

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ УКРАИНЫ
ХАРЬКОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени В.Н. КАРАЗИНА

На правах рукописи

ПОСОХОВ ЕВГЕНИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 544.1+544.3+544.4+544.7

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
С ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ И ФОТОНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ
ОРИЕНТИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ, ИССЛЕДОВАННЫЕ
МЕТОДАМИ ОПТИЧЕСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**

02.00.04 - физическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора химических наук

Научный консультант

Дорошенко Андрей Олегович,
профессор, доктор химических
наук

ХАРЬКОВ – 2014

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
РАЗДЕЛ 1. МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ ПРОТЕИНОВ С ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ...	22
1.1. Оценка доли мембранно-компетентной формы рН-встраива- емых мембранных протеинов.....	33
1.2. Оценка мембранной топологии модельных мембранных про- теинов.....	42
1.3. Кинетика процесса связывания транслокационного домена дифтерийного токсина с липидной мембраной.....	61
1.4. Кинетика рН-зависимого встраивания транслокационного домена дифтерийного токсина в липидную мембрану.....	66
1.5. Механизм рН-зависимого взаимодействия транслокационного домена дифтерийного токсина с липидными мембранами.....	72
РАЗДЕЛ 2. ТЕРМОДИНАМИКА МЕМБРАННЫХ ВЗАИМОДЕЙ- СТВИЙ МЕМБРАННЫХ ПРОТЕИНОВ И ГИДРОФОБНЫХ ТРАНС- МЕМБРАННЫХ ПЕПТИДОВ.....	78
2.1. Оценка свободной энергии мембранного связывания модель- ного мембранного протеина аннексина B12.....	83
2.2. Метод оценки свободной энергии протеин-липидного взаимо- действия мембранных протеинов при низких рН с использованием фторированных поверхностно-активных веществ (ФПАВ).....	89
2.3. Оценка свободной энергии мембранного встраивания гидро- фобных трансмембранных пептидов.....	96
РАЗДЕЛ 3. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЦИСТЕИНОВЫХ ПЕПТИДОВ – БЛОКАТОРОВ ИОННЫХ КАНАЛОВ (ЦПБИК): ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАННОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЦПБИК	109

3.1. Свободная энергия мембранного связывания цистеиновых пептидов – блокаторов ионных каналов	113
3.2. Глубина проникновения цистеиновых пептидов – блокаторов ионных каналов в липидную мембрану.....	121
3.3. Определение возможности неполной дегидратации цистеинового пептида GsMTx4 при его связывании с липидной мембраной	125
РАЗДЕЛ 4. ФОТОНИКА НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ ОРИЕНТИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ	130
.....	
4.1. Способ экспериментальной коррекции в оценке эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии в ходе исследования самоассоциации пептидов/протеинов в липидных мембранах	131
4.2. Механизмы тушения флуоресценции в меченных органическими флуорофорами гистидин-содержащих пептидах, образующих комплексы с катионами переходных металлов.....	140
4.3. Водные растворы, содержащие фторированные поверхностно-активные вещества, в качестве среды для исследования мембранных протеинов.....	149
4.4. Набор флуоресцентных зондов для исследования изменений физико-химических свойств липидных мембран.....	164
4.4.1. Определение патологических изменений в мембранах тромбоцитов пациентов с сосудистой патологией головного мозга.....	180
4.4.2. Определение мембранотропной активности летучих органических соединений.....	193
4.4.3. Определение мембранотропной активности криопротекторов.....	203
4.4.4. Определение влияния магнитного поля или электромагнит-	

ного излучения на биологические мембраны.....	207
4.5. Поиск потенциальных флуоресцентных зондов среди производных 1,3,4-оксадиазола и 1,3-оксазола.....	212
4.5.1. Спектрально-флуоресцентные и сольватохромные свойства 2-(3'-кумаринил)-5-(2'-(R-амино)-фенил)-1,3,4-оксадиазолов.....	212
4.5.2. Спектрально-флуоресцентные свойства 5-R-2-(хинолин-2-ил)- и 5-R-2-(хинолин-4-ил)-1,3-бензоксазолов.....	227
4.6 Спектрально-флуоресцентные свойства антиракового препарата камптотецина	240
4.7. Исследование возможности детекции N,N'-бис-н-бутилдиимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты	253
4.8. Оценка растворимости ряда производных диимида 1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты в органических растворителях различной природы.....	258
4.9. Исследование спектральных свойств новых физиологически активных соединений, полученных из турецких лишайников.....	263
4.10. Исследование спектральных свойств некоторых производных 2- и 4-(N-арилимино)-хинолина.....	270
4.11. Идентификация продукта фототрансформации β -тиоксокетонов.....	277
ВЫВОДЫ.....	300
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ...	307
ПРИЛОЖЕНИЕ – КОПИИ АКТОВ ВНЕДРЕНИЯ.....	364

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АНК	– аннексин B12
БУВ	– большие униламеллярные везикулы
БУВ 25ФХ:75ФГ	– большие униламеллярные везикулы, содержащие 25 мольных % фосфатидилхолина и 75 мольных % фосфатидилглицерола
БУВ 75ФХ:25ФГ	– большие униламеллярные везикулы, содержащие 75 мольных % фосфатидилхолина и 25 мольных % фосфатидилглицерола
БУВ 90ФХ:10ФГ	– большие униламеллярные везикулы, содержащие 90 мольных % фосфатидилхолина и 10 мольных % фосфатидилглицерола
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ИК-спектроскопия	– инфракрасная спектроскопия
КД	– круговой дихроизм
ККМ	– критическая концентрация мицеллообразования
ЛД	– линейный дихроизм
ЛОС	– летучие органические соединения
МП	– магнитное поле
ТДДТ	– транслокационный домен дифтерийного токсина
ФГ	– фосфатидилглицерол
ФКС	– флуоресцентная корреляционная спектроскопия
ФПАВ	– фторированные поверхностно-активные вещества
ФРПЭ	– Фёрстеровский резонансный перенос энергии
ФС	– фосфатидилсерин
ФХ	– фосфатидилхолин

ЦПБИК	– цистеиновые пептиды-блокаторы ионных каналов
ЭМИ	– электромагнитное излучение
ЭПР	– электронный парамагнитный резонанс
ЯМР	– ядерный магнитный резонанс
F _{МК}	– доля мембранно-компетентной формы протеина
DM	– н-додецил-β-D-мальтопиранозид
MNB	– менадион никотинамид бисульфит
MPB	– менадион диметилпиримидинол бисульфит
MSB	– менадион натрий бисульфит
OG	– флуоресцентный краситель Oregon Green488
SDS	– додецил сульфат натрия

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Большинство биологически активных соединений как эндогенного, так и экзогенного происхождения или непосредственно действуют на мембраны клеток, или проникают через мембраны для того, чтобы достичь своих «мишеней» внутри клеток. В обоих случаях стадия взаимодействия таких соединений с мембраной является одной из важнейших стадий в молекулярном механизме их действия. В зависимости от специфики конкретного биологически ориентированного¹ соединения (БОС) или липидных мембран взаимодействие БОС с мембранами может зависеть как от физических (электростатического потенциала поверхности, полярности, вязкости), так и от химических факторов (гидратированности мембран, кислотно-основных взаимодействий, особенностей строения молекул БОС). Выяснение физических и химических факторов, определяющих механизмы взаимодействия тех или иных биологически ориентированных соединений с липидными мембранами, является актуальной научной проблемой, определённому решению которой посвящена данная диссертационная работа. Важным инструментом исследования взаимодействия биологически ориентированных соединений с липидными мембранами является оптическая спектроскопия. В контексте применения оптической спектроскопии как для детекции БОС, так и для исследования их взаимодействия с липидными мембранами представляется необходимым исследование фотоники БОС, т.е. природы и эффективности первичных фотофизических и фотохимических процессов, происходящих в возбужденном состоянии этих соединений.

¹ Под биологически ориентированными соединениями (БОС) в диссертации подразумеваются химические соединения, имеющие отношение к биологии: (а) биологически активные соединения, (б) биологические макромолекулы (пептиды, протеины), (в) биологически малоактивные соединения, применяемые в биоисследованиях (флуоресцентные зонды, химические шапероны и т.д.).

С точки зрения практического применения, знание механизмов взаимодействия тех или иных БОС с липидными мембранами позволяет целенаправленно влиять на такое взаимодействие и является принципиально важным при поиске новых фармацевтических препаратов. Данные по фотонике являются основой для разработки новых методологических подходов и методов оптической спектроскопии для определения физических и химических свойств, структуры и межмолекулярных взаимодействий тех или иных биологически ориентированных соединений.

Связь работы с научными программами, планами и темами. Диссертационная работа является частью плановых научных исследований, проводимых в течение нескольких лет в отделе физико-органической химии НИИ химии Харьковского национального университета имени В.Н. Каразина в рамках госбюджетных тем: «Внутримолекулярная водородная связь и перенос протона в возбужденном состоянии в молекулах-флуорофора» (№ гос. регистрации 0101U002779), «Молекулярные системы с фотопереносом протона и заряда в качестве основы для создания сенсорных материалов» (№ гос. регистрации 0110U000582). В перечисленных научно-исследовательских работах диссертант был исполнителем. Некоторые исследования проведены в сотрудничестве с проф. А. Ладохиным (кафедра биохимии медицинского центра Канзасского университета, г. Канзас-Сити, США) в рамках грантов NIH GM-069783 и NIH GM-069783-S1, а также в группе проф. Я. Валука (отдел спектроскопии Института физической химии Польской академии наук, г. Варшава, Польша) и в группе проф. С. Ичли (Институт солнечной энергии Эгейского университета, г. Измир, Турция).

Цель и задачи исследования: Выяснить, какие физические и химические факторы определяют механизмы взаимодействия мембранных протеинов и цистеиновых пептидов с липидными мембранами. Расширить возможности изучения термодинамических и кинетических параметров взаимодействия биологически ориентированных соединений с липидными

мембранами, а также физических и химических свойств и структуры липидных мембран и биологически ориентированных соединений путем разработки и внедрения новых методологических подходов и методов оптической спектроскопии. Определить природу и эффективность первичных фотофизических и фотохимических процессов, происходящих в возбужденном состоянии исследуемых биологически ориентированных соединений.

Для достижения этой цели было необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать комплекс методов оптической спектроскопии для мониторинга взаимодействия мембранных протеинов (или гидрофобных пептидов) с липидными мембранами:

а) метод с использованием флуоресцентной корреляционной спектроскопии для количественной оценки фракции мембранно-компетентной формы модельных мембранных протеинов аннексина B12 и транслокационного домена (Т-домена) дифтерийного токсина в зависимости от pH среды;

б) метод, основанный на использовании флуоресцентной корреляционной спектроскопии, для оценки свободной энергии связывания модельного мембранного протеина аннексина B12 с липидными мембранами;

в) метод определения термодинамических параметров протеин-липидного (или пептид-липидного) взаимодействия мембранных протеинов (или гидрофобных пептидов), основанный на использовании флуоресцентной корреляционной спектроскопии и фторированных поверхностно-активных веществ (ФПАР);

г) метод с использованием флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении для определения мембранной топологии

модельных мембранных протеинов аннексина B12 и Т-домена дифтерийного токсина;

д) метод с использованием Фёрстеровского резонансного переноса энергии электронного возбуждения для количественной оценки фракции мембранно-компетентной формы Т-домена дифтерийного токсина в зависимости от рН среды, который позволяет проводить определение кинетических параметров связывания протеина с мембраной.

2. По данным измерений динамики изменения интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении определить механизм встраивания Т-домена дифтерийного токсина в липидную мембрану, а именно: выявить наличие интермедиата встраивания в зависимости от кислотности среды и липидного состава мембран.

3. Усовершенствовать методику флуоресцентного титрования для повышения точности оценки термодинамических параметров мембранного связывания цистеиновых пептидов - блокаторов ионных каналов.

4. Предложить и разработать способ коррекции в оценке эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии электронного возбуждения в ходе исследования самоассоциации пептидов/протеинов в мембранах, основанный на применении флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении.

5. С помощью флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении выяснить механизм тушения флуоресценции в меченных органическими флуорофорами гистидин-содержащих пептидах, образующих комплексы с ионами переходных металлов, знание которого является важным для разработки флуоресцентных методов регистрации изменений конформации пептидов низкой молекулярной массы.

6. Разработать методологический подход с применением комплекса методов оптической спектроскопии для выяснения возможности использования фторированных поверхностно-активных веществ в качестве

среды при оценке термодинамических параметров взаимодействия мембранных протеинов с липидными мембранами.

7. Выяснить возможность использования производных 1,3-оксазола и 1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для исследования биообъектов, в частности для оценки локальных физико-химических свойств и структуры биомембран: для выявления изменений в клеточных мембранах под действием летучих органических соединений, криопротекторов, магнитного поля и электромагнитного излучения, а также в случае сосудистой патологии у пациентов, клеточные образцы которых взяты на исследование. Изучить спектрально-флуоресцентные и сольватофлуорохромные свойства производных 2-кумаринил-1,3,4-оксадиазола и 2-хиолинил-1,3-бензоксазола для выяснения возможности их применения в качестве флуоресцентных зондов, чувствительных к физико-химическим характеристикам среды.

8. Изучить спектрально-флуоресцентные свойства противоракового препарата камптотецина, некоторых соединений природного происхождения, выделенных из турецких лишайников, а также некоторых производных арилиминохинолина для выяснения возможности определения этих соединений с помощью оптической спектроскопии. Применяя UV/VIS спектроскопию, определить растворимость в различных органических растворителях ряда производных диимида 1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты.

9. С помощью ИК-спектроскопии (в частности поляризационной ИК-спектроскопии в условиях низкотемпературной матричной изоляции в инертном газе) и электронной абсорбционной спектроскопии определить строение молекулы продукта фототрансформации β -тиоксокетонов при низких температурах.

Объект исследования: взаимодействие биологически ориентированных соединений (БОС) с липидными мембранами, первичные фотофизические и

фотохимические процессы, происходящие в возбужденном состоянии способных к флуоресценции физиологически-активных соединений и меченных органическими флуорофорами БОС.

Предмет исследования: электростатические и гидрофобные взаимодействия БОС с липидными мембранами; физические (заряд БОС, электростатический потенциал поверхности липидных мембран) и химические (строение молекул, кислотнo-основные свойства) факторы, определяющие механизмы взаимодействия биологически ориентированных соединений с липидными мембранами; термодинамические, кинетические и структурные параметры пептид-пептидных, пептид- или протеин-липидных взаимодействий; спектральные характеристики способных к флуоресценции физиологически активных соединений (камптотецина, производных диимида 1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты, производных арилиминохинолина), биологических макромолекул (цистеиновых пептидов-блокаторов ионных каналов; меченных флуорофорами гидрофобных пептидов, мембранных протеинов – аннексина B12 и транслокационного домена дифтерийного токсина) и биологически малоактивных соединений, применяемых в биоисследованиях (флуоресцентных зондов – 2,5-диарил производных оксазола и оксадиазола, меченных флуорофорами фторированных поверхностно-активных веществ, β -тиоксокетонoв), изменения спектральных параметров в ходе межмолекулярных взаимодействий БОС (взаимодействие мембранный протеин - фторированное поверхностно-активное вещество; пептид-пептидная димеризация; пептид- или протеин-липидные взаимодействия и т.д.) или изменения структуры БОС (пептидный/протеиновый фолдинг); природа и эффективность первичных фотофизических и фотохимических процессов, происходящих в возбужденном состоянии способных к флуоресценции физиологически активных соединений и меченных органическими флуорофорами БОС (природа процессов тушения флуоресценции,

эффективность Фёрстеровского резонансного переноса энергии электронного возбуждения), физико-химические свойства биомембран (полярность, вязкость, гидратированность).

Методы исследования: флуоресцентная спектроскопия при стационарном и импульсном возбуждении, флуоресцентная корреляционная спектроскопия, электронная абсорбционная спектроскопия в УФ и видимой областях спектра, инфракрасная спектроскопия, спектроскопия кругового дихроизма. Для интерпретации экспериментальных данных привлекались расчетные методы: квантово-химические полуэмпирические – *AM1*, *PM3*; неэмпирические – *ab initio* DFT и метод молекулярной динамики.

Научная новизна полученных результатов.

1. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия впервые была использована для количественного анализа мембранных взаимодействий мембранных протеинов и гидрофобных трансмембранных пептидов. Впервые предложен метод, основанный на применении флуоресцентной корреляционной спектроскопии, для количественной оценки фракции мембранно-компетентной формы модельных мембранных протеинов аннексина B12 и T-домена дифтерийного токсина в зависимости от pH среды. С помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии впервые оценена ΔG связывания с липидной мембраной аннексина B12. Впервые предложен метод, основанный на использовании флуоресцентной корреляционной спектроскопии, для оценки термодинамики протеин-липидного взаимодействия мембранных протеинов при наличии фторированных поверхностно-активных веществ, который позволил оценить свободную энергию связывания с липидной мембраной при низких pH для транслокационного домена дифтерийного токсина, а также свободную энергию встраивания в липидную мембрану для модельных гидрофобных трансмембранных пептидов различной длины: WALP23 и WALP27.

2. Явление Фёрстеровского резонансного переноса энергии электронного возбуждения впервые было применено для исследования кинетики процесса связывания транслокационного домена дифтерийного токсина с липидной мембраной. Впервые установлено, что мембранное связывание Т-домена происходит достаточно быстро (< 1 минуты), причем скорость связывания не зависит от pH и количества анионного липида в составе мембран.

3. Мониторинг динамики изменения интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении впервые был применён для выявления интермедиата встраивания транслокационного домена дифтерийного токсина в липидные мембраны и позволил показать, что интермедиат встраивания может быть стабилизирован на поверхности мембран с малым содержанием анионного липида.

4. Предложен новый метод оценки мембранной топологии протеинов, основанный на применении флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении. Этот метод был успешно использован нами для исследования мембранной топологии модельных мембранных протеинов аннексина B12 и транслокационного домена дифтерийного токсина.

5. Предложенная в диссертации модифицированная методика флуоресцентного титрования при наличии тушителя флуоресценции была впервые успешно использована для выяснения механизма действия блокеров ионных каналов - цистеиновых пептидов.

6. Предложен метод с использованием флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении для коррекции в оценке эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии в ходе изучения самоассоциации пептидов/протеинов. Этот метод был успешно использован нами при исследовании димеризации пептида FGFR3 в липидных мембранах.

7. Флуоресцентная спектроскопия при импульсном возбуждении впервые была применена для исследования механизмов тушения флуоресценции в меченных органическими флуорофорами гистидин-содержащих пептидах при образовании ими комплексов с ионами переходных металлов. Впервые установлено, что вопреки общепринятым представлениям, Фёрстеровский резонансный перенос энергии не является механизмом тушения флуоресценции в исследованных гистидин-содержащих пептидных системах.

8. Флуоресцентные зонды на основе орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 1,3,4-оксадиазола впервые были успешно применены в медицинских исследованиях для выявления патологических изменений в мембранах тромбоцитов у больных с сосудистой патологией головного мозга гипертонического и атеросклеротического генеза, для выявления изменений в мембранах клеток обонятельного анализатора в ходе токсикологических исследований, в биологических исследованиях для оценки мембранотропной активности криопротекторов и для определения влияния магнитного поля или электромагнитного излучения на биологические мембраны.

9. Комплексное применение набора спектроскопических методов впервые позволило показать, что: (а) фторированные поверхностно-активные вещества обладают свойствами химических шаперонов для Т-домена дифтерийного токсина и могут использоваться в качестве среды для исследования мембранных протеинов; (б) в ходе встраивания в липидную мембрану ингибитора ионных каналов GsMTx4 не происходит его полной дегидратации; (в) при взаимодействии транслокационного домена дифтерийного токсина с липидными мембранами встраивание этого протеина в мембраны начинается еще до достижения его полного связывания с ними.

10. Впервые систематически исследованы спектрально-флуоресцентные свойства противоракового препарата камптотецина,

некоторых новых соединений природного происхождения, выделенных из турецких лишайников. С помощью электронной абсорбционной спектроскопии впервые была систематически исследована растворимость ряда производных диимида 2,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты в органических растворителях различной природы.

11. Метод с использованием поляризационной ИК-спектроскопии впервые был применен для идентификации продукта фототрансформации β -тиоксокетонов в условиях изоляции в аргоновых матрицах при низких температурах. Впервые было показано, что продуктом фототрансформации β -тиоксокетонов при низких температурах является тиоенольная форма без внутримолекулярной водородной связи (SH-ротамер).

Все научные положения диссертации с учетом достигнутого уровня новизны являются основой для решения актуальной научной проблемы - выявления физических и химических факторов, определяющих механизмы взаимодействия биологически ориентированных соединений с липидными мембранами.

О новизне и практическом значении работы свидетельствует наличие пяти патентов Украины на полезную модель.

Практическое значение полученных результатов.

1. Предложенный в диссертации набор флуоресцентных зондов на основе орто-гидрокси производных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 1,3,4-оксадиазола был использован для оценки изменений физико-химических характеристик липидных мембран в случае патологии или под воздействием вредных факторов внешней среды. Например, в диссертации предложен способ оценки изменений в мембранах тромбоцитов человека при сосудистой патологии, способ оценки мембранотропной активности летучих органических соединений, криопротекторов, магнитного поля и электромагнитного излучения. Способ оценки мембранотропной активности летучих органических соединений был применён в ходе биолого-

медицинских исследований в Институте неврологии, психиатрии и наркологии АМН Украины (акт внедрения от 14.05.2013). Способ оценки мембранотропной активности криопротекторов был применён в биологических исследованиях, проводимых на кафедре физиологии и на кафедре биохимии ХНУ (акты внедрения от 25.04.2013). Способ определения влияния магнитного поля или электромагнитного излучения на биологические мембраны был применён в исследованиях, проводимых в отделе генетики НИИ биологии ХНУ (акт внедрения от 06.02.2013).

2. Метод оценки термодинамических параметров мембранного связывания позволяет выяснить механизм блокировки ионных каналов с помощью цистеиновых пептидов. Знание механизма действия цистеиновых пептидов является принципиально важным при поиске потенциальных фармацевтических препаратов для лечения нарушений функционирования сердечно-сосудистой системы среди пептидов-токсинов, содержащихся в яде насекомых: например, исследованный в работе пептид GsMTx4, выделенный из яда тарантула, блокирует механо-чувствительные ионные каналы и способен замедлять частоту сердцебиения в случае тахикардии.

3. Показано, что аннексин B12 и транслокационный домен дифтерийного токсина можно использовать как модельные протеины для изучения физических и химических факторов, определяющих механизмы взаимодействия мембранных протеинов с липидными мембранами. Сведения о механизмах взаимодействия с липидными мембранами (в частности, сведения о рефолдинге и встраивании в мембрану) аннексина B12 и транслокационного домена дифтерийного токсина позволяют выявить физико-химические принципы, лежащие в основе процессов агрегации и стабилизации мембранных протеинов. Предложенные в диссертации методы и методологические подходы (в том числе, применение фторированных поверхностно-активных веществ в качестве химических шаперонов) для оценки термодинамики, кинетики и топологии взаимодействия

транслокационного домена дифтерийного токсина или аннексина B12 с липидными мембранами при низких pH могут использоваться для аналогичных исследований малорастворимых в воде протеинов: например, бактериальных токсинов (дифтерийного, ботулинового), колицинов т.п.

4. Метод с использованием флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении для коррекции в оценке эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии позволяет снизить систематические погрешности в количественной оценке ассоциации пептидов/протеинов в липидных мембранах. Например, в диссертации исследована димеризация мембранного пептида FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3), которая является важной в патогенезе ахондроплазии (синдром карликовости). Предложенный метод коррекции в оценке эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии может быть полезным при изучении взаимодействия лигандов (например, белковых или пептидных гормонов, пептидов-нейромедиаторов) с рецепторами в липидном бислое.

5. Предложенная в работе методология, основанная на применении флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении для исследования механизмов тушения флуоресценции в меченных органическими флуорофорами гистидин-содержащих пептидах, образующих комплексы с ионами переходных металлов, может использоваться в ходе дальнейшей разработки флуоресцентных методов оценки конформационных изменений олигопептидов (12-15 аминокислотных остатков).

6. Изученные в работе спектрально-флуоресцентные свойства противоракового препарата камптотецина, некоторых новых натуральных физиологически активных соединений, выделенных из турецких лишайников, и отдельных производных хинолина открывают возможность детекции (количественного и качественного анализа) этих соединений с помощью оптической спектроскопии. Полученные в диссертации сведения о

растворимости в органических растворителях различной природы ряда производных диимида 2,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты полезны для практического применения этих соединений.

7. Результаты исследований модельных β -тиоксокетонов могут быть использованы в ходе изучения колебательных спектров β -дикетонов, которые являются интермедиатами в микробальном метаболизме, а также обладают антиоксидантными свойствами в биологических системах.

Разработанные в работе спектроскопические методы и методологические подходы могут быть и уже частично применены в клинической диагностике, медико-биологических исследованиях, в биологии, биохимии.

Личный вклад соискателя. Формулировка цели диссертационного исследования, планирование и постановка задач, разработка и апробация методов исследований, проведение спектральных измерений, анализ и обобщение результатов, написание научных статей, подготовка и представление научных докладов на конференциях, формулирование выводов и основных положений диссертации выполнены соискателем лично: разработан ряд спектроскопических методов и новых методологических подходов для изучения физико-химических свойств липидных мембран, а также термодинамических и структурных параметров пептид-липидного взаимодействия цистеиновых пептидов и протеин-липидного взаимодействия мембранных протеинов. Проф. А. Ладохин (медицинский центр Канзасского университета, Канзас-Сити, США) и проф. Я. Валюк (институт физической химии ПАН, Варшава, Польша) участвовали в обсуждении результатов и написании статей. Автор выражает благодарность научному консультанту проф. А.О. Дорошенко (ХНУ, Харьков) за участие в обсуждении некоторых результатов и предоставлении образцов орто-гидроксипроизводных 2,5-диарилоксазола и оксадиазола; проф. А. Ладохину (медицинский центр Канзасского университета, Канзас-Сити, США), к.б.н.

Д.А. Бевзюк (Институт неврологии, психиатрии, и наркологии АМНУ, Харьков) и м.н.с. Е.М. Корниенко (ХНУ, Харьков) - за предоставление биологических объектов; проф. Я. Валуку (Институт физической химии ПАН, Варшава, Польша), проф. С. Ичли (Институт солнечной энергии Эгейского университета, Измир, Турция) - за предоставление некоторых биологически ориентированных соединений; к.х.н. А.В. Кириченко (ХНУ, Харьков), проф. Е. Ларсену (Роскильдский университет, Роскильд, Дания) - за проведение квантово-химических расчетов и проф. Д. Тобайесу (Калифорнийский университет, Ирвайн, США) - за проведение расчетов методом молекулярной динамики.

Апробация полученных результатов. Основные результаты диссертации были представлены и обсуждались на научных съездах и конференциях:

Euroconference Matrix 2001 (Szklarska poreba, Poland, 2001), ICP XX International Conference on Photochemistry (Moscow, Russia, 2001), XVII Turkish National Chemical Congress. (Istanbul, Turkey, 2003), Workshop "Novel Experimental Techniques and Instrumentation" (Lesko, Poland, 2005), Biophysical Society 50-th Annual Meeting (Salt Lake City, Utah, USA, 2006), Biophysical Society 51-th Annual Meeting (Baltimore, Maryland, USA, 2007), Biophysical Society 52-th Annual Meeting/16-th International Biophysics Congress (Long Beach, California, USA, 2008), Biophysical Society 53-rd Annual Meeting (Boston, Massachusetts, USA, 2009) 10th Annual KUMC Biomedical Research Training Program (Kansas City, Kansas, USA, 2009), Biophysical Society 54-th Annual Meeting (San Francisco, USA, 2010) Biophysical Society 56-th Annual Meeting (San Diego, California, USA , 2012), VII Международной научно-технической конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии, БФФХ-2012» (Севастополь, 2012).

Публикации. Материалы диссертации опубликованы в 44 научных работах, среди которых 27 статей в научных изданиях (в т.ч. 2 статьи без

соавторов), 12 тезисов докладов на специализированных отечественных и международных научных конференциях и 5 патентов (в т.ч. - 3 патента без соавторов).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованных литературных источников, включающего 511 наименований, и приложения (копии актов внедрения). Литературный обзор распределён по четырем разделам. Общий объем диссертации составляет 370 страниц, содержит 41 таблицу и 129 рисунков.

РАЗДЕЛ 1. МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАННЫХ ПРОТЕИНОВ С ЛИПИДНЫМИ МЕМБРАНАМИ

Взаимодействие полипептидных молекул с биологическими мембранами является важным для целого ряда биологических процессов: фолдинга (изменение α -спиральной структуры полипептида) и встраивания мембранных протеинов в липидный бислой клеточных мембран [1,2], связывания гормонов с мембранными рецепторами [3], действия антимикробиальных пептидов [4-7], протеиновой транслокации (перемещения сквозь мембрану) токсинов [8-13].

Вследствие анизотропной природы мембран начальные стадии взаимодействия полипептидов с мембранами, конечная структура и локализация полипептидных молекул в липидном бислое зависят от суперпозиции гидрофобных и электростатических взаимодействий [14]. Гидрофобные взаимодействия являются преобладающими при встраивании трансмембранных (т.е. пронизывающих оба липидных слоя мембраны) полипептидов [1,2]. Электростатические взаимодействия играют большую роль при связывании антимикробиальных пептидов с липидной мембраной [5,15], при связывании протеинов с поверхностью липидной мембраны [16-18] и являются фактором, определяющим топологию мембранных протеинов в ходе их биосинтеза [19].

В большинстве случаев, основной вклад в общее электростатическое взаимодействие вносят силы притяжения между анионными головками фосфолипидов и положительно заряженными аминокислотными остатками [20,21]. Однако, имеются примеры, когда электростатическое отталкивание играет важную роль при связывании пептидов с липидной мембраной, особенно в случаях, когда структура молекул пептидов и их локализация в мембране регулируется кислотностью среды [22-25].

Каким образом происходит суперпозиция гидрофобных и электростатических взаимодействий и их распределение в полипептидной цепочке были детально изучены только для пептидов относительно невысокой молекулярной массы [3,5,7,20-26]. В случае протеинов роль этих взаимодействий при связывании с липидными мембранами и встраивании в мембраны является недостаточно изученной [2,27-30].

Как показали исследования взаимодействия пептидов относительно невысокой молекулярной массы с липидными мембранами [30-36], на поверхности бислоя происходит изменение конформации (рефолдинг) полипептидных цепочек, облегчающие их глубокое встраивание в липидный бислой. Применение этого представления для случая более сложных систем - протеинов предполагает наличие некоего существующего относительно непродолжительное время интермедиата, формирующегося на поверхности липидной мембраны [14]. Действительно, в литературе имеются сведения о существовании поверхностных интермедиатов в ходе взаимодействия с липидными мембранами нескольких протеинов, включая колицин E1 [37-40], транслокационный домен дифтерийного токсина [41-45] и аннексин B12 [46]. Авторы [47] выдвинули гипотезу о том, что процессы, происходящие у поверхности мембраны, играют ключевую роль в ходе встраивания в липидную мембрану: важным элементом механизма мембранного встраивания для неконститутивных мембранных протеинов (спонтанно встраивающихся в мембраны без участия сложных мультипротеиновых ансамблей [19]) является обязательное существование интермедиата на поверхности липидных мембран, характеризующегося изменённой вторичной структурой по сравнению с исходной формой протеина, не связанного с липидной мембраной. Образование этого интермедиата и последующее трансбислойное встраивание определяется балансом гидрофобных взаимодействий между молекулой протеина и поверхностью мембраны [14,47,48]. Таким образом, выяснение физических и химических

факторов, способствующих стабилизации интермедиата встраивания, формирующегося на поверхности мембраны, является принципиально важным при выяснении механизма взаимодействия протеина с мембраной.

Для протеинов, спонтанно встраивающихся в липидные мембраны [12,49-57], Вимли и Вайт предложили четырёхступенчатую схему взаимодействия [47,48] (рис. 1.1), которая включает следующие процессы: связывание протеина с мембраной, фолдинг протеина на поверхности мембраны, встраивание протеина в мембрану и ассоциация встроенных в мембрану протеинов.

Взаимодействие протеина с мембраной

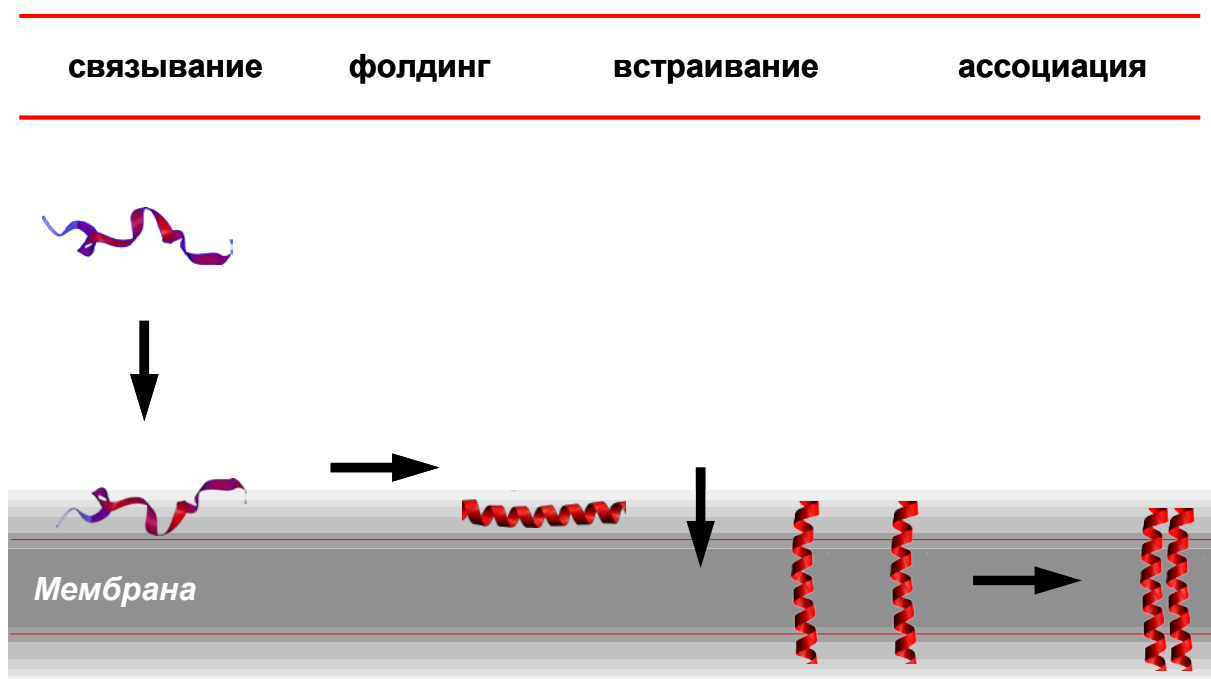


Рис. 1.1. Схема взаимодействия протеина с мембраной [47,48].

В литературе имеются сведения о взаимодействии с липидными мембранами водорастворимых протеинов аннексина Б12 (АНК) и транслокационного домена дифтерийного токсина (АНК растворим при рН среды ≥ 4 , Т-домен дифтерийного токсина (ТДДТ) растворим только при рН ≥ 7), которые способны обратимо встраиваться в мембраны в кислой среде

[45,46]. Это обстоятельство делает их хорошими моделями для исследования фолдинга и стабильности мембранных протеинов.

Аннексин B12 состоит из 305 аминокислотных остатков, которые формируют двадцать α -спиралей, и относится к группе аннексинов – протеинов, биологической функцией которых является инициирование клеточных реакций в ответ на изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} [56-59], обеспечение связи между внутриклеточным уровнем Ca^{2+} и протеканием некоторых клеточных биологических процессов с участием клеточных мембран, включая организацию мембранных доменов, транспорт ионов, адгезию клеток [56-59] и т.д.

Транслокационный домен дифтерийного токсина – протеин, состоящий из 181 аминокислотного остатка (рис. 1.2), объединённых в десять α -спиралей, биологической функцией которого является транслокация (перемещение) каталитического домена дифтерийного токсина сквозь липидный бислой [42,49,50,60-63]. Для осуществления такой транслокации ТДТ необходимо связаться с поверхностью липидного бислоя мембраны а, затем – встроиться в липидный бислой [42,49,50,55,60].

202

I N L D W D V I R D K T K T K I E S L K E H G P I K N K M S E S P N K T V S
E E K A K Q Y L E E F H Q T A L E H P E L S E L K T V T G T N P V F A
G A N Y A A W A V N V A Q V I D S E T A D N L L E K T T A A L S I L P G
I G S V M G I A D G A V H N N T E E I V A Q S I A L S S L M V A Q A I P L
V G E L V D I G F A A Y N F V E S I I N L F Q V V H N S Y N R P A Y S P
382

Рис. 1.2. Последовательность аминокислотных остатков транслокационного домена дифтерийного токсина [60]. Остатки, образующие спиральную структуру (по данным рентгеноструктурного анализа [61-63]), подчёркнуты. Цифры обозначают порядковый номер в аминокислотной последовательности всего дифтерийного токсина.

Как упоминалось выше, аннексин B12 и ТДДТ принадлежат к протеинам, спонтанно встраивающимся в липидные мембраны при низких рН среды.

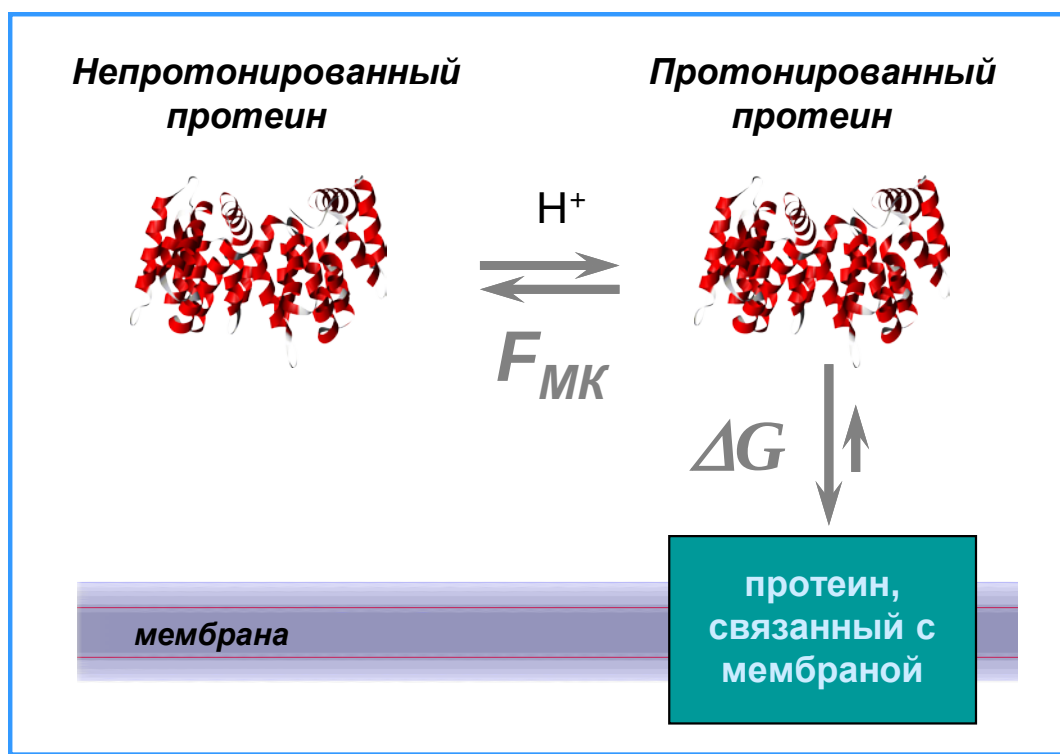


Рис. 1.3. Схема рН-зависимого связывания протеинов с липидными мембранами. F_{MK} – доля мембранно-компетентной формы протеина, т.е. формы, способной к связыванию с мембраной.

