^{3+}$  (рис. 10). Это распределение объясняется более плотной упаковкой молекул во внутреннем монослое, ввиду чего объемные полярные фрагменты ФХ лучше размещаются в наружном монослое. Однако по мере увеличения содержания ФС или ФИ электростатические силы отталкивания вытесняют все большее число молекул анионных липидов в наружный слой, и асимметрия мембранны уменьшается [64, 65].

Асимметрия распределения холестерина в везикулах из ФХ была также впервые обнаружена методом парамагнитного зонда ( $\text{Pr}^{3+}$ ) [112]. При этом в везикулах из ненасыщенных ФХ холестерин находится в наружном монослое, а из насыщенных — везде [113]. Постоянная спонтанного межмембранного обмена холестерина составляет  $0,0117 \text{ мин}^{-1}$  [113].

Скорость латеральной диффузии холестерина зависит от молекулярной структуры ФХ [53, 114]. Поэтому, если в липосомах одновременно присутствуют молекулы SS-, SU- и UU-типа (S, U — насыщенные и ненасыщенные алкильные цепи), холестерин чаще вступает в контакт с молекулами UU-типа, чем с молекулами SU- или SS-типа. Таким образом, если в мембране имеются разные пузы ФХ, холестерин окажется преимущественно в фазе, содержащей более ненасыщенные молекулярные виды ФХ.

## 5. Анализ взаимодействия липосом с низкомолекулярными и биологически активными соединениями

Рассмотренный пример изучения поведения молекул холестерина в структуре липосом свидетельствует о перспективности использования метода парамагнитного зонда для выяснения характера взаимодействия физиологически активных соединений с мембраной. Большинство исследований базируется на использовании эффекта трансмембранных переноса катионов лантанидов под действием ионофоров [66, 115–117], местных анестетиков [118, 119] и других физиологически активных соединений [76, 77, 120] подобно тому, как было сделано для ЛФХ [110].

Для изучения транспорта катионов  $\text{Pr}^{3+}$ ,  $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Dy}$  через бислой использованы ионофор X-537A [115], аламетицин [116], ионофор A23187 типа никерцина [117], гликофорин [66], местные анестетики: тетраканин, прокайн, лидокаин [118], изопреноиды [119], таурохолат натрия [120]. Катионы лантанидов выступают здесь в качестве физиологических аналогов кальция. Энергия активации процесса составляет 85 кДж/моль [119].

Иная методика предложена для определения кинетики транспорта  $\text{Na}^+$  и  $\text{Li}^+$  ионофором монензином с помощью релаксационного зонда  $\text{Gd}^{3+}$ . Поскольку скорость переноса по порядку величины совпадала со скоростью релаксации ядер  $^{23}\text{Na}$  и  $^{7}\text{Li}$ , подвижность ионов дала вклад во времена релаксации. Найденные значения  $v_{\text{Na}}=4$  нм/с и  $v_{\text{Li}}=0,035$  нм/с соответствуют аффинности ионофора по отношению к катионам [121].  $^{13}\text{C}$ -Обогащенные липиды использованы при парамагнитном гидрофильном зондировании распределения жирных кислот в везикулах ФХ при градиенте рН [58]. Релаксационный зонд  $\text{Mn}^{2+}$  позволил установить, что молекула 1-анилино-8-нафталинсульфоната локализованы на поверхности везикул [122].