При $pH \sim 4,5 - 6,5$ происходит протонирование нейтрально заряженных гистидиновых аминокислотных остатков и нейтрализация отрицательно заряженных аминокислотных остатков (аспартат, глутамат) АНК или ТДДТ. В результате, молекулы рН-встраиваемых протеинов становятся в целом более положительно заряженными и приобретают способность к связыванию с липидными мембранами, имеющими в своём составе анионные липиды [42-46, 56,57].

В литературе отсутствуют сведения о количестве мембранно-компетентной формы аннексина B12 в зависимости от рН для случая связывания этого пептида с липидными мембранами с различным

содержанием анионных липидов. Кроме того, нет данных о том, где (около поверхности липидных мембран или в объёме раствора далеко от мембран) происходит протонирование, приводящее к образованию мембранно-компетентной формы этого протеина.

В работе [42] приведены сведения об относительном количестве мембранно-компетентной формы ТДДТ в зависимости от pH, полученные экспериментально при помощи метода центрифугирования: путём оценки количества протеина, связавшегося с липидными мембранами с низким содержанием анионного липида. Авторы [42] производили измерение интенсивности флуоресценции триптофановых аминокислотных остатков ТДДТ в растворе до и после прибавления мембран с последующим отделением мембран от раствора ТДДТ при помощи центрифуги [42]. По интенсивности триптофановой флуоресценции ТДДТ в растворе до и после его связывания с мембранами оценивали долю мембранно-компетентной формы при различных значениях pH [42].

Тем не менее, в литературе не обнаружено сведений об оценке количества мембранно-компетентной формы ТДДТ в зависимости от pH для случая больших униламелярных везикул (БУВ) с различным (в том числе и высоким) содержанием анионного липида. Отсутствие таких данных не позволяет судить где (около поверхности липидных мембран или в объёме раствора далеко от мембран) происходит протонирование ТДДТ, приводящее к образованию его мембранно-компетентной формы.

В работе [46] приведены сведения о кинетике встраивания АНК в липидные мембраны с различным содержанием анионного липида. При помощи измерений изменений флуоресценции при стационарном возбуждении связанной с АНК флуоресцентной метки NBD, чувствительной к изменению полярности и гидратированности среды при переходе меченого протеина из водной среды в липидную мембрану, было установлено, что встраивание этого протеина в липидные мембраны с низким содержанием

анионного липида происходит почти в 100 раз быстрее, чем в мембраны с высоким содержанием анионного липида. По мнению авторов [46] наблюдаемые различия в скорости встраивания свидетельствуют о возможном существовании интермедиата встраивания, формирующегося на поверхности липидного бислоя. Однако, не было проведено исследований изменений мембранной топологии АНК (т.е. исследований изменений расположения фрагментов АНК в липидном бислое) в ходе его встраивания в мембрану, непосредственно доказывающих существование обсуждаемого интермедиата встраивания.

В работах [56,57,60] имеются сведения, полученные при помощи метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), о том какие фрагменты АНК в результате встраивания в липидные мембраны оказываются расположенными в липидном бислое. В ходе проведенного ЭПР-эксперимента сравнивались сигналы парамагнитных меток, связанных с различными аминокислотными остатками АНК. Поскольку интенсивность тушения парамагнитных меток в липидном бислое парамагнитными молекулами кислорода отличалась от таковой в водной среде (содержащей полярный тушитель: комплекс Ni(II)-этилендиаминдиацетат) авторам [56,57,65] удалось различить аминокислотные остатки встроеного в липидную мембрану АНК, находящиеся в липидном бислое, от соответствующих аминокислотных остатков, остающихся в водной среде.

На основании упомянутых результатов [56,57,65], полученных при помощи метода ЭПР, авторы [46] провели исследование мембранной топологии фрагмента АНК, расположенного между 134-м и 162-м аминокислотными остатками протеина. В работе [46] индикатором изменений мембранной топологии выступала флуоресценция флуорофора NBD, ковалентно связанного с 134-м или 162-м аминокислотными остатками АНК, в присутствии тушителя флуоресценции LysoUB, зафиксированного на поверхности внешнего липидного слоя мембраны. Таким образом, авторами

[46] было установлено, что 134-й аминокислотный остаток АНК, встроенного в липидный бислой, находится во внешнем слое мембраны (эффективное тушение), а 162-й аминокислотный остаток – во внутреннем слое (тушение незначительно) [46]. Вместе с тем, имеющиеся в литературе сведения о мембранной топологии АНК являются далеко не полными: отсутствуют сведения о мембранной топологии других фрагментов АНК, например, участка этого протеина, находящегося между 221-м и 251-м аминокислотными остатками.

Аналогичный подход, основанный на применении метода ЭПР-спектроскопии, был применён авторами [66,67] и к ТДДТ для выяснения, какие части его полипептидной цепи включаются в липидный бислой, а какие остаются экспонированными в водную фазу.

В работах [55,68-77] для решения обсуждаемой задачи были задействованы альтернативные методы: о мембранной топологии различных фрагментов ТДДТ судили на основании кристаллографических данных о структуре ТДДТ в его водорастворимой форме [61,62,68]; на основании ионной проводимости плоского липидного бислоя [69-72], содержащего ТДДТ (такие измерения возможны, поскольку некоторые фрагменты ТДДТ способны образовывать трансмембранную пору (пронизывающую бислой), через которую происходит перемещение ионов при наложении разности потенциалов); на основании измерений флуоресценции флуорофора бимана, ковалентно присоединённого к тому или иному участку ТДДТ [64,73-77]. В последнем случае о глубине встраивания меченного биманом фрагмента протеина судили по величине коротковолнового сдвига флуоресценции метки, а также путём сравнения эффективности тушения флуоресценции конъюгата ТДДТ-биман при расположении тушителя флуоресценции (N-оксид [74,77]) вблизи поверхности липидного бислоя с соответствующей эффективностью тушения при расположении тушителя флуоресценции глубоко внутри липидного бислоя.

Вышеупомянутые исследования мембранной топологии ТДДТ при помощи флуоресцентной спектроскопии [73-77] проводились только для случая встраивания этого протеина в липидные мембраны, полученные в ходе обработки взвеси липидов при действии ультразвука. В отличие от больших униламелярных везикул, полученных в результате экструзии взвеси липидов через фильтр с заданной величиной пор [78], липидные везикулы, полученные при действии ультразвука, не являются стабильными структурами, что зачастую приводит к ошибочным результатам при исследовании встраивания протеина (или пептида) в липидные мембраны [79]. Таким образом, в литературе отсутствуют сведения о мембранной топологии ТДДТ, встроенного в достаточно стабильные липидные мембраны – большие униламелярные везикулы.

В работах [41-45] упоминается о возможности существования интермедиата встраивания ТДДТ в липидные мембраны. Авторы [41] при помощи измерений флуоресценции бимана, ковалентно присоединённого к тому или иному участку ТДДТ, обнаружили стабильный интермедиат встраивания, существующий при низких концентрациях протеина при его встраивании в условиях низких рН (~ 4,5) в липидные мембраны, полученные при помощи ультразвука. При значительных концентрациях ТДДТ и в случае мембран, имеющих в своём составе липиды с короткой углеводородной цепочкой (например, димиристолеоилфосфатидилхолин), образования стабильного интермедиата встраивания не наблюдалось [41]. Авторы [43] при помощи шкал гидрофобности Вимли-Вайта (шкал гидрофобности аминокислотных остатков) провели анализ термодинамики связывания и встраивания (hydropathy analysis) ТДДТ в липидные мембраны при различных рН. Результаты [43] указывают на существование интермедиата встраивания, формирующегося на поверхности липидного бислоя. На основании данных о положении максимума и интенсивности триптофановой флуоресценции ТДДТ авторы [42,44,45] сделали вывод о

существовании интермедиата встраивания, расположенного на поверхности бислоя, в интервале рН 5,5-6,5 при встраивании протеина в липидные мембраны с высоким содержанием анионного липида, полученные как при помощи ультразвука (нестабильные мембраны) [42], так и методом экструзии (относительно стабильные мембраны) [44,45].

При понижении рН до 4,5 наблюдался коротковолновый сдвиг флуоресценции триптофановых аминокислотных остатков ТДДТ, который авторы [42,44,45] отнесли к исчезновению находящегося на поверхности мембраны интермедиата вследствие встраивания этого протеина глубоко в липидный бислой.

Таким образом, авторы [42,44,45] показали наличие двух последовательных стадий при взаимодействии ТДДТ с липидными мембранами, а именно: связывания ТДДТ с липидными мембранами и последующего встраивания этого протеина в липидный бислой.

Следует отметить, что использование триптофановой флуоресценции ТДДТ для исследования мембранных взаимодействий Т-домена не является оптимальным, поскольку наблюдаемые изменения флуоресценции триптофановых аминокислотных остатков могут быть обусловлены не только связыванием или встраиванием ТДДТ в липидные мембраны, а и рефолдингом этого протеина на поверхности липидного бислоя или в объеме водного раствора вдали от мембран [43].

Обобщение научных результатов, опубликованных на настоящий момент, показало, что в литературе отсутствуют сведения об исследовании возможности стабилизации интермедиата встраивания ТДДТ в случае униламелярных мембран с низким содержанием анионного липида.

Кроме того, в литературе отсутствуют сведения о кинетике взаимодействия ТДДТ с липидными мембранами: в частности, отсутствуют сведения о зависимости скорости процесса связывания ТДДТ с липидными мембранами от рН или липидного состава мембран, а также о зависимости

кинетики процесса встраивания Т-домена в липидные мембраны от содержания анионного липида в составе мембран.

Для прямого доказательства наличия интермедиата встраивания при взаимодействии ТДДТ с липидными мембранами необходимо разработать методы, позволяющие отдельно исследовать кинетику отдельных стадий его взаимодействия с мембранами: связывания с липидным бислоем, рефолдинга и встраивания в мембрану. Такое доказательство существования интермедиата встраивания могло бы позволить: выяснить механизм взаимодействия ТДДТ с липидными мембранами, выявить физические и химические факторы, регулирующие его отдельные стадии: протонирования ТДДТ [77], взаимосвязанных процессов фолдинга и встраивания Т-домена [30,33,34]. Также данные о кинетике мембранных взаимодействий ТДДТ могут позволить выяснить последовательно или одновременно протекает его связывание и встраивание в липидные мембраны.

Одной из задач настоящей диссертационной работы является, с одной стороны, заполнить пробелы и устранить несоответствия в сведениях о физических и химических факторах, определяющих механизмы взаимодействия модельных мембранных протеинов аннексина B12 и транслокационного домена дифтерийного токсина с липидными мембранами; с другой стороны, верифицировать имеющиеся в литературе сведения о возможных механизмах мембранных взаимодействий АНК и ТДДТ, полученные либо недостаточно точными методами, либо при использовании недостаточно стабильных липидных везикул.

В целом, исследование процесса взаимодействия модельных мембранных протеинов аннексина B12 и транслокационного домена дифтерийного токсина, спонтанно встраивающихся в мембраны под действием изменений среды, может помочь как в выяснении физических и химических факторов, лежащих в основе мембранных взаимодействий спонтанно встраивающихся в мембрану бактериальных токсинов [49,53-55],

коллицинов [39,81,82], так и в определении физико-химических принципов, лежащих в основе мембранных взаимодействий конститутивных протеинов (т.е. протеинов, постоянно синтезируемых клеткой), встраивание которых осуществляется при помощи сложных мультипротеиновых ансамблей, таких как транслокон эндоплазматического ретикулума [83-87].

1.1. Оценка доли мембранно-компетентной формы pH-встраиваемых мембранных протеинов

Как уже упоминалось выше, аннексин B12 и T-домен дифтерийного токсина взаимодействуют с липидными мембранами при пониженном pH среды и, таким образом, принадлежат к так называемым pH-встраиваемым протеинам [12,49-57]. В кислой среде происходит протонирование нейтрально заряженных гистидиновых аминокислотных остатков и отрицательно заряженных аминокислотных остатков (аспартат, глутамат) таких протеинов, приводящее к образованию их мембранно-компетентной формы (рис. 1.3), способной связываться с липидными мембранами, имеющими в своём составе анионные (отрицательно заряженные) липиды [42-46,57].

Нами предложен метод оценки доли мембранно-компетентной формы pH-встраиваемых протеинов в зависимости от pH среды [88,89], основанный на использовании флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС).

Благодаря возможности исследования малого числа флуоресцирующих молекул (концентрация $\sim 1-10$ наномоль/дм⁻³) ФКС приобрела большую популярность при исследованиях биообъектов и БОС [90,91-108]. Высокая чувствительность ФКС (вплоть до детекции единичных молекул [90]) является причиной выбора этого вида спектроскопии для исследования связывания мембранных протеинов, большинство из которых

малорастворимы в воде и склонны к агрегации и осаждению [1,47], с липидными мембранами.

Применение флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС) для количественной оценки мембранного связывания рН-встраиваемых протеинов основывается на различии в скоростях диффузии свободных и связанных с мембраной молекул протеинов, меченных флуорофором (различие в скоростях диффузии свободных и связанных с мембраной молекул протеинов является следствием значительного различия размеров молекул протеина и липидной везикулы). Поскольку количественная оценка мембранного связывания рН-встраиваемых протеинов проводится при различных (в том числе и низких) рН среды, для мечения протеинов должны использоваться флуорофоры (рис. 1.4), флуоресцентные свойства которых остаются неизменными в интервале значений рН от 4 до 10 [109] – Alexa488 (максимум поглощения ~ 493 нм, максимум флуоресценции ~ 516 нм [110]) или Alexa 647 (максимум поглощения ~ 651 нм, максимум флуоресценции ~ 671 нм [110]).

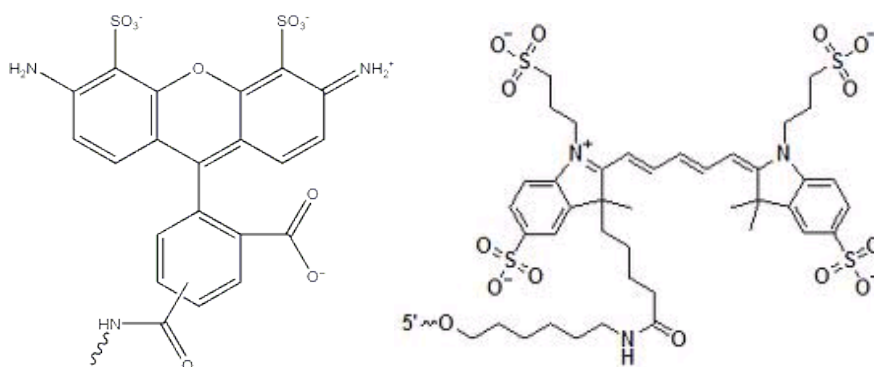


Рис. 1.4. Метки Alexa488 (слева) и Alexa647 (справа).

В ходе ФКС-измерений регистрируют флуктуации интенсивности флуоресценции малого числа флуоресцирующих молекул, диффундирующих через малый объём, освещённый лучом лазера (т.н. фокальный объём) [111-120]. Флуктуации интенсивности флуоресценции $\delta I(t)$ количественно характеризуют при помощи нормализованной функции автокорреляции $G(\tau)$.

Нормированную функцию автокорреляции для флуктуаций $\delta I(t)$ флуоресцентного сигнала $I(t)$ определяют как

$$G(\tau) = \langle \delta I(t) \delta I(t + \tau) \rangle / \langle I(t) \rangle^2, \text{ где } \delta I(t) = I(t) - \langle I(t) \rangle \text{ и } \langle I(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T I(t) dt \quad (1.1)$$

Поскольку величина флуктуаций интенсивности флуоресценции уменьшаются с увеличением числа флуоресцирующих молекул, для проведения измерений при помощи ФКС важно минимизировать среднее число молекул в фокальном объёме до значений в пределах 0,1-1000, соответствующих интервалу концентраций от субнанолярной ($\sim 10^{-10}$ М) до (суб)микролярной ($\leq 10^{-6}$ М) в фокальном объёме 1 фемтолитр (10^{-15} дм³).

Экспериментально измеренные значения автокорреляционной функции для одного вида флуоресцирующих молекул, перемещающихся через фокальный объём в ходе их броуновского движения, аппроксимируют при помощи уравнения [109,111-115]:

$$G(\tau) = \frac{1}{N} \times g(\tau) = \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{T}{1-T} \cdot e^{-\tau/\tau_{tr}} \right) \cdot \left(\frac{1}{1 + \tau/\tau_D} \right) \cdot \left(\frac{1}{1 + \tau/S^2\tau_D} \right)^{1/2} \quad (1.2)$$

где N – среднее число флуоресцирующих молекул в фокальном объёме и τ_D – т. н. корреляционное время флуоресцирующих частиц, за которое флуоресцентная частица диффундирует через фокальный объём: $\tau_D = \omega^2/4D$, где ω^2 – квадрат радиуса фокуса лазерного луча и D – коэффициент диффузии флуоресцирующих молекул, S – отношение расстояний от центра фокуса лазерного луча в радиальном и аксиальном направлениях, соответственно, T – фракция молекул в триплетном состоянии и τ_{tr} – время

жизни триплетного состояния (~ 2 мкс для меток, использованных нами при ФКС измерениях).

Для случая связывания протеинов с липидными мембранами рассматриваются только два вида диффундирующих частиц: меченный флуорофором свободный протеин (индекс «п») и липидные везикулы, связанные с меченым протеином (индекс «м») [109,121,122]:

$$G(\tau) = A_{\Pi} \cdot g_{\Pi}(\tau) + A_M \cdot g_M(\tau) \quad (1.3)$$

где A_{Π} , A_M – параметры, характеризующие вклад функций $g_{\Pi}(\tau)$ и $g_M(\tau)$, соответственно.

При значительном мольном избытке липида ($\geq 10^4$), когда каждая из липидных мембран, связанных с меченым протеином, содержит только одну молекулу протеина, фракция мембранно-связанного протеина определяется по формуле [109,121,122]:

$$\frac{[\Pi]_M}{[\Pi]_{\text{общ}}} = \frac{A_M}{A_{\Pi} + A_M} \quad (1.4)$$

где $[\Pi]_M$ и $[\Pi]_{\text{общ}}$ – молярная концентрация мембранно-связанного протеина и общая молярная концентрация протеина, соответственно.

При условии значительного мольного избытка липида ($\sim 10^6$) значение доли мембранно-компетентной формы протеина ($F_{\text{МК}}$) равняется фракции мембранно-связанного протеина, определённой по уравнению 1.4.

Значения доли мембранно-компетентной формы ($F_{\text{МК}}$) рН-встраиваемых протеинов, полученные при различных рН, аппроксимируют по формуле [88,89]:

$$F_{MK} = \frac{1}{1 + 10^{n(pH - pKa)}} \quad (1.5)$$

где pK_a – отрицательный логарифм константы кислотной диссоциации, n – коэффициент Хилла.

Предлагаемый метод оценки доли мембранно-компетентной формы pH-встраиваемых протеинов в зависимости от pH среды был применён при исследовании мембранного связывания модельных мембранных протеинов аннексина B12 [88] и T-домена дифтерийного токсина [89], меченных флуорофором Alexa488.

Пример ФКС-измерений связывания аннексина B12 с липидными мембранами при значительном молярном избытке липида при различных pH показан на рис. 1.5.

Повышение кислотности среды приводит к изменениям значений мобильности от значений, соответствующих свободному АНК (корреляционное время $\tau_D \sim 0,34$ миллисекунды) до значений, соответствующих мобильности связанного с мембраной АНК (корреляционное время $\tau_D \sim 2,1$ миллисекунды). При проведении количественного анализа мембранного связывания аутокорреляционные кривые (штриховые линии) аппроксимировались (сплошные линии) при фиксированных значениях двух корреляционных времён (0,34 и 2,1 миллисекунды) для всех аутокорреляционных кривых. В случае значительного молярного избытка липида, когда долю мембранно-связанного протеина определяют по формуле 1.4, знание абсолютных значений амплитуд аутокорреляционных функций не является существенным, поскольку используются только их относительные вклады. Для демонстрации этого факта и для удобства визуального сравнения все кривые на рис. 1.5 были нормализованы к одинаковому числу флуоресцирующих молекул в фокальном объёме ($N=1$).

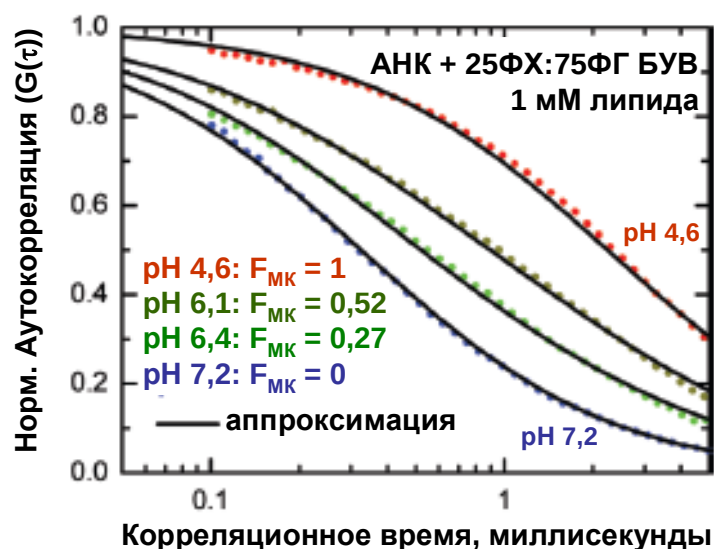


Рис. 1.5. Аутокорреляционные кривые, полученные при титровании аннексина Б12 большими униламелярными везикулами (БУВ) состава 25ФХ:75ФГ при значительном ($\sim 10^6$) мольном избытке липида при различных pH.

Значения доли мембранно-компетентной формы АНК, полученные при различных pH для случая связывания этого пептида с липидными мембранами с различным содержанием анионного липида приведены на рис. 1.6. Зависимости $F_{МК}$ от pH среды аппроксимировались по формуле 1.5.

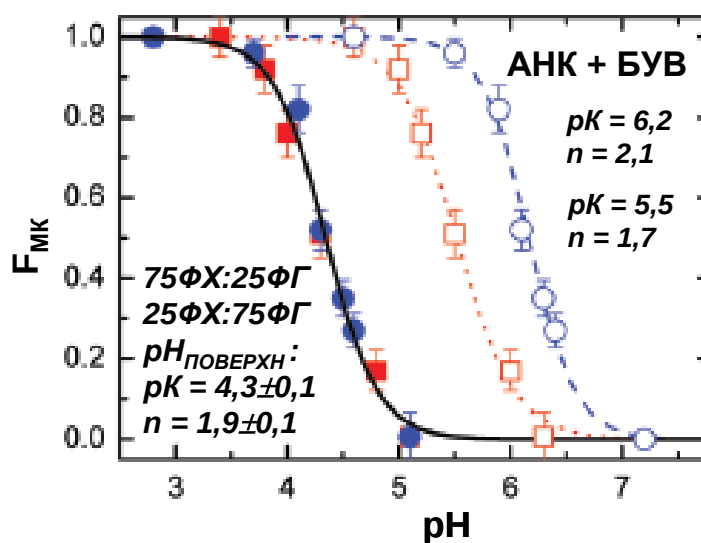


Рис. 1.6. Зависимость доли мембранно-компетентной формы аннексина Б12 от pH среды в случае мембран с преобладанием цвитерионного липида

(75ФХ:25ФГ, см. кружки) и в случае мембран с преобладанием анионного липида (25ФХ:75ФГ, см. квадраты). Результаты представлены для значений рН в объёме раствора (открытые символы) и для значений рН вблизи поверхности мембран с различным электростатическим потенциалом поверхности (заполненные символы), см. формулу 1.6.

Согласно данным рисунка 1.6, зависимости от рН для образования мембранно-компетентной формы АНК различаются для мембран с различным липидным составом: протонирование АНК происходит при более высоких значениях рН в случае мембран с большим содержанием анионного липида (25ФХ:75ФГ).

Принимая во внимание, что концентрация ионов водорода вблизи поверхности мембран, содержащих анионные липиды, выше, чем соответствующая концентрация в объёмной фазе раствора вдали от мембран [123,124], отмеченное различие кривых, приведенных на рис. 1.6, для мембран с различным содержанием анионного липида указывает на то, что образование мембранно-компетентной формы АНК происходит на поверхности мембран.

В зависимости от содержания анионного липида мембраны различаются по величине электростатического потенциала поверхности (φ), например: значения φ для мембран 90ФХ:10ФГ, 75ФХ:25ФГ и 25ФХ:75ФГ составляют -28, -72 и -103 мВ, соответственно [124]. Значения рН вблизи поверхности мембран ($pH_{\text{поверхн}}$) с различным электростатическим потенциалом поверхности (φ) определяются по формуле [124]:

$$pH_{\text{поверхн}} = pH_{\text{объём}} - F \cdot \varphi / R \cdot T \quad (1.6)$$

где $pH_{объем}$ – pH в объеме раствора, F и R – постоянная Фарадея и универсальная газовая постоянная, соответственно, T – абсолютная температура.

При использовании значений pH вблизи поверхности мембран ($pH_{поверхн}$) pH-зависимости для образования мембранно-компетентной формы АНК совпадают для мембран с различной величиной электростатического потенциала поверхности (см. заполненные символы, рис. 1.6). Это также свидетельствует о том, что образование мембранно-компетентной формы АНК происходит на поверхности мембран. Полученное значение коэффициента Хилла ($n \sim 2$) указывает на то, что образование мембранно-компетентной формы АНК происходит путём протонирования двух аминокислотных остатков этого протеина.

Пример ФКС-измерений при связывании транслокационного домена дифтерийного токсина с липидными мембранами при значительном молярном избытке липида при различных pH показан на рис. 1.7.

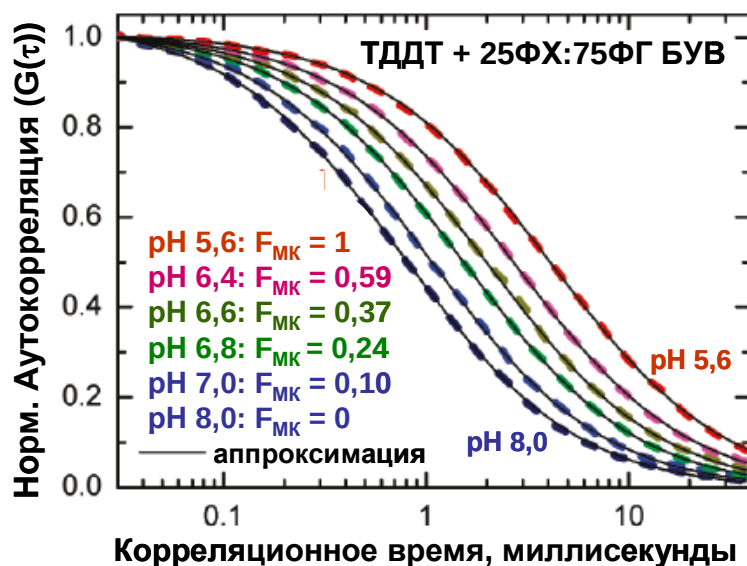


Рис. 1.7. Автокорреляционные кривые, полученные при титровании транслокационного домена дифтерийного токсина липидными мембранами (25ФХ:75ФГ) при значительном ($\sim 10^6$) молярном избытке липида при различных pH. Для удобства визуального сравнения все кривые были

нормализованы к одинаковому числу флуоресцирующих молекул в фокальном объёме ($N=1$).

Увеличение кислотности среды приводит к изменениям корреляционного времени (τ_D) от 0,34 миллисекунды (соответствует мобильности свободного ТДДТ) до 2,1 миллисекунды (соответствует мобильности связанного с мембраной ТДДТ). При проведении количественного анализа мембранного связывания все аутокорреляционные кривые (штриховые линии) аппроксимировались (сплошные линии) при фиксированных значениях вышеуказанных корреляционных времён.

Значения доли мембранно-компетентной формы ТДДТ, полученные при различных рН, приведены на рис. 1.8. Зависимости F_{MK} от рН среды аппроксимировались по формуле 1.5.

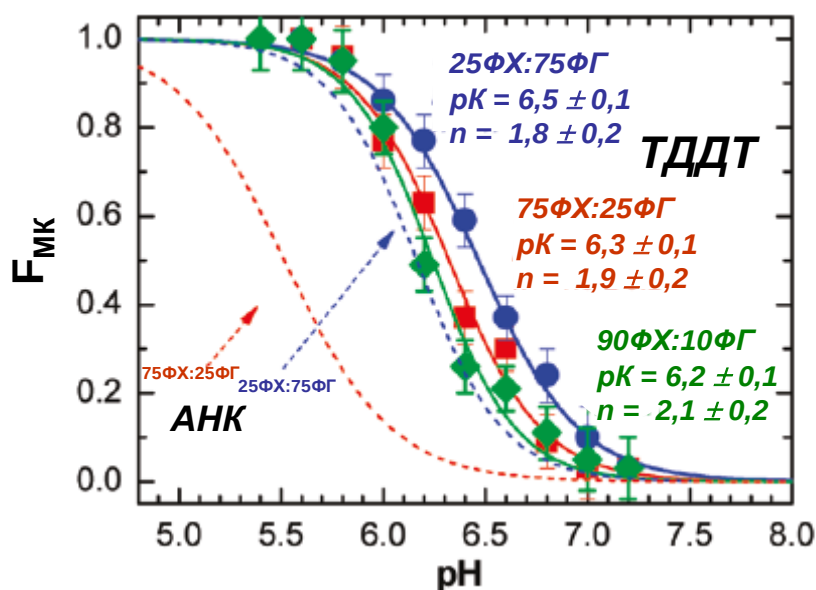


Рис. 1.8. Зависимости величин доли мембранно-компетентной формы транслокационного домена дифтерийного токсина от рН в объёме раствора для мембран с различным липидным составом: 25ФХ:75ФГ (кружки), 75ФХ:25ФГ (квадраты), 90ФХ:10ФГ (ромбы) и их аппроксимация по уравнению 1.5 (линии). Для сравнения представлены соответствующие аппроксимирующие кривые для АНК (штриховые линии), см. рис. 1.6.

Согласно данным рисунка 1.8, в отличие от случая АНК (рис. 1.6), протонирование ТДДТ происходит при более высоких значениях рН и полученные рН-зависимости образования мембранно-компетентной формы ТДДТ значительно не различаются для мембран с различным содержанием анионного липида ФГ и, следовательно, с различной концентрацией ионов водорода вблизи мембранной поверхности.

Принимая во внимание, что протонирование ТДДТ не зависит от концентрации ионов водорода вблизи поверхности мембран, можно сделать вывод о том, что, в отличие от АНК, образование мембранно-компетентной формы ТДДТ происходит в объеме раствора вдали от поверхности мембран. Полученное значение коэффициента Хилла ($n \sim 2$) указывает на то, что образование мембранно-компетентной формы ТДДТ происходит путём протонирования двух аминокислотных остатков этого протеина.

Таким образом, разработанным нами методом оценки количества мембранно-компетентной формы модельных мембранных протеинов с рН-регулируемым встраиванием (аннексина Б12 и Т-домена дифтерийного токсина) в зависимости от рН среды, основанным на применении флуоресцентной корреляционной спектроскопии, установлено, что образование мембранно-компетентной формы аннексина происходит у поверхности липидных мембран, в то время как аналогичный процесс для Т-домена дифтерийного токсина происходит в объеме раствора.

1.2. Оценка мембранной топологии модельных мембранных протеинов

Важным этапом в исследовании механизма встраивания протеина в липидную мембрану является определение мембранной топологии тех или иных фрагментов протеина (т.е. определение расположения протеиновых фрагментов в липидном бислое) [55,68-77,46].

Одним из известных в литературе [46] способов изучения мембранной топологии протеинов является метод, использующий флуоресцентную спектроскопию при стационарном возбуждении для выявления тушения флуоресценции связанной с протеином метки NBD (рис. 1.9) при помощи тушителя флуоресценции LysoUB (рис. 1.10), в котором хромофор UniBlue (UB) связан с лизолипидом (lyso).

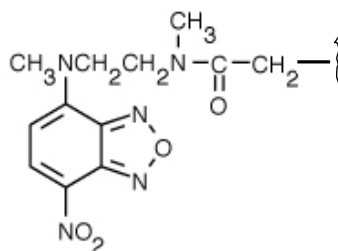


Рис. 1.9. Метка NBD (донор энергии электронного возбуждения [46]; максимум поглощения ~ 472 нм, максимум флуоресценции ~ 536 нм [110]).

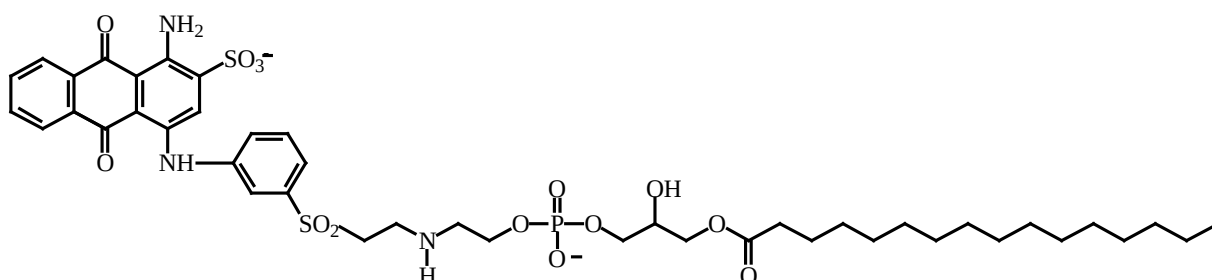


Рис. 1.10. LysoUB (акцептор энергии электронного возбуждения, который тушит флуоресценцию метки NBD по механизму Фёрстеровского резонансного переноса энергии [46]; максимум поглощения ~ 585 нм [46]).

Использование лизолипида позволяет добиться асимметричного связывания тушителя с липидной мембраной: LysoUB локализуется только во внешнем липидном слое мембраны.

Измеряя изменение интенсивности флуоресценции метки NBD в присутствии тушителя LysoUB оценивают эффективность Фёрстеровского

резонансного переноса энергии и делают вывод о мембранной топологии встроенных в мембрану протеинов, то есть о расположении меченного NBD участка протеина во внешнем или во внутреннем монослое липидного бислоя, или же о его равномерном распределении между внешним и внутренним липидными слоями мембраны [46].

Однако, предложенный авторами [46] способ имеет недостаток: использование флуоресцентной спектроскопии при стационарном возбуждении при исследовании топологии мембранных протеинов осложняется плохой воспроизводимостью результатов от образца к образцу, которая является следствием гидрофобности мембранных протеинов, приводящей их к агрегации с последующим выпадением в осадок [49,53,54]. Перечисленные выше процессы приводят к изменению количества флуоресцирующих молекул в растворе, а значит, к систематическим ошибкам в измерении интенсивности флуоресценции.

Для минимизации ошибок в оценке топологии мембранных протеинов, связанных с девиацией интенсивности флуоресценции от образца к образцу, нами предлагается модификация описанного LysoUB/NBD метода [46], основанная на использовании флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении [125]. Измерения времени жизни вместо интенсивности флуоресценции позволяет решить проблему воспроизводимости результатов, поскольку скорость затухания флуоресценции в условиях импульсного возбуждения не зависит от количества флуоресцирующих молекул в растворе [126]. Применение флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении для оценки тушения флуоресценции зонда NBD в присутствии тушителя флуоресценции LysoUB является возможным поскольку LysoUB тушит флуоресценцию NBD по механизму Фёрстеровского переноса энергии электронного возбуждения [46], результатом чего является уменьшение измеряемых времён затухания

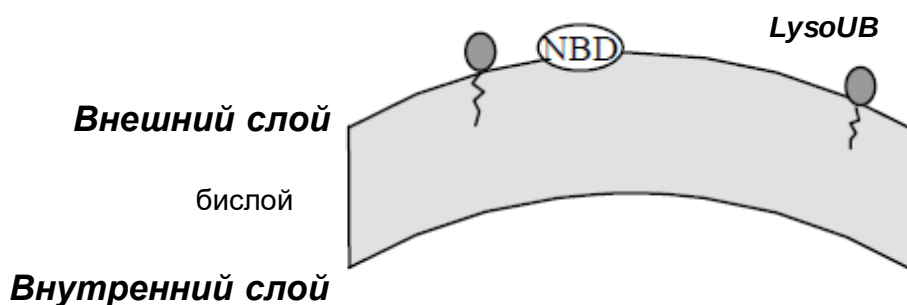
этого флуорофора, т.е. тушение происходит по динамическому механизму [126].

Общий принцип предложенного нами метода оценки мембранной топологии протеинов при помощи LysoUB/NBD показан на рис. 1.11. LysoUB связывается с внешним липидным слоем мембраны и тушит флуоресценцию NBD. Радиус Фёрстера для резонансного переноса энергии с NBD на LysoUB, вычисленный на основании интеграла перекрывания спектра флуоресценции NBD и спектра поглощения LysoUB при стандартных условиях (25°C), составляет 35 Å [46]. Такое значение радиуса Фёрстера примерно равно толщине углеводородной части липидного бислоя мембраны [46]. Таким образом, эффективность переноса энергии будет наибольшей, если тушитель и флуорофор расположены в поверхностном липидном слое мембраны (рис. 1.11, А) и будет наименьшей, если тушитель и флуорофор расположены в разных липидных слоях мембраны: тушитель – в верхнем, а флуорофор – в нижнем (рис. 1.11, В). В случае равномерного (изотропного) распределения NBD между внешним и внутренним слоями мембраны (рис. 1.11, Б) эффективность тушения флуоресценции NBD будет иметь промежуточное значение.

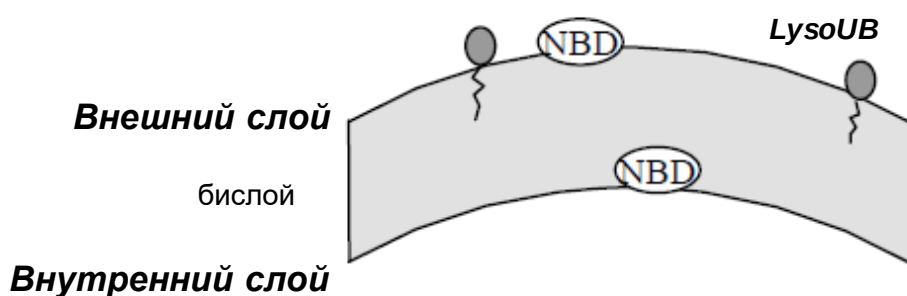
Нами были измерены времена жизни флуоресценции NBD при наличии и при отсутствии 2% (мол.) LysoUB для трёх модельных систем, соответствующих идеальным случаям А,Б и С, представленным на рис. 1.11. Возбуждение флуоресценции измеряемых образцов проводилось на длине волны 439 нм, флуоресценция регистрировалась на длине волны 536 нм.

Распределение NBD только во внешнем липидном слое было достигнуто с использованием протеина аннексина, меченного NBD и связанного с поверхностью липидной мембраны в присутствии ионов Ca^{2+} (в этих условиях молекулы аннексина образуют тримеры, расположенные на поверхности липидной мембраны) [46].

А. NBD во внешнем слое: сильное тушение



Б. равномерное распределение NBD между внешним и внутренним слоями: среднее тушение



В. NBD во внутреннем слое: слабое тушение

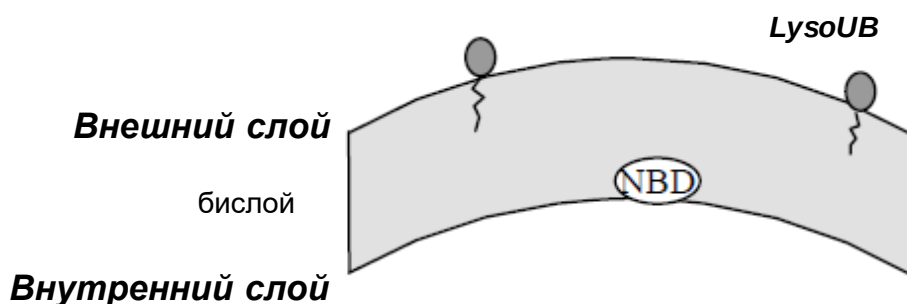


Рис. 1.11. Схема, иллюстрирующая возможности тушения флуоресценции NBD при помощи LysoUB в зависимости от расположения NBD во внешней или во внутренней части липидного бислоя.

Равномерное распределение NBD между внешним и внутренним слоями мембраны было достигнуто использованием NBD-ФЭ (NBD, связанный с липидом – 1-пальмитоил-2-олеоил-*sn*-глицеро-3-фосфо-

этаноламином (ФЭ)) при образовании липидных везикул из смеси меченного NBD и немеченого липидов. Распределение NBD только во внутреннем липидном слое было достигнуто при помощи химической модификации молекул этой метки, расположенных во внешнем липидном слое везикул с изотропным распределением NBD: при воздействии дитионита натрия нитрогруппы молекул NBD, расположенных во внешнем липидном слое мембраны, восстанавливаются до аминогрупп и, как следствие, молекулы NBD, находящиеся во внешнем липидном слое, теряют способность флуоресцировать при возбуждении на длинах волн 430-445 нм [46].

Кривые затухания флуоресценции, измеренные для трёх модельных систем, соответствующих идеальным случаям А, Б и С (см. рис. 1.11), представлены на рис. 1.12. Как и ожидалось, измеренные кривые затухания флуоресценции, заметно отличаются – это означает, что флуоресцентная спектроскопия при импульсном возбуждении пригодна для определения мембранной топологии пептидов/протеинов, меченных NBD.

Кинетика затухания флуоресценции NBD в мембранной среде в присутствии LysoUB аппроксимировалась полиэкспоненциальными функциями [126,127]:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i e^{(-t/\tau_i)} \quad (1.7)$$

где α_i – предэкспоненциальные множители и τ_i – времена затухания флуоресценции.

В процессе деконволюции подбор конечного вида аппроксимирующей полиэкспоненциальной функции осуществлялся на основе критерия χ^2 . Во всех измерениях экспериментальных кривых затухания регистрировалась короткоживущая компонента с $\tau \sim 0,3$ нс, вклад которой не превышал 1%.

Она была отнесена нами к рассеянному излучению импульсного источника, и не принималась во внимание в ходе дальнейшего анализа.

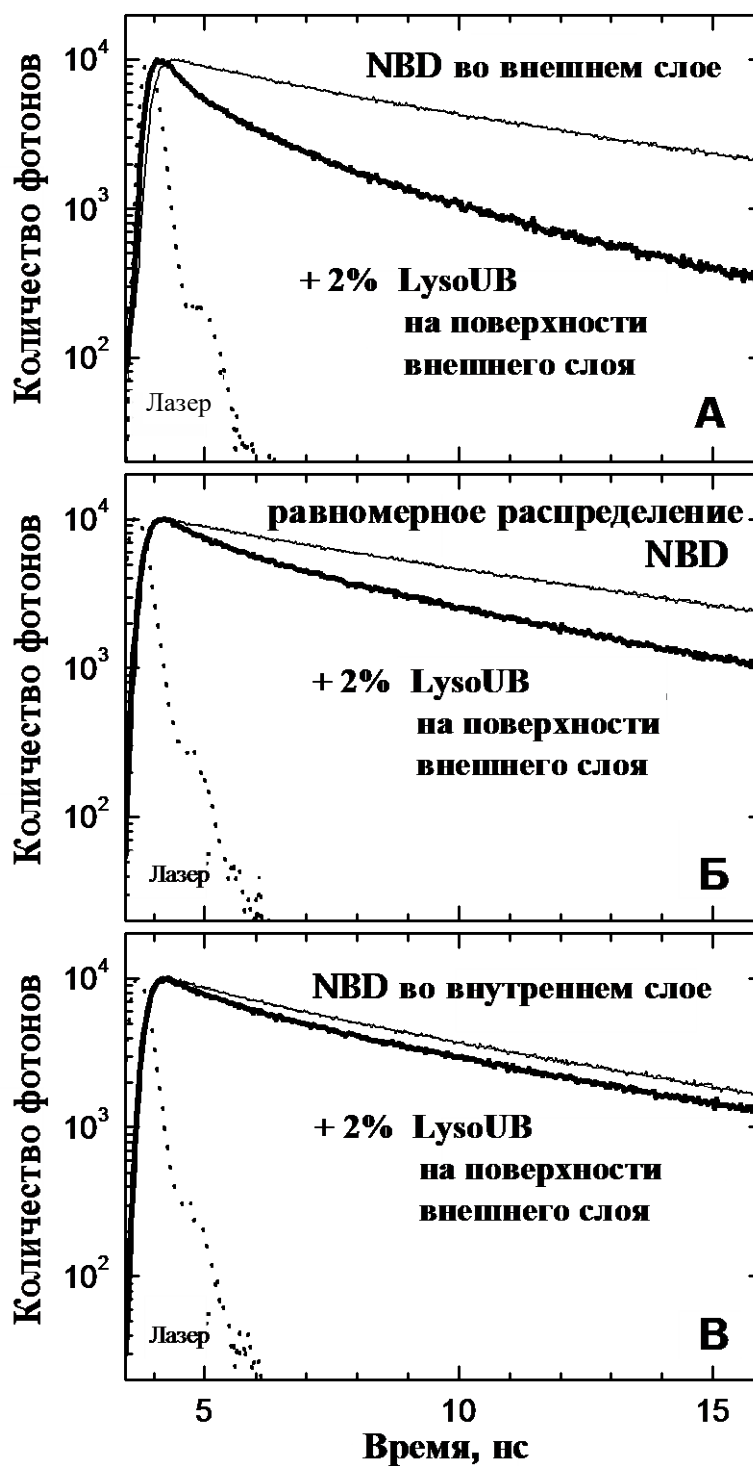


Рис. 1.12. Кривые затухания флуоресценции NBD при наличии и при отсутствии LysoUB, измеренные для трёх модельных систем, представленных на рис. 1.11.

Усреднённые по амплитуде и по интенсивности времена жизни флуоресценции вычислялись по формулам:

$$\tau_{\alpha} = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n \alpha_i} \quad \tau_I = \frac{\sum_{i=1}^n I_i \tau_i}{\sum_{i=1}^n I_i} = \frac{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i^2}{\sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i} \quad (1.8, 1.9)$$

Полученные параметры затухания флуоресценции NBD для трёх модельных систем (см. рис. 2.57) в отсутствие и в присутствии LysoUB приведены в таблице 1.1. Представлены: два времени жизни флуоресценции, τ_1 и τ_2 , амплитуда (α_1) и интенсивность (I_1) для τ_1 . Амплитуда и интенсивность для времени жизни τ_2 не представлены, поскольку они равны $\alpha_2 = 1 - \alpha_1$ и $I_2 = 100\% - I_1$, соответственно.

Таблица 1.1

Параметры затухания флуоресценции NBD для трёх модельных систем при наличии и при отсутствии LysoUB.

NBD	LysoUB	τ_1 , нс	(α_1)	I_1	τ_2 , нс	χ^2	τ_{α} , нс	τ_I , нс
Внешний слой	0	2,1	(0,25)	8%	8,1	1,13	6,6	7,6
	+2%	1,4	(0,64)	34%	4,9	1,26	2,7	3,7
Равномерное распределение	0	2,9	(0,22)	8%	9,5	1,09	8,1	9,0
	+2%	2,4	(0,54)	26%	8,0	1,18	5,0	6,5
Внутренний слой	0	3,2	(0,42)	21%	8,7	1,22	6,4	7,5
	+2%	2,7	(0,49)	23%	8,5	1,26	5,6	7,2

При отсутствии тушителя кривые затухания флуоресценции NBD для трёх модельных систем хорошо аппроксимируются двухэкспоненциальной

функцией, из них наибольший вклад вносит наиболее длительная компонента закона затухания ($\tau_2 \sim 8-9,5$ нс), в то время как короткая компонента ($\tau_1 \sim 2-3$ нс) характеризуется меньшим вкладом в общую интенсивность флуоресценции. Добавка LysoUB к модельной системе с распределением NBD только во внешнем липидном слое мембраны (А, рис. 1.11) приводит к существенному укорачиванию обох времён затухания (τ_1 - до 1,4 нс, а τ_2 - до 4,9 нс), а также к увеличению вклада короткой компоненты. Добавка тушителя флуоресценции к модельной системе с распределением NBD только во внутреннем липидном слое мембраны (В, рис. 1.11) не приводит к значительному изменению аналитического вида закона затухания флуоресценции NBD. Изменение параметров затухания флуоресценции NBD для системы с равномерным распределением NBD между внешним и внутренним слоями мембраны (Б, рис. 1.11) закономерно является промежуточным по отношению к рассмотренным выше граничным случаям (модельные системы А и В).

Зависимость тушения флуоресценции NBD в модельных системах А, Б и В от мольной концентрации LysoUB представлена на рис. 1.13.

Как видно из зависимостей, представленных на рис. 1.13, при добавлении 2% мольной концентрации LysoUB наблюдается заметное различие между кривыми затухания флуоресценции для исследованных модельных систем с различной топологией NBD в липидном бислое. При высоких концентрациях тушителя ($\geq 3\%$ мол.) характер зависимостей не меняется, что указывает на отсутствие заметных изменений структуры липидного бислоя под действием LysoUB.

Таким образом, для исследования мембранной топологии можно использовать любой из трёх параметров затухания флуоресценции NBD: время жизни флуоресценции длинной компоненты τ_2 , усреднённое по амплитуде время жизни флуоресценции τ_a , усреднённое по интенсивности время жизни флуоресценции τ_1 .

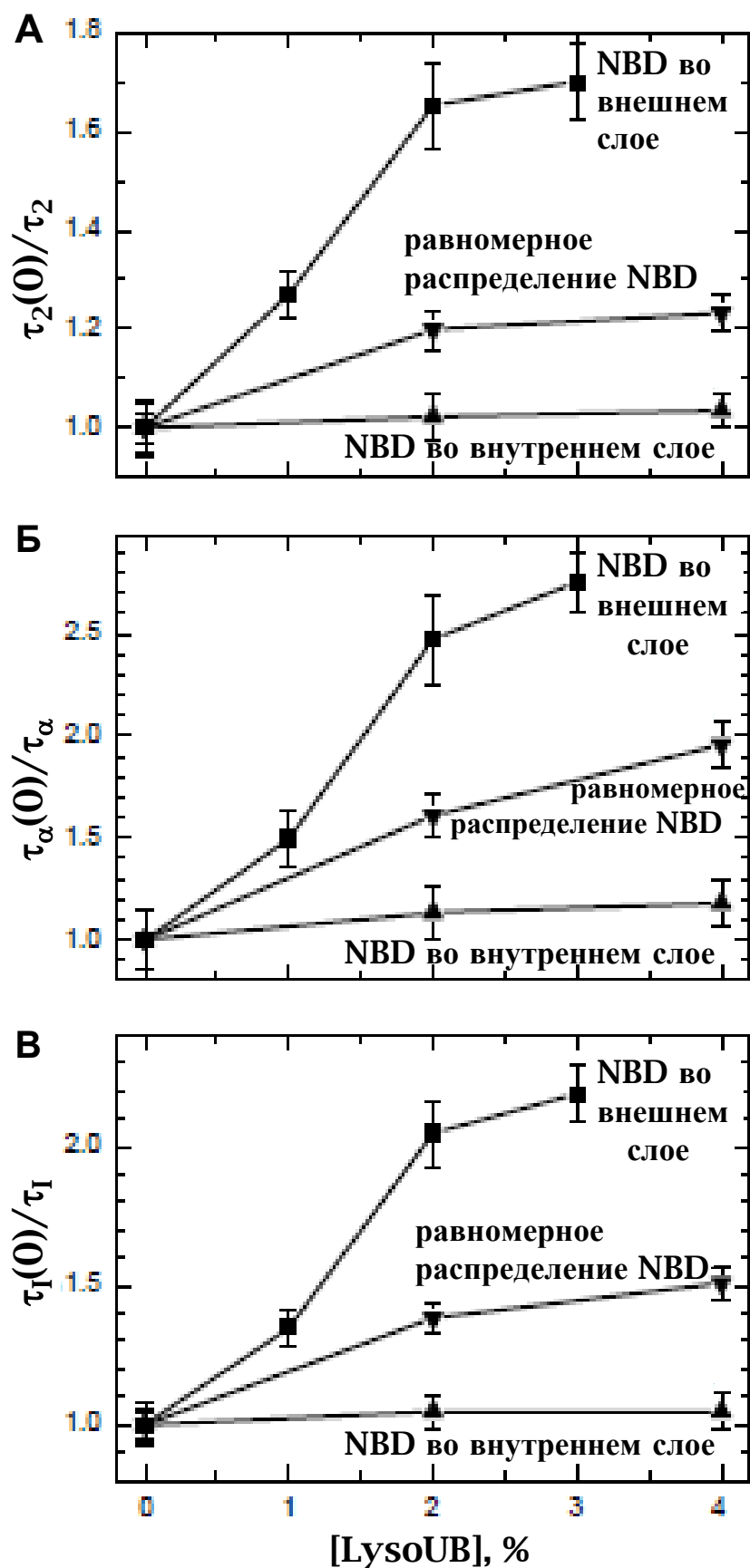


Рис. 1.13. Зависимость тушения флуоресценции NBD от мольной концентрации LysoUB для модельных систем: с распределением NBD только

во внешнем липидном слое мембраны (■), с равномерным (изотропным) распределением NBD между внешним и внутренним слоями мембраны (▼) и с распределением NBD только во внутреннем липидном слое мембраны (▲).

На основании результатов, полученных для модельных систем (см. рис. 1.10-1.12), нами были выработаны экспериментальные критерии для отнесения NBD-меченного участка протеина к той или иной мембранной топологии, основанные на использовании отношения значений любого из трёх параметров затухания флуоресценции (τ_2 , τ_α , τ_L) при наличии (τ_0) и при отсутствии 2% LysoUB (τ): (а) слабое тушение ($\tau_0/\tau \leq 1,25$) указывает на транслокацию NBD-меченного участка протеина во внутренний липидный слой мембраны, (б) сильное тушение ($\tau_0/\tau \geq 1,45$) указывает на отсутствие транслокации (NBD-меченный участок протеина локализуется во внешнем липидном слое), (в) среднее тушение ($1,25 \leq \tau_0/\tau \leq 1,45$) свидетельствует о равномерном распределении NBD-меченного участка протеина между внешним и внутренним липидными слоями мембраны.

Предложенный метод, использующий измерения времени жизни флуоресценции, был успешно использован для изучения мембранной топологии аннексина B12 [88] и Т-домена дифтерийного токсина [89], а также для исследования механизма взаимодействия этих протеинов с липидными мембранами (для исследования условий стабилизации интермедиата встраивания на поверхности липидного бислоя).

Для исследования мембранной топологии аннексина B12 использовались четыре цистеиновых мутанта этого протеина (D132C, D162C, Q221C, E251C), в которых к цистеиновым аминокислотным остаткам ковалентно присоединялся зонд NBD [46]. Исследовалась топология мембранного встраивания АНК через 10 минут и через 2 часа после начала его связывания с мембранами (связывание АНК с мембранами инициируется понижением pH с 7 до 4,5) [88].

Результаты измерений время-разрешённой флуоресценции АНК-NBD представлены на рис. 1.14.

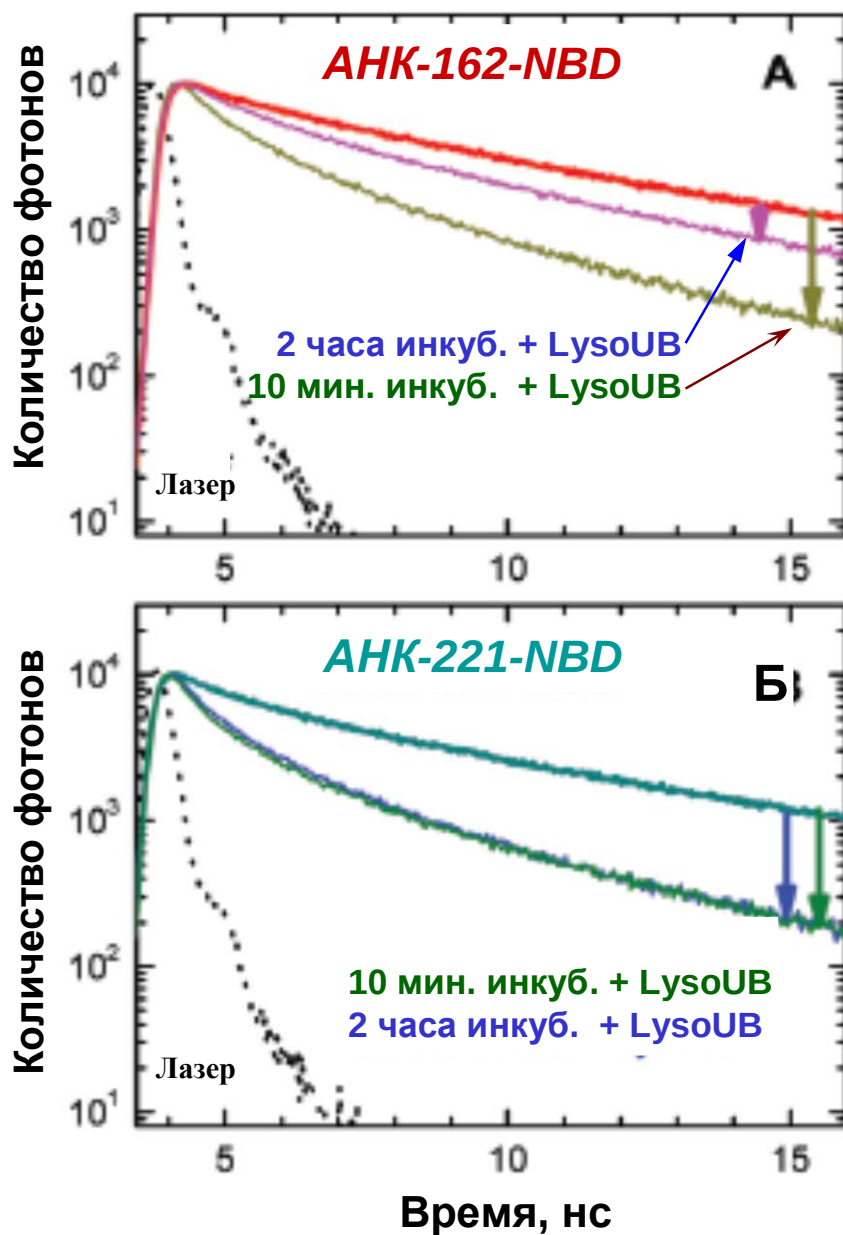


Рис. 1.14. Наиболее характерные кривые затухания флуоресценции NBD, присоединённого к 162-му (А) или 221-му (Б) аминокислотным остаткам аннексина В12 измеренные через 10 минут и через 2 часа после начала связывания АНК с мембранами БУВ 25ФХ:75ФГ.

На рис. 1.14 вертикальные стрелки показывают изменение кинетики затухания флуоресценции при добавке 2% LysoUB через 10 минут или через

2 часа после начала связывания АНК с мембранами: более сильное тушение указывает на локализацию NBD-меченного участка протеина во внешнем липидном слое мембраны (например, АНК-221-NBD или АНК-162-NBD после 10 мин инкубации с БУВ 25ФХ:75ФГ), транслокация NBD-меченного участка протеина через бислой приводит к уменьшению тушения (например, АНК-162-NBD через 2 часа инкубации с БУВ).

Отнесение полученных экспериментальных результатов для АНК к той или иной мембранной топологии производилось согласно предложенным выше критериям, основанным на исследованиях модельных систем (см. рис. 1.11-1.13). Результаты отнесения экспериментальных результатов для АНК, меченного NBD по различным аминокислотным остаткам, к мембранной топологии приведены в таблице 1.2.

Таблица 1.2

Топология мембранного встраивания аннексина Б12, меченного зондом NBD по различным аминокислотным остаткам, через 10 минут и через 2 часа после начала его связывания с мембранами

Мутант АНК	БУВ	Время инкубации	τ_0/τ	Липидный слой
АНК-134-NBD	25ФХ:75ФГ	10 мин	1.50	<i>Внешний</i>
		2 часа	1.51	<i>Внешний</i>
	75ФХ:25ФГ	10 мин	1.48	<i>Внешний</i>
		2 часа	1.47	<i>Внешний</i>
АНК-162-NBD	25ФХ:75ФГ	10 мин	1.60	<i>Внешний</i>
		2 часа	1.29	<i>Внешний /Внутренний</i>
	75ФХ:25ФГ	10 мин	1.19	<i>Внешний</i>
		2 часа	1.11	<i>Внутренний</i>

Мутант АНК	БУВ	Время инкубации	τ_0 / τ	Липидный слой
АНК-221-NBD	25ФХ:75ФГ	10 мин	1.60	<i>Внешний</i>
		2 часа	1.66	<i>Внешний</i>
	75ФХ:25ФГ	10 мин	1.57	<i>Внешний</i>
		2 часа	1.63	<i>Внешний</i>
АНК-251-NBD	25ФХ:75ФГ	10 мин	1.48	<i>Внешний</i>
		2 часа	1.41	<i>Внешний /Внутренний</i>
	75ФХ:25ФГ	10 мин	1.25	<i>Внутренний</i>
		2 часа	1.23	<i>Внутренний</i>

τ^0 и τ – значения долгоживущей компоненты в законе затухания флуоресценции АНК-NBD (нс) в отсутствие и в присутствии LysoUB, соответственно.

Результаты исследования мембранной топологии аннексина B12, приведенные в табл. 1.2, свидетельствуют в пользу существования интермедиата встраивания этого протеина в мембрану, который может быть стабилизирован на поверхности бислоя при наличии в составе мембраны анионного липида, и, таким образом, позволяют предложить следующий механизм встраивания аннексина B12 в липидные мембраны, представленный на рис. 1.15.

Стабилизация интермедиата встраивания аннексина B12 в липидную мембрану при наличии в составе мембраны анионного липида может быть результатом кулоновских взаимодействий между анионными липидами и катионными аминокислотными остатками в трансмембранных (т.е. транслоцирующихся через бислой) участках АНК.

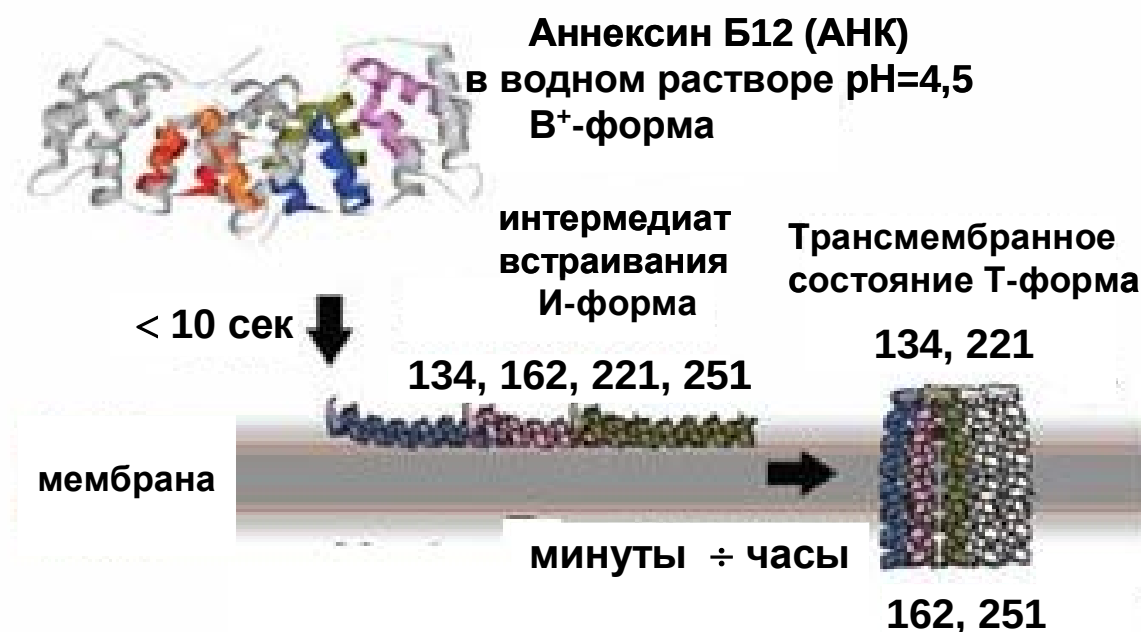


Рис. 1.15. Схема, демонстрирующая механизм встраивания модельного мембранного протеина аннексина Б12 в липидный бислой при низких pH, включающая мембранно-компетентную форму протеина (B⁺-форма), трансмембранную (т.е. встроенную в бислой) форму (Т-форма), интермедиат встраивания на поверхности бислоя (И-форма). 132, 162, 221, 251 – номера цистеиновых аминокислотных остатков к которым ковалентно присоединялся зонд NBD [46].

Таким образом, проведенные нами исследования изменений мембранной топологии АНК в ходе его встраивания в мембрану: (а) впервые непосредственно доказывают предположение о существовании локализуемого на поверхности мембраны интермедиата встраивания этого протеина, сделанное авторами [46] на основании исследований кинетики встраивания; (б) подтверждают предположение авторов [46] о возможности стабилизации интермедиата встраивания АНК в случае униламелярных мембран с высоким (75% мол.) содержанием анионного липида; (в) впервые проясняют мембранную топологию фрагмента АНК,

находящегося между 221-м и 251-м аминокислотными остатками; (г) верифицируют сведения о мембранной топологии фрагмента АНК, расположенного между 134-м и 162-м аминокислотными остатками, полученные авторами [46] при использовании менее точного способа изучения мембранной топологии протеинов.

Для исследования зависимости мембранной топологии транслокационного домена дифтерийного токсина (см. рис. 1.16) от липидного состава везикул использовались два цистеиновых мутанта этого протеина (L350C и P378C, рис. 1.16), в которых к цистеиновым аминокислотным остаткам ковалентно присоединялась метка NBD [89].

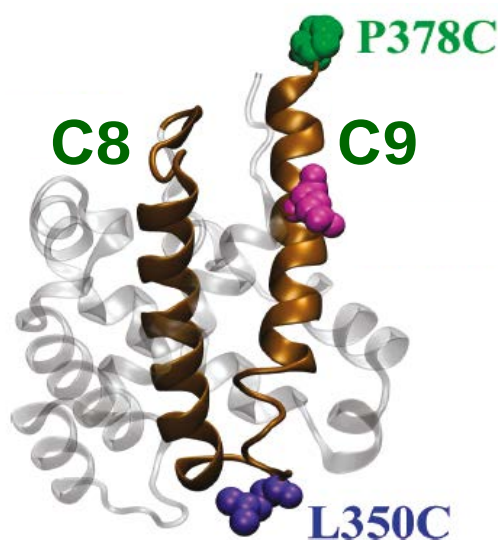


Рис. 1.16. Структура (PDB-структура (protein database structure)) Т-домена дифтерийного токсина в его водорастворимой форме, построенная на основании кристаллографических данных [61]. α -Спирали C8 и C9 выделены тёмным тоном. Аминокислотные остатки L350 и P378, расположенные на краях α -спирали C9, заменялись на цистеиновые аминокислотные остатки для ковалентного присоединения метки NBD.

Измерения кинетики затухания флуоресценции ТДДТ-NBD в отсутствие и в присутствии 2% LysoUB проводились через 2 часа после начала связывания ТДДТ с липидными мембранами (при pH ~ 4,5, т.е. в

условиях, когда ТДДТ может проникать в липидный бислой [89]). Полученные экспериментальные результаты и их интерпретация с точки зрения мембранной топологии ТДДТ в зависимости от липидного состава мембран приведены в таблице 1.3. Два времени жизни, τ_1 и τ_2 представлены вместе с соответствующими амплитудами α_1 и α_2 . Усреднённое по амплитуде (τ_α) и по интенсивности (τ_I) время жизни флуоресценции вычислялось по формуле 2.18. τ^0 и τ_α – значения усреднённого по амплитуде времени жизни флуоресценции ТДДТ при наличии и при отсутствии LysoUB, соответственно. Отнесение полученных экспериментальных результатов для ТДДТ-NBD к той или иной мембранной топологии производилось согласно предложенным выше критериям, основанным на исследованиях модельных систем (см. рис. 1.11-1.13).

Таблица 1.3

Кинетика флуоресценции конъюгатов транслокационного домена дифтерийного токсина с флуоресцентной меткой NBD, при их взаимодействии с модельными мембранами – липидными везикулами с различным содержанием анионного липида ФГ, при наличии тушителя LysoUB и без него.

Конъюгат	БУВ	LysoUB	τ_1 , ns (α_1)	τ_2 , ns (α_2)	τ_α , ns	τ_0/τ_α (Липидный слой)
350-NBD	25ФХ:75ФГ	0	1.50 (0.32)	7.90 (0.68)	5.85	1.12 (Внутренний)
		2%	1.42 (0.37)	7.47 (0.63)	5.25	
350-NBD	75ФХ:25ФГ	0	1.33 (0.35)	7.20 (0.65)	5.13	1.11 (Внутренний)
		2%	1.32 (0.40)	6.79 (0.60)	4.61	

Конъюгат	БУВ	LysoUB	τ_1 , ns (α_1)	τ_2 , ns (α_2)	τ_a , ns	τ_0/τ_a (Липидный слой)
350-NBD	90ФХ:10ФГ	0	1.18 (0.50)	6.27 (0.50)	3.72	1.70 (Внешний)
		2%	0.94 (0.59)	3.97 (0.41)	2.19	
378-NBD	25ФХ:75ФГ	0	1.23 (0.51)	4.54 (0.49)	2.98	1.72 (Внешний)
		2%	0.85 (0.67)	3.50 (0.33)	1.73	

Как следует из результатов исследования топологии встраивания ТДДТ в мембраны с различным липидным составом, по данным кинетики флуоресценции, представленным в табл.1.3, в случае мембран с относительно высоким ($\geq 25\%$ мол.) содержанием анионного липида (25ФХ:75ФГ и 75ФХ:25ФГ) наблюдается трансмембранное встраивание ТДДТ: участок протеина, содержащий 350-NBD, локализуется во внутреннем липидном слое мембраны, а участок ТДДТ, содержащий 378-NBD, локализуется во внешнем липидном слое.

В отличие от имеющихся в литературе сведений о мембранной топологии ТДДТ [73-77], полученных при использовании недостаточно стабильных липидных везикул (например, везикулы, полученные при помощи ультразвука, что часто приводит к ошибочным результатам при исследовании встраивания протеина в липидные мембраны [79]), проведенные нами исследования впервые проясняют мембранную топологию фрагмента ТДДТ, находящегося между 350-м и 378-м аминокислотными остатками, для протеина, встроенного в достаточно стабильные липидные мембраны: в большие униламеллярные везикулы.

В случае мембран с низким содержанием анионного липида (90ФХ:10ФГ, табл.1.3) трансмембранного встраивания ТДДТ не происходит: участок протеина, содержащий 350-NBD, локализуется во внешнем липидном слое мембраны. Это свидетельствует о существовании на поверхности мембраны интермедиата встраивания, стабилизированного при низком содержании анионного липида (90ФХ:10ФГ). Таким образом, нами впервые показана возможность стабилизации интермедиата встраивания ТДДТ при использовании униламелярных мембран с низким содержанием анионного липида.

Отсутствие стабилизации интермедиата встраивания ТДДТ при высоком содержании анионного липида объясняется тем, что катионные аминокислотные остатки ТДДТ (H322, H323, H372, R377, рис. 1.2) расположены в верхней части α -спиралей C8 и C9 (рис. 1.16) и, следовательно, не мешают трансмембранному встраиванию. Наблюдаемое встраивание ТДДТ при высоком содержании анионного липида и, напротив, стабилизация интермедиата встраивания ТДДТ при низком содержании анионного липида (10% мол.) указывают на то, что встраивание ТДДТ может быть связано с дополнительным протонированием этого протеина на поверхности мембраны: концентрация ионов водорода вблизи поверхности мембран, содержащих анионные липиды, выше, чем соответствующая их концентрация в объёмной водной фазе раствора вдали от мембран [124].

Таким образом, с помощью разработанного нами нового метода оценки мембранной топологии протеинов, основанного на использовании флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении, было экспериментально доказано, что для аннексина B12 и для транслокационного домена дифтерийного токсина существует интермедиат встраивания в липидные мембраны, который локализуется на поверхности липидного бислоя. Установлено, что интермедиат встраивания может быть

стабилизирован на поверхности мембран в зависимости от липидного состава последних: в случае аннексина B12 интермедиат стабилизируется при высоком содержании анионного липида, тогда как в случае транслокационного домена дифтерийного токсина стабилизация интермедиата происходит при низком содержании анионного липида.

1.3. Кинетика процесса связывания транслокационного домена дифтерийного токсина с липидной мембраной

Кинетика связывания ТДДТ с мембраной исследовалась при помощи предложенного нами метода оценки доли мембранно-компетентной формы Т-домена в зависимости от pH среды, основанного на использовании Фёрстеровского резонансного переноса энергии [89].

Перенос энергии происходит между донором энергии электронного возбуждения (Alexa488, рис. 1.4), ковалентно связанным с протеином, и акцептором энергии электронного возбуждения (родамин-ФЭ, рис. 1.17), ковалентно связанным с мембраной [89]: долю мембранно-компетентной формы протеина оценивают по степени тушения флуоресценции донора в ходе взаимодействия мембранного протеина с липидными мембранами (доля мембранно-компетентной формы Т-домена дифтерийного токсина принималась равной доле ТДДТ, связывающегося с липидными мембранами при избытке липида).

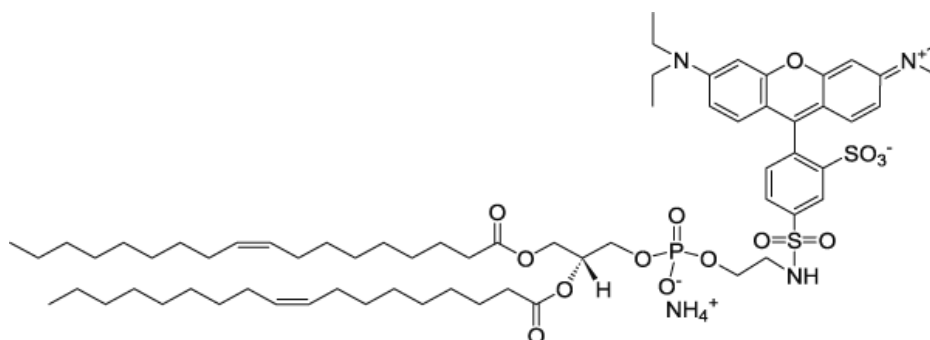


Рис. 1.17. Структура зонда родамин-ФЭ (1,2-диолеоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-(лиссамин родамин Б сульфонил) аммонийная соль).

Нами была оценена доля мембранно-компетентной формы рН-встраиваемого протеина - транслокационного домена дифтерийного токсина в зависимости от рН среды. Для этого 0,2 мкМ раствор ТДДТ, меченного донором энергии электронного возбуждения Alexa488, добавлялся к 1 мМ раствору липидных везикул в фосфатном буфере при рН 8,0. Затем необходимое значение рН достигалось при помощи добавки 0,5 М ацетатного буфера (рН 4,5).

Донор энергии электронного возбуждения (Alexa488) ковалентно присоединялся к цистеиновому аминокислотному остатку мутанта N235C транслокационного домена дифтерийного токсина. Акцептор энергии электронного возбуждения (родамин), ковалентно связанный с фосфолипидом ФЭ, добавлялся к смеси липидов ФХ и ФГ, использованной для приготовления липидных мембран (больших униламелярных везикул). Количество акцептора флуоресценции родамина-ФЭ в липидной мембране составляло 2% мол.

Результаты измерений флуоресценции при стационарном возбуждении растворов с различным рН, содержавших ТДДТ, меченный донором (Alexa488), и липидные везикулы, содержащие акцептор (родамин), представлены на рис. 1.18.

Как видно из рис. 1.18, изменение рН от нейтрального до кислого приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции донора (Alexa488, максимум флуоресценции ~ 515 нм). Интенсивность испускания акцептора (родамин, максимум флуоресценции ~ 600 нм) существенно не изменялась, поскольку флуоресценция родамина вызвана его непосредственным возбуждением (455 нм). Для обеспечения эффективного переноса энергии эксперимент проводился в условиях 100-кратного мольного избытка акцептора энергии электронного возбуждения.

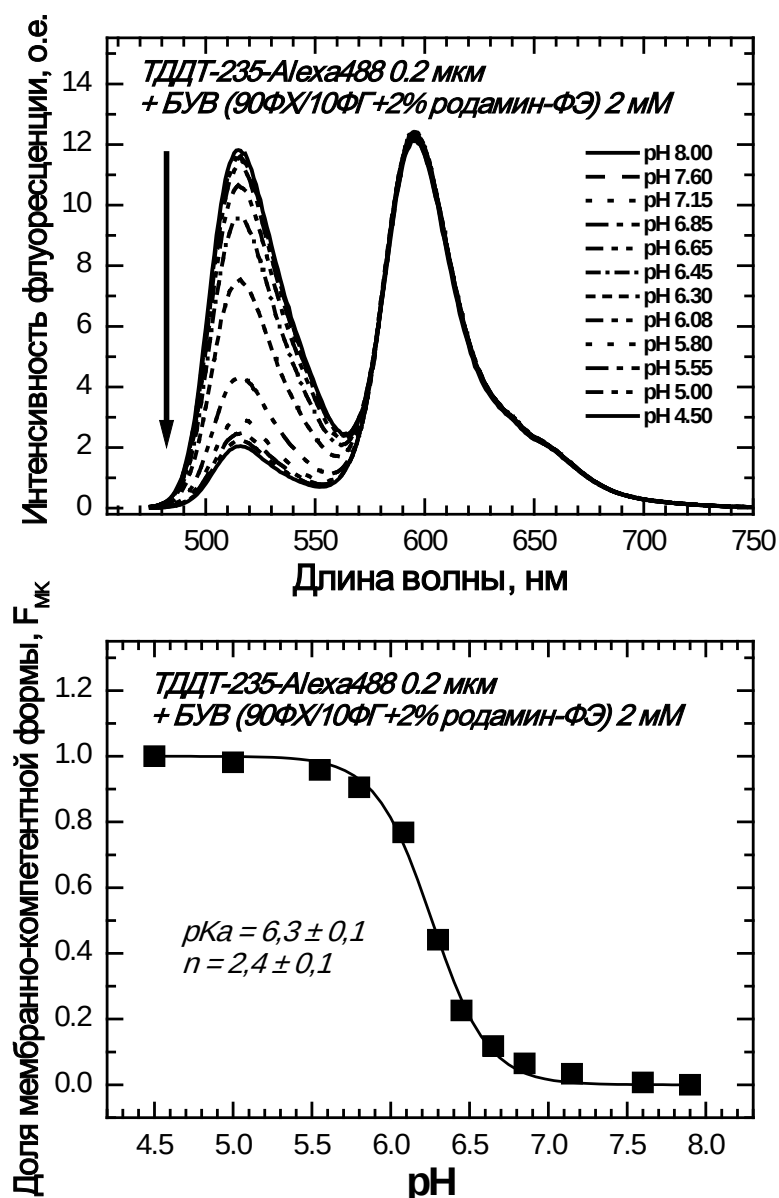


Рис. 1.18. (А) Вверху: тушение флуоресценции донора энергии электронного возбуждения (Alexa488), связанного с ТДДТ, акцептором энергии электронного возбуждения (родамин-ФЭ), входящим в состав мембран. (Б) Внизу: зависимость доли мембранно-компетентной формы Т-домена дифтерийного токсина от рН. pK_a – отрицательный логарифм константы протонной диссоциации, n – коэффициент Хилла.