## IV. СТРУКТУРА БИОКОЛЛОИДНЫХ СИСТЕМ

Транспорт ионов через мембранный барьер играет фундаментальную роль в жизнедеятельности клеток. Однако не менее важно установить механизм липид-белкового взаимодействия и поведение связанной воды в биоколлоидных системах. Особенности встраивания в липосому полипептидов (поли-*L*-глутаминовой кислоты, поли-*L*-лейцина) [123] и транспортного белка [76, 77] рассмотрены с помощью ионов  $\text{Eu}^{3+}$  и  $\text{Pr}^{3+}$  по данным спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$ . Установлено, что для бислойных везикул справедлива мозаичная модель. Согласно этой модели, белковые «айсберги» в мембране плавают в липидном море. Мозаичная модель оказалась справедливой и для липопротеинов сыворотки крови [124–127], структура которых определена спектроскопией ЯМР  $^{13}\text{C}$  и  $^{31}\text{P}$  с применением ионов  $\text{Eu}^{3+}$  и встроенных  $[\text{N}-^{13}\text{CH}_3]\text{-ФХ}$ ,  $-\text{CM}$ , 1,2-(1-олеоил- $^{13}\text{C}$ )-ФХ [124, 125]. Опыты с феррицианид-анионом и  $\text{Nd}^{3+}$  [126] подтвердили выводы работ [124, 125] о том, что все подвижные группы  $\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$  фосфолипидов как в липопротеинах низкой, так и высокой плотности находятся на наружной поверхности глобулы (рис. 12). Неполное уширение сигналов  $^{31}\text{P}$  в спектрах липопротеинов в присутствии ионов  $\text{Mn}^{2+}$  (80% в липопротеинах высокой плотности и 50% — низкой плотности) [127] может быть вызвано ошибкой в постановке эксперимента из-за конкуренции с сильным комплексоном — этилендиаминтетрауксусной кислотой.

Ионы  $Mn^{2+}$  использованы для определения локализации мембранныго белка теней эритроцитов [128]. Сравнение уширений сигналов в спектрах ПМР модельных мембран из ФХ и теней эритроцитов показало, что белок находится на поверхности биомембраны. Это согласуется с результатами анализа мембраны саркоплазматического ретикулума с помощью иминоксильного зонда по его уширяющему эффекту на сигналы ЯМР  $^1H$  и  $^{13}C$  [129].

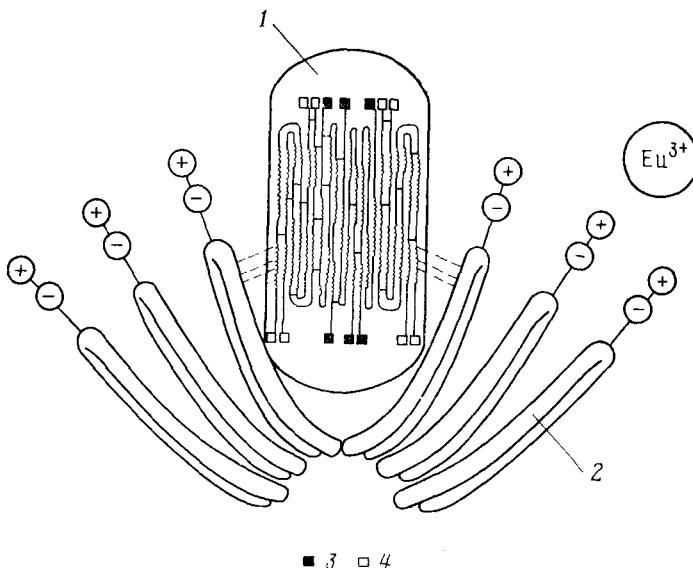


Рис. 12. Модель липопротеина высокой плотности: 1 — белок, 2 — смесь ФХ и СМ, 3 — апопротеин I, 4 — апопротеин II [125]

В работе [130] спектроскопия ЯМР  $^{31}P$  применена для измерения скорости проникновения парамагнитных ионов внутрь клеток сердца. Проникновение ионов  $Mn^{2+}$  позволило диагностировать ишемическую болезнь.

В значительном числе работ [56–58, 132, 133] релаксационные парамагнитные зонды используются для исследования поведения воды в биологических системах. В первой из подобных работ с помощью ионов  $Mn^{2+}$  идентифицированы сигналы от свободной и связанной (внутриклеточной, при 4 м. д.) воды и нативном седалищном нерве кролика [131]. В методическом плане все остальные исследования подобны этому. В качестве одной из наиболее интересных отметим работу [132], в которой спектроскопией ЯМР изучен межклеточный транспорт воды в корнях проростков пшеницы. Введение во внеклеточное пространство ионов  $Mn^{2+}$  позволяет исключить из рассмотрения вакуолярный транспорт воды и контролировать симпластный путь. Известно, что марганец необходим для выделения кислорода при фотосинтезе в мембране хлоропласта. Для оценки состояния ионов марганца, связанных с мембраной, использованы значения времени спин-решеточной релаксации  $T_1$  протонов воды в суспензии тилакоидных мембран хлоропласта [133]. Показано, что атомы марганца имеют степени окисления II и III.