Зная, что при рН 4,5 наблюдается полное связывание ТДДТ с липидными мембранами 25ФХ:75ФГ (по данным флуоресцентной

корреляционной спектроскопии [88]), а при pH 8,0 связывание с мембраной не происходит [88], можно определить диапазон изменений интенсивности флуоресценции донора (Alexa488) для определения доли мембранного связывания в зависимости от pH: $I_{\text{макс}}^D$ и $I_{\text{мин}}^D$, соответственно – максимальную и минимальную интенсивности флуоресценции донора, относящиеся к полному связыванию протеина с мембранами и отсутствию связывания, соответственно. Измеряя интенсивность флуоресценции донора $I_{\text{изм}}^D$ при определённом значении pH и липидном составе мембран, доли мембранно-компетентной формы протеина определяют по формуле:

$$F_{\text{МК}} = \frac{I_{\text{макс}}^D - I_{\text{изм}}^D}{I_{\text{макс}}^D - I_{\text{мин}}^D} \quad (1.10)$$

Исходя из интенсивности флуоресценции донора в ходе мембранного связывания протеина была построена зависимость доли мембранно-компетентной формы протеина от pH (рис. 1.18, Б), которая аппроксимировалась формулой 1.5 (см. раздел 1.3). Полученное значение pKa для ТДДТ ($pK_a = 6,2 \pm 0,1$, рис. 2.51, панель Б) хорошо согласуется с соответствующим значением ($pK_a = 6,3 \pm 0,1$), определённым при помощи метода, использующего данные флуоресцентной корреляционной спектроскопии [89] (см. раздел 1.3).

Преимущество метода с применением Фёрстеровского резонансного переноса энергии для оценки доли мембранно-компетентной формы Т-домена дифтерийного токсина в зависимости от pH среды по сравнению с рассмотренным ранее методом с применением флуоресцентной корреляционной спектроскопии [88,89] (см. раздел 1.1) состоит в возможности первого из них проводить измерения кинетики связывания ТДДТ с липидной мембраной по скорости изменения относительной

интенсивности флуоресценции. Пример таких измерений представлен на рис. 1.19.

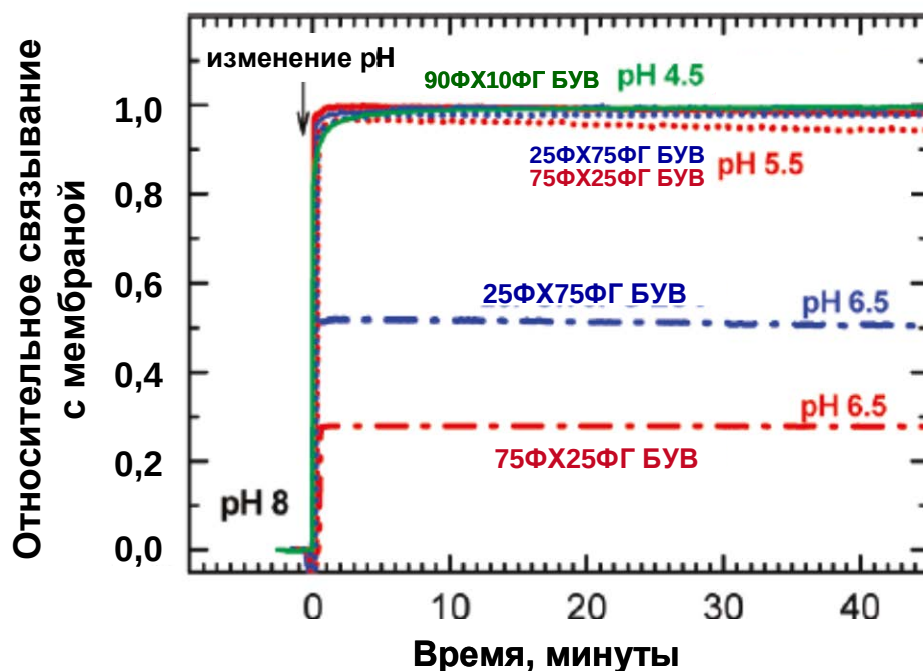


Рис. 1.19. Зависимость от времени относительного связывания ТДДТ с мембранами при его взаимодействии с большими униламелярными везикулами (БУВ) с различным содержанием анионного липида при различных pH.

Исследования кинетики процесса связывания ТДДТ с липидными мембранами в зависимости от pH или липидного состава мембран были проведены впервые. В них использовались большие униламелярные везикулы (БУВ) с различным мольным содержанием цвитерионного фосфатидилхолина (ФХ) и отрицательно заряженного фосфатидилглицерола (ФГ): 25ФХ:75ФГ, 75ФХ:25ФГ и 90ФХ:10ФГ. Зависимости изменений интенсивности флуоресценции донора (Alexa488) от времени при помощи формулы 1.10 конвертировали в кинетические кривые относительного связывания ТДДТ с мембраной.

Полученные кинетические результаты (рис. 1.19) показывают, что ассоциация Т-домена дифтерийного токсина с липидной мембраной происходит достаточно быстро (за время < 1 минуты), а скорость связывания

(константа скорости $k > 2 \cdot 10^{-2} \text{ с}^{-1}$) не зависит от pH и количества анионного липида в составе мембран.

Таким образом, предложенным нами методом оценки количества мембранно-компетентной формы транслокационного домена дифтерийного токсина в зависимости от pH среды, основанным на применении Фёрстеровского резонансного переноса энергии и позволяющим проводить кинетические исследования процесса связывания протеина с мембраной, было установлено, что мембранное связывание ТДДТ происходит достаточно быстро (за время < 1 минуты), а его скорость не зависит от pH и количества анионного липида в составе мембран.

1.4. Кинетика pH-зависимого встраивания транслокационного домена дифтерийного токсина в липидную мембрану

Кинетика pH-зависимого встраивания Т-домена дифтерийного токсина в липидную мембрану исследовалась при помощи метода, основанного на измерении динамики изменения интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении [89,128].

Метод состоит в измерении зависимости от времени интенсивности флуоресценции метки NBD (см. раздел 1.2, рис. 1.9), ковалентно связанной с 369-м аминокислотным остатком транслокационного домена дифтерийного токсина, при встраивании ТДДТ в липидные мембраны. Флуоресценция зонда NBD чувствительна к изменениям полярности и гидратированности его микроокружения [129-135]: при встраивании NBD в липидные мембраны интенсивность его флуоресценции многократно возрастает.

Измерения интенсивности флуоресценции конъюгата ТДДТ-NBD проводились на длине волны 530 нм, при длине волны возбуждения: 465 нм. Для измерений использовались большие униламелярные везикулы (БУВ) с различным молярным содержанием фосфатидилхолина (ФХ) и

фосфатидилглицерола (ФГ): 25ФХ:75ФГ, 75ФХ:25ФГ и 90ФХ:10ФГ. Кинетические кривые, полученные в результате измерений, представлены на рис. 1.20.

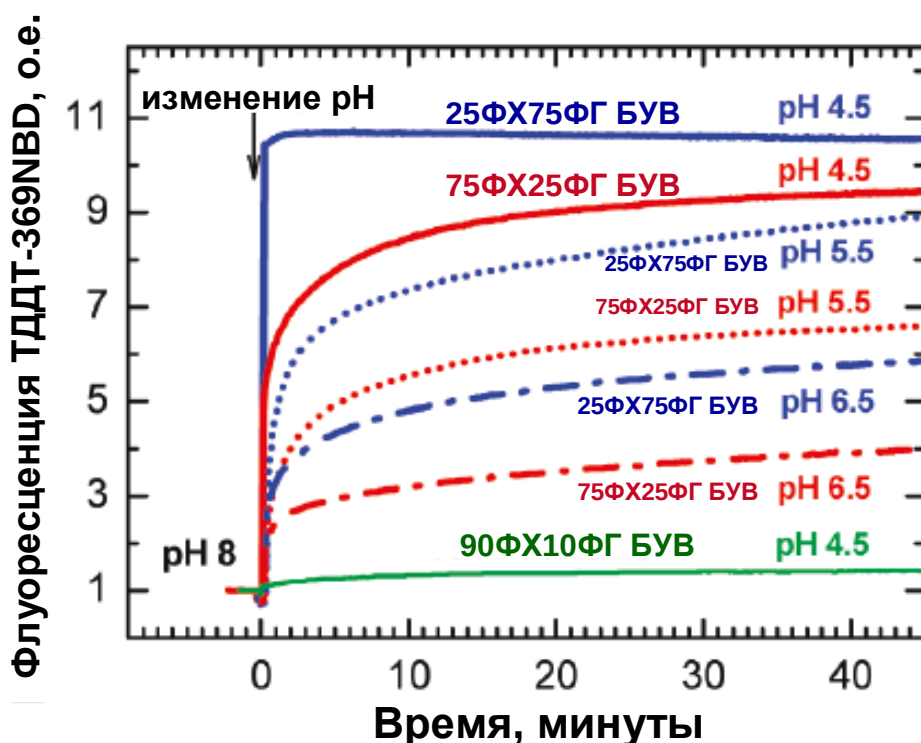


Рис. 1.20. Зависимости интенсивности флуоресценции конъюгата ТДДТ-369-NBD от времени при его встраивании в липидные мембраны с различным содержанием анионного липида при различных pH.

Было установлено, что pH-зависимое встраивание ТДДТ в мембрану (рис. 1.20) происходит достаточно быстро при условии высокого содержания в ней заряженного липида (25ФХ:75ФГ) при низких значениях pH (~4,5). В то же время, встраивание в мембрану происходит медленно при более высоких значениях pH (~5,5-6,5), а также при низких значениях pH в случае мембран с малым содержанием заряженного липида (75ФХ:25ФГ).

Факт более медленного встраивания указывает на существование pH-зависимого интермедиата встраивания, стабилизированного на поверхности бислоя при высоких pH, а также в случае мембран с малым содержанием анионного липида.

Кинетические данные для встраивания конъюгата ТДДТ-NBD в липидные мембраны аппроксимировалась уравнением:

$$F_T(t) = A_0 + A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t}) \quad 1.11$$

Здесь A_i – амплитуды соответствующих кинетических компонент с кинетическими константами k_i (A_0 соответствует неопределённо быстрой компоненте с корреляционным временем короче времени смешения растворов протеина и везикул (~ 10 с), т.е. $k_0 > 0,1 \text{ с}^{-1}$).

Для однокомпонентной и двухкомпонентной, аппроксимации дополнительные амплитуды принимались равными нулю, $A_0=A_2=0$ и $A_0=0$, соответственно.

Сумма амплитуд $A_0 + A_1 + A_2$ соответствуют доле протеина (F_B), способного к встраиванию.

Пример применения различных вариантов аппроксимации (однокомпонентной и двухкомпонентной) для встраивания ТДДТ в мембрану 75ФХ:25ФГ при pH 4,5 приведен на рис. 1.21, панель А. Моноэкспоненциальная зависимость с двумя варьируемыми параметрами (рис. 1.21, штриховая линия) плохо описывает экспериментальную кинетическую кривую: величина коэффициента корреляции является низкой ($R=0,56$). Двухэкспоненциальная зависимость с четырьмя изменяющимися параметрами (рис. 1.21, точечная линия) описывает экспериментальную зависимость лучше: $R=0,98$. Наилучшим образом экспериментальная кривая аппроксимируется при помощи двухэкспоненциальной зависимости с пятью варьируемыми параметрами (рис. 1.21, сплошная чёрная линия): $R=0,99$. Константы скорости второй и третьей кинетических компонент для встраивания ТДДТ в мембрану 75ФХ:25ФГ при pH 4,5 (рис. 1.21) оказались $0,9 \cdot 10^{-2}$ и $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$, соответственно (табл. 1.4).

Наличие медленной компоненты встраивания ($\sim 10^{-3}$) указывает на существование интермедиата встраивания ТДДТ в липидную мембрану.

Аналогичные аппроксимации были получены и для встраивания ТДДТ в мембраны с различным липидным составом при различных рН (табл. 1.4).

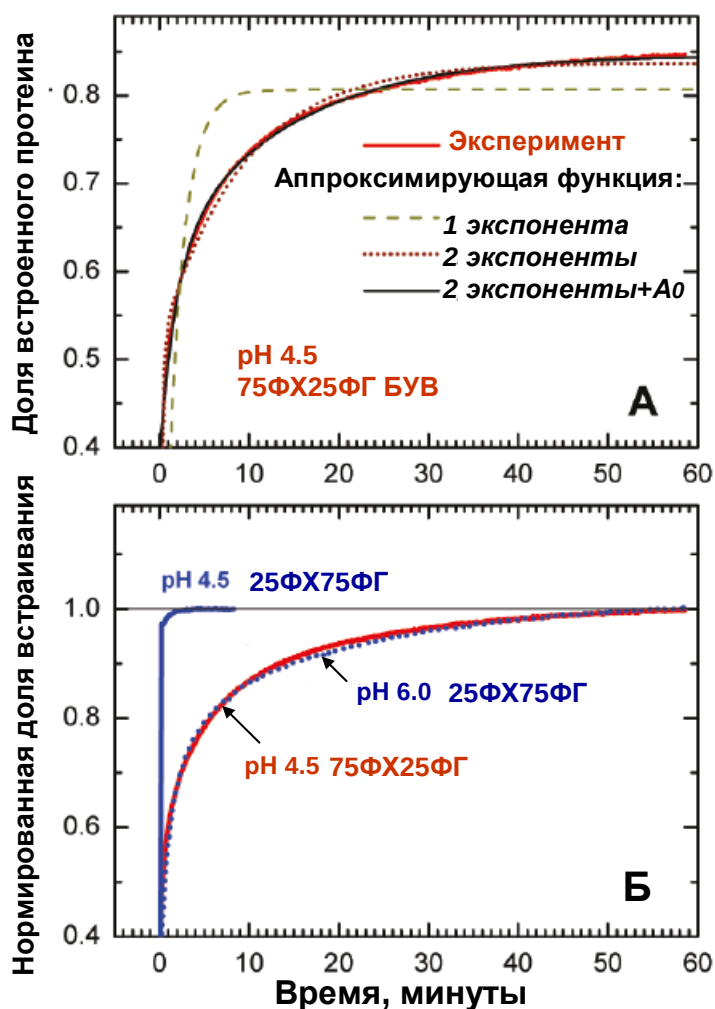


Рис. 1.21. Анализ кинетических кривых встраивания ТДДТ-369-NBD в липидные мембраны (БУВ) с различным содержанием анионного липида при различных рН: (А) встраивание ТДДТ-369-NBD в мембраны 75ФХ:25РС (сплошная серая линия) и аппроксимирующие (формула 1.11) кривые (одноэкспоненциальная – штриховая линия, двухэкспоненциальная – точечная линия, двухэкспоненциальная с параметром A_0 – сплошная черная линия), (Б) кинетические кривые встраивания ТДДТ в липидные мембраны с различным липидным составом (25ФХ:75ФГ или 75ФХ:25ФГ). Приведенные

кинетические зависимости встраивания нормированы на конечный уровень встраивания.

Влияние рН и липидного состава на скорость встраивания ТДТ показано на рисунке 1.21, панель Б. Снижение мольной доли анионного липида с 75% до 25% при рН 4,5 приводит к существенному замедлению встраивания. Интересно, что повышение рН с 4,5 до 6,0 для мембран 25ФХ:75ФГ (пунктирная линия) приводит к очень похожему кинетическому эффекту. С учётом того, что концентрация ионов H^+ вблизи мембран, содержащих отрицательно заряженные липиды, выше, чем их концентрация в объёме водной фазы вдали от мембран [124], отмеченное сходство кинетических эффектов при повышении рН и при снижении мольной доли анионного липида в мембране указывает на то, что встраивание интермедиата происходит в результате его протонирования на поверхности липидной мембраны.

Таблица 1.4

Кинетические характеристики встраивания ТДТ в липидные мембраны.

Липидный состав	рН	A_0	A_1	k_1	A_2	k_2	$F_B = A_0 + A_1 + A_2$
25ФХ:75ФГ	6,5	0,17	0,13	$0,7 \times 10^{-2}$	0,21	$0,7 \times 10^{-3}$	0,51
	6,0	0,19	0,36	$1,8 \times 10^{-2}$	0,21	$1,1 \times 10^{-3}$	0,76
	5,5	0,20	0,36	$1,4 \times 10^{-2}$	0,34	$0,5 \times 10^{-3}$	0,90
	4,5	0,96	0,04	$1,8 \times 10^{-2}$	0,00		1,00
75ФХ:25ФГ	6,5	0,07	0,06	$1,0 \times 10^{-2}$	0,13	$0,5 \times 10^{-3}$	0,26
	5,5	0,11	0,23	$1,3 \times 10^{-2}$	0,24	$1,2 \times 10^{-3}$	0,58
	4,5	0,42	0,22	$0,9 \times 10^{-2}$	0,23	$1,2 \times 10^{-3}$	0,87

Полученные кинетические данные кривых позволяют оценить не только скорость встраивания, но и более точно определить степень встраивания. Сумма коэффициентов $A_0 + A_1 + A_2$, соответствующая доле способной к встраиванию формы протеина (F_B), использовалась для оценки степени максимального встраивания ТДДТ в мембраны различного липидного состава в зависимости от рН (рис. 1.22). Концентрации измеряемых образцов и условия проведения измерений были одинаковыми для всей экспериментальной серии.

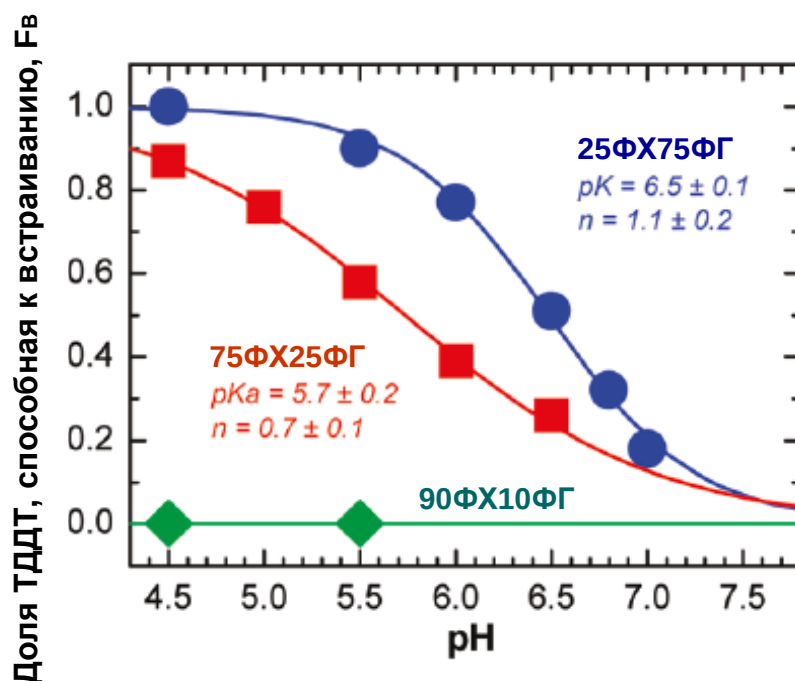


Рис. 1.22. Зависимость доли ТДДТ (F_B), способной к встраиванию в мембрану, от pH. Мембраны с различным содержанием анионного липида: 75ФХ:25ФГ (квадраты), 25ФХ:75ФГ (кружки), 90ФХ:10ФГ (ромбы).

Согласно полученным данным (рис. 1.22), степень максимального встраивания, возрастает со снижением pH и с увеличением доли анионного липида в составе мембран (см. данные для мембран состава 75ФХ:25ФГ и 25ФХ:75ФГ). Напротив, в случае мембран 90ФХ:10ФГ с низким содержанием анионного липида ФГ, встраивания в мембрану не наблюдалось. Вывод об отсутствии встраивания ТДДТ в мембраны

90ФХ:10ФГ хорошо согласуется с результатами исследования мембранной топологии ТДДТ, описанными в разделе 1.2.

Исследования зависимости кинетики процесса встраивания ТДДТ в липидные мембраны от рН и липидного состава мембран были проведены впервые.

Таким образом, методом, основанным на измерении динамики изменения интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении, установлено, что рН-зависимое встраивание транслокационного домена дифтерийного токсина в липидные мембраны происходит быстро (< 2 минут) в случае мембран с большим содержанием анионного липида при низких значениях рН ($\sim 4,5$). В то же время, встраивание ТДДТ в мембраны происходит медленно (десятки минут) при более высоких значениях рН ($\sim 6,0$), а также при низких значениях рН в случае мембран с малым содержанием анионного липида. Наличие более медленного встраивания было объяснено существованием рН-зависимого интермедиата встраивания, стабилизированного на поверхности бислоя при высоких рН или наличии мембран с малым содержанием анионного липида.

1.5. Механизм рН-зависимого взаимодействия транслокационного домена дифтерийного токсина с липидными мембранами

Выяснение механизма рН-зависимого взаимодействия Т-домена дифтерийного токсина с липидными мембранами проводилось при помощи комбинации двух методов: метода оценки доли мембранно-компетентной формы рН-встраиваемых протеинов, использующего Фёрстеровский резонансный перенос энергии (разд. 1.3, рис. 1.18, панель А), и метода измерения динамики изменения интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении меченного флуорофором NBD протеина при его

встраивании в мембрану (разд. 1.4, рис. 1.21, панель Б) [89,128]. Установлено, что рН-зависимое связывание ТДДТ с липидными мембранами (рис. 1.23, панель А) происходит быстро, а соответствующее рН-зависимое встраивание ТДДТ в мембраны – достаточно медленно (особенно при высоких рН (~ 5,5; 6,5), а также для мембран с меньшим содержанием заряженного липида, т.е. 75ФХ:25ФГ).

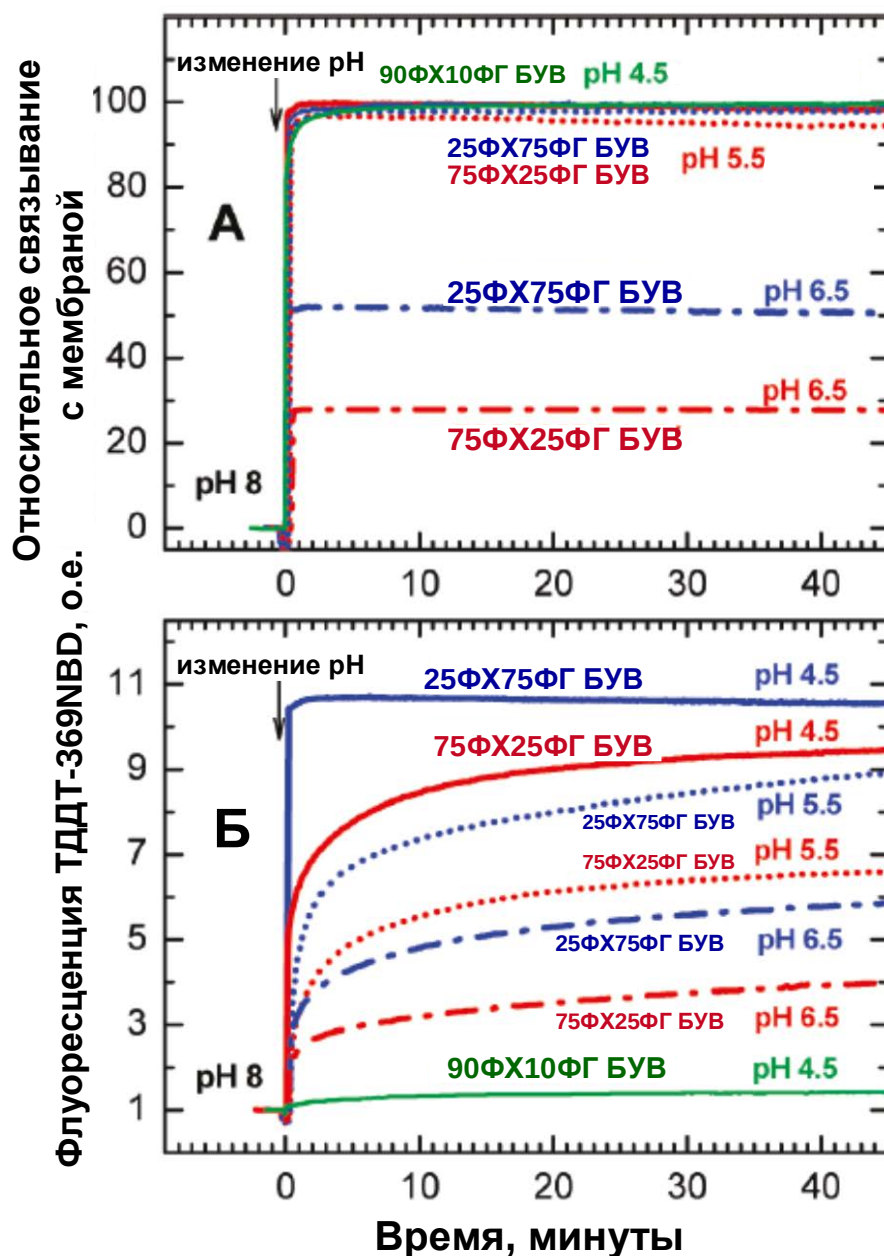


Рис. 1.23. Кинетика мембранного связывания (А) и встраивания (Б) транслокационного домена дифтерийного токсина в мембраны различного липидного состава.

Такое наличие быстрого связывания и медленного встраивания указывает на существование рН-зависимого интермедиата встраивания, стабилизированного при высоких рН или малом содержании анионного липида.

На существование интермедиата встраивания также указывает наличие медленной компоненты встраивания ($\sim 10^{-3}$) при аппроксимации кинетических кривых мембранного встраивания ТДДТ (см. раздел 1.4: рис. 1.21; табл. 1.4).

В случае мембран с наименьшим содержанием заряженного липида, т.е. 90ФХ:10ФГ БУВ, регистрировалось связывание ТДДТ, но не наблюдалось его встраивания в мембраны (рис. 1.23): таким образом, происходила стабилизация интермедиата встраивания ТДДТ, локализованного на поверхности мембраны. Локализация ТДДТ на поверхности мембран 90ФХ:10ФГ была подтверждена при помощи метода исследования мембранной топологии протеинов, использующего тушение флуоресценции связанного с мембранами метки NBD при помощи тушителя флуоресценции LysoUB (раздел 1.2: табл. 1.3).

Принимая во внимание, что концентрация ионов H^+ вблизи мембраны, содержащей отрицательно заряженные липиды, выше, чем концентрация протонов в объёме раствора вдали от мембран [124], отсутствие зависимости связывания ТДДТ с мембранами от липидного состава мембран (рис. 1.23, панель А), а также отсутствие значительного сдвига кривой зависимости доли мембранно-компетентной формы ТДДТ от рН в случае мембран с большим содержанием заряженных липидов (см. результаты измерений при помощи флуоресцентной корреляционной спектроскопии, приведенные на рис. 1.8, раздел 1.1) указывают на то, что образование мембранно-компетентной формы ТДДТ происходит в растворе, а не на поверхности мембран. В тоже время, увеличение доли ТДДТ, способного к встраиванию в мембрану, с увеличением содержания анионного липида (раздел 1.4: рис.

1.22) свидетельствует о том, что протонирование ТДДТ с образованием формы, способной к встраиванию в мембрану, происходит на поверхности мембраны.

Согласно рис. 1.23, встраивание ТДДТ в мембраны начинается еще до достижения его полного связывания с ними (см. кинетики связывания и встраивания для рН 6,5).

Обобщение вышеупомянутых результатов, полученных при помощи различных методов, использующих измерение флуоресценции, позволяет предложить механизм рН-зависимого взаимодействия ТДДТ с липидными мембранами (рис. 1.24), который предполагает наличие двух процессов: (а) образования формы ТДДТ, способной к связыванию с липидными мембранами (V^+ -форма, рис. 1.24) и (б) образования формы ТДДТ, способной к встраиванию в мембраны (I^+ -форма, рис. 1.24).

Начальное протонирование, приводящее к образованию мембранно-компетентной формы V^+ , происходит вдали от поверхности мембран и не зависит от свойств липидного бислоя (см. раздел 1.1, рис. 1.8). В присутствии липидных мембран V^+ быстро связывается с ними, образуя на поверхности мембраны интермедиат встраивания – И-форму (рис. 1.23, панель А).

Последующему встраиванию способствует наличие в составе мембраны анионного липида (рис. 1.23, панель Б), который содействует образованию I^+ -формы (раздел 1.4: рис. 1.22) и ускоряет переход в трансмембранную Т-форму (раздел 1.4: рис. 1.21, панель Б). Две стадии протонирования ТДДТ (т.е. $V \rightarrow V^+$ и $I \rightarrow I^+$) имеют перекрывающиеся интервалы рН: таким образом, существуют такие значения рН, при которых реализуются обе стадии протонирования: ($I \rightarrow I^+$) и ($V \rightarrow V^+$).

***pH-зависимое встраивание T-домена
дифтерийного токсина в липидные мембраны***

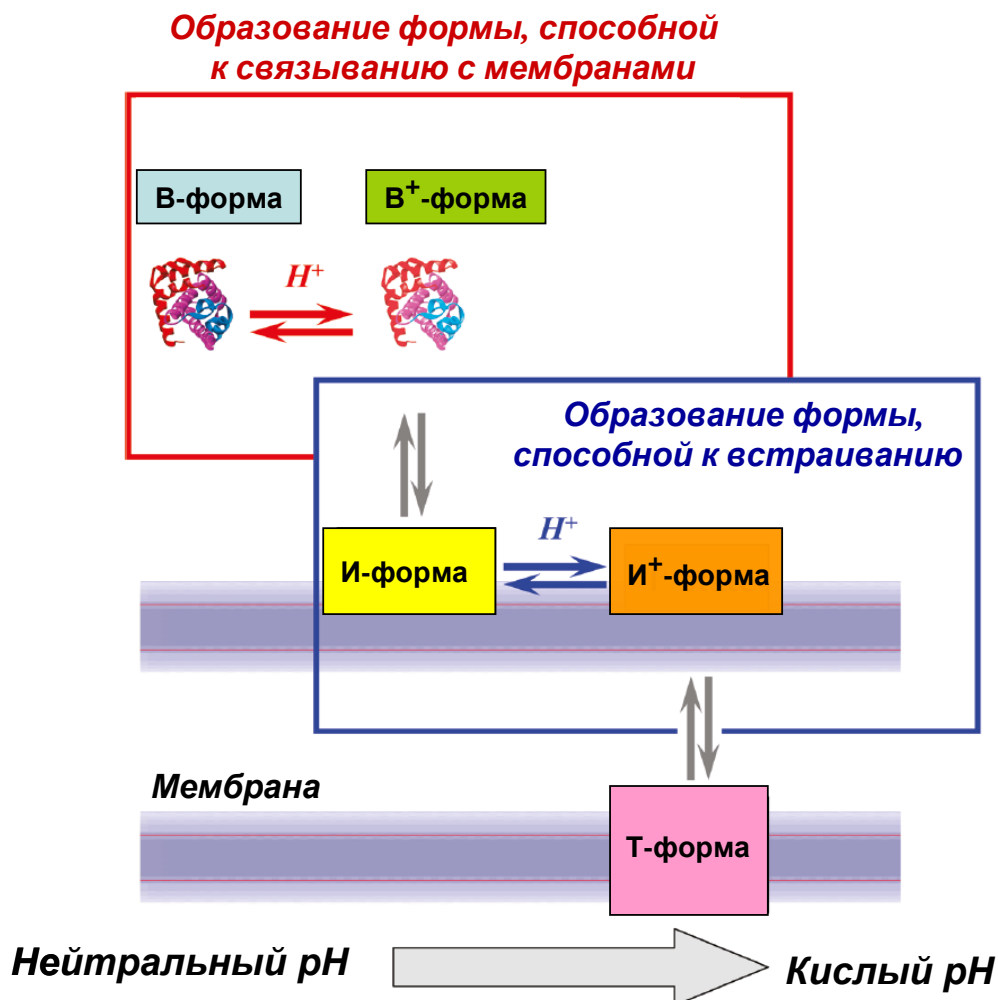


Рис. 1.24. Схема pH-зависимого встраивания транслокационного домена дифтерийного токсина (ТДДТ) в липидные мембраны. Формы ТДДТ: В-форма протеина в водном растворе; В⁺- мембранно-компетентная форма протеина; И – непротонированный интермедиат встраивания на поверхности мембраны; И⁺ – протонированный интермедиат встраивания на поверхности мембраны, способный к переходу в трансмембранную форму; Т – трансмембранная (т.е. встроенная в бислой) форма.

Возможными причинами перекрывания интервалов pH для обсуждаемых стадий протонирования могут быть: (а) более высокая концентрация протонов вблизи мембран, содержащих анионный липид, по

сравнению с концентрацией протонов в объёме раствора вдали от мембран [124], (б) возможное изменение pK_a негативно заряженных аминокислотных остатков (предположительно E349 и D352), обусловленное рефолдингом протеина, происходящим на поверхности липидного бислоя [31,80,136-139].

Таким образом, комплексное применение Фёрстеровского резонансного переноса энергии и измерений динамики изменения интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении позволило выявить две стадии pH-зависимого взаимодействия транслокационного домена дифтерийного токсина (ТДДТ) с липидными мембранами, а именно: быстрое pH-зависимое связывание с мембранами и медленное pH-зависимое встраивание в мембраны, а также впервые установить, что эти стадии не следуют одна за другой: встраивание ТДДТ в мембраны начинается еще до достижения его полного связывания с ними.

РАЗДЕЛ 2. ТЕРМОДИНАМИКА МЕМБРАННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕМБРАННЫХ ПРОТЕИНОВ И ГИДРОФОБНЫХ ТРАНСМЕМБРАННЫХ ПЕПТИДОВ

Знание энергетики протеин-липидного взаимодействия мембранных протеинов является важным для предсказания условий, при которых такие протеины находятся в мембране в наиболее стабильном состоянии и, в целом, для предсказания структуры таких протеинов в липидном бислое исходя из знаний о последовательности их аминокислотных остатков [31,47,48,86,87,140-150].

Большинство экспериментальных методов оценки термодинамики протеин-липидного взаимодействия, разработанных для случая водорастворимых протеинов [79,151-153], оказываются неприменимыми в случае малорастворимых мембранных протеинов, особенно для конститутивных мембранных протеинов, встраивающихся в липидные мембраны при помощи сложных мультипротеиновых ансамблей (транслокона) [83-85]. По этой причине в литературе предлагается производить оценку энергетики взаимодействий мембранных протеинов с липидными мембранами на основании имеющихся шкал гидрофобности аминокислотных остатков [31,47,48,154-159]. Среди упомянутых шкал гидрофобности имеются, как основанные на результатах теоретических расчётов [154-157], так и полученные путём экспериментального исследования мембранных взаимодействий различных наборов коротких водорастворимых модельных пептидов [31,47,48,158,159].

В отличие от большинства шкал гидрофобности аминокислотных остатков, основанных на учёте мембранных взаимодействий только боковых цепей аминокислотных остатков, экспериментальные шкалы Вимли-Вайта [31,47] дополнительно учитывают вклад мембранных взаимодействий

цепочки пептидных связей и, по этой причине, считаются наиболее точными [47,48].

Известны две шкалы гидрофобности аминокислотных остатков по Вимли-Вайту [31,47] (рис. 2.1): (1) шкала взаимодействия пептида с поверхностью мембраны (WW “interfacial scale”), представляющая значение изменения свободной энергии (ΔG_{WIF}) для каждого из аминокислотных остатков пептида при его переходе из водной фазы на поверхность липидной мембраны, построенной из цвитерионного липида из фосфатидилхолина; (2) октанольная шкала (WW “octanol scale”), представляющая значение изменения свободной энергии (ΔG_{WOCT}) для каждого из аминокислотных остатков пептида при его переходе из водной фазы в октанольную. Разность значений ΔG_{WOCT} и ΔG_{WIF} позволяет оценить свободную энергию встраивания в липидный бислой ($\Delta G_{INSERTION}$, рис. 2.1) для каждого из аминокислотных остатков пептида.

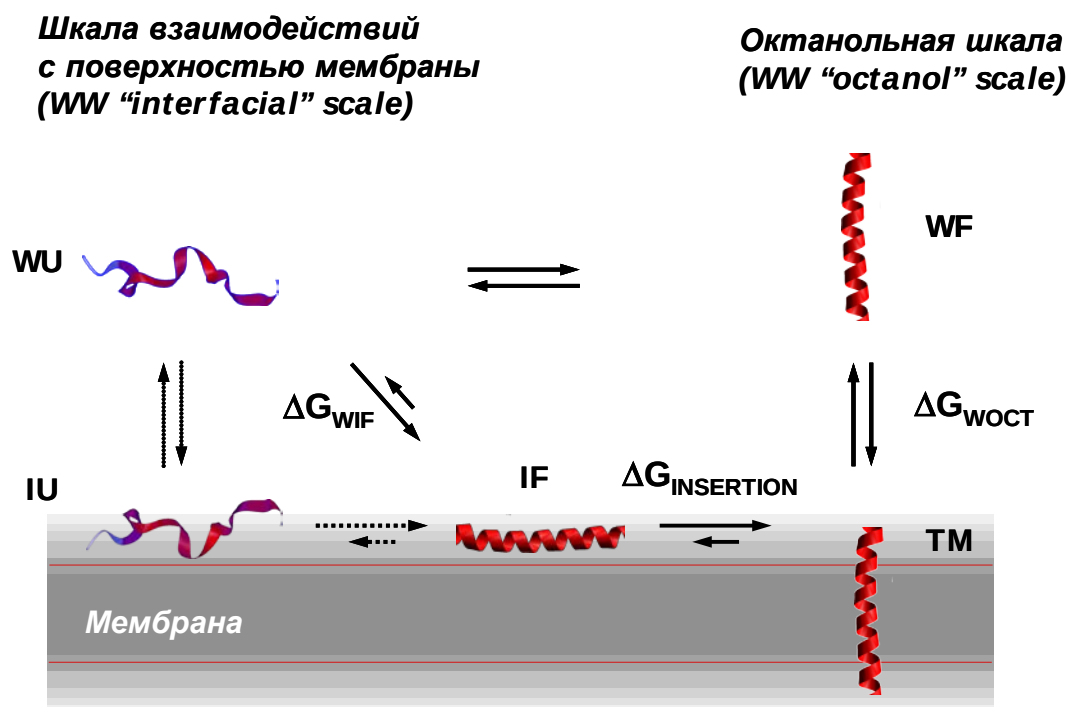


Рис. 2.1. Термодинамическая схема взаимодействия модельного пептида с мембраной [33,48]. Обозначения: WU – развёрнутая форма пептида в воде; IU – развёрнутая форма пептида на поверхности мембраны; IF – интермедиат

встраивания на поверхности бислоя, находящийся в α -спиральной конформации; WF – находящаяся в α -спиральной конформации форма пептида в воде, TM – трансмембранная форма пептида (встроенная в бислой форма пептида, находящаяся в α -спиральной конформации).

Обе шкалы гидрофобности Вимли-Вайта задействованы в качестве экспериментальных параметров при разработке компьютерной программы MPEx [160], предназначенной для предсказания термодинамики мембранных взаимодействий и выявления трансмембранных фрагментов (фрагментов, встраивающихся в липидную мембрану) мембранных протеинов.

Использование модельных пептидов оказалось очень успешным при исследовании термодинамики связывания с липидной мембраной [32-34,160] и фолдинга на поверхности липидного бислоя [30,33,35,36], однако моделирование встраивания в липидную мембрану оказалось не столь удачным: например, исследование пептидов TMX [80,161], синтезированных в качестве моделей pH-встраиваемых мембранных протеинов (аннекина B12, транслокационного домена дифтерийного токсина) показало, что наиболее термодинамически стабильным состоянием таких пептидов является состояние, в котором они имеют α -спиральную структуру и расположены на поверхности липидного бислоя. Трансмембранное встраивание этих пептидов в липидный бислой не может быть достигнуто даже при использовании наиболее гидрофобных из них, т.к. при этом они начинают агрегировать и выпадать в осадок из водного раствора [80,161]. В результате, авторам [80,161] не удалось успешно промоделировать мембранные взаимодействия pH-встраиваемых мембранных протеинов при помощи более простых модельных пептидов TMX. Следовательно, не могут быть более или менее адекватно определены многие термодинамические параметры, знание которых является важным для выявления способных к встраиванию в липидную мембрану фрагментов протеина, например, не может быть

оценено изменение свободной энергии при переходе цепочки пептидных связей пептида/протеина, находящегося в α -спиральной конформации, из водной среды в липидную мембрану, несомненно вносящей в эти взаимодействия большой вклад наряду с аминокислотными заместителями, присоединёнными к ней [47,48].

Таким образом, для уточнения и выяснения границ применимости шкал гидрофобности Вимли-Вайта необходимы данные по термодинамике взаимодействия с липидными мембранами для более сложных систем: - например, для протеинов, спонтанно встраивающихся в липидный бислой.

Кроме одной публикации, описывающей очень приблизительную оценку свободной энергии мембранного связывания ТДДТ, проведенную в условиях осложняющих получение адекватных результатов, а именно, при значительной агрегации и осаждения этого протеина [43], в литературе отсутствуют сведения о термодинамике мембранных взаимодействий мембранных протеинов, в частности, нет данных о свободной энергии мембранного связывания аннексина B12, биологической функцией которого является инициирование клеточных реакций в ответ на изменения внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} [56-59], обеспечение связи между внутриклеточным уровнем Ca^{2+} и протеканием некоторых клеточных биологических процессов с участием клеточных мембран [56-59].

В работе [48] показано, что оценка термодинамики мембранных взаимодействий и выявление трансмембранных фрагментов при помощи компьютерной программы MPEx [160], использующей в качестве параметров шкалы гидрофобности Вимли-Вайта, в значительной степени зависит от адекватности оценки вклада мембранных взаимодействий для цепочки пептидных связей. Значения изменений свободной энергии $\Delta G_{\text{wост}}$, представленные в октанольной шкале Вимли-Вайта, были экспериментально получены при исследовании энергетики перехода пептида, имеющего структуру неупорядоченного клубка (т.е. не находящегося в α -спиральной

конформации), из водной среды в октанольную [47]. Авторами обсуждаемых шкал гидрофобности [47] на основании теоретических работ [162,163] было виднунто предположение, что изменение свободной энергии ΔG_{CONH} в расчёте на один аминокислотный остаток для цепочек пептидных связей в случае перехода пептида, имеющего структуру неупорядоченного клубка, из водной среды в октанольную, удовлетворительно совпадает с соответствующим значением для пептида, находящегося в α -спиральной конформации.

Поскольку такое допущение потенциально может приводить к неточностям в анализе термодинамики взаимодействий пептид-мембрана, авторами [164] было оценено рассчитанное на один аминокислотный остаток различие $\Delta\Delta G_{\text{CONH}}$ между вкладом в значения октанольной шкалы мембранных взаимодействий цепочек пептидных связей, находящихся в α -спиральной конформации, и соответствующим вкладом цепочек пептидных связей, находящихся в конформации неупорядоченного клубка.

Величина упомянутого различия ($\Delta\Delta G_{\text{CONH}}$) использовалась авторами [164] как варьируемый параметр при оптимизации в ходе статистического анализа количества совпадений для прогнозов, сделанных при помощи компьютерной программы MPEx [160] для известных трансмембранных фрагментов протеинов [165]: было показано, что значение $\Delta\Delta G_{\text{CONH}}$ с 98% вероятностью находится в пределах $+0,05 \div -0,1$ ккал/моль.

Следует отметить, что примеры экспериментальной оценки $\Delta\Delta G_{\text{CONH}}$ в литературе не обнаружены.

Гидрофобные трансмембранные WALP-пептиды (пептиды, имеющие в своём составе триптофановые, лейциновые и аланиновые аминокислотные остатки) в липидной мембране имеют структуру мономерной трансмембранной спирали, что делает их удобной моделью для экспериментального нахождения изменения свободной энергии при переходе пептида / протеина в α -спиральной конформации из водной среды

в липидную мембрану, а значит и для оценки $\Delta\Delta G_{\text{CONH}}$. До настоящего момента экспериментальная оценка свободной энергии встраивания гидрофобных трансмембранных WALP-пептидов в липидные мембраны произведена не была, так как агрегация этих пептидов вне липидного бислоя делает такую оценку практически невозможной [166,167].

Представленное диссертационное исследование имеет своей целью, с одной стороны, восполнить вышеупомянутое отсутствие сведений о свободной энергии мембранного связывания модельного мембранного протеина аннексина B12 и данных о свободной энергии мембранного встраивания гидрофобных трансмембранных пептидов различной длины (WALP23 и WALP27); с другой стороны, критически пересмотреть и скорректировать имеющиеся в литературе сведения о свободной энергии мембранного связывания транслокационного домена дифтерийного токсина, полученные в условиях агрегации и осаждения этого протеина.

Сведения о термодинамике мембранных взаимодействий мембранных протеинов и гидрофобных трансмембранных пептидов можно будет в дальнейшем использовать для проверки и уточнения шкал Вимли-Вайта – экспериментальных шкал гидрофобности аминокислотных остатков пептидов и протеинов.

2.1. Оценка свободной энергии мембранного связывания модельного мембранного протеина аннексина B12.

Нами была впервые проведена оценка ΔG мембранного связывания для аннексина B12 при помощи флуоресцентной корреляционной спектроскопии [88,168], основанная на определении доли связанного с мембраной протеина в зависимости от концентрации липида (рис. 2.2,2.3).

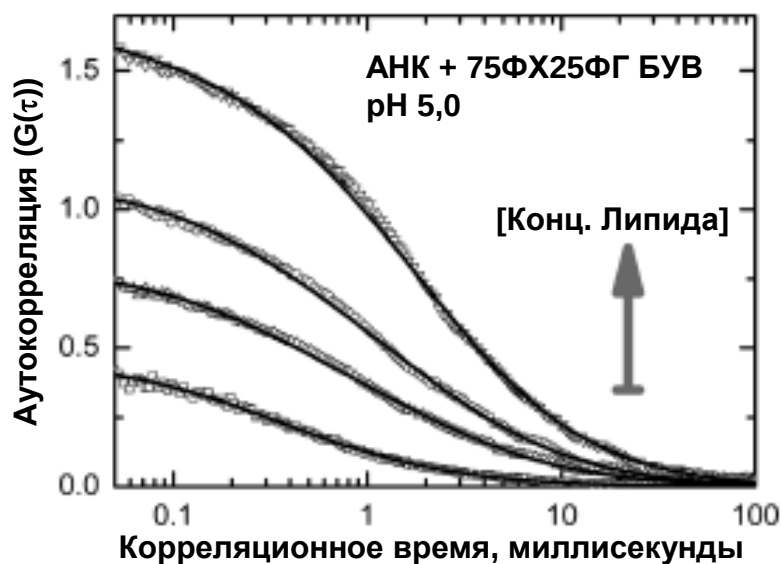


Рис. 2.2. Аутокорреляционные кривые, полученные при титровании аннексина Б12 липидными мембранами (75ФХ:25ФГ) при отсутствии значительного ($\geq 10^4$) избытка липида (т.е. когда среднее число молекул АНК, связавшихся с липидной везикулой > 1): символы – экспериментальные кривые, линии – результат аппроксимации с помощью уравнения 1.2 (см. раздел 1.1).

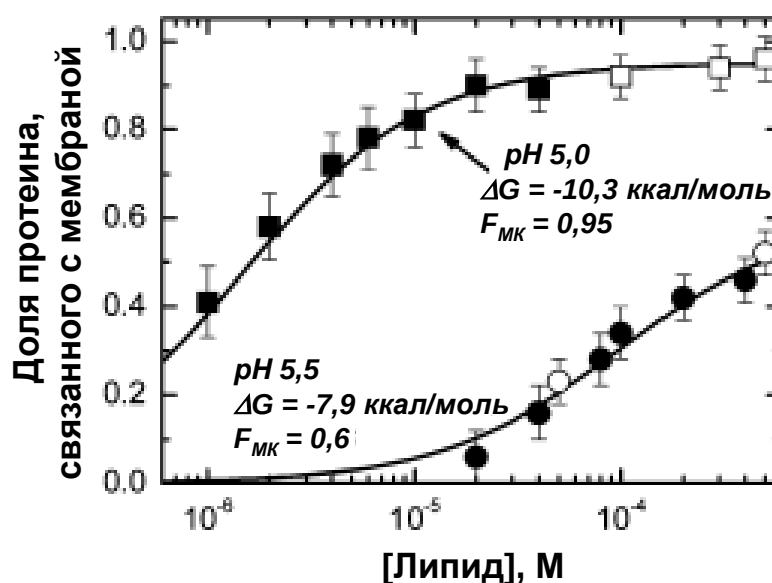


Рис. 2.3. Изотермы связывания аннексина Б12 с липидными мембранами (75ФХ:25ФГ) при pH 5.5 (кружки) и pH 5 (квадраты), 293° К. Данные,

представленные заполненными символами, получены при использовании уравнения 2.1, соответствующего титрованию при отсутствии значительного избытка липида. Данные, представленные открытыми символами, получены при использовании уравнения 1.4, соответствующего титрованию при значительном избытке липида. Линии представляют аппроксимацию полученных результатов при помощи формулы 2.2.

Корреляционные кривые, представленные на рис. 2.2, были получены для образцов, содержащих 1 нМ АНК либо без везикул, либо в присутствии мембран с общей концентрацией липида 1, 2 и 4 мкМ (рис. 2.2: снизу-вверх): увеличение концентрации липида приводит к увеличению амплитуд аутокорреляционных кривых. Амплитуда аутокорреляции, обратнопропорциональная среднему числу частиц в фокальном объёме (см. раздел 1.1: формулы 1.2,1.3), возрастает с увеличением концентрации липида: при низких концентрациях липида одна липидная везикула связывается более чем с одной молекулой АНК, меченной флуорофором, и, таким образом, общее число флуоресцирующих частиц, диффундирующих через фокальный объём уменьшается.

Вследствие отсутствия значительного молярного избытка липида (избыток липида $<10^4$) в начальных точках титрования АНК липидными мембранами (рис. 2.2), каждая из липидных мембран, связанных с меченным протеином, может содержать несколько молекул протеина, что делает невозможным применение формулы 1.4 (см. раздел 1.1). При отсутствии значительного избытка липида фракция мембранно-связанного протеина определяется по формуле [104]:

$$\frac{[P]_M}{[P]_{\text{общ}}} = 1 - A_P \cdot N \quad (2.1)$$

где $[П]_м$ и $[П]_{общ}$ – молярная концентрация мембранно-связанного протеина и общая молярная концентрация протеина, соответственно; параметр $A_п$ определялся по уравнению 1.3; N – количество меченных флуорофором молекул протеина в малом объёме, в котором производится регистрация флуктуаций интенсивности флуоресценции. Значение N определяется в ходе ФКС-измерения образца, содержащего меченный флуорофором протеин при отсутствии мембран (концентрация протеина в образце без мембран и в образцах, содержащих липидные мембраны, должна быть одинаковой).

Следует отметить, что применение формулы 2.1 для оценки мембранного связывания АНК является возможным вследствие отсутствия агрегации и осаждения АНК при низких рН в отсутствие мембран [46,56,57,88].

В условиях значительного мольного избытка липида ($\geq 10^4$), когда каждая из липидных мембран, связанных с меченым протеином, содержит только одну молекулу протеина, фракция мембранно-связанного протеина, определялась по уравнению 1.4.

Зависимость доли связанного с мембраной протеина от концентрации липида (рис. 2.3) аппроксимировалась при помощи уравнения, являющегося модификацией уравнения для коэффициента межфазного распределения протеина [35,79] и учитывающего наличие определённой фракции молекул протеина, находящейся в форме не способной к связыванию с мембранами:

$$\frac{[П]_M}{[П]_{общ}} = F_{МК} \cdot \frac{K_x \cdot [L]}{[W] + K_x \cdot [L]} \quad (2.2)$$

где $F_{МК}$ – доля мембранно-компетентной формы протеина оценивалась по формуле 1.4 как описано в разделе 1.1; $[L]$ – молярная концентрация липида; $[W]$ – концентрация воды (55,3 М); K_x – коэффициент межфазного распределения протеина ($K_x = ([П]_M / ([П]_M + [L])) / ([П]_w / ([П]_w + [W]))$), где $[П]_w$ – молярная концентрация протеина, находящегося в водной фазе).

Найденный по формуле 2.2 коэффициент межфазного распределения протеина (K_x) использовался для оценки свободной энергии связывания протеина с липидными мембранами:

$$\Delta G = -RT \cdot \ln K_x. \quad (2.3)$$

На рис. 2.4 показаны результаты оценки свободной энергии мембранного связывания для аннексина Б12 при его связывании с мембранами различного липидного состава при различных рН среды. Установлено, что в зависимости от липидного состава мембран или рН среды значения свободной энергии мембранного связывания для аннексина Б12 находятся в пределах $(-7,9 \div -11,8) \pm 0,2$ ккал/моль (рис. 2.4): например, $\Delta G = -7,9 \pm 0,2$ ккал/моль в случае мембран 75ФХ:25ФГ при рН = 5,5, и, $\Delta G = -11,8 \pm 0,2$ ккал/моль в случае мембран 25ФХ:75ФГ при рН = 5,0.

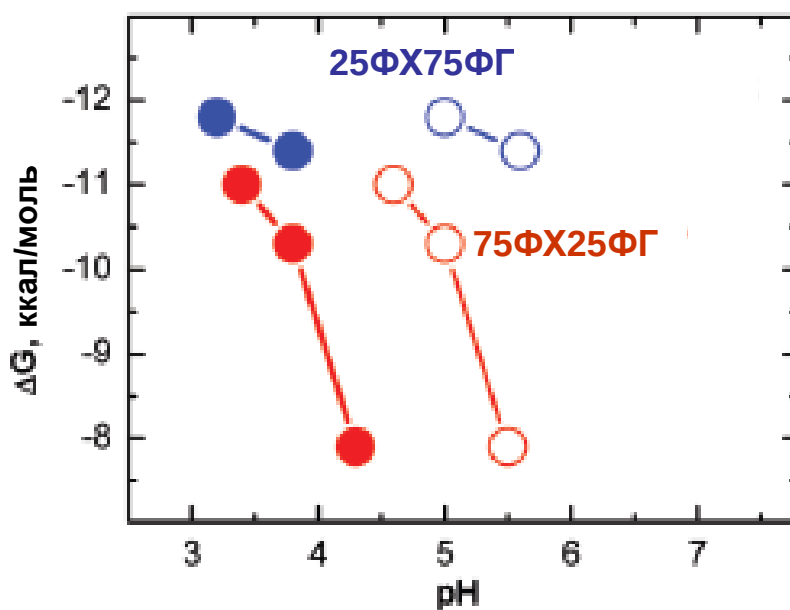


Рис. 2.4. Зависимость свободной энергии связывания аннексина Б12 с липидными мембранами (ΔG) от рН среды в случае мембран с преобладанием цвитерионного липида (75ФХ:25ФГ, соединённые линией верхние кружки) и в случае мембран с преобладанием анионного липида (25ФХ:75ФГ, соединённые линией нижние кружки). Результаты

представлены для рН в объёме раствора (открытые символы) и для рН вблизи мембран с различным электростатическим потенциалом поверхности (заполненные символы), см. формулу 1.6 (раздел 1.1).

Следует отметить, что большинство полученных значений свободной энергии мембранного связывания для аннексина B12 (рис. 2.4) по абсолютной величине превышают -10 ккал/моль, – предельное значение свободной энергии мембранного связывания пептидов/протеинов, которое может быть оценено экспериментально при помощи стационарной флуоресцентной спектроскопии [169].

Как следует из результатов проведения экспериментов, представленных на рисунке 2.4, свободная энергия связывания АНК с липидными мембранами (ΔG) зависит от рН среды. Для объяснения этого факта можно предположить наличие рН-зависимого рефолдинга (изменения структуры) мембранно-компетентной формы АНК, которая формируется у поверхности липидных мембран: в результате такого рефолдинга, происходящего при низких рН, сродство протеина к мембране возрастает.

Таким образом, флуоресцентная корреляционная спектроскопия впервые была использована нами для оценки свободной энергии мембранного связывания модельного мембранного протеина аннексина B12. Впервые была оценена свободная энергия связывания с липидными мембранами для аннексина B12, величина которой зависит как от липидного состава мембран, так и от рН среды: например, составляет $-7,9 \pm 0,2$ ккал/моль при связывании с мембранами 75ФХ:25ФГ при рН = 5,5 и $-11,8 \pm 0,2$ ккал/моль при связывании с мембранами 25ФХ:75ФГ при рН = 5,0.

Полученные данные по термодинамике взаимодействия аннексина B12 с липидными мембранами могут быть использованы для проверки и

уточнения шкал Вимли-Вайта - экспериментальных шкал гидрофобности аминокислотных остатков пептидов и протеинов.

2.2. Метод оценки свободной энергии протеин-липидного взаимодействия мембранных протеинов при низких pH с использованием фторированных поверхностно-активных веществ (ФПАВ)

Экспериментальное определение свободной энергии протеин-липидных взаимодействий мембранных протеинов затруднено агрегацией и осаждением мембранных протеинов, находящихся вне липидных мембран [47,48]. Применение фторированных поверхностно-активных веществ (ФПАВ) позволяет устранить упомянутые выше мешающие факторы (рис. 2.5) за счёт увеличения растворимости мембранных протеинов в водной среде [170-176].

В отличие от других поверхностно-активных веществ, ФПАВ не взаимодействуют с липидным бислоем и не нарушают его структуру благодаря плохой смешиваемости фторированных и нефторированных углеводородных цепочек [170-176]. Кроме того, ФПАВ, предотвращая агрегацию мембранных протеинов в водном растворе, сохраняют их функциональную структуру [171-174], и, таким образом, действие ФПАВ на мембранные протеины аналогично действию химических шаперонов [170,173,176].

Нами предложен метод оценки свободной энергии взаимодействия мембранных протеинов с липидными мембранами, комбинирующий шапероноподобное действие фторированных поверхностно-активных веществ (ФПАВ) и чувствительность флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС) [177,178].

А Фторированные поверхностно-активные вещества (ФПАВ)

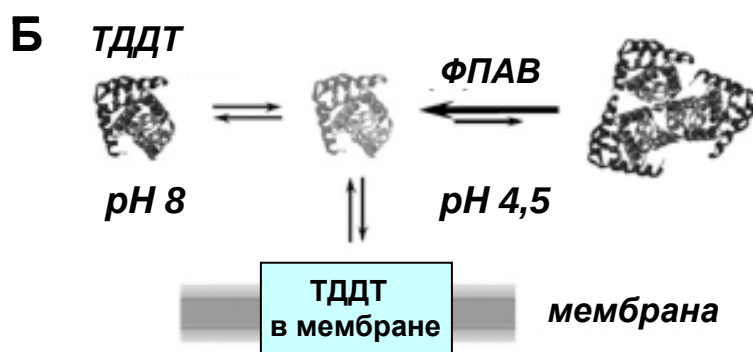
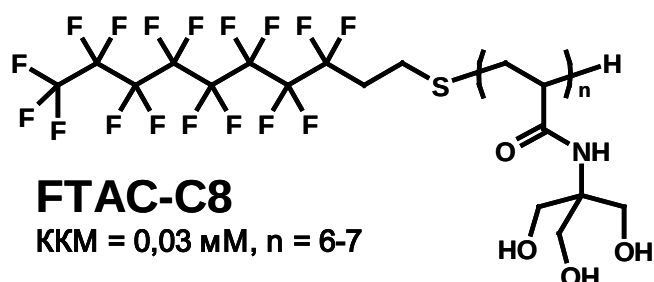
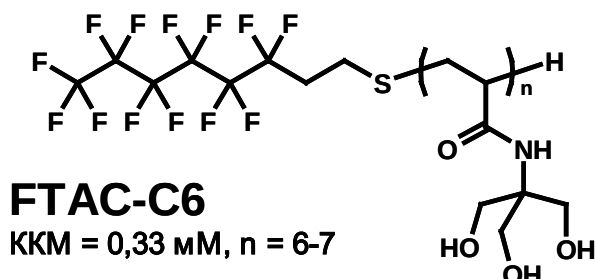
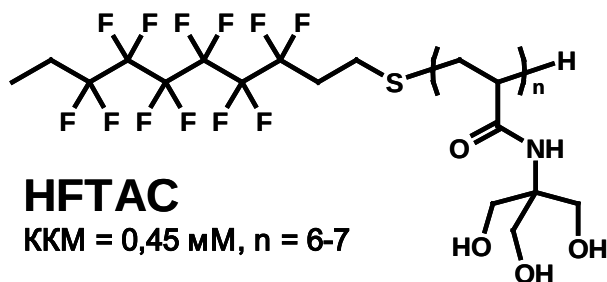


Рис. 2.5. (А) Структура молекул использованных в настоящей работе фторированных поверхностно-активных веществ (ФПАВ). ККМ – критическая концентрация мицеллообразования (Б) схематическое представление, каким образом ФПАВ предотвращают агрегацию Т-домена дифтерийного токсина в растворе при низких рН.

Для верификации метода использовался процесс связывания модельного мембранного протеина аннексина B12 с липидными мембранами в присутствии ФПАВ.

Выбор аннексина для верификации метода обусловлен его способностью к обратимому связыванию с липидными мембранами и отсутствием агрегации даже в мембранно-компетентной форме (при низких pH) [46,56,57,88]. Сопоставление ΔG мембранного связывания аннексина при наличии и при отсутствии ФПАВ (см. раздел 2.1), даёт однозначный ответ на вопрос об адекватности полученных результатов в условиях наличия в системе дополнительной компоненты – ФПАВ.

Необходимым условием для проведения оценки ΔG мембранного связывания протеинов является наличие обратимости изучаемого процесса. Обратимость мембранного связывания АНК была подтверждена результатами ФКС-измерений (рис. 2.6).

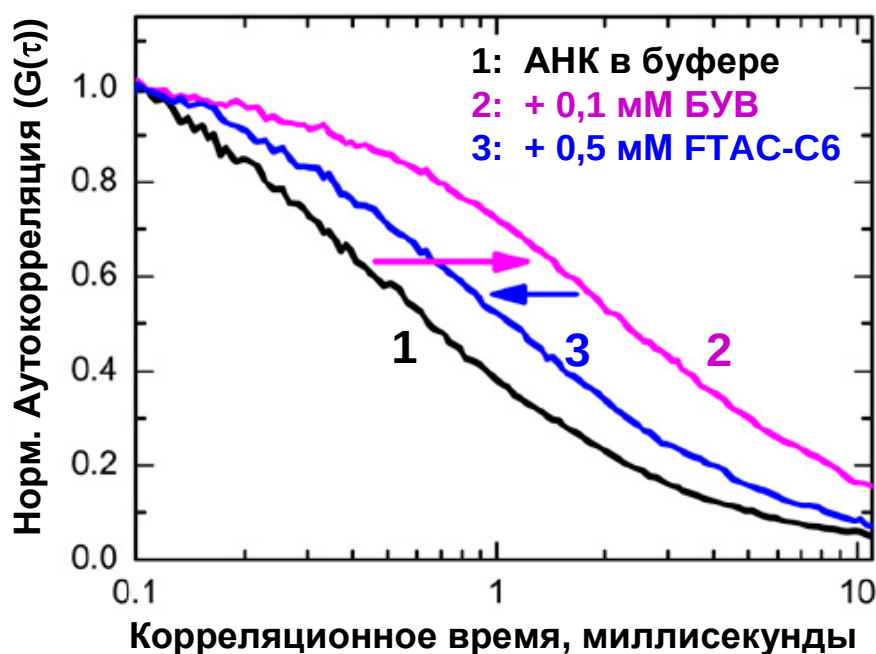


Рис. 2.6. Обратимость мембранного связывания АНК при добавлении ФПАВ, по данным флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Для ФКС-измерений использовался Q4С мутант АНК, меченный флуорофором (Alexa488 или Alexa647).

Поскольку мобильность свободного АНК в растворе намного выше, чем мобильность этого протеина, связанного с липидной мембраной, связывание АНК с мембраной приводит к сдвигу аутокорреляционной кривой в сторону больших корреляционных времён (стрелка слева направо). Добавка ФПАВ FTAC-C6 приводит к распределению АНК между липидными везикулами и ФПАВ, приводя к обратному сдвигу аутокорреляционной кривой (стрелка справа-налево). Таким образом, результаты ФКС-измерений, представленные на рис. 2.6, свидетельствуют об обратимости связывания АНК с липидными мембранами при добавлении ФПАВ FTAC-C6.

После того, как нами была установлена обратимость мембранного связывания (рис. 2.6), ФПАВ были применены для оценки ΔG мембранного связывания модельных мембранных протеинов аннексина B12 и транслокационного домена дифтерийного токсина: ФКС-измерения амплитуд и сдвигов аутокорреляционных кривых, а также обработка результатов (см. формулы 1.2-1.4, 2.1,2.2) были проведены аналогично описанным в предыдущих разделах 1.1 и 2.1. Полученные изотермы связывания АНК и ТДДТ с липидными мембранами при наличии ФПАВ представлены на рис. 2.7, соответствующие значения свободной энергии мембранного связывания АНК и ТДДТ были получены при помощи уравнения 2.3 (см. раздел 2.1).

Наличие ФПАВ приводит к снижению ΔG мембранного связывания АНК с -11,4 ккал/моль при отсутствии ФПАВ до -10,6 и -10,1 ккал/моль для 0,1 и 0,2 мМ, соответственно (см. рис. 2.7, панель А). В случае Т-домена дифтерийного токсина (ТДДТ) при отсутствии ФПАВ ΔG мембранного связывания составляет -8,8 ккал/моль (см. рис. 2.7, панель Б). Такое низкое значение ΔG мембранного связывания для ТДДТ по сравнению с соответствующим значением для АНК (-11,4 ккал/моль) объясняется агрегацией и осаждением ТДДТ при низких pH при отсутствии ФПАВ [179-

181]. Таким образом, величину $\Delta G = -8,8$ ккал/моль следует считать кажущейся свободной энергией мембранного связывания ТДДТ. Агрегация и осаждение ТДДТ могут быть предотвращены действием ФПАВ [171,179-181]. При наличии ФТАС-С6 доля молекул ТДДТ, связавшихся с липидными мембранами, возрастает, следовательно, согласно формулы 2.3 возрастает и значение свободной энергии мембранного связывания: $\Delta G = -11,4$ и $-10,7$ ккал/моль для 0,1 и 0,2 мМ, соответственно (см. рис. 2.7, панель Б).

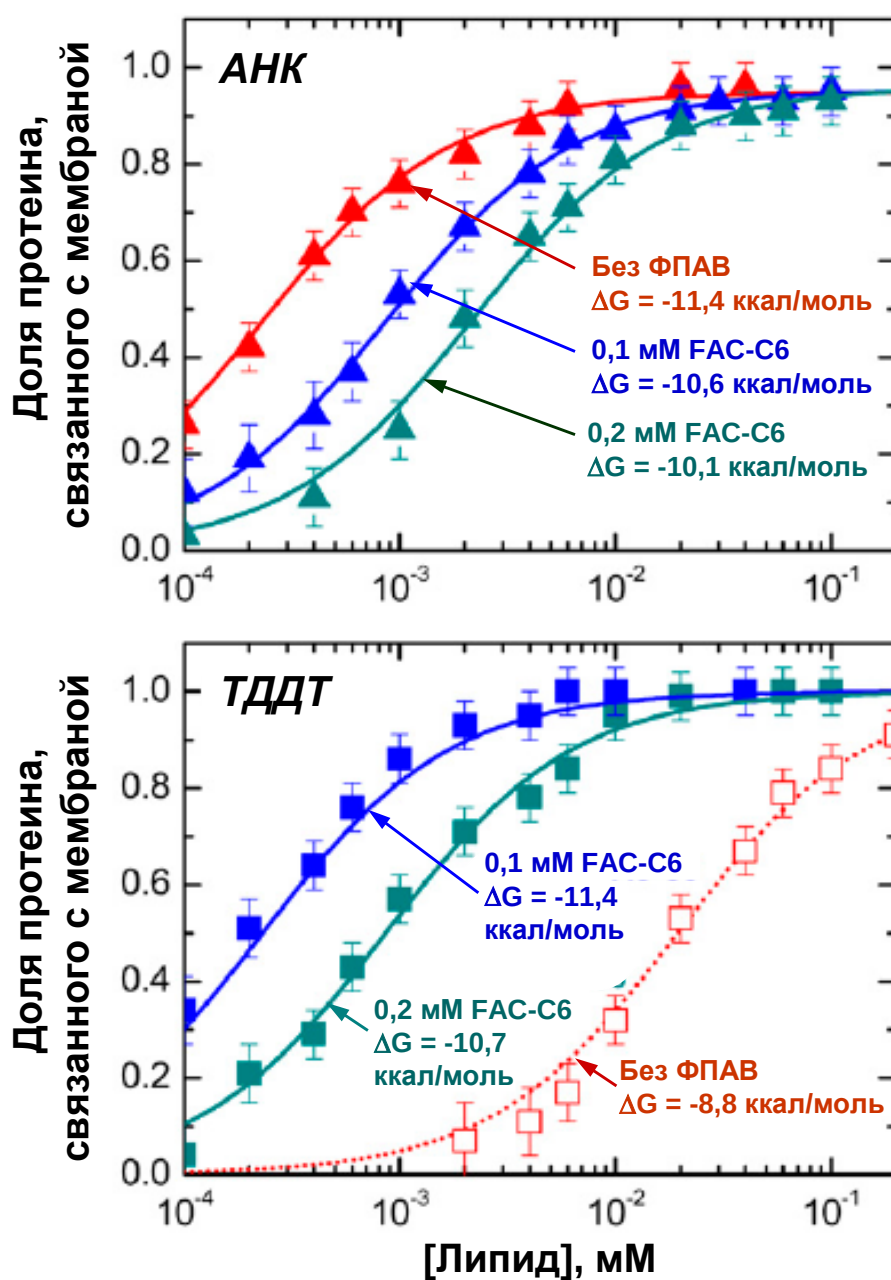


Рис. 2.7. Изотермы связывания АНК (верхняя панель, А) и ТДДТ (нижняя панель, Б) с липидными мембранами (БУВ 25ФХ:75ФГ) при отсутствии

(пустые символы) и при наличии 0,1 мМ и 0,2 мМ FTAC-C6 (заполненные символы), при рН вблизи поверхности мембран $\sim 4,0$, 293° К.

Эффект ФПАВ на ΔG мембранного связывания АНК и ТДДТ представлен на рис. 2.8.

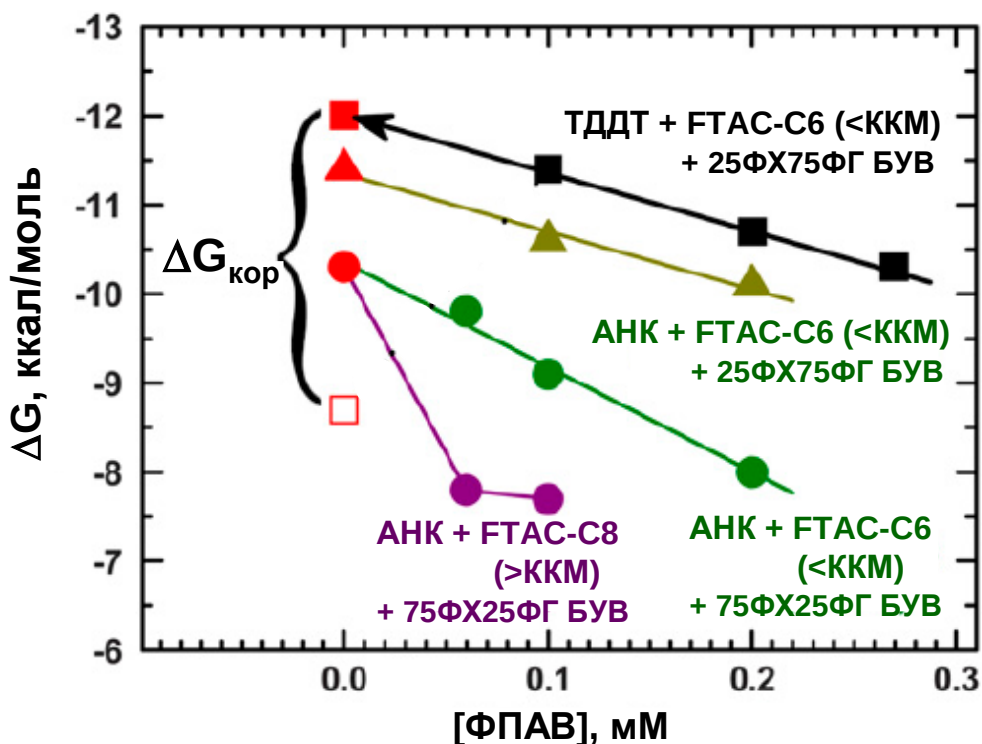


Рис. 2.8. Определение скорректированной свободной энергии связывания мембранных протеинов с липидными мембранами при использовании ФПАВ. Открытый квадрат - кажущаяся ΔG связывания ТДДТ с мембранами 25ФХ:75ФГ, полученная при отсутствии ФПАВ, т.е. в условиях агрегации и осаждения ТДДТ при низких рН.

В отличие от FTAC-C8, для которого наблюдалось резкое и нелинейное изменение ΔG мембранного связывания АНК с ростом концентрации ФПАВ (рис. 2.8), в случае FTAC-C6 происходило небольшое и линейное изменение ΔG мембранного связывания АНК для везикул различного липидного состава (рис. 2.8: треугольники - мембраны

75ФХ:25ФГ, кружки - мембраны 25ФХ:75ФГ) (рис. 2.8). Такое различие между FTAC-C8 и FTAC-C6 может быть объяснено образованием мицелл в случае FTAC-C8 (ККМ~0,03 мМ, рис. 2.77), в то время как FTAC-C6 (ККМ~0,33 мМ, рис. 2.5) оставался в мономерном (домицеллярном) состоянии.

Линейный характер зависимости ΔG мембранного связывания АНК от концентрации FTAC-C6 (рис. 2.8) открывает возможность использования этого ФПАВ для определения свободной энергии мембранного связывания мембранных протеинов при отсутствии их агрегации и осаждения: значение скорректированной ΔG мембранного связывания определяется экстраполяцией к нулевой концентрации FTAC-C6.

О точности предлагаемого метода свидетельствует то, что величина ΔG связывания АНК с мембранами состава 75ФХ:25ФГ, найденная экстраполяцией к нулевой концентрации FTAC-C6 ($-10,3 \pm 0,1$ ккал/моль) совпала с соответствующей величиной ΔG , полученной для АНК в отсутствие ФПАВ (рис. 2.8, $-10,3 \pm 0,1$ ккал/моль).

Предложенный метод был применён для оценки энергии мембранного связывания Т-домена дифтерийного токсина при отсутствии его агрегации и осаждения: скорректированная ΔG связывания ТДДТ с мембранами 25ФХ:75ФГ оказалась равной $-12,0 \pm 0,1$ ккал/моль (рис. 2.8, заполненный квадрат), что на целых 3,2 ккал/моль (рис. 2.8, $\Delta G_{\text{кор}}$) отличается от кажущейся ΔG связывания (рис. 2.8, открытый квадрат), полученной при отсутствии ФПАВ, т.е. в условиях агрегации и осаждения ТДДТ при низких рН.

Таким образом, для оценки термодинамики протеин-липидного взаимодействия малорастворимых в воде мембранных протеинов нами был впервые предложен метод, комбинирующий шапероноподобное действие

фторированных поверхностно-активных веществ и чувствительность флуоресцентной корреляционной спектроскопии, который позволил впервые корректно оценить свободную энергию связывания с липидными мембранами при низких pH для транслокационного домена дифтерийного токсина при отсутствии его агрегации и осаждения: найденная ΔG связывания T-домена с анионными мембранами с высоким содержанием анионного липида составила $-12,0 \pm 0,1$ ккал/моль.

Полученные данные по термодинамике взаимодействия ТДТ с липидными мембранами могут быть использованы для проверки и уточнения шкал Вимли-Вайта - экспериментальных шкал гидрофобности аминокислотных остатков пептидов и протеинов.

2.3. Оценка свободной энергии мембранного встраивания гидрофобных трансмембранных пептидов

Знание величины свободной энергии перехода α -спирального фрагмента из водной среды в липидный бислой является важным для понимания и предсказания фолдинга и стабильности мембранных протеинов [82,86,87,143,182,183].

Гидрофобные трансмембранные WALP-пептиды в липидной мембране имеют конформацию мономерной трансмембранной спирали, что делает их удобной моделью для изучения протеин-липидного взаимодействия [166,167].

Однако, экспериментальная оценка свободной энергии встраивания гидрофобных трансмембранных WALP-пептидов в липидные мембраны была до настоящего исследования невозможной вследствие агрегации и осаждения этих пептидов вне липидного бислоя [166,167].

В настоящем разделе предлагается метод оценки свободной энергии встраивания гидрофобных трансмембранных пептидов в липидные

мембраны, основанный на применении фторированных поверхностно-активных веществ (ФПАВ) и флуоресцентной корреляционной спектроскопии (ФКС) [184-186]. Предложенный метод был использован нами для оценки свободной энергии трансмембранного встраивания гидрофобных пептидов WALP23 и WALP27 (рис. 2.9).

WALP23: (Ацетил-С)GWWLALALALALALALALWW(А-Амид)

WALP27: (Ацетил-С)GWWLALALALALALALALALWW(А-Амид)

Рис. 2.9. Последовательность аминокислотных остатков для исследованных трансмембранных гидрофобных WALP-пептидов.

В качестве ФПАВ в данном исследовании использовался FTAC-С6 (см. раздел 2.2: рис. 2.5).

Необходимым условием для проведения оценки ΔG мембранного встраивания WALP-пептидов является наличие обратимости изучаемого процесса. При помощи ФКС-измерений было установлено, что встраивание WALP-пептидов в липидные мембраны является обратимым [184]: добавка FTAC-С6 к липидным везикулам, содержащим WALP-пептиды, приводит к распределению WALP-пептидов между везикулами и ФПАВ (не показано).

ФКС-измерения сдвигов аутокорреляционных кривых при переходе WALP23 и WALP27 из водной среды, содержащей ФПАВ, в липидный бислой проводились аналогично тому, как это описано в разделах 1.1, 2.1, 2.2. Поскольку молярные концентрации липида, использованные при титровании WALP-пептидов, были в значительном избытке ($\geq 10^4$) по отношению к концентрации пептидов (~ 1 нМ), доля встроенного в мембраны пептида определялись по формуле 1.4. Свободная энергия перехода WALP23 и WALP27 из водной среды, содержащей ФПАВ, в липидный бислой оценивалась с использованием формулы 2.3.

Изотермы перехода WALP23 и WALP27 из водной среды, содержащей FTAC-C6, в липидные мембраны, а также зависимости ΔG встраивания в мембраны от молярной концентрации FTAC-C6 показаны на рис. 2.10.