Большое количество исследований посвящено изучению структуры и топографии белково-коллоидных систем с применением парамагнитных гидрофильных зондов [14, 15]. Не останавливаясь на характеристики всех этих однотипных работ, рассмотрим результаты одной из них, где возможности метода использованы наиболее полно [134]. Авторы этой работы с помощью зондов  $Mn^{2+}$ - и  $Cr^{3+}$ -АТФ определили расстояния до разных областей карбамоил-фосфат-синтетазы (КФС) спектроскопией ЯМР  $^1H$ ,  $^{13}C$ ,  $^{15}N$ ,  $^6Li$ ,  $^7Li$ ,  $^{31}P$  (табл. 5). Эти результаты дали первую топографическую карту окружения субстратов, расположения

Таблица 5

Расстояние от ионов  $Mn^{2+}$ - и  $Cr^{3+}$ -АТФ ( $r$ ) до ядер лиганда в комплексе КФС из *E. coli* [134]

$Mn^{2+}$ —лиганд			$Cr^{3+}$ -АТФ—лиганд		
лиганд	ядро	$r$ , нм	лиганд	ядро	$r$ , нм
Glu	$^{13}C$ (5)	$0,86 \pm 0,06$	Glu	$^{13}C$ (5)	$0,70 \pm 0,05$
$Co(NH_3)_4$ -АТФ	$^{31}P$ ( $\alpha\beta$ ); $^{31}P$ ( $\gamma$ )	$0,66 \pm 0,04$ ; $0,64 \pm 0,04$	$HCO_3^-$ ; $NH_4^+$	$^{13}C$ ; $^{15}N$	$0,47 \pm 0,03$ $0,74 \pm 0,05$
$Li^+$	$^7Li$ ; $^6Li$	$0,75 \pm 0,04$ ; $0,80 \pm 0,05$	—	—	—

ионов-активаторов и аллостерических модификаторов в димере КФС из *E. coli*.