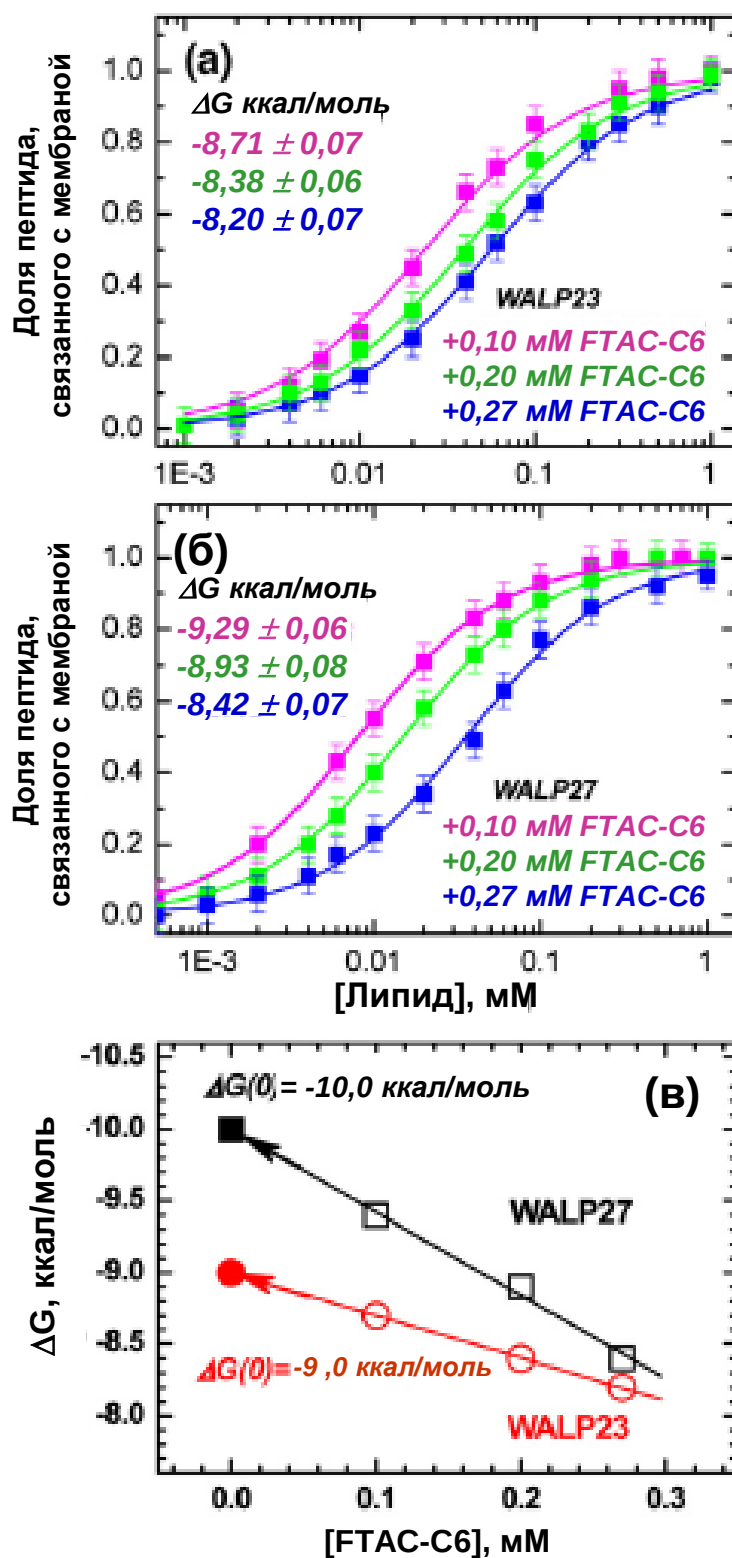


Рис. 2.10. Изотермы встраивания WALP23 (верхняя панель, (а)) и WALP27 (средняя панель, (б)) в липидные мембраны в присутствии 0,1; 0,2 и 0,27 мМ

FTAC-C6, 293° К. В измерениях были использованы большие униламелярные везикулы (БУВ) состоящие из пальмитоилолеоилфосфатидилхолина. Определение свободной энергии встраивания трансмембранных пептидов в липидные мембраны при использовании FTAC-C6 (нижняя панель, (в)): ΔG в присутствии FTAC-C6 (пустые символы) используются для оценки свободной энергии встраивания трансмембранных пептидов в липидные мембраны при отсутствии ФПАВ ($\Delta G(0)$, заполненные символы), которую находят путём экстраполяции зависимости ΔG от концентрации FTAC-C6 к нулевой концентрации ФПАВ (стрелки).

Как и в случае АНК, свободная энергия перехода WALP23 и WALP27 из водной среды в липидный бислой уменьшаются с ростом концентрации ФПАВ FTAC-C6. Линейная экстраполяция зависимостей ΔG от концентрации FTAC-C6 (рис. 2.10, панель (в)) к нулевой концентрации ФПАВ позволила определить значения свободной энергии встраивания трансмембранных пептидов в липидные мембраны при отсутствии агрегации и осаждения WALP-пептидов: $-9,0 \pm 0,1$ и $-10,0 \pm 0,1$ ккал/моль для гидрофобных трансмембранных пептидов WALP23 и WALP27, соответственно.

Принимая во внимание, что WALP27 отличается от WALP23 наличием фрагмента L–A–L–A (лейцин-аланин-лейцин-аланин), разница значений ΔG перехода из водной среды в липидный бислой для этих пептидов соответствует ΔG встраивания в мембраны фрагмента L–A–L–A:

$$\Delta G (L-A-L-A) = \Delta G (WALP27) - \Delta G (WALP23) = -1,0 \text{ ккал/моль.}$$

Полученные данные можно использовать для проверки и уточнения октанольной шкалы Вимли-Вайта – экспериментальной шкалы гидрофобности аминокислотных остатков пептидов и протеинов: в

частности, для экспериментальной оценки изменения свободной энергии ΔG_{CONH} , приходящегося на один аминокислотный остаток, для цепочек пептидных связей в случае перехода пептида, находящегося в α -спиральной конформации, из водной среды в октанольную.

Как уже упоминалось выше, в липидном бислое WALP-пептиды имеют полностью α -спиральную конформацию (все аминокислотные остатки пептида участвуют в образовании α -спирали) [166,167]. Поэтому для возможности оценки ΔG_{CONH} для каждого из исследованных нами WALP-пептидов необходимо знать число аминокислотных остатков, которые образуют α -спиральную конформацию пептида в воде.

Соответствующая оценка была проведена нами при помощи спектроскопии кругового дихроизма.

На первом этапе для пептидов WALP23 и WALP27 проводилась оценка свободной энергии фолдинга, которая позволяет судить о том, является ли количество аминокислотных остатков, не образующих α -спиральную конфигурацию, одинаковым или различным у сравниваемых пептидов.

Для оценки свободной энергии фолдинга трансмембранных пептидов WALP23 и WALP27 использовались измерения кругового дихроизма этих пептидов в водно-спиртовых смесях (см. рис. 2.11) [184,185]: известно, что в 2,2,2-трифторэтаноле (ТФЭ) гидрофобные пептиды (например, пептиды $A_8Q_3L_4$ -GW [34], Мелиттин [187] и т.п.) имеют полностью α -спиральную, а в воде – частично-развёрнутую конформацию [34,187]. В ходе измерений кругового дихроизма WALP-пептидов в смесях ТФЭ-вода регистрировалась молярная эллиптичность (Θ) пептидов на длине волны 222 нм. По изменениям значений Θ , наблюдаемых с ростом концентрации ТФЭ (рис. 2.12), оценивалась свободная энергия фолдинга.

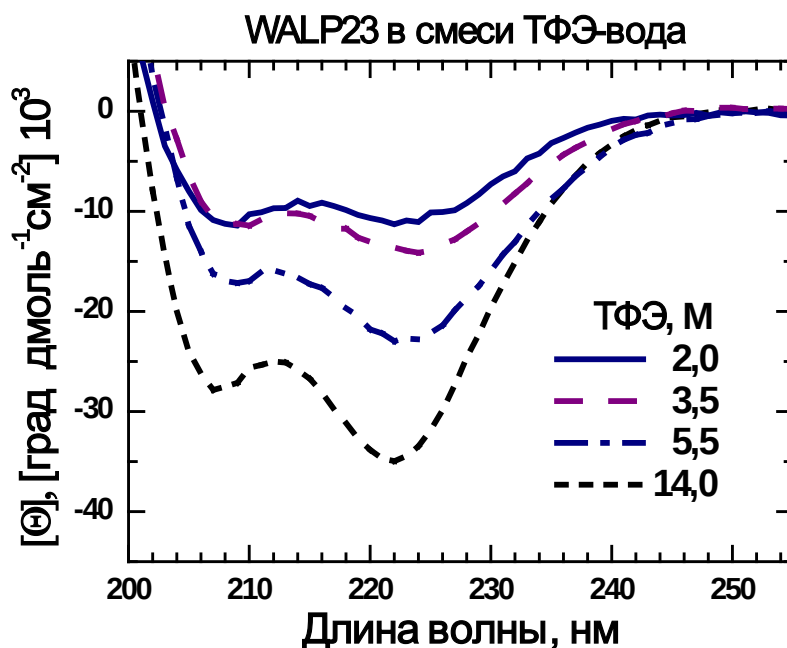


Рис. 2.11. Спектры кругового дихроизма 8 мкМ раствора WALP23, измеренные в смесях ТФЭ-вода с различным количеством ТФЭ.

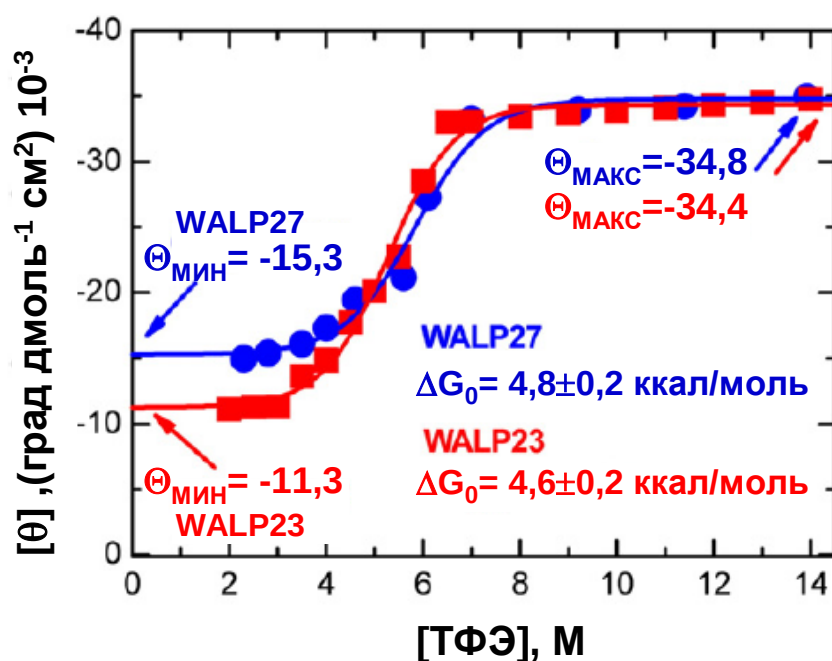


Рис. 2.12. Значения молярной эллиптичности (Θ) для WALP23 (квадраты) и WALP27 (кружки), на длине волны 222 нм, в смесях ТФЭ-вода с различным количеством ТФЭ. Сплошные линии соответствуют аппроксимации по формуле 2.8.

Для интерпретации зависимостей Θ от концентрации ТФЭ, полученных для WALP23 и WALP27, использовался подход, предложенный в [34] (формулы 2.4-2.8).

Изменения Θ , наблюдаемые с ростом концентрации фторированного спирта, описываются распределением Больцмана, позволяя оценить долю пептида с полностью α -спиральной конформацией $F_{СП}$:

$$F_{СП} = (\Theta + \Theta_{МИН}) / (\Theta_{МАКС} + \Theta_{МИН}) \quad (2.4)$$

где Θ - измеряемая молярная эллиптичность, $\Theta_{МИН}$ и $\Theta_{МАКС}$ - минимальное и максимальное значения молярной эллиптичности.

Оценка свободной энергии фолдинга в отсутствии 2,2,2-трифторэтанола (ТФЭ): $\Delta G_0 = -RT \cdot \ln K_0$, где $K_0 = F_{СП}(0) / F_P(0)$, а $F_{СП}(0)$ и $F_P(0)$ – доли пептида с полностью спиральной конформацией и с частично-развёрнутой конфигурацией, соответственно, для [ТФЭ]=0.

Для [ТФЭ]≠0, свободная энергия фолдинга ΔG_Φ может быть представлена как

$$\Delta G_\Phi = \Delta G_0 - m \cdot [ТФЭ] \quad (2.5)$$

где m – коэффициент, описывающий зависимость ΔG_Φ от молярной концентрации ТФЭ ([ТФЭ]).

После преобразования уравнения 2.5 получаем:

$$K_\Phi = K_0 \cdot \exp(m \cdot [ТФЭ] / RT) \quad (2.6)$$

Комбинируя уравнения 2.4 и 2.6 получаем:

$$F_{СП} = F_{СП} / (1 + F_{СП}) = 1 / (1 + F_{СП}^{-1}) \quad (2.7)$$

Объединяя уравнения 2.4-2.7 получаем функцию, аппроксимирующую зависимость величин молярной эллиптичности пептида от концентрации ТФЭ:

$$\Theta = \frac{\Theta_{МИН} + \Theta_{МАКС} \cdot K_0 \cdot \exp(m \cdot [ТФЭ] / RT)}{1 + K_0 \cdot \exp(m \cdot [ТФЭ] / RT)} \quad (2.8)$$

где $\Theta_{МИН}$ и $\Theta_{МАКС}$ - значения молярной эллиптичности, на основании которых оценивалось количество аминокислотных остатков, образующих α -спиральную конфигурацию пептида в воде, K_0 – константа фолдинга пептида при отсутствии ТФЭ, которая используется для расчёта свободной энергии фолдинга пептида в воде.

Аппроксимация экспериментальных данных для WALP-пептидов (рис. 2.12) с помощью уравнения 2.8 позволила оценить свободные энергии фолдинга (ΔG_0) трансмембранных пептидов WALP23 и WALP27 в отсутствие 2,2,2-трифторэтанола (ТФЭ), которые оказались равными $4,8 \pm 0,2$ и $4,6 \pm 0,2$ ккал/моль, соответственно. Статистическая неразличимость полученных величин для WALP23 и WALP27 указывает на то, что в отсутствие ТФЭ исследованные WALP-пептиды имеют одинаковое число аминокислотных остатков, не образующих α -спирали.

Принимая во внимание, что в 2,2,2-трифторэтаноле (ТФЭ) гидрофобные пептиды [34,187] имеют полностью α -спиральную конформацию, $\Theta_{МАКС}$ (максимальное значение молярной эллиптичности, полученное при измерениях КД-спектров WALP-пептидов в ТФЭ) относили к КД-сигналу пептида, все аминокислотные остатки которого принимают участие в образовании α -спирали. Затем, используя $\Theta_{МИН}$,

оценивали количество аминокислотных остатков, образующих α -спиральную конформацию WALP-пептидов в воде: 7 аминокислотных остатков – для WALP23 и 11 аминокислотных остатков – для WALP27, соответственно. Следовательно, количество аминокислотных остатков, не участвующих в образовании α -спирали, для обоих пептидов в воде оказалось одинаковым: 16 аминокислотных остатков. Такой результат хорошо согласуется с близостью величин свободной энергии фолдинга (ΔG_0) трансмембранных пептидов WALP23 и WALP27 при отсутствии ТФЭ.

Следует отметить, что в случае WALP-пептидов сведения о количестве аминокислот, образующих спиральную конформацию в воде, не могут быть получены непосредственно в результате измерений кругового дихроизма пептидов в воде вследствие их агрегации и осаждения.

Принимая во внимание, что WALP27 отличается от WALP23 наличием фрагмента L–A–L–A (лейцин-аланин-лейцин-аланин), а также учитывая, что количество аминокислотных остатков, образующих α -спиральную конформацию WALP27 в воде, отличается от соответствующего количества для WALP23 на четыре аминокислотных остатка, можно сделать вывод, что в водной фазе фрагмент L–A–L–A находится в α -спиральной конформации.

Зная величину свободной энергии перехода из водной среды в липидный бислой α -спирального фрагмента L–A–L–A (–1,0 ккал/моль), а также используя значения свободной энергии перехода вода-октанол для боковых цепей аминокислотных остатков лейцина (L) и аланина (A), можно найти значение свободной энергии перехода из воды в гидрофобную среду липидного бислоя для пептидной связи одного аминокислотного остатка в составе α -спиральной конформации пептида: $\Delta G_{\text{CONH}} = ((\Delta G (\text{L–A–L–A}) - 2 \cdot (\Delta G (\text{L})) - 2 \cdot (\Delta G (\text{A}))) / 4)$.

Для оценки ΔG_{CONH} мы использовали значения свободной энергии перехода вода-октанол для боковых цепей аминокислотных остатков лейцина (L) и аланина (A), полученные на основании двух независимых

экспериментальных шкал гидрофобности аминокислотных остатков: шкалы гидрофобности Вимли-Вайта [47], полученной в результате исследований перехода модельных пептидов WL-X-LL и WL_m из воды в октанол, и шкалы Муна-Флеминга [159], полученной в результате исследований денатурации протеина OmpA.

Октанольная шкала гидрофобности Вимли-Вайта для каждого аминокислотного остатка учитывает вклад изменения свободной энергии перехода вода-октанол как для боковой цепи, так и для пептидной связи (цепочка пептидных связей находится в конформации неупорядоченного клубка) [47]. Поэтому, для нахождения ΔG (L) и ΔG (A) необходимо из значений изменения свободной энергии для лейцинового ($-1,25 \pm 0,11$ ккал/моль) и аланинового ($0,50 \pm 0,12$ ккал/моль) аминокислотных остатков, приведенных в октанольной шкале Вимли-Вайта, вычесть вклад изменения свободной энергии для пептидной связи в составе полипептидной цепочки, находящейся в состоянии неупорядоченного клубка. Последний вклад оказался равным $+2$ ккал/моль [47].

При использовании свободных энергий перехода из воды в октанол для боковых цепей аминокислотных остатков лейцина (ΔG (L) = $-3,25 \pm 0,11$ ккал/моль) и аланина (ΔG (A) = $-1,50 \pm 0,12$ ккал/моль), полученных на основании данных экспериментальной шкалы гидрофобности Вимли-Вайта [47], вычисляем значение свободной энергии перехода из воды в гидрофобную среду липидного бислоя для пептидной связи одного аминокислотного остатка в составе α -спиральной конформации пептида, оказавшееся равным $+2,13 \pm 0,17$ ккал/моль.

При использовании значений свободной энергии перехода из водной в гидрофобную среду для боковых цепей аминокислотных остатков лейцина (ΔG (L) = $-3,32$ ккал/моль) и аланина (ΔG (A) = $-1,57$ ккал/моль), полученных на основании данных экспериментальной шкалы гидрофобности Муна-Флеминга [159], вычисляем значение свободной энергии перехода из

воды в гидрофобную среду для пептидной связи одного аминокислотного остатка в составе α -спиральной конформации пептида, которое составляет +2,2 ккал/моль.

Таким образом, значения ΔG_{CONH} , полученные с использованием параметров двух независимых экспериментальных шкал гидрофобности аминокислотных остатков, оказались близкими.

Найденное нами различие $\Delta \Delta G_{\text{CONH}}$ в расчёте на один аминокислотный остаток между вкладом в значения октанольной шкалы мембранных взаимодействий цепочек пептидных связей, находящихся в α -спиральной конформации, и соответствующим вкладом цепочек пептидных связей, находящихся в конформации неупорядоченного клубка (+2 ккал/моль [47]), оказалось равным +0.13 ккал/моль. Полученное значение $\Delta \Delta G_{\text{CONH}}$ является сравнимым с аналогичными величинами $\sim +0,05 \div -0,1$ ккал/моль, теоретически оцененными в ходе статистического анализа количества совпадений для прогнозов, сделанных при помощи компьютерной программы MPEx [160] для известных трансмембранных фрагментов протеинов [165].

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные, показывают, что при оценке термодинамики мембранных взаимодействий и выявлении трансмембранных фрагментов при помощи программы MPEx [160], использующей в качестве параметров октанольную шкалу гидрофобности Вимли-Вайта, следует вносить поправку, равную +0.13 ккал/моль.

Обобщённые результаты термодинамического анализа встраивания исследованных WALP-пептидов в липидные мембраны представлены на рис. 2.13.

**Термодинамика встраивания
в мембраны пептидных α -спиралей**

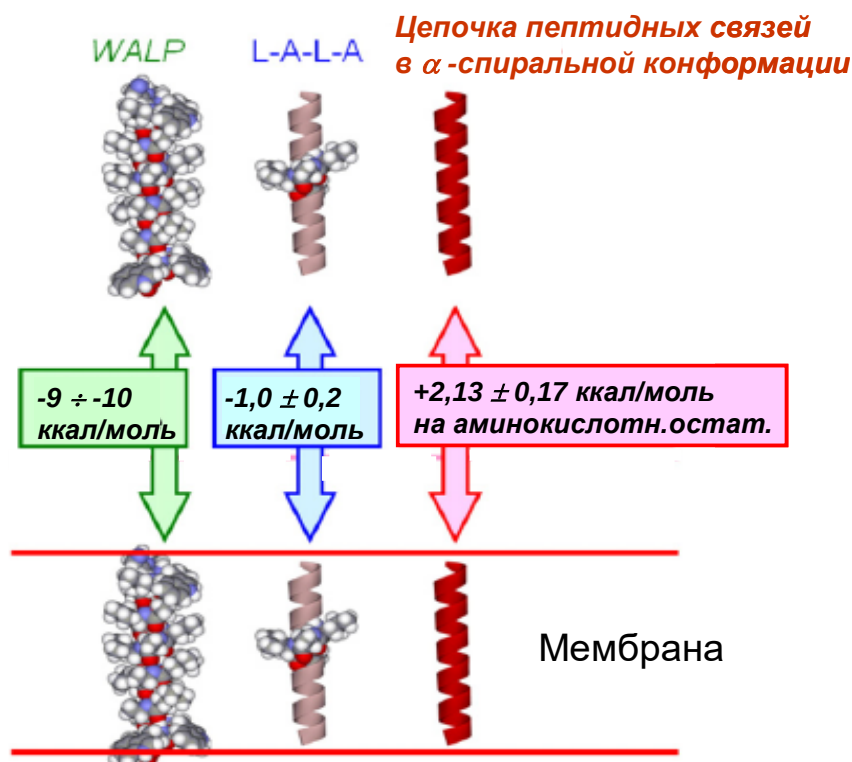


Рис. 2.13. Термодинамика встраивания WALP-пептидов в липидный бислой. Левая панель представляет свободные энергии встраивания трансмембранных пептидов в липидные мембраны: $-9,0 \pm 0,1$ и $-10,0 \pm 0,1$ ккал/моль для WALP23 и WALP27, соответственно. Средняя панель показывает свободную энергию встраивания α -спирального фрагмента L–A–L–A ($-1,0 \pm 0,2$ ккал/моль), полученную на основании результатов, представленных на рис. 2.10. Правая панель представляет полученное значение свободной энергии перехода из воды в липидный бислой для пептидной связи одного аминокислотного остатка в составе α -спиральной конформации пептида ($+2,13 \pm 0,17$ ккал/моль).

Таким образом, для оценки термодинамики пептид-липидного взаимодействия малорастворимых в воде гидрофобных трансмембранных пептидов предложен метод, комбинирующий шапероноподобное действие фторированных поверхностно-активных веществ и чувствительность

флуоресцентной корреляционной спектроскопии, который позволил впервые оценить свободную энергию встраивания в липидную мембрану для гидрофобных пептидов различной длины, а именно WALP23 и WALP27: (найденные их ΔG встраивания в цвитерионные мембраны составили $-9,0 \pm 0,1$ и $-10,0 \pm 0,1$ ккал/моль, соответственно) а также позволил впервые экспериментально оценить величину свободной энергии перехода из воды в липидный бислой для пептидной связи одного аминокислотного остатка в составе α -спиральной конформации пептида: $+2,13 \pm 0,17$ ккал/моль.

Полученные данные по термодинамике взаимодействия с липидными мембранами использованы нами для проверки и уточнения октанольной шкалы Вимли-Вайта - экспериментальной шкалы гидрофобности аминокислотных остатков пептидов и протеинов.

РАЗДЕЛ 3. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЦИСТЕИНОВЫХ ПЕПТИДОВ – БЛОКАТОРОВ ИОННЫХ КАНАЛОВ (ЦПБИК): ИССЛЕДОВАНИЕ МЕМБРАННОГО СВЯЗЫВАНИЯ ЦПБИК

Функционирование мембранных ионных каналов – порообразующих одиночных белков либо белковых комплексов, которые поддерживают электрическую разность потенциалов между внешней и внутренней сторонами клеточной мембраны живых клеток) регулируется при помощи пептидов-блокаторов ионных каналов [188-190], которые воздействуют на ионный канал и, таким образом, закрывают его [188-190].

Среди пептидов-блокаторов ионных каналов широко распространены т.н. цистеиновые пептиды (inhibitor cysteine knot (ICK) channel blockers, [191-204]), имеющие в своём составе несколько аминокислотных остатков цистеина, образующих между собой дисульфидные (-S-S-) связи и, таким образом, способствующих пространственному разделению участков пептида, содержащих наиболее гидрофобные аминокислотные остатки (W, Y, F, L, I) от участков пептида, содержащих заряженные (катионные и анионные) аминокислотные остатки (K, R, D, E), рис. 3.1.

Цистеиновые пептиды представляют интерес в качестве потенциальных фармацевтических препаратов для лечения нарушений функционирования сердечно-сосудистой системы: например, пептид GsMTx4, выделенный из яда тарантула, блокирует механо-чувствительные ионные каналы и, таким образом, замедляет частоту сердцебиения при тахикардии [205].

В литературе [191-193] обсуждаются возможные механизмы действия цистеиновых пептидов, например, для GsMTx4 и VSTX1 было показано, что связывание с липидными мембранами является важной стадией в ходе их воздействия на ионные каналы (рис. 3.2).

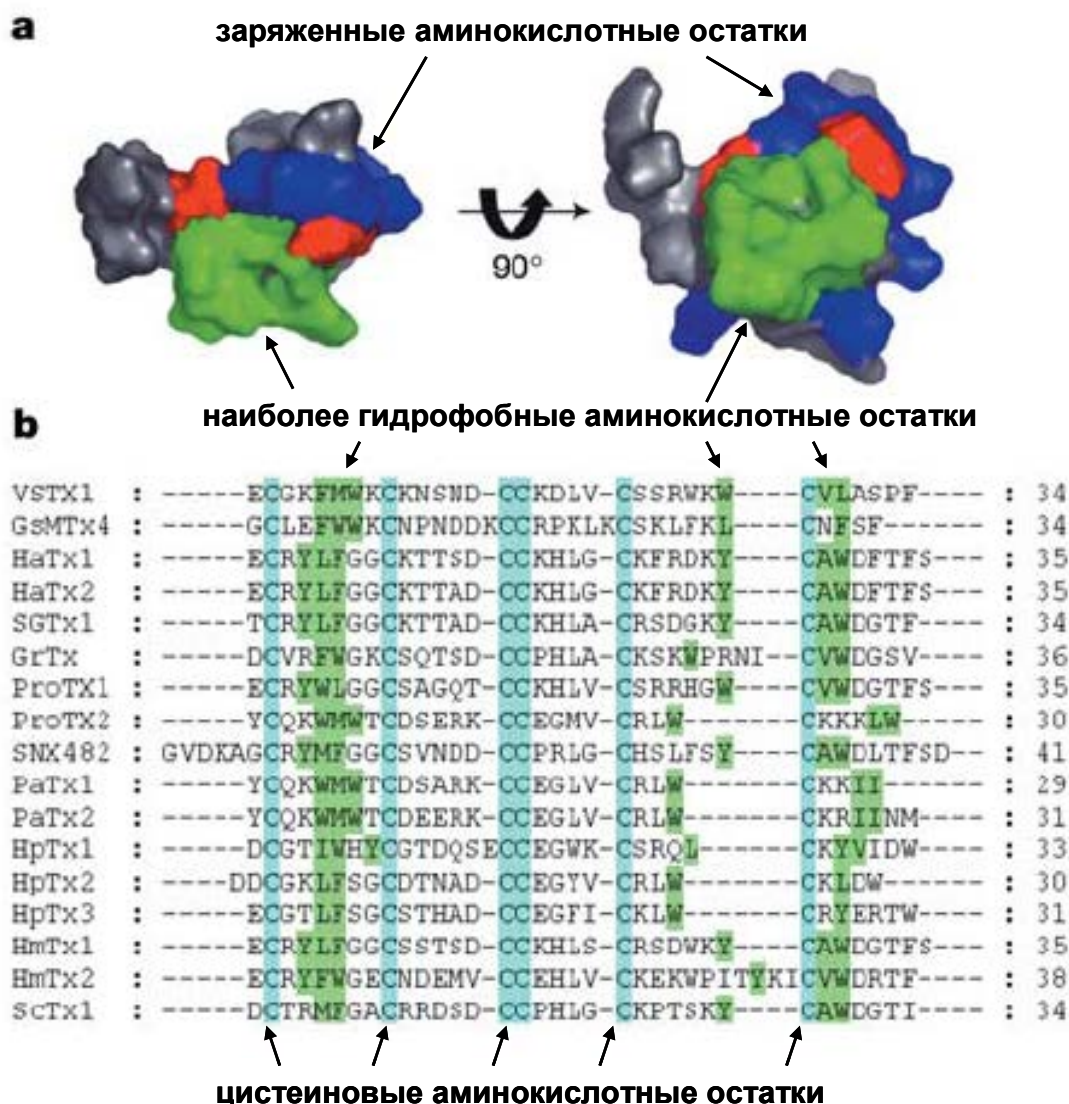


Рис. 3.1. Цистеиновые пептиды-блокаторы ионных каналов [191]: вверху (a) – показано разделение участков пептида, содержащих гидрофобные аминокислотные остатки от участков, содержащих заряженные аминокислотные остатки; внизу (b) – последовательность аминокислотных остатков для различных ЦПБИК: цистеиновые аминокислотные остатки и гидрофобные аминокислотные остатки выделены фоном.

О связывании с липидными мембранами блокатора VSTx1 авторы [191] судили по коротковолновому сдвигу и возрастанию интенсивности флуоресценции триптофановых аминокислотных остатков этого пептида. Вывод о связывании с липидными мембранами блокатора GsMTx4 авторы

[192] сделали на основании результатов измерений ионной проводимости механочувствительных мембранных каналов: в результате действия пептида GsMTx4 поток ионов внутрь клетки уменьшался, при том, что поток ионов из клетки наружу оставался неизменным.

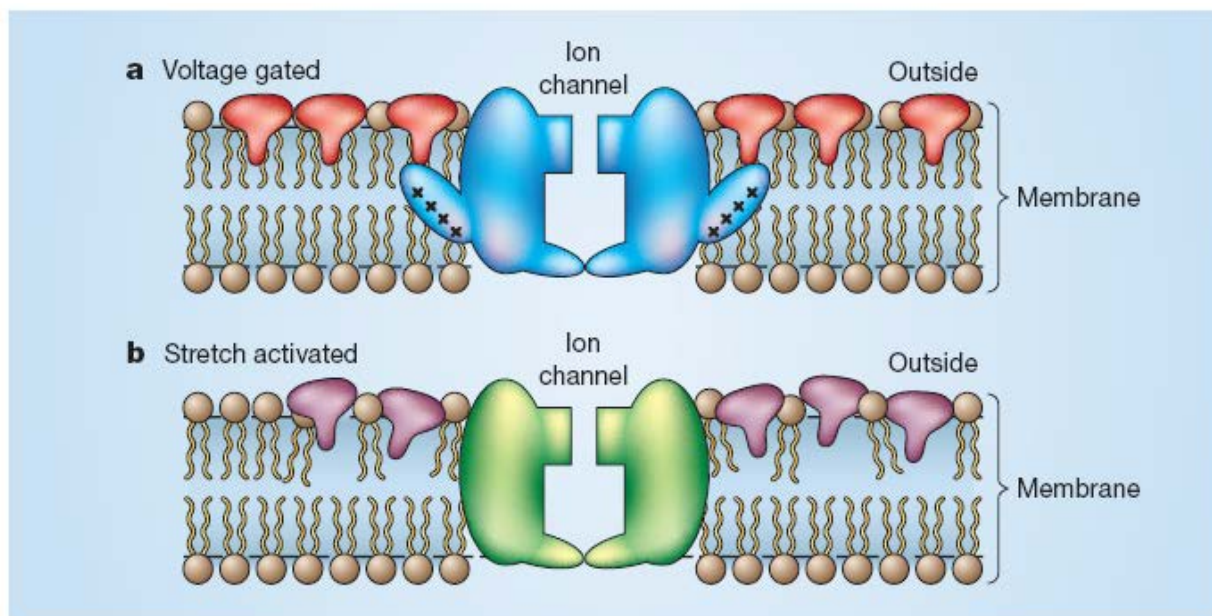


Рис. 3.2. Действие блокаторов ионных каналов посредством их взаимодействия с липидной мембраной [193]: вверху (a) – взаимодействие пептида-токсина VSTX1 с положительно заряженным сенсором кальциевого канала KvAP K^+ ; внизу (b) – пептид-блокатор GsMTx4 блокирует механочувствительный ионный канал посредством изменений в упаковке липидов вблизи ионного канала.

Таким образом, в отличие от общепринятых представлений о регулировании пропускной способности ионного канала блокатором посредством только пептид-пептидного взаимодействия (т.н. взаимодействия «ключ-замок» [206], рис. 3.3, верхняя часть рисунка), предложенный авторами [191,192] механизм действия ЦПБИК, основанный на их связывании с липидными мембранами, предполагает участие пептид-липидных взаимодействий и отсутствие строгих стерических ограничений при взаимодействии канал-блокатор (например, действие на ионные каналы

D и L-GsMTx4 не отличается [192]. Принимая во внимание последний механизм, авторами [207,208] была предложена новая модель функционирования кальциевых ионных каналов (рис. 3.3, нижняя часть рисунка).

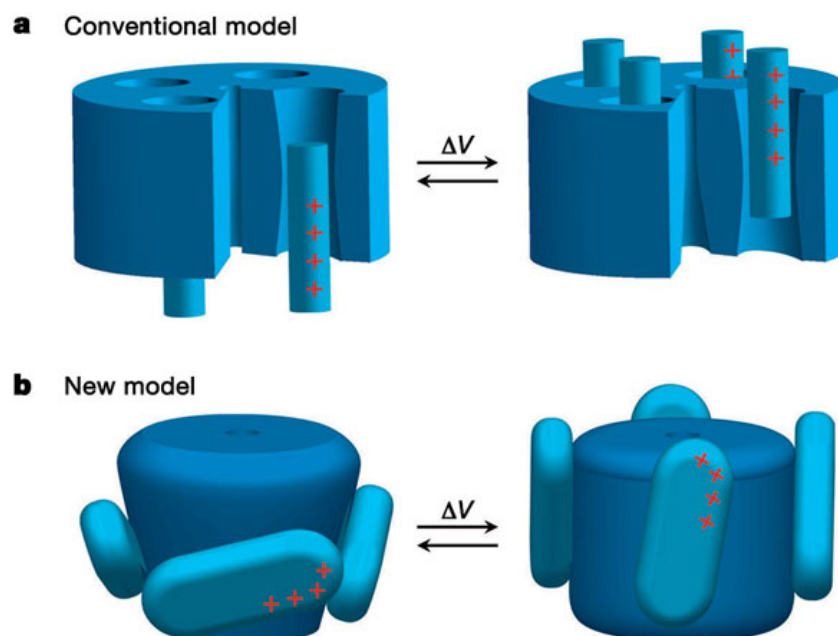


Рис. 3.3. Общепринятая (вверху) и новая (внизу) модели функционирования кальциевых ионных каналов [206-208].

На основании структурного подобия цистеиновых пептидов в литературе [193] было высказано предположение, что взаимодействие с липидным бислоем является важным для всех ЦПБИК.

В настоящей работе была проведена верификация этой гипотезы путём определения свободной энергии связывания некоторых ЦПБИК с липидными мембранами. Также было проведено исследование зависимости обсуждаемой свободной энергии связывания от электростатического потенциала липидных мембран, оценена глубина проникновения ЦПБИК в липидную мембрану и исследована возможность неполной дегидратации цистеинового пептида GsMTx4 при его связывании с липидной мембраной.

Знание механизма действия цистеиновых пептидов является принципиально важным для поиска потенциальных фармацевтических препаратов среди пептидов-токсинов, содержащихся в ядах насекомых.

3.1. Свободная энергия мембранного связывания цистеиновых пептидов-блокаторов ионных каналов

Верификация высказанного в литературе предположения о том, что взаимодействие с липидным бислоем является важным для всех ЦПБИК [193] проводилась путём определения свободной энергии связывания некоторых ЦПБИК (рис. 3.4) с липидными мембранами различного липидного состава.

GsMTx1, YCQKWMWTCDEERKCCEGLVCRLWCKKKIEW;
GsMTx4, GCLEFWWKCNPNDDKCCRPKLKCSKLFKLCNFSF–Амид;
rHpTx2gs, GSDDCGKLFSGCDTNADCEGYVCRLWCKLDW;
SGTx1 (D24A), TCRYLFGGCKTTADCKHLACRSAGKYCAWDGTF.

Рис. 3.4. Последовательность аминокислотных остатков для исследованных цистеиновых пептидов-блокаторов ионных каналов.

Наличие в структуре ЦПБИК триптофановых аминокислотных остатков (W) делает потенциально возможным определение свободной энергии мембранного связывания этих пептидов при помощи метода флуоресцентной спектроскопии: обычно, при наличии липидных мембран флуоресценция триптофановых остатков пептида изменяется – максимум сдвигается в коротковолновую область, при этом интенсивность испускания значительно возрастает.

Однако, как оказалось, при наличии липидных мембран флуоресценция аминокислотных остатков триптофана исследованных ЦПБИК изменяется незначительно (рис. 3.5, панель А), что обычно интерпретируется как отсутствие связывания пептида с липидной мембраной.

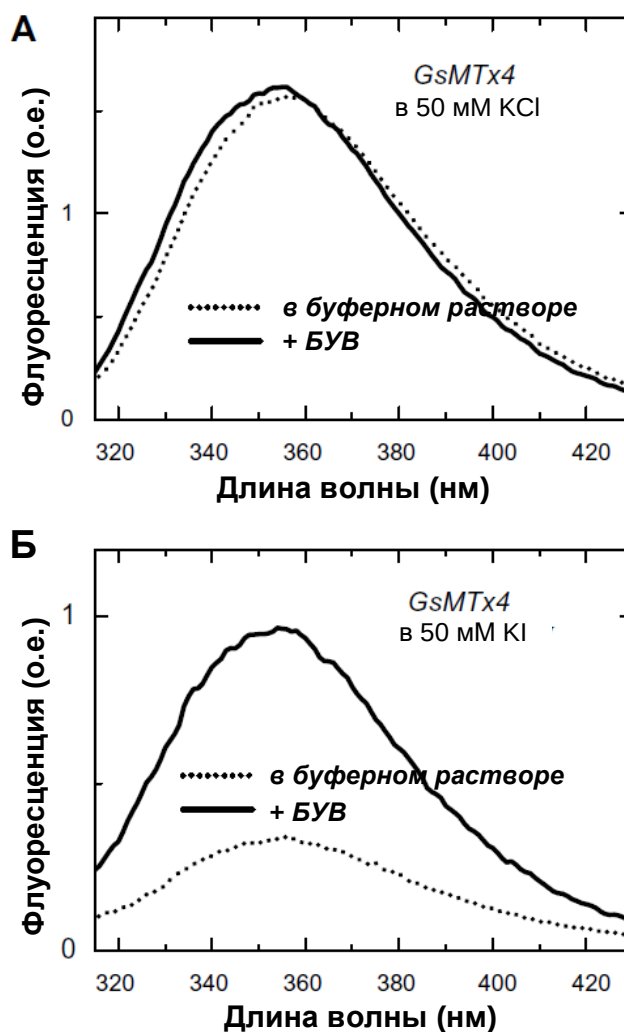


Рис. 3.5. Спектры флуоресценции 1 мкМ пептида GsMTx4 при отсутствии (А) и при наличии (Б) ионного тушителя I^- в водном HEPES-буфере при отсутствии мембран (точечная линия) и при наличии 0,8 мМ БУВ 75ФХ:25ФГ (сплошная линия).

Напротив, эффективность тушения флуоресценции остатков триптофана ЦПБИК специально добавленными соединениями-тушителями заметно уменьшается при наличии липидных мембран (табл. 3.1), указывая на связывание исследуемых пептидов с липидным бислоем: например, константа Штерна-Фольмера (K_{SV}) для тушения пептида GsMTx4 иодид ионом (I^-) уменьшается от $12,2 \text{ M}^{-1}$ в буферном растворе, не содержащем мембран, до $6,9$ и $2,1 \text{ M}^{-1}$ при наличии мембран: $0,8 \text{ мМ}$ ФХ БУВ и $75\text{ФХ}:25\text{ФГ}$ БУВ, соответственно [209,210].

Таблица 3.1

**Величины констант Штерна-Фольмера (K_{SV}) при тушении
флуоресценции триптофана, входящего в состав пептидов GsMTx1 и
GsMTx4, ионами I^- и Cs^+**

	пептид	K_{SV}, M^{-1}	
		I^-	Cs^+
В буферном растворе (10 mM HEPES, 50 mM KCl, pH 7)	GsMTx1	12,8±0,2	2,3±0,1
	GsMTx4	12,2±0,4	2,86±0,05
+ 0,8 mM БУВ 75ФХ:25ФГ	GsMTx1	8,4±0,4	1,2±0,1
	GsMTx4	2,1±0,3	0,30±0,03
+ 0,8 mM БУВ ФХ	GsMTx1	11,4±0,4	<< 0,2
	GsMTx4	6,9±0,2	0,65±0,08

Отмеченную разницу в тушении при помощи иодид иона для свободных и мембраносвязанных ЦПБИК решено было использовать для увеличения спектрального ответа при связывании исследуемых пептидов с липидными мембранами. Для этого был изменён состав используемого для измерений буферного раствора (HEPES-буфер, pH 7): хлорид калия был заменён иодидом в той же концентрации. При добавке липидных мембран к ЦПБИК при наличии 50 mM KI, интенсивность триптофановой флуоресценции увеличивается в несколько раз (рис. 3.5, панель Б).

Увеличение интенсивности триптофановой флуоресценции ЦПБИК при связывании с липидными мембранами при наличии ионного тушителя флуоресценции (иодид-иона) связано с тем, что последний не проникает в липидную мембрану и тушит флуоресценцию пептида, находящегося в водной фазе, а не в мембране.

Таким образом, титрование липидами при наличии тушителя флуоресценции позволяет проводить детекцию мембранного связывания, и, следовательно, позволяет определять ΔG мембранного связывания.

Для выяснения влияния изменения состава буферного раствора (замены KCl на KI) на связывание ЦПБИК с мембранами была проведена количественная оценка мембранного связывания модельного пептида с хорошо известными свойствами – мелиттина [33,35,79,211,212], который титровали раствором ФХ БУВ при наличии 50 мМ KCl (рис. 3.6: верхняя панель, открытые квадраты) или 50 мМ KI (рис. 3.5: верхняя панель, сплошные квадраты).

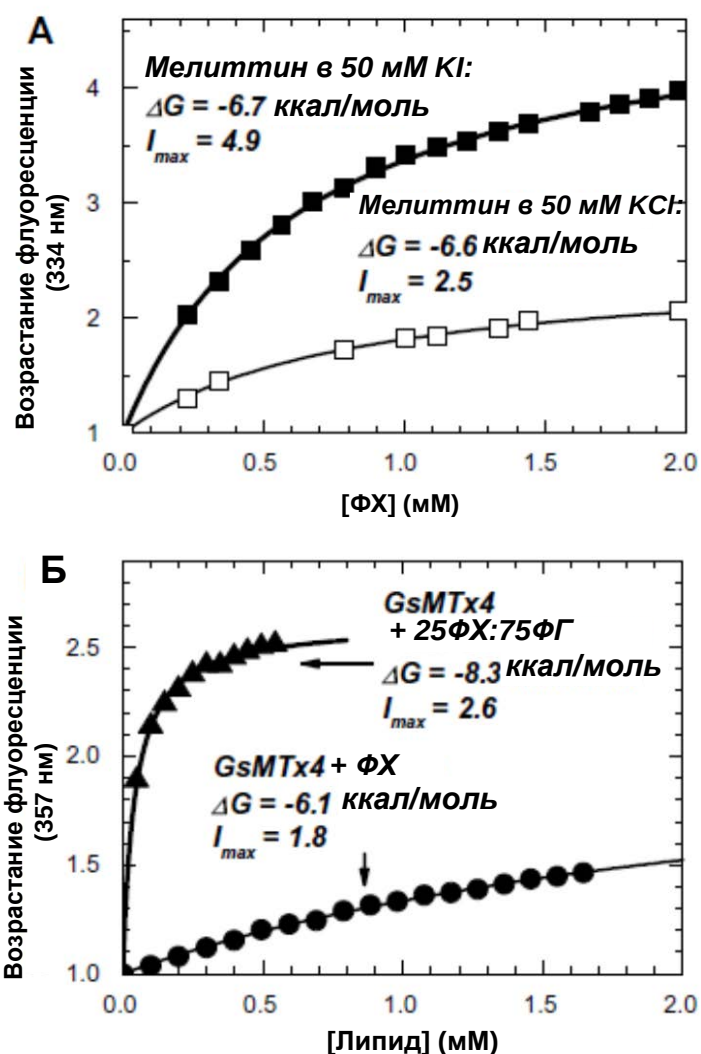


Рис. 3.6. Тестирование (верхняя панель, А) и применение (нижняя панель, Б) предложенной методики флуоресцентного титрования с использованием

тушителя флуоресценции (иодид-иона) для определения свободной энергии мембранного связывания, ΔG .

Как и ожидалось, увеличение интенсивности испускания мелиттина было более значительным в присутствии KI благодаря более эффективному тушению флуоресценции свободного мелиттина в водной фазе по сравнению с соответствующим тушением мелиттина, связанного с мембранами.

Интенсивность флуоресценции пептида (I) в присутствии липидных мембран, скорректированная на рассеяние и разведение, аппроксимировалась с использованием уравнения [79]:

$$I([L]) = 1 + I_{\max} \frac{K_x [L]}{[W] + K_x [L]} \quad (3.1)$$

где $I_{\max}$ – относительная интенсивность флуоресценции пептида в условиях насыщения – при полном связывании с липидными мембранами ($I_{\max} = I/I_0$, I_0 – интенсивность флуоресценции в растворе без добавки липида), $[L]$ – молярная концентрация липида, $[W]$ молярная концентрация воды (55,3 М), и K_x – коэффициент межфазного распределения пептида [35,79] (см. раздел 2.1). Свободная энергия переноса пептида из водной среды в мембрану была рассчитана на основании коэффициента межфазного распределения пептида с использованием уравнения 2.3, см. раздел 2.1.

Значения свободной энергии связывания мелиттина с липидной мембраной для растворов, содержащих KCl и KI, совпадают (в пределах погрешности определения величины ΔG мембранного связывания: ± 0.1 ккал/моль), рис. 3.6. В тоже время, наличие иодид иона приводило к почти трёхкратному увеличению относительной интенсивности флуоресценции мелиттина (рис. 3.6: $I_{\max} - 1$) при связывании с липидными мембранами по сравнению с таковой при отсутствии тушителя.

Применение усовершенствованной методики флуоресцентного титрования с использованием тушителя флуоресценции (иодид-иона) [213,214] позволило оценить свободную энергию мембранного связывания для нескольких ЦПБИК (рис. 3.4), а также установить, что пептид GsMTx4 связывается как с цвитерионными (ФХ), так и с анионными (95ФХ:5ФГ, 75ФХ:25ФГ и 25ФХ:75ФГ) мембранами (рис. 3.6), пептиды GsMTx1 (рис. 3.7: А) и SGTx1 связываются только с мембранами с высоким содержанием отрицательно заряженного липида ФГ (25ФХ:75ФГ), а пептид rHpTx2gs (рис. 3.7: Б) не взаимодействует с липидными мембранами в нейтральной среде, и, приобретает такую способность в кислых растворах (рис. 3.6: Б, открытые символы), т.е. только после протонирования отрицательно заряженных анионных аминокислотных остатков).

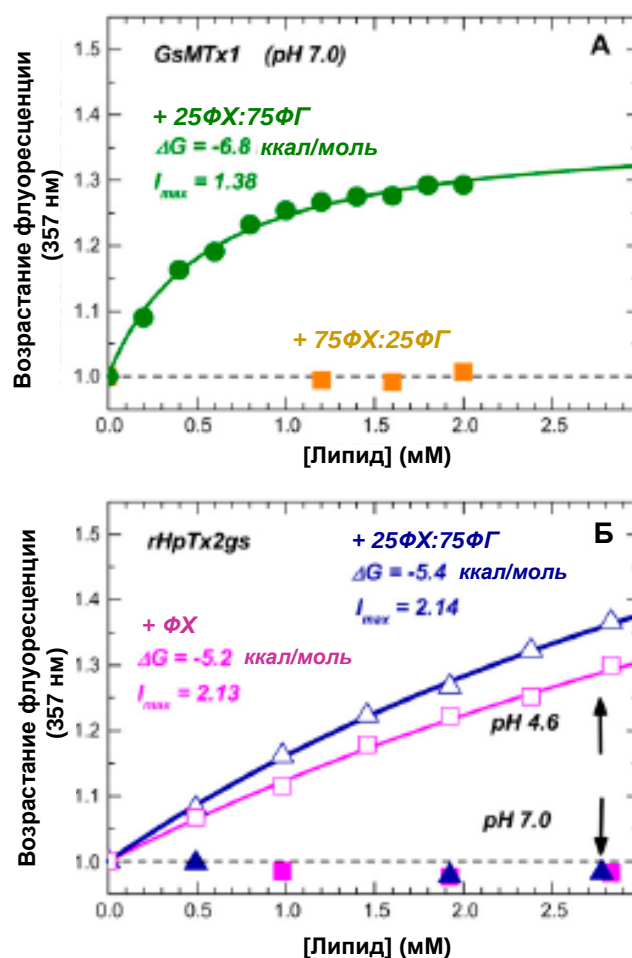


Рис. 3.7. Результат применения предложенной методики флуоресцентного титрования при наличии тушителя флуоресценции (иодид-иона) для

определения свободной энергии связывания пептидов GsMTx1 и gHrTx2gs с липидными мембранами (липидный состав мембран указан на графиках).

Таким образом, применение усовершенствованной нами методики флуоресцентного титрования с использованием тушителя флуоресценции (иодид иона) позволило установить, что, несмотря на структурное подобие всех ЦПБИК, способность к взаимодействию с липидными мембранами не является общим свойством, присущим всем цистеиновым пептидам-блокаторам ионных каналов.

Зависимости свободной энергии мембранного связывания исследованных ЦПБИК от электростатического потенциала поверхности (ϕ) липидных мембран представлены на рис. 3.8: для GsMTx4 приведены данные для (сплошные квадраты) ФХ, 95ФХ:5ФГ, 75ФХ:25ФГ и 25ФХ:75ФГ; (ромбы) ФХ и 25ФХ:25ФС и (открытые квадраты) для 25ФХ:75ФГ при наличии дополнительных 450 мМ KCl (все другие образцы содержали только 50 мМ KI); для D-GsMTx4 приведены данные (кружки) ФХ, 75ФХ:25ФГ и 25ФХ:75ФГ. Для SGTx1 (перевернутые треугольники) и GsMTx1 (треугольники) представлены данные 25ФХ:75ФГ с (открытые символы) или без (сплошные символы) дополнительных 50 мМ KCl.

Для GsMTx4 и его D-энантиомера (D-GsMTx4, все аминокислотные остатки в D-конфигурации) угол наклона зависимости ΔG от ϕ (рис. 3.8), пропорциональный величине эффективного заряда пептида $Z_{\text{эф}}$ [30,124], соответствует значению последнего +0,8, в то время как номинальный заряд каждого из этих пептидов +5. Малый эффективный заряд рассматриваемых пептидов указывает на значительный вклад гидрофобных взаимодействий (D-) GsMTx4 с липидной мембраной [30,34].

С другой стороны, значения ΔG для SGTx1 и GsMTx1 продемонстрировали значительную зависимость от мембранного потенциала – эффективные заряды $Z_{\text{эф}}$, этих пептидов являются значительными: +6,5 для

SGTx1 и +4,1 для GsMTx1. Вышеизложенное свидетельствует о выраженной электростатической природе взаимодействия катионных пептидов SGTx1 и GsMTx1 с анионными липидными мембранами [30,34]. Резкое уменьшение мембранного связывания для SGTx1 и GsMTx1 при уменьшении электростатического мембранного потенциала хорошо согласуется с упомянутым выше фактом о связывании этих пептидов только с анионными мембранами с высоким содержанием отрицательно заряженного липида ФГ (25ФХ:75ФГ).

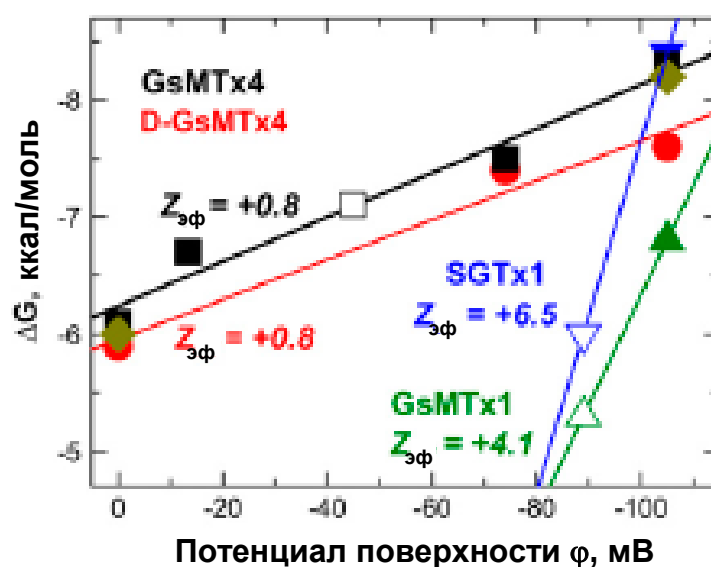


Рис. 3.8. Свободная энергия связывания четырёх пептидов с липидными мембранами, различающимися величиной электростатического потенциала поверхности, зависящего от молярной доли заряженных липидов в составе мембраны и ионной силы буферного раствора [124].

Установлено, что, несмотря на структурное подобие всех ЦПБИК, характер взаимодействия ЦПБИК с липидными мембранами различается: имеются ЦПБИК как с преимущественно гидрофобным, так и с преимущественно электростатическим характером взаимодействия с липидными мембранами.

Таким образом, для улучшения точности оценки термодинамических параметров мембранного связывания цистеиновых пептидов – блокаторов ионных каналов, нами была усовершенствована методика флуоресцентного титрования при наличии водорастворимого тушителя флуоресценции. Предложенная методика успешно использована для выяснения механизма действия цистеиновых пептидов – было показано, что, несмотря на структурную близость этих пептидов, они разделяются на три типа в зависимости от их способности к взаимодействию с липидными мембранами: первый тип – пептиды, которые связываются как с цвитерионными, так и с анионными мембранами, второй тип – блокаторы, которые связываются только с мембранами с высоким содержанием анионного липида, третий тип – пептиды, которые не связываются с мембранами при физиологических значениях pH.

3.2. Глубина проникновения цистеиновых пептидов – блокаторов ионных каналов в липидную мембрану

О глубине проникновения цистеиновых пептидов – блокаторов ионных каналов (ЦПБИК) в липидную мембрану судили на основании результатов оценки тушения триптофановой флуоресценции пептида GsMTx4 (см. рис. 3.4) с помощью липидных везикул, полученных из бромированных фосфолипидов с различным положением атома брома (тушитель флуоресценции) в углеводородной цепочке фосфолипида [215]: 6,7-; 9,10- и 11,12-ФХ (рис. 3.9). В липидных везикулах, полученных из 6,7-дибромо-ФХ; 9,10-дибромо-ФХ и 11,12-дибромо-ФХ, тушители флуоресценции триптофана (атомы брома, большие чёрные шары на рис. 3.9) располагаются на расстоянии 11; 8,3 и 6,5 Å от центра липидного бислоя, соответственно [152,215-220].

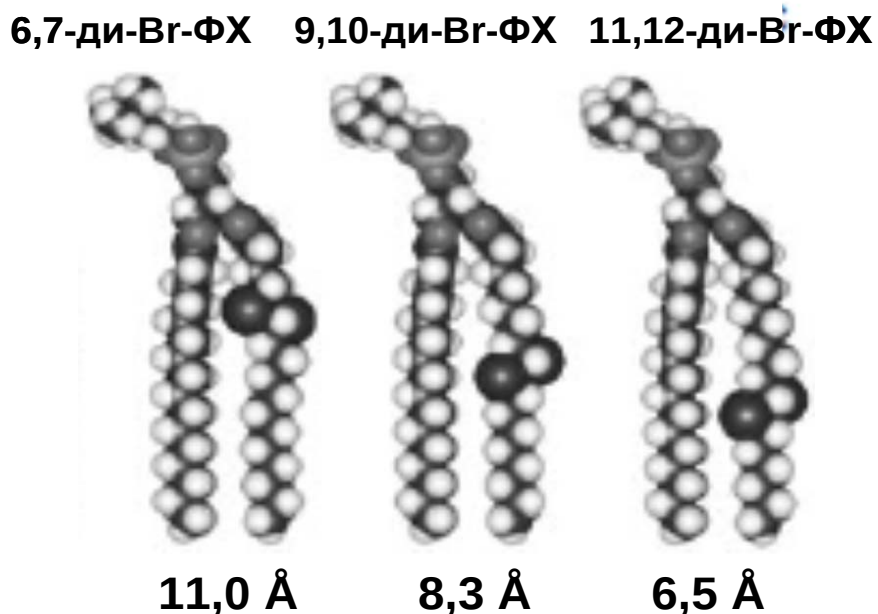


Рис. 3.9. Набор бромированных фосфолипидов, использованных для тушения триптофановой флуоресценции пептида GsMTx4: 6,7-дибромо-фосфатидилхолин (6,7-ди-Br-ФХ); 9,10-дибромо-фосфатидилхолин (9,10-ди-Br-ФХ) и 11,12-дибромо-фосфатидилхолин (11,12-ди-Br-ФХ).

Для сравнения, нами была проведена оценка глубины проникновения в липидную мембрану пептида мелиттина (не относящегося к группе цистеиновых пептидов) [211,212]. Зависимость относительной интенсивности триптофановой флуоресценции мелиттина при титровании липидными везикулами, приготовленных из фосфолипидов с различным положением брома, показана на рис. 3.10.

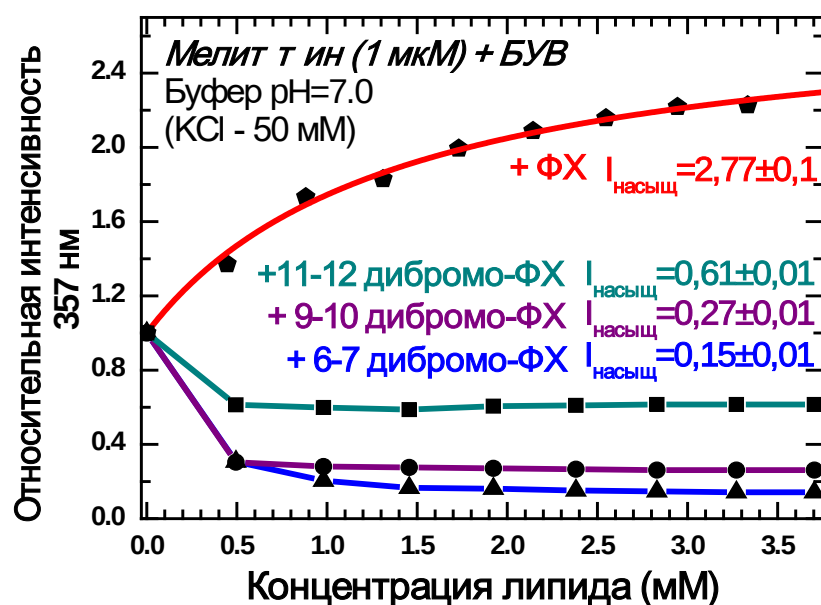


Рис. 3.10. Относительная интенсивность триптофановой флуоресценции мелиттина при титровании большими униламелярными везикулами (БУВ), приготовленными из фосфолипидов с различным положением брома в углеводородной цепи фосфолипида (см. рис. 3.8). Тушение 6-7-дибром-ФХ, 9-10-дибром-ФХ, 11-12-дибром-ФХ – треугольники, круги и квадраты, соответственно. $I_{\text{насыщ}}$ – относительная интенсивность флуоресценции мелиттина при насыщении липидом. Зависимость относительной интенсивности триптофановой флуоресценции мелиттина (пятиугольники) при титровании ФХ БУВ, не содержащими бромированных липидов, показана для сравнения.

В ходе оценки тушения флуоресценции GsMTx4 и мелиттина определяли интенсивность флуоресценции F , как функцию расстояния от центра липидного бислоя до места расположения тушителя флуоресценции в мембране, h . Полученные значения интенсивностей F_h нормировали на величину интенсивности флуоресценции при отсутствии тушения F_0 . (рис. 3.11).

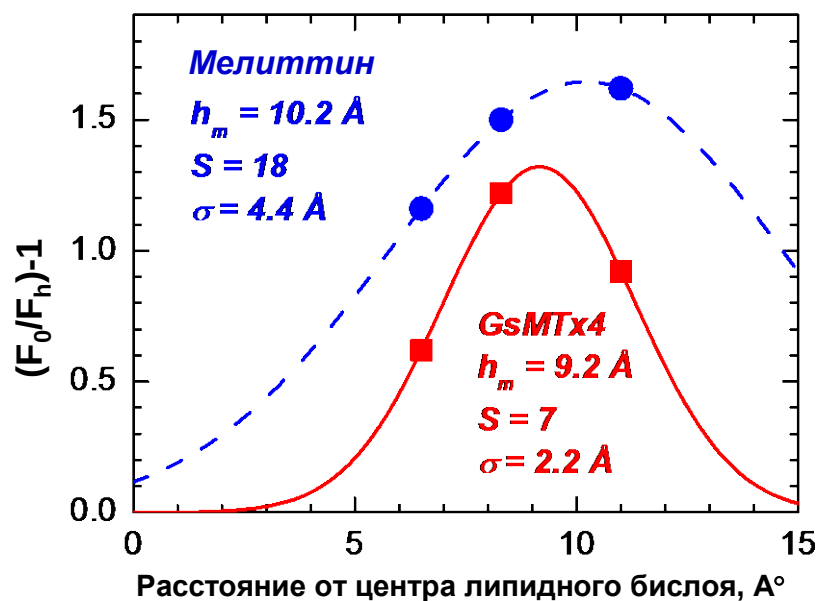


Рис. 3.11. Кривые распределения Гаусса для среднего расстояния от центра липидного бислоя до места расположения триптофановых аминокислотных остатков GsMTx4 (штриховая линия) или мелиттина (сплошная линия), полученные в результате применения метода дистрибутивного анализа (см. формулу 3.2).

Экспериментальные результаты (рис. 3.11) были проанализированы при помощи метода дистрибутивного анализа [212], который использует функцию распределения Гаусса для описания зависимости степени тушения флуоресценции от расположения тушителя флуоресценции относительно центра липидного бислоя:

$$\frac{F_0}{F_h} - 1 = \frac{S}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot \exp\left[-\frac{(h - h_m)^2}{2\sigma^2}\right] \quad (3.2)$$

где h_m – среднее расстояние от центра липидного бислоя до места расположения триптофанового аминокислотного остатка; σ – дисперсия в оценке расположения триптофанового аминокислотного остатка, которая

зависит от размеров флуорофора и тушителя флуоресценции, а также от термических флуктуаций расстояния между ними; S – площадь под кривой функции распределения Гаусса, которая зависит от эффективности тушения и от концентрации тушителя в мембране. Формула 3.2 применима к образцам мембран, находящимся в термическом равновесии.

Как показал проведенный нами дистрибутивный анализ (рис. 3.11), среднее расстояние от триптофановых аминокислотных остатков (W6 and W7, см. рис. 3.4) пептида GsMTx4 до центра липидного бислоя составляет 9,2 Å, что свидетельствует о достаточно глубокой локализации этого пептида в мембране, а также о несколько более глубоком расположении пептида GsMTx4 в липидном бислое по сравнению с мелиттином (среднее расстояние от триптофанового остатка мелиттина до центра липидного бислоя составляет 10,2 Å).

Таким образом, при помощи измерений флуоресценции при стационарном возбуждении триптофановых аминокислотных остатков цистеинового пептида GsMTx4 (блокатор механо-чувствительных ионных каналов) при его взаимодействии с липидными везикулами, полученными из бромированных фосфолипидов с различным положением тушителя флуоресценции (атома брома) в углеводородной цепи фосфолипида, нами впервые была произведена оценка локализации ЦПБИК в липидной мембране, в частности, нами было показано, что GsMTx4 проникает в мембрану достаточно глубоко (~ 9,2 Å от центра липидного бислоя).

3.3. Определение возможности неполной дегидратации цистеинового пептида GsMTx4 при его связывании с липидной мембраной

Известно [152,221], что положение максимума в спектре флуоресценции триптофана смещается в область более коротких длин волн при уменьшении полярности растворителя. Аналогичное коротковолновое

смещение максимума флуоресценции триптофановых аминокислотных остатков наблюдается для пептидов/протеинов при их переходе из полярной среды водного буфера в неполярную среду липидной мембраны [152], например, в случае пептида мелиттина (табл. 3.2).

Таблица 3.2

Положение максимумов флуоресценции ($\lambda_{\text{макс}}$, нм) триптофановых аминокислотных остатков пептидов GsMTx4 и мелиттина*

<i>Пептид</i>	$\lambda_{\text{макс}}$, нм			
	<i>Водный буферный раствор</i>	<i>БУВ (25ФХ:75ФГ)</i>	<i>БУВ (75ФХ:25ФГ)</i>	<i>БУВ (ФХ)</i>
<i>GsMTx4</i>	356	355	355	355
<i>Мелиттин</i>	347	335	332	335

*Мелиттин приведен для сравнения.

Данные спектров флуоресценции триптофановых аминокислотных остатков пептида GsMTx4 свидетельствуют, что при встраивании этого пептида в липидные мембраны не происходит существенного изменения положения максимума флуоресценции триптофановых остатков (см. раздел 3.1, рис. 3.4, табл. 3.2). Отсутствие ожидаемого коротковолнового сдвига полосы флуоресценции триптофановых остатков (см. рис. 3.4, см. табл. 3.2) указывает на то, что микроокружение триптофановых остатков GsMTx4 осталось полярным даже после связывания этого пептида с мембраной.

Вместе с тем, оценка глубины проникновения пептида GsMTx4 в липидную мембрану, проведённая методом тушения триптофановой флуоресценции GsMTx4 с помощью бромированных фосфолипидов с последующей обработкой результатов посредством дистрибутивного анализа (см. раздел 3.2, рис. 3.11), показала, что GsMTx4 проникает в мембрану достаточно глубоко (среднее расстояние от центра липидного бислоя до

места расположения триптофановых аминокислотных остатков GsMTx4 составляет $\sim 9,2 \text{ \AA}$, см. рис 3.11).

Интересно, что GsMTx4, для которого не наблюдается существенного коротковолнового сдвига флуоресценции триптофановых остатков при его переходе из полярной среды водного буферного раствора в неполярную среду липидной мембраны (табл. 3.2), расположен в мембране глубже, чем пептид мелиттин (среднее расстояние от триптофановых остатков мелиттина до центра липидного бислоя составляет $10,2 \text{ \AA}$, рис 3.11), для которого характерно упомянутое выше коротковолновое смещение полосы флуоресценции (табл. 3.2).

Для объяснения полученных экспериментальных данных нами было выдвинуто предположение о возможности неполной дегидратации триптофановых аминокислотных остатков пептида GsMTx4 при его связывании с липидной мембраной.

С целью верификации этого предположения нами было проведено моделирование взаимодействия GsMTx4 с липидной мембраной (ФХ) методом молекулярной динамики (МД) [222].

В качестве исходного параметра для проведения МД-моделирования распределения GsMTx4 в липидной мембране (ФХ) использовались результаты дистрибутивного анализа экспериментальных данных по тушению пептида GsMTx4 бромированными липидами (рис. 3.11).

Согласно результатам расчётов методом молекулярной динамики, распределение триптофановых аминокислотных остатков GsMTx4 в липидной мембране хорошо аппроксимируется функцией распределения Гаусса (рис. 3.12) и достаточно хорошо согласуется с соответствующим распределением, полученным при аппроксимации экспериментальных данных при помощи дистрибутивного анализа (рис. 3.11).

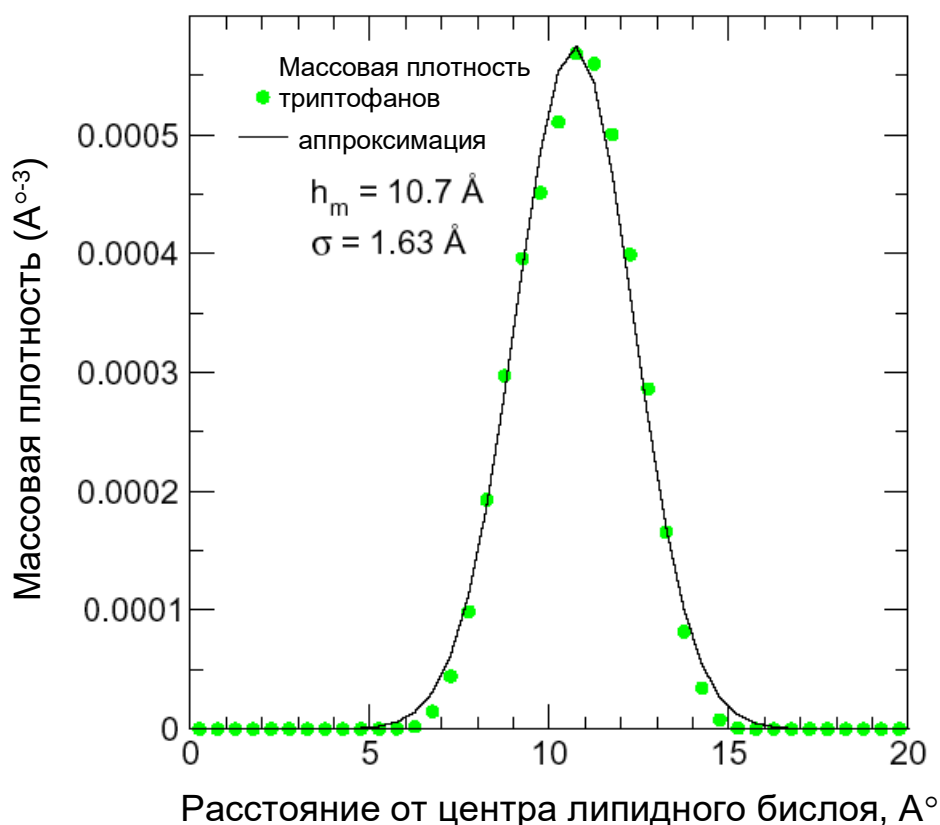


Рис. 3.12. Результат МД-моделирования распределения триптофановых аминокислотных остатков GsMTx4 в липидной мембране.

Результаты, полученные методом молекулярной динамики, показали, что молекулы воды из сольватной оболочки протеина проникают в липидную мембрану достаточно глубоко и сохраняются в ближайшем микроокружении триптофановых аминокислотных остатков пептида GsMTx4 (рис. 3.13) – это может объяснить отсутствие коротковолнового сдвига максимума полосы флуоресценции триптофановых остатков GsMTx4 при его переходе из полярной среды водного буфера в неполярную среду липидной мембраны.

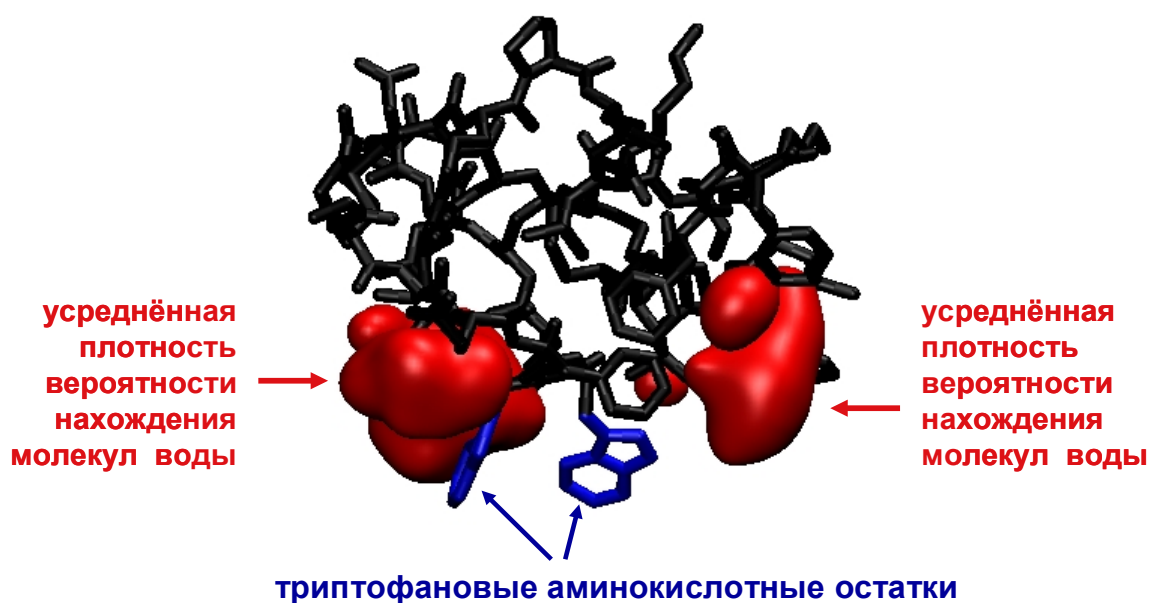


Рис. 3.13. Полученная МД-модель сольватного комплекса молекулы GsMTx4 в липидной мембране (ФХ): молекулы воды проникают в мембрану достаточно глубоко и могут находиться в ближайшем микроокружении триптофановых остатков пептида GsMTx4.

Таким образом, применение совокупности методов флуоресцентной спектроскопии при стационарном возбуждении (измерение флуоресценции триптофановых аминокислотных остатков цистеинового пептида GsMTx4 при встраивании в липидную мембрану, не содержащую тушителей флуоресценции, и соответствующее измерение флуоресценции этого пептида при встраивании в липидные мембраны, содержащие тушитель флуоресценции с различной глубиной локализации в мембране), а также компьютерное моделирование методом молекулярной динамики позволили впервые показать, что при встраивании в липидную мембрану ингибитора ионных каналов GsMTx4 не происходит полной дегидратации его триптофановых аминокислотных остатков.

РАЗДЕЛ 4. ФОТОНИКА НЕКОТОРЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ ОРИЕНТИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

В предыдущих разделах было показано, что оптическая спектроскопия является важным инструментом для исследования взаимодействия биологически ориентированных соединений с липидными мембранами.

В контексте применения оптической спектроскопии для детекции БОС, для исследования их взаимодействия с липидными мембранами, их межмолекулярных взаимодействий в липидных мембранах, а также для выяснения возможности их использования для мониторинга изменений физико-химических свойств липидных мембран представляет интерес исследование фотоники БОС, а именно – природы и эффективности первичных фотофизических и фотохимических процессов, происходящих в возбужденном состоянии этих соединений.

В четвёртом разделе описаны способ коррекции в оценке эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии в ходе исследования самоассоциации пептидов/протеинов в мембранах, основанный на применении флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении; исследование механизма тушения флуоресценции в меченных органическими флуорофорами гистидин-содержащих пептидах, образующих комплексы с ионами переходных металлов, фотоники меченных флуоресцентными метками фторированных поверхностно-активных веществ в ходе их оценки в качестве среды при оценке термодинамических параметров взаимодействия мембранных протеинов с липидными мембранами. Также в разделе исследована возможность использования производных 1,3-оксазола и 1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для определения физико-химических характеристик липидных мембран; спектрально-флуоресцентные и сольватофлуорохромные свойства производных 2-кумаринил-1,3,4-

оксадиазола и 2-хинолинил-1,3-бензоксазола для выяснения возможности их применения в качестве флуоресцентных зондов, чувствительных к физико-химическим характеристикам среды; спектрально-флуоресцентные свойства противоракового препарата камптотецина, коммерческих продуктов витамина К₃, новых физиологически-активных соединений, полученных из турецких лишайников, а также некоторых производных арилиминохинолина для выяснения возможности определения этих соединений с помощью оптической спектроскопии; установлена структура продукта фототрансформации β -тиоксокетон в условиях низких температур.

4.1. Способ экспериментальной коррекции в оценке эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии в ходе исследования самоассоциации пептидов/протеинов в липидных мембранах

Процесс самоассоциации пептидов/протеинов имеет большое значение при формировании мембранных ионных каналов [223,224], мембранных пор [10-13], а также является важным в ходе изменения активности рецепторов [225].

Точная количественная оценка самоассоциации пептидов/протеинов в мембранах при помощи флуоресцентной спектроскопии при стационарном возбуждении, проводимая на основании оценки эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии (ФРПЭ) между флуорофорами-донорами и флуорофорами-акцепторами энергии электронного возбуждения, которые связаны с пептидами/протеинами (и таким образом, выступают в роли флуоресцентных меток), всегда затруднена из-за существенного вклада тушения доноров в мономерных молекулах пептидов/протеинов близко расположенными акцепторами, связанными с мономерными пептидами/протеинами [226-228], рис. 4.1.