Таким образом, применение парамагнитных сдвигающих и релаксационных гидрофильных зондов в комплексе с традиционными методами исследования коллоидных систем спектроскопией ЯМР открывает широкие возможности при анализе их структуры и молекулярной динамики. Полученные этим методом результаты представляют принципиальный интерес для установления механизмов мицеллярного катализа и эмульсионной полимеризации. Метод дал возможность изучить широкий круг свойств мембранных систем, важных как для выяснения молекулярной структуры и механизма функционирования клеточных мембран, так и для развития мембранных технологий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Яблонский О. П., Шапиро Ю. Е., Коновалова В. П.//Коллоид. журн. 1984. Т. 46. С. 610.
2. Бергельсон Л. Д., Барсуков Л. И., Дубровина Н. И., Быстров В. Ф.//Докл. АН СССР. 1970. Т. 194. С. 222.
3. Bystrov V. F., Dubrovina N. I., Barsukov L. I., Bergelson L. D.//Chem. Phys. Lipids. 1971. V. 6. P. 343.
4. Bystrov V. F., Shapiro Yu. E., Viktorov A. V. et al.//FEBS Lett. 1972. V. 25. P. 337.
5. Барсуков Л. И., Шапиро Ю. Е., Викторов А. В. и др.//Докл. АН СССР. 1973. Т. 208. С. 717.
6. Барсуков Л. И., Шапиро Ю. Е., Викторов А. В. и др.//Докл. АН СССР. 1973. Т. 211. С. 847.
7. Заев Е. Е., Спирюхин Л. В.//Изв. СО АН СССР. Сер. хим. 1973. Т. 12. С. 32.
8. Shapiro Yu. E., Viktorov A. V., Volkova V. I. et al.//Chem. Phys. Lipids. 1975. V. 14. P. 227.
9. Шапиро Ю. Е., Викторов А. В., Барсуков Л. И., Бергельсон Л. Д.//Биофизика мембран. М.: Наука, 1981. С. 22.
10. Bloembergen N., Dickinson W. S.//Phys. Rev. 1950. V. 79. P. 179.
11. Слоним Й. Я., Булат А. Х.//Успехи химии. 1973. Т. 42. С. 1976.
12. Reuben J.//Progress in NMR Spectroscopy. V. 9. N. Y.: Pergamon Press, 1973. Pt 1. P. 1.
13. NMR Shift Reagents/Ed. by Sievers R. E. N. Y.: Acad. Press, 1973.
14. Orrell K. G.//Annual Reports on NMR Spectroscopy. V. 9. L.: Acad. Press, 1979. P. 1.
15. Золин В. Ф., Коренева Л. Г. Редкоземельный зон в химии и биологии. М.: Наука, 1980. 350 с.
16. Шапиро Ю. Е.//Успехи химии. 1984. Т. 53. С. 1407.
17. McConnell H. M., Robertson R. E.//J. Chem. Phys. 1958. V. 29. P. 1361.
18. Solomon J.//Phys. Rev. 1955. V. 99. P. 559.
19. Overhauser A. W.//Ibid. 1953. V. 91. P. 476.
20. Dill K. A., Flory P. J.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 676.
21. Заев Е. Е., Халилов Л. М., Спирюхин Л. В.//Кинетика и катализ. 1974. Т. 15. С. 1088.
22. Заев Е. Е., Халилов Л. М.//Коллоид. журн. 1974. Т. 36. С. 147.
23. Заев Е. Е.//Там же. 1979. Т. 41. С. 1179; 1980. Т. 42. С. 752.
24. Menger F. M.//Acc. Chem. Reson. 1979. V. 12. P. 111.
25. Fromberz P.//Chem. Phys. Lett. 1981. V. 77. P. 460.
26. Ziemiecki H., Cherry W. R.//J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. P. 4479.
27. Cabane B.//J. Physique (Orsay). 1981. V. 42. P. 847.
28. Mitchell D. J., Nonham B. W.//J. Chem. Soc. Faraday Trans. II. 1981. V. 77. P. 601.
29. Menger F. M., Doll D. W.//J. Amer. Chem. Soc. 1984. V. 106. P. 1109.
30. Веселова О. В., Николаев Б. П., Шляков А. М.//Коллоид. журн. 1985. Т. 47. С. 1027.

31. Aizawa M., Komatsu T., Nakagawa T.//Bull. Chem. Soc. Jap. 1982. V. 55. P. 3434.
32. Шапиро Ю. Е., Швецов О. К., Дозорова Н. П.//Коллоид. журн. 1976. Т. 38. С. 943.
33. Дозорова Н. П., Шапиро Ю. Е., Балыбердина Т. Г. и др./Там же. 1979. Т. 41. С. 545.
34. Шапиро Ю. Е., Дозорова Н. П., Миронова Н. М., Балыбердина Т. Г.///Высокомолекуляр. соединения. 1981. Т. 23А. С. 1374.
35. Шапиро Ю. Е., Зубов В. П., Егоров В. В., Дозорова Н. П.///Коллоид. журн. 1981. Т. 43. С. 187.
36. Шапиро Ю. Е., Орлов Ю. Н., Егоров В. В., Зубов В. П.///Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия. 1984. Т. 25. С. 487. С. 595.
37. Svecov O. K., Mironova N. M., Shapiro Ju. E. et al.///Faserforsch. Textiltechn. 1977. B. 28. S. 217.
38. Шапиро Ю. Е., Швецов О. К., Дозорова Н. П., Ершов А. А.///Высокомолекуляр. соединения. 1978. Т. 20Б. С. 328.
39. Заев Е. Е.///Коллоид. журн. 1980. Т. 42. С. 752.
40. Заев Е. Е., Халилов Л. М.///Там же. 1980. Т. 42. С. 1175.
41. Заев Е. Е., Халилов Л. М.///Журн. структур. химии. 1980. Т. 21. С. 53.
42. Заев Е. Е., Халилов Л. М.///Коллоид. журн. 1984. Т. 46. С. 427.
43. Заев Е. Е., Пономарева В. А., Обжелянская Л. М., Штангеев А. Л.///Там же. 1981. Т. 43. С. 251.
44. Заев Е. Е., Спиринин Л. В., Гречишников Ю. Г.///Журн. физ. химии. 1977. Т. 51. С. 524.
45. Matsuo T., Yudate K., Nagamura T. J.///J. Colloid and Interf. Sci. 1981. V. 83. P. 354.
46. Jendrasiak G. L.///Chem. Phys. Lipids. 1970. V. 5. P. 85; 1971. V. 6. P. 215.
47. Miyagishi S., Nishida M.///J. Colloid and Interf. Sci. 1980. V. 73. P. 270.
48. Багракова Е. В., Орлов Ю. Н., Егоров В. В. и др.///Коллоид. журн. 1985. Т. 47. С. 130.
49. Барсуков Л. И., Шапиро Ю. Е., Викторов А. В. и др.///Биоорган. химия. 1976. Т. 2. С. 1404.
50. Chachaty C., Perly B., Quaegebeur J. et al.///Sci. et rech. num. spec. 1982. Р. 30.
51. Chevalier Y., Chachaty C.///J. Phys. Chem. 1985. V. 89. P. 875.
52. Егоров В. В., Зубов В. П., Голубев В. Б. и др.///Высокомолекуляр. соединения. 1981. Т. 23Б. С. 803.
53. Шапиро Ю. Е.///Физическая химия. Ярославль. 1976. С. 42.
54. Bergelson L. D., Barsukov L. I.///Science. 1977. V. 197. P. 224.
55. Hutton W. C., Yeagle P. L., Martin R. B.///Chem. Phys. Lipids. 1977. V. 19. P. 255.
56. Wennerström H., Lindblom G.///Quat. Rev. Biophys. 1977. V. 10. P. 67.
57. Jacobs R. E., Oldfield E.///Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. N. Y.; L: Pergamon Press, 1980. V. 14(3). P. 113.
58. Ptak M., Sanson A.///Magn. Reson. in Colloid and Interf. Sci. N. Y.: Reidel Publ. Comp., 1980. P. 285.
59. Levine Y. K., Lee A. G., Birdsall N. J. M. et al.///Biochim. et biophys. acta. 1973. V. 291. P. 592.
60. Andrews S. B., Faller J. W., Gilliam J. M., Barnett R. J.///Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 1814.
61. Hauser H., Barratt M. D.///Biochem. Biophys. Res. Commununs. 1973. V. 53. P. 399.
62. Tsuchida E., Seki N., Ohno H.///Makromol. Chem. 1986. V. 187. P. 1351.
63. Takane M., Shigehara K., Tsuchida E.///Makromol. Chem. 1986. V. 187. P. 853.
64. Викторов А. В., Василенко И. А., Барсуков Л. И. и др.///Докл. АН СССР. 1977. Т. 234. С. 207.
65. Викторов А. В., Василенко И. А., Барсуков Л. И. и др.///Там же. 1979. Т. 245. С. 1243; 1980. Т. 246. С. 479.
66. Gerritsen W. J., Van Zoelen E. J. J., Vecklen A. J. et al.///Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 551. P. 248.
67. Arnold K.///Studia Biophysica. 1974. B. 42. S. 229.
68. Arnold K., Gründer W., Göldner R., Hofmann A.///Z. Phys. Chemie (Leipzig). 1975. B. 256. S. 522.
69. Lawaczek R., Kainosho M., Girardet J.-L., Chan S. J.///Nature. 1975. V. 256. P. 584.
70. Uhing M. C.///Chem. Phys. Lipids. 1975. V. 14. P. 303.
71. Sears B., Hutton W. C., Thompson T. E.///Biochemistry. 1976. V. 15. P. 1635.
72. Gabriel N. E., Roberts M. F.///Ibid. 1984. V. 23. P. 4011; 1986. V. 25. P. 2812; 1987. V. 26. P. 2432.
73. De Kruijff B., Cullis P. R., Radda G. K.///Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 406. P. 6.
74. Michaelson D. M., Horwitz A. F., Klein M. P.///Biochemistry. 1973. V. 12. P. 2637; 1974. V. 13. P. 2605.
75. Horwitz A. F., Klein M. P., Michaelson D. M., Kohler S. J.///Ann. N. Y. Acad. Sci. 1973. V. 222. P. 468.
76. Barsukov L. I., Shapiro Yu. E., Viktorov A. V. et al.///Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974. V. 60. P. 196.
77. Barsukov L. I., Shapiro Yu. E., Viktorov A. V. et al.///Chem. Phys. Lipids. 1975. V. 14. P. 211.
78. Levine Y. K., Wilkins M. F. H.///Nature. New Biol. 1971. V. 230. P. 69.
79. Hauser H., Irons L., Hoppe-Seylers Z.///Physiol. Chem. 1972. V. 333. P. 1579.
80. Kostelnik R. J., Castellano S. M.///J. Magn. Reson. 1972. V. 8. P. 219; 1973. V. 9. P. 291.

81. Sheetz M. P., Chan S. I.//*Biochemistry*. 1972. V. 11. P. 4576.
82. Berden J. A., Barker N. W., Radda G. K.//*Biochim. et biophys. acta*. 1975. V. 375. P. 186.
83. Шапиро Ю. Е., Викторов А. В., Барсуков Л. И., Бергельсон Л. Д.//*Биофизика*. 1978. Т. 23. С. 727.
84. Шапиро Ю. Е., Егоров В. В., Зубов В. П.//*Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия*. 1987. Т. 28. С. 183.
85. Nolden P. W., Ackerman T.//*Biophys. Chem.* 1975. V. 3. P. 183.
86. Hauser H., Phillips M. C., Levine B. A., Williams R. J. P.//*Eur. J. Biochem.* 1975. V. 58. P. 133.
87. Барсуков Л. И., Волкова В. И., Шапиро Ю. Е. и др.//*Биоорган. химия*. 1977. Т. 3. С. 1355.
88. Gally H.-U., Niederberger A., Seelig J.//*Biochemistry*. 1975. V. 14. P. 3647.
89. Akutsu H., Kyogoku Y.//*Chem. Phys. Lipids*. 1977. V. 18. P. 285.
90. Brown M. F., Seelig J.//*Nature*. 1977. V. 269. P. 721.
91. Birdsall N. J. M., Feeney J., Lee A. G. et al.//*J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*. 1972. P. 1441.
92. Yabusaki K. E., Wells M. A.//*Biochemistry*. 1975. V. 14. P. 162.
93. Yeagle P. L., Hyton W. C., Huang C.-H., Martin B.//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1975. V. 72. P. 3477.
94. Yeagle P. L.//*Biomolecular Structure and Function*. N. Y.; L.: Acad. Press, 1978. P. 65.
95. Griffin R. G., Powers L., Herzfeld J. et al.//*Biophys. J.* 1977. V. 17. P. 84.
96. Griffin R. G., Powers L., Pershan P. S.//*Biochemistry*. 1978. V. 17. P. 2718.
97. Bildt B., Gally H.-U., Seelig A. et al.//*Nature*. 1978. V. 271. P. 182.
98. Hitchcock P. B., Mason R., Thomas K. M., Shipley G. G.//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. P. 3036.
99. Seelig J., Gally H.//*Biochemistry*. 1976. V. 15. P. 5199.
100. Seelig J., Gally H., Wohlgemuth R.//*Biochim. et biophys. acta*. 1977. V. 467. P. 109.
101. Seelig J.//*Ibid.* 1978. V. 515. P. 105.
102. Pullman B., Berthold H.//*FEBS Lett.* 1974. V. 44. P. 266.
103. Shipunov Yu. A., Drachev G. Yu.//*J. Colloid and Interf. Sci.* 1986. V. 110. P. 424.
104. Phillips M. C., Finer E. G., Hauser H.//*Biochim. et biophys. acta*. 1972. V. 290. P. 397.
105. Hauser H., Phillips M. C., Levine B. A., Williams R. J. P.//*Nature*. 1976. V. 261. P. 390.
106. Kornberg R. D., McConnell H. M.//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1971. V. 68. P. 2564.
107. Kornberg R. D., McConnell H. M.//*Biochemistry*. 1971. V. 10. P. 1111.
108. De Kruijff B., Wirtz K. W. A.//*Biochim. et biophys. acta*. 1977. V. 467. P. 318.
109. Barclay L. R. C., Balcom B. J., Forrest B. J.//*J. Amer. Chem. Soc.* 1986. V. 108. P. 761.
110. Барсуков Л. И., Шапиро Ю. Е., Парфеньев А. М. и др.//*Биофизика*. 1974. Т. 19. С. 456.
111. De Kruijff B., Van den Besselaar H. P., Van Deenen L. L. M.//*Biochim. et biophys. acta*. 1977. V. 465. P. 443.
112. Hunag C. H., Sipe J. P., Chow S. T. et al.//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. P. 359.
113. Bar L. K., Barenholz Y., Thompson T. E.//*Biochemistry*. 1986. V. 25. P. 6701.
114. Барсуков Л. И., Шапиро Ю. Е., Викторов А. В.//*Биофизика*. 1977. Т. 22. С. 207.
115. Fernandes M. S., Celis C. H., Montal M.//*Biochim. et biophys. acta*. 1973. V. 232. P. 600.
116. Lau A. L., Chan S. I.//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1975. V. 72. P. 2170.
117. Hunt G. R. A.//*FEBS Lett.* 1975. V. 58. P. 194.
118. Fernandes M. S., Cerbon J.//*Biochim. et biophys. acta*. 1973. V. 298. P. 8.
119. Cushley R. J., Forrest B. J., Gillis A., Tribe J.//*Can. J. Chem.* 1979. V. 57. P. 458.
120. Castellino F. J., Violand B. N.//*Arch. Biochem. Biophys.* 1979. V. 193. P. 543.
121. Degani H., Elgavish G. A.//*FEBS Lett.* 1978. V. 90. P. 357.
122. Jendrasiaik G. Z., Ester T. N.//*Chem. Phys. Lipids*. 1977. V. 18. P. 181.
123. Ohno H., Seki N., Tsuchida E.//*Makromol. Chem.* 1984. B. 185. S. 329.
124. Assmann G., Sokoloski E. A., Brewer H. B.//*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. P. 549.
125. Assmann G., Brewer H. B.//*Ibid.* 1974. V. 71. P. 989. P. 1534.
126. Finer E. G., Henry R., Leslie R. B., Robertson R. W.//*Biochim. et biophys. acta*. 1975. V. 380. P. 320.
127. Henderson T. O., Kruski A. W., Davis L. G. et al.//*Biochemistry*. 1975. V. 14. P. 1915.
128. Sheetz M. P., Chan S. I.//*Ibid.* 1972. V. 11. P. 548.
129. Robinson J. D., Birdsall N. J. M., Lee A. G. et al.//*Ibid.* 1972. V. 11. P. 2903.
130. Hollis D. P., Bulkley B. H., Nummally R. L. et al.//*Clin. Res.* 1978. V. 26. P. 240A.
131. Dea P., Chan S. I., Dea F. J.//*Science*. 1972. V. 175. P. 206.
132. Анисимов А. В., Евартов А. С., Самуилова И. Д., Гусев Н. А. Докл. АН СССР. 1983. Т. 271. С. 1246.
133. Wydrzynski T., Zumbulyadis N., Schmidt P. G. et al.//*Biochim. et biophys. acta*. 1975. V. 408. P. 349.
134. Raushel F. M., Anderson P. M., Villafranca J. J.//*Biochemistry*. 1983. V. 22. P. 1872.