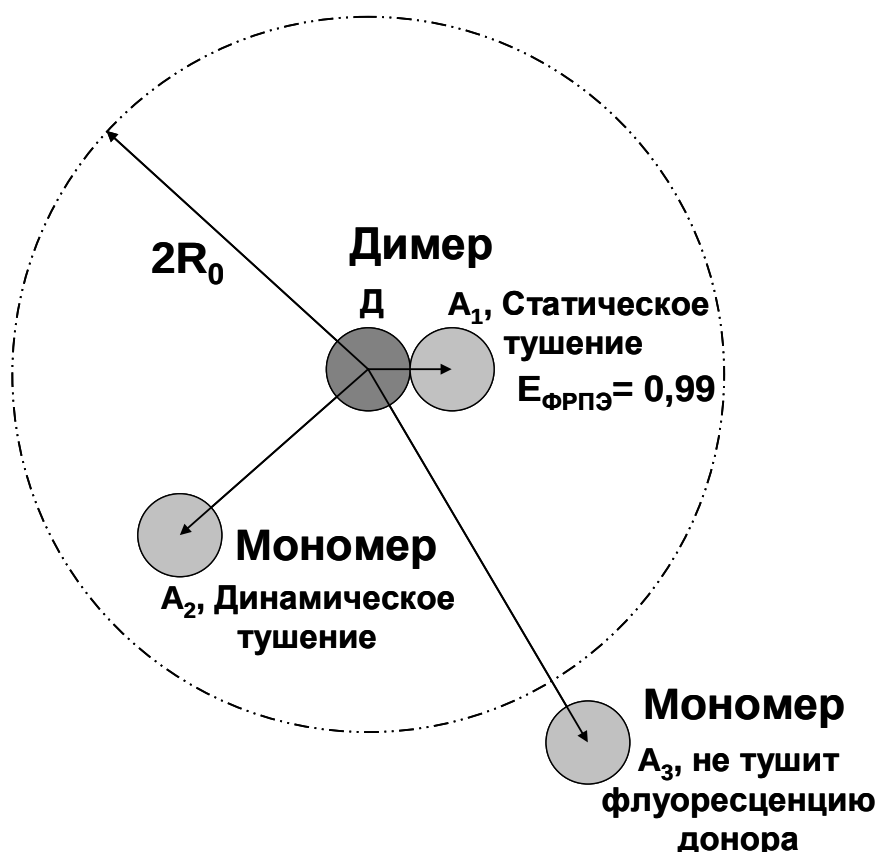


Рис. 4.1. Различные возможности тушения флуоресценции донора при димеризации пептида. «Д» и «А» обозначают молекулы пептида, меченные флуорофором-донором и флуорофором-акцептором энергии электронного возбуждения, соответственно. A₁ – акцептор в донор-содержащем димере, для которого наблюдается почти полный перенос энергии от донора к акцептору (статическое тушение донора) [226-227]; A₂ – акцептор, присоединённый к случайно распределённому мономеру и обуславливающий динамическое тушение флуоресценции донора; A₃ – акцептор, присоединённый к мономеру, находящемуся на значительном расстоянии от донора ($R > 2R_0$, где R_0 – радиус Фёрстера для пары донор/акцептор) и не вызывающий тушения флуоресценции донора. $E_{\text{ФРПЭ}}$ – эффективность ФРПЭ.

Для точной оценки эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии, вызванного димеризацией, необходимо вычесть

эффективность ФРПЭ (E_m) между близко расположенными мономерными пептидами/протеинами, меченными донором, и мономерными пептидами/протеинами, меченными акцептором, из общей эффективности ФРПЭ (E^I), вычисленной на основании измерений флуоресценции при стационарном возбуждении донора в присутствии акцептора по формуле:

$$E^I = \frac{I^D - I^{DA}}{I^D} \quad (4.1)$$

где I^D и I^{DA} – интенсивности флуоресценции меченных донором пептидов/протеинов при наличии и при отсутствии пептидов/протеинов, меченных акцептором, соответственно.

Таким образом, скорректированная эффективность Фёрстеровского резонансного переноса энергии ($E^{кор}$) при исследовании самоассоциации пептидов/протеинов в липидных мембранах будет равна: $E^{кор} = E^I - E_m$.

Одним из способов оценки E_m (т.е. эффективности ФРПЭ между близко расположенными мономерными пептидами/протеинами, меченными донором, и мономерными пептидами/протеинами, меченными акцептором) является компьютерное моделирование случайно распределённых в мембране мономеров, содержащих доноры или акцепторы [229]. В ходе компьютерного моделирования $E_m^{теор}$ определяется путём усреднения эффективности тушения донора в мономерах при помощи акцепторов, связанных с мономерами и находящихся в различных положениях по отношению к донору [229]:

$$E_m^{теор} = \frac{1}{1 + \sum_i (R_0/r_i)^6} \quad (4.2)$$

где r_i – расстояние между донором и i -м акцептором и R_0 – радиус Фёрстера для пары донор/акцептор.

Однако, одним из ограничений такого моделирования является то, что его можно применять только в случае случайного мономеров в плоскости бислоя.

Нами предлагается более простой альтернативный способ оценки вклада тушения близко расположенных мономерных доноров и акцепторов в общую эффективность ФРПЭ при димеризации пептидов/протеинов в мембране, не требующий соблюдения допущения о случайном распределении мономеров, ковалентно меченных флуорофорами, и основанный на сравнении результатов измерений флуоресценции при стационарном возбуждении донора с соответствующими результатами измерений при импульсном возбуждении флуоресценции [230].

Поскольку флуоресценция донора в димерах является почти полностью затухнувшей [226-228] (статическое тушение, см. рис. 4.1), регистрируя время жизни флуоресценции меченных донором мономеров, оставшихся после димеризации, можно оценить эффективность резонансного переноса энергии донора в мономерах (динамическое тушение) при наличии близко расположенных мономеров, меченных акцепторами:

$$E_m^{\tau} = \frac{\tau_{\alpha}^D - \tau_{\alpha}^{DA}}{\tau_{\alpha}^D} \quad (4.3)$$

E_m^{τ} – эффективность ФРПЭ между мономерными пептидами/протеинами, меченными донором, и мономерными пептидами/протеинами, меченными акцептором, τ_{α}^D -и τ_{α}^{DA} – усреднённые по амплитуде времена жизни флуоресценции (затухание флуоресценции описывается суммой экспонент, см. формулу 1.8.) меченных донором мономеров при отсутствии и при наличии акцепторов, соответственно.

Таким образом, скорректированная эффективность Фёрстеровского резонансного переноса энергии ($E^{\text{кор}}$) при использовании предлагаемого экспериментального способа коррекции будет равна: $E^{\text{кор}}_{\text{эксп}} = E^{\text{I}} - E^{\text{M}}_{\text{т}}$.

Предлагаемый способ экспериментальной коррекции ФРПЭ был применён при исследовании димеризации в липидных мембранах молекул пептида FGFR3 (трансмембранного домена фибробластного фактора роста – рецептора 3, имеющего важное значение при развитии синдрома карликовости [226-228]), меченных флуоресцеином (донор) или родамином (акцептор). Флуорофор (флуоресцеин или родамин) ковалентно связывался с 380-м аминокислотным остатком пептида после мутации RRG380R (в ходе мутации глициновый остаток в 380-м положении пептидной цепочки заменялся на аргининовый) [226-228]. Спектры флуоресценции при стационарном возбуждении и кривые затухания флуоресценции меченного флуоресцеином пептида FGFR3 при отсутствии и при наличии эквимольного количества меченного родамином пептида FGFR3 показаны на рис. 4.2 и 4.3, соответственно.

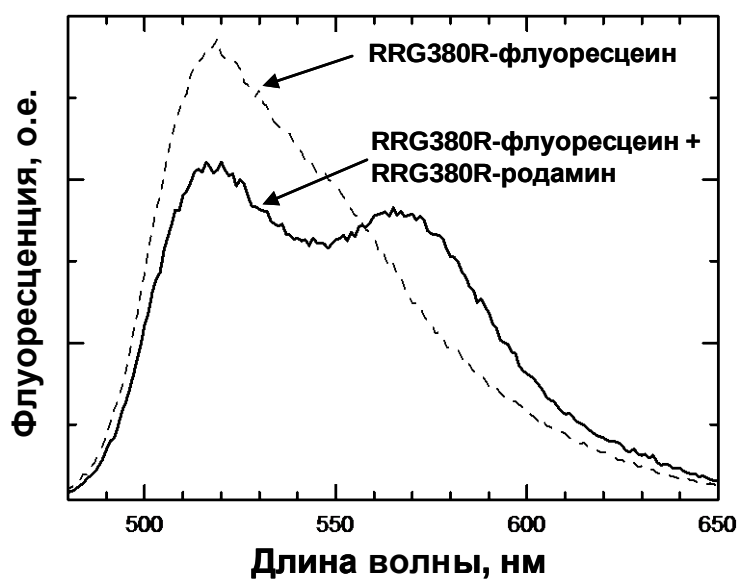


Рис. 4.2. Спектры флуоресценции при стационарном возбуждении (длина волны возбуждения ~ 439 нм) для меченного флуоресцеином или родамином

пептида FGFR3 RRG380R в мембранах: общее количество пептида 0,3% мол. (0,15% мол. RRG380R-флуоресцеин и 0,15% мол. RRG380R-родамин). Спектры были измерены для образца (—), содержавшего смесь пептида, меченного флуоресцеином, и пептида, меченного родамином, а также для контрольного образца (---), содержавшего только меченный флуоресцеином пептид. При наличии акцептора наблюдается уменьшение интенсивности флуоресценции донора (519 нм).

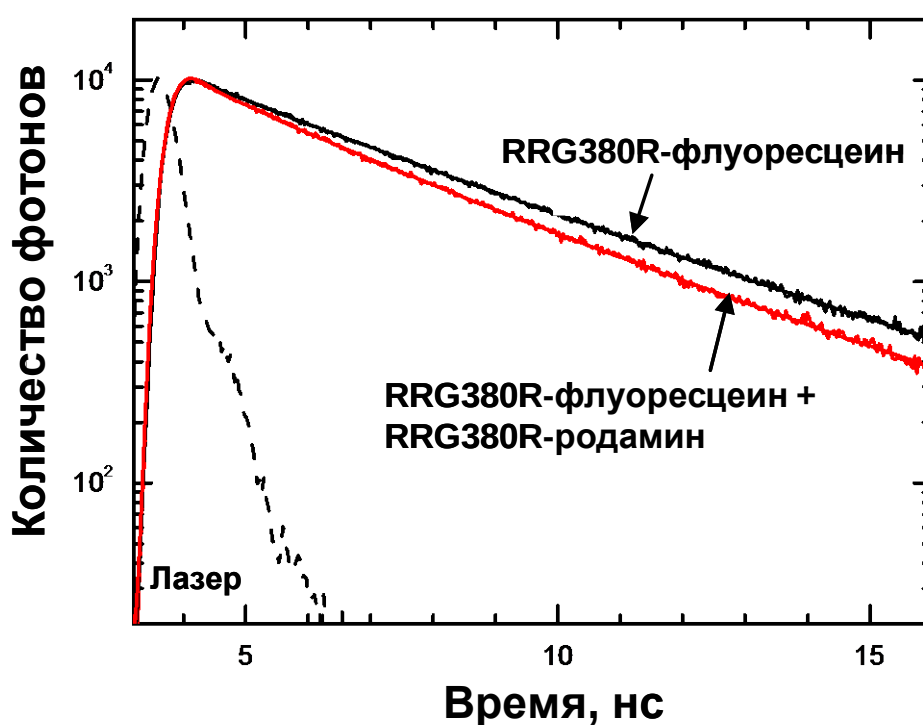


Рис. 4.3. Кривые затухания флуоресценции для меченного флуоресцеином или родамином пептида FGFR3 RRG380R в мембранах, соответствующие спектрам флуоресценции при стационарном возбуждении, представленным на рис. 4.2. Длина волны возбуждения ($\lambda_{\text{возб}}$) ~ 439 нм, длина волны регистрации флуоресценции ($\lambda_{\text{фл.}}$) ~ 519 нм. Наличие акцептора энергии электронного возбуждения (родамин) приводит к уменьшению времени жизни флуоресценции донора (флуоресцеин).

Результаты измерений, полученные при стационарном и импульсном возбуждении флуоресценции представлены в табл. 4.1.

Таблица 4.1

Флуоресценция при стационарном и импульсном возбуждении липидных мембран, содержащих смесь RRG380R-мутантов пептида FGFR3, меченных донором (флуоресцеин) или (акцептором) энергии возбуждения.

Образец	Интенсивность флуоресценции ($\lambda_{\text{фл.}} \sim 519 \text{ нм}$)		Параметры затухания флуоресценции ($\lambda_{\text{возб.}} \sim 439 \text{ нм}, \lambda_{\text{фл.}} \sim 519 \text{ нм}$)				
	$I_{\text{Д}}$	$I_{\text{ДА}}$	$\tau_1, \text{нс}$	α_1	$\tau_2, \text{нс}$	α_2	τ_{α}
0,125%RRG380R_Флуоресцеин	1	-	2,9	0,49	4,7	0,51	3,8
0,04%RRG380R_Флуоресцеин +0,04%RRG380R_Родамин	1	0,91	2,9	0,54	4,7	0,46	3,7
0,15%RRG380R_Флуоресцеин +0,15%RRG380R_Родамин	1	0,75	2,4	0,49	4,3	0,51	3,4

Здесь: $I_{\text{Д}}$ и $I_{\text{ДА}}$ – относительные интенсивности флуоресценции (на длине волны 519 нм) образцов, содержащих только меченные донором (флуоресцеин) пептиды, и образцов, содержащих меченные донором и акцептором (родамин) пептиды, соответственно. Две компоненты времени жизни флуоресценции τ_1 и τ_2 (см. формулу 1.7) представлены с соответствующими амплитудами α_1 и α_2 . τ_{α} – усреднённое по амплитуде время жизни флуоресценции (см. формулу 1.8).

Согласно результатам измерений флуоресценции при стационарном и импульсном возбуждении, представленным в табл. 4.1, добавка меченного акцептором пептида приводит к уменьшению относительной интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении донора, к увеличению вклада короткой компоненты затухания флуоресценции (см. образец с добавкой 0,04%RRG380R_родамин) и к существенному укорачиванию времён жизни флуоресценции τ_1 и τ_2 (см. образец с добавкой 0,15%RRG380R_родамин).

Значения эффективности ФРПЭ (E^I , E_M^τ , $E^{\text{кор}}_{\text{эксп.}}$), определённые на основании данных табл. 4.1 представлены в табл. 4.2.

Таблица 4.2

Эффективность ФРПЭ (E^I , E_M^τ , $E^{\text{кор}}_{\text{эксп.}}$), оцененная по результатам измерений при стационарном и импульсном возбуждении флуоресценции растворов мембран, содержащих смесь RRG380R-мутантов пептида FGFR3, меченных донором (флуоресцеин) или (акцептором) энергии возбуждения.

Образец	E^I	E_M^τ	$E^{\text{кор}}_{\text{эксп.}}$	$E^{\text{кор}}_{\text{теор.}}$ [227]
0,04%RRG380R_ Флуоресцеин +0,04%RRG380R_Родамин	0,09	0,03	0,06	0,06
0,15%RRG380R_ Флуоресцеин +0,15%RRG380R_Родамин	0,25	0,11	0,14	0,14

Эффективность ФРПЭ для меченных донором и акцептором димеров ($E^{\text{кор}}_{\text{эксп.}}$), скорректированная экспериментально, находилась как разность между общей эффективностью ФРПЭ (E^I), оцененной по данным флуоресценции при стационарном возбуждении, и эффективностью ФРПЭ

(E_m^{τ}) между мономерными пептидами/протеинами, меченными донором, и мономерными пептидами/протеинами, меченными акцептором, оцененной по данным флуоресценции при импульсном возбуждении. Относительная погрешность определения E^I , E_m^{τ} и $E_{\text{эксп}}^{\text{кор}}$ составляла менее 1%, 15% и 10%, соответственно. $E_{\text{теор}}^{\text{кор}}$ - эффективность ФРПЭ для меченных донором и акцептором димеров, скорректированная теоретически [227] (см. формулу 4.2).

Согласно данным табл. 4.2, эффективность Фёрстеровского резонансного переноса энергии (E_m^{τ}) между мономерными пептидами/протеинами, меченными донором, и мономерными пептидами/протеинами, меченными акцептором, оцененная (формула 4.3) на основании результатов измерений флуоресценции при импульсном возбуждении, является существенно меньшей, по сравнению с общей эффективностью ФРПЭ (E^I), вычисленной (формула 4.1) на основании данных флуоресценции при стационарном возбуждении.

Как видно из табл. 4.2, экспериментально скорректированные величины эффективности ФРПЭ для меченных донором и акцептором димеров ($E_{\text{эксп}}^{\text{кор}}$) совпали с соответствующими теоретическими величинами $E_{\text{теор}}^{\text{кор}}$. Такое совпадение величин $E_{\text{эксп}}^{\text{кор}}$ с соответствующими величинами $E_{\text{теор}}^{\text{кор}}$, вычисленными в предположении случайного распределения флуорофоров в плоскости бислоя, указывает на обоснованность допущения о случайном распределении мономеров пептида FGFR3 в липидном бислое, использованного в [226-228] для теоретической коррекции величины эффективности ФРПЭ для меченных донором и акцептором димеров этого пептида.

Таким образом, нами предложен способ экспериментальной коррекции в оценке эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии при

изучении самоассоциации пептидов/протеинов в мембранах, основанный на применении флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении. Вышеупомянутый способ использован для проведения экспериментальной коррекции при изучении димеризации пептида FGFR3 в липидных мембранах. В отличие от общепринятого сейчас способа теоретической коррекции [226-228], предложенный способ экспериментальной коррекции является более простым и универсальными – его можно применять даже в случае неравномерного распределения доноров и акцепторов энергии электронного возбуждения в мембране: например, в липидном бислое с фазово-разделёнными липидными доменами; в системах, в которых флуорофоры расположены на заданных расстояниях от поверхности бислоя и т.д.

4.2. Механизмы тушения флуоресценции в меченных органическими флуорофорами гистидин-содержащих пептидах, образующих комплексы с катионами переходных металлов

Для понимания молекулярных механизмов функционирования протеинов требуется точная оценка структурных изменений, происходящих в суб-нанометровой шкале.

Одним из предложенных в литературе подходов для измерения расстояний короче 20 Å является использование Фёрстеровского резонансного переноса энергии для оценки расстояния между донорами энергии электронного возбуждения – ионами лантаноидов (например, Tb³⁺) и акцепторами энергии электронного возбуждения – ионами переходных металлов (например, Cu²⁺, Ni²⁺) [231-236]. Поскольку эффективность ФРПЭ обратно пропорциональна расстоянию между донором и акцептором в шестой степени [126,237-239], можно вычислить расстояние между фрагментами биообъекта, мечеными донором и акцептором.

Динамический характер переноса энергии между ионами лантаноидов и ионами переходных металлов, специфически связанными с биообъектами (ДНК, ионные каналы и т.д.), был подтверждён при помощи данных времени жизни флуоресценции донора [231,232]. Ионы лантаноидов и переходных металлов специфически связываются с ДНК, пептидами, протеинами при помощи вводимых в биообъект хелатных фрагментов (например, LBT [231,233] и гексагистидиновый фрагмент [240,241]).

Taraska et al. [242,243] предложили новую модификацию этого подхода: вместо ионов лантанидов в качестве донора энергии использовать органический люминофор (флуоресцеин, биман), а для связывания с катионами переходных металлов (Cu^{2+} , Ni^{2+}) вместо гексагистидинового фрагмента использовать пептидный/протеиновый фрагмент, содержащий два близкорасположенных гистидиновых аминокислотных остатка, разделённых в полипептидной цепи тремя аминокислотными остатками (т.о. гистидиновые аминокислотные остатки находятся на смежных витках пептидной α -спирали, рис. 4.4).

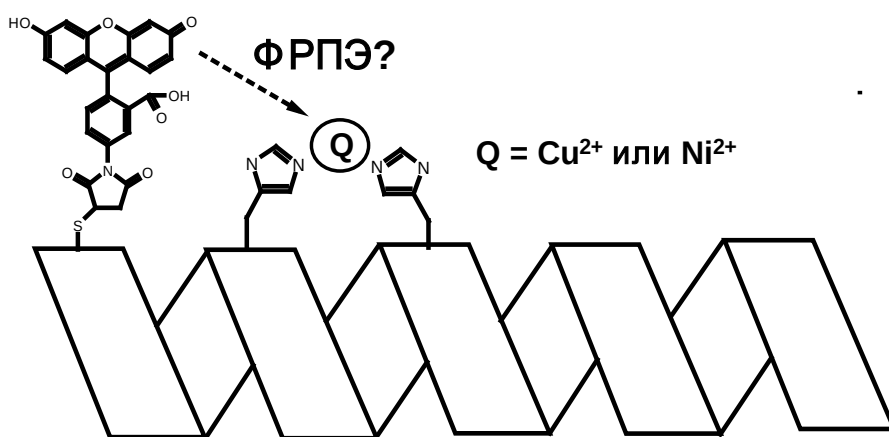


Рис. 4.4. Схема тушения флуоресценции меченного флуоресцеином пептида **C2H6H10** (АСААКНААКНААААКА) при помощи ионов переходных металлов в предположении, что тушение флуоресценции происходит по механизму Фёрстеровского резонансного переноса энергии (Taraska et al [242,243]).

С целью калибровки зависимости эффективности тушения флуоресценции меток (флуоресцеина или бимана) от расстояния до иона переходного металла (Cu^{2+} или Ni^{2+}), связанного с дигистидиновым фрагментом, Taraska et al. [242,243] использовали набор спиральных пептидов, в которых флуорофоры связывались с цистеиновым аминокислотным остатком пептида, а ионы переходных металлов связывались с двумя остатками гистидина, расположенными в различных положениях вдоль пептидной цепочки. При наличии ионов переходных металлов наблюдалось значительное тушение флуоресценции при стационарном возбуждении флуорофоров, связанных с такими пептидами [242,243]. Наблюдаемое тушение флуоресценции при стационарном возбуждении, Taraska et al. [242,243] объяснили реализацией Фёрстеровского резонансного переноса энергии, в рамках которого безызлучательная дезактивация флуорофора происходит по динамическому механизму [126].

Для выяснения природы тушения флуоресценции в упомянутых пептидах, использованных для калибровки зависимости эффективности тушения флуорофора от расстояния до иона переходного металла [242,243], нами была использована флуоресцентная спектроскопия при импульсном возбуждении [244]. Был исследован механизм тушения флуоресценции в конъюгатах флуорофор- $\text{C}_{2\text{H}6\text{N}10}$ (АСААК**Н**ААК**Н**ААААКА) и флуорофор- $\text{C}_{2\text{H}10\text{N}14}$ (АСААКАААК**Н**ААА**Н**КА), в которых флуоресцентный фрагмент (флуоресцеин, биман) был ковалентно связан с цистеиновым остатком в позиции 2, в то время как остатки гистидина находились в положении 6 и 10 (в случае $\text{C}_{2\text{H}6\text{N}10}$) или в положении 10 и 14 (в случае $\text{C}_{2\text{H}10\text{N}14}$) полипептидной цепи.

На начальном этапе исследования нами были воспроизведены приведенные в литературе [242,243] результаты тушения связанных с дигистидиновыми пептидами флуорофоров в условиях насыщения ионами переходных металлов, полученные по данным флуоресценции при

стационарном возбуждении. Полученные нами данные для исследованных пептидов достаточно хорошо совпали с литературными [242,243]. В качестве примера на рис. 4.5 (панели А и Б) приведены результаты тушения флуоресценции при стационарном возбуждении для меченных флуоресцеином или биманом образцов пептида C2H6N10 при наличии ионов переходных металлов (заполненные символы), которые мы сопоставили с данными, приведенными в литературе [242,243], (пустые символы). Хорошее совпадение наших результатов с литературными данными свидетельствует о том, что структурное состояние исследованных нами образцов пептидов не отличалось от такового для пептидов, исследованных Taraska et al. [242,243].

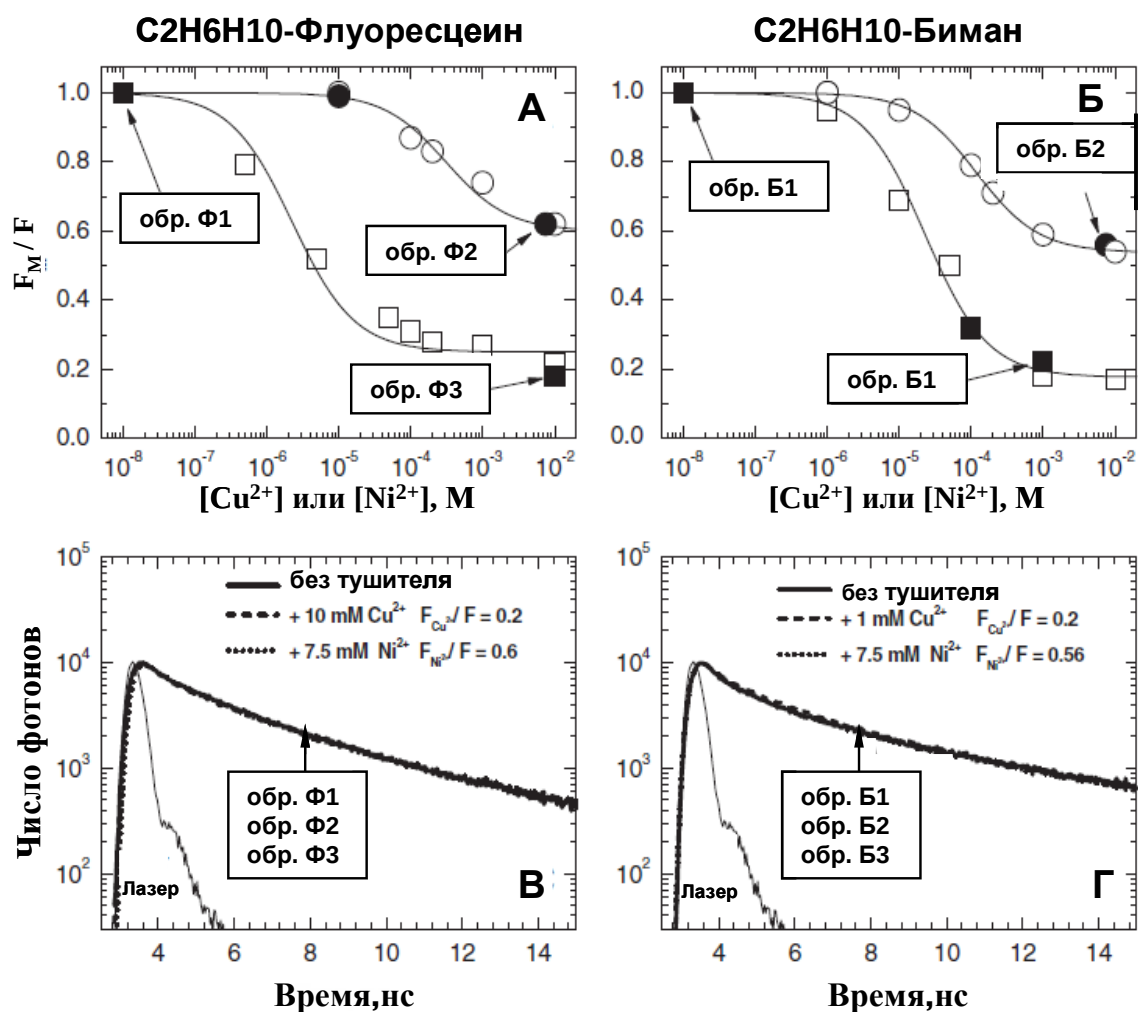


Рис. 4.5. Уменьшение интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении меченных флуоресцеином или биманом образцов пептида

C2H6N10 с ростом концентрации ионов переходных металлов (панели А и Б) и соответствующие кривые затухания флуоресценции (панели В и Г). F и F_M – интенсивности флуоресценции в максимуме флуоресценции флуорофора при наличии и при отсутствии ионов Cu^{2+} или Ni^{2+} . Длины волн при стационарном возбуждении флуоресценции: 470 и 400 нм для флуоресцеина и бимана. Импульсное возбуждение флуоресценции осуществлялось на длине волны 373 нм. Длины волн регистрации флуоресценции: 519 и 500 нм для флуоресцеина и бимана, соответственно.

Меченные флуоресцеином или биманом образцы пептида, использованные нами для измерений флуоресценции при стационарном возбуждении (рис.4.5: обр. Ф1-Ф3 и обр. Б1-Б3), применялись также для измерений кинетики затухания флуоресценции.

На рис.4.5 (панели В и Г) приведены данные кинетики затухания флуоресценции образцов пептида C2H6N10 при отсутствии и при наличии ионов переходных металлов. Несмотря на существенное уменьшение интенсивности флуоресценции в присутствии ионов металлов (F_M/F , см. рис.4.5: панели А и Б), соответствующие кинетические кривые затухания флуоресценции не изменялись даже в условиях насыщения ионами переходных металлов (см. рис.4.5: панели В и Г). Аналогичный результат наблюдался и для меченного флуоресцеином или биманом пептида C2H10N14 (не показано).

Приведенные факты указывают на статический механизм тушения флуоресценции меченных флуоресцеином или биманом дигистидиновых пептидов в присутствии ионов переходных металлов, и, таким образом, указывает на некорректность применения теории Фёрстера для интерпретации результатов тушения флуоресценции связанных с пептидами органических флуорофоров ионами переходных металлов.

Таким образом, нами впервые было показано, что Фёрстеровский резонансный перенос энергии не является механизмом тушения флуоресценции в исследованных гистидин-содержащих пептидах, меченных органическими флуорофорами.

Одним из условий для тушения флуоресценции по статическому механизму является близкое расположение флуорофора и тушителя [126]: если расстояние между ними $\sim 2 \text{ \AA}$, то существует возможность орбитального перекрывания и, следовательно, тушение может происходить по механизму быстрого ($k \geq 10^{11} \text{ с}^{-1}$) переноса электрона. Для исследования насколько флуорофор и дигистидиновый фрагмент пептида C2H6H10, связанный с Cu^{2+} , могут быть близко расположенными друг к другу, нами были построены молекулярные модели Биман-C2H6H10 (рис. 4.6).

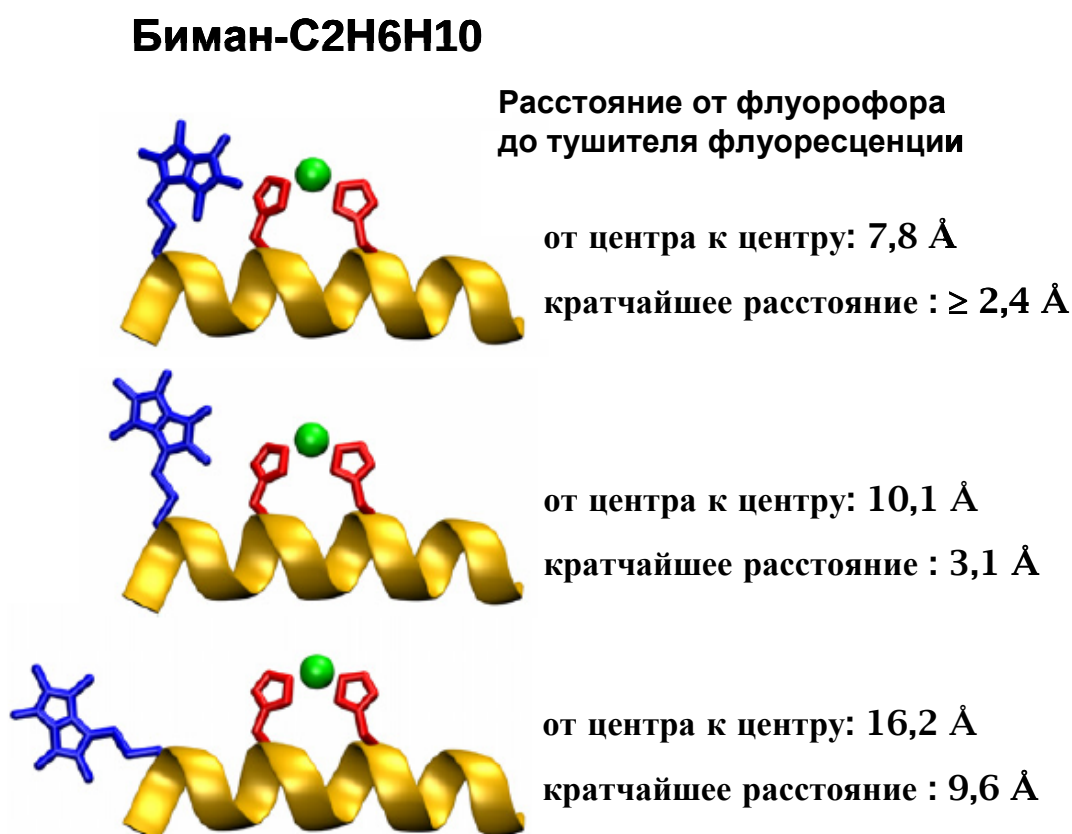


Рис. 4.6. Молекулярные модели Биман-C2H6H10, использованные для выяснения механизма тушения флуоресценции при помощи катионов переходных металлов (Cu^{2+} и Ni^{2+}).

На рис 4.6: биман и пептидная α -спираль построены при помощи пакета программ Molden [245]; положение иона Cu^{2+} и конформации гистидиновых аминокислотных остатков показаны в соответствии с результатами рентгеноструктурного анализа протеинов, связывающихся с Cu^{2+} [246]; энергия начальной конфигурации меченного флуорофором пептида с двумя гистидиновыми аминокислотными остатками, связанными с Cu^{2+} , минимизировалась методом молекулярной механики ММ+, входящим в пакет программ Molden; три панели представляют три структуры с различным положением фрагмента бимана по отношению к гистидиновым аминокислотным остаткам, связанным с ионом Cu^{2+} ; структуры получены вращением вокруг C-S связи, соединяющей биман и пептидную α -спираль; расстояние от центра к центру – расстояние между центром фрагмента бимана и центром иона металла; кратчайшее расстояние между флуорофором и тушителем флуоресценции – расстояние между наиболее близкорасположенными неводородными атомами бимана и гистидинового аминокислотного остатка.

В зависимости от ориентации бимана по отношению к связанному с Cu^{2+} дигистидиновому фрагменту пептида, расстояние между центрами флуорофора и иона (т.е. расстояние от центра к центру, рис.4.6), имеющее принципиальное значение для ФРПЭ, находится в пределах 8-16 Å, и является сравнимым с размером бимана (7,5 Å; длинная ось молекулы) или флуоресцеина (9,7 Å; длинная ось молекулы). Даже если бы тушение флуоресценции происходило по механизму Фёрстеровского резонансного переноса энергии, то, как показано Wong et al. [247], такое малое расстояние между донором и акцептором энергии возбуждения не может быть адекватно оценено при помощи теории Фёрстера, которая описывает взаимодействия точечных диполей [126, 237-239] (т.е. когда размеры диполей значительно меньше расстояния между ними).

Согласно рис. 4.6, кратчайшее расстояние между молекулами (расстояние между гистидиновым аминокислотным остатком и ближайшим к нему атомом углерода бимана), величина которого имеет значение для возможности орбитального перекрывания, приводящего к статическому тушению вследствие переноса электрона к иону металла, может быть довольно коротким ($\sim 2,4 \text{ \AA}$) даже в упрощённых моделях (рис. 4.6), которые не учитывают возможных колебаний и вращений вокруг химических связей. Такое короткое расстояние между гистидиновым аминокислотным остатком и ближайшим к нему атомом углерода бимана хорошо согласуется с наблюдаемым эффективным тушением по статическому механизму.

Для иллюстрации того, как должны были бы выглядеть кинетические кривые для меченного флуоресцеином $C2H6N10$ в случае динамического механизма тушения флуоресценции ионами переходных металлов, было проведено моделирование кинетических кривых, соответствующих результатам измерений флуоресценции при стационарном возбуждении (см. рис. 4.5, панель А). Полученные модельные кривые затухания флуоресценции флуоресцеина, связанного с пептидом $C2H6N10$, рассчитанные в предположении динамического механизма тушения флуоресценции ионами переходных металлов (на основании значений радиусов Фёрстера из [242,243]), приведены на рис. 4.7. Расчитанные теоретически кривые затухания флуоресценции при тушении ионами переходных металлов, представленные на рис. 4.7, заметно отличаются от соответствующих кривых, измеренных экспериментально, см.рис. 4.5.

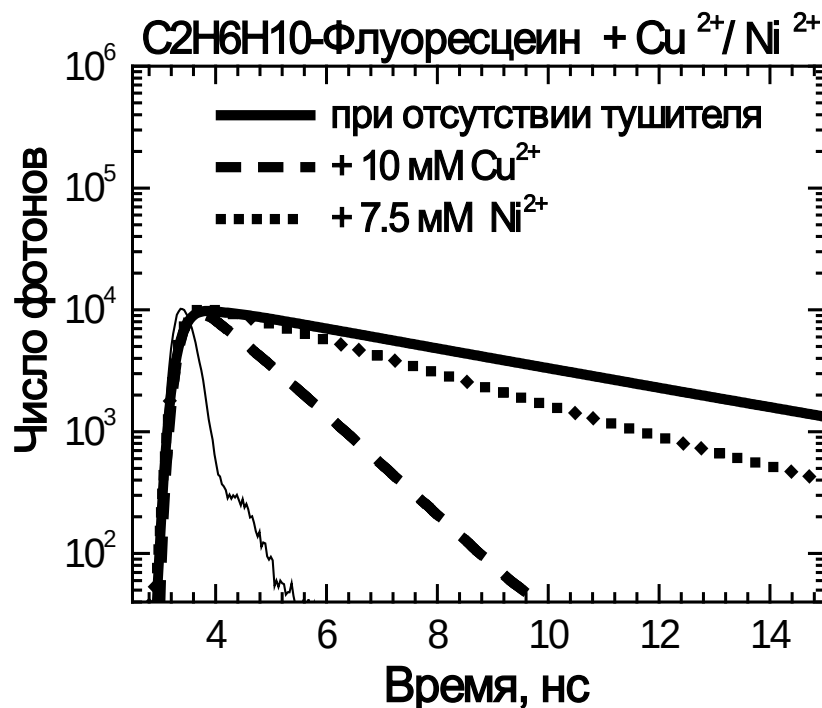


Рис. 4.7. Смоделированные кривые затухания флуоресценции при тушении ионами переходных металлов меченного флуоресцеином пептида C2H6N10 в предположении, что тушение флуоресценции происходит по механизму Фёрстеровского резонансного переноса энергии.

Таким образом, флуоресцентная спектроскопия при импульсном возбуждении была применена нами для исследования механизма тушения флуоресценции в меченных органическими флуорофорами гистидин-содержащих пептидах, образующих комплексы с катионами переходных металлов: впервые установлено, что Фёрстеровский резонансный перенос энергии не является механизмом тушения флуоресценции в подобных гистидин-содержащих пептидных флуоресцентных системах. Полученные сведения о механизме тушения флуоресценции в гистидин-содержащих пептидах имеют значение при проектировании новых флуоресцентных систем для мониторинга структурных изменений в пептидах.

4.3. Водные растворы, содержащие фторированные поверхностно-активные вещества, в качестве среды для исследования мембранных протеинов

Основным затруднением при исследовании фолдинга и стабильности мембранных протеинов является их агрегация за пределами липидного бислоя [47,48]. Для устранения этого затруднения предлагается использовать фторированные поверхностно-активные вещества (ФПАВ), которые, как ожидается, путём устранения агрегации и осаждения мембранных протеинов будут способствовать взаимодействию мембранных протеинов с липидными мембранами [148,170,248]. С другой стороны, ожидается, что способствуя взаимодействию мембранных протеинов с липидными мембранами, ФПАВ не будут нарушать структуру липидного бислоя [148,170,248]. Своим свойством не нарушать структуру липидного бислоя ФПАВ отличаются от других ПАВ, использующихся для извлечения мембранных протеинов из мембран (ПАВ, при помощи которых мембранные протеины извлекают из мембраны, нарушая при этом структуру липидного бислоя, относят к детергентам [148,170,173,175,176,248,249]).

Таким образом, ожидается, что способствуя взаимодействию мембранных протеинов с липидными мембранами и при этом не нарушая структуру липидного бислоя, ФПАВ будут действовать аналогично биологическим шаперонам, т.е. ФПАВ будут являться химическими шаперонами [148,170,248].

Нами было исследована возможность использования ФПАВ (НФТАС, ФТАС-С6, ФТАС-С8 (см. рис. 2.5, раздел 2.2) в качестве химических шаперонов при взаимодействии модельного мембранного протеина (транслокационного домена дифтерийного токсина, см. рис. 1.2, раздел 1) с липидными мембранами.

Поскольку действие транслокационного домена дифтерийного токсина на липидные мембраны связано с образованием поры [10,250], способность ТДТ к взаимодействию с липидными мембранами (т.е. активность ТДТ) оценивалась при помощи флуоресцентного метода детекции мембранного порообразования [251]. Метод основан на использовании липидных везикул, содержащих внутри себя пару флуорофор-тушитель флуоресценции: в качестве флуорофора используется ANTS (рис. 4.8), а в качестве тушителя – DPX (рис. 4.8).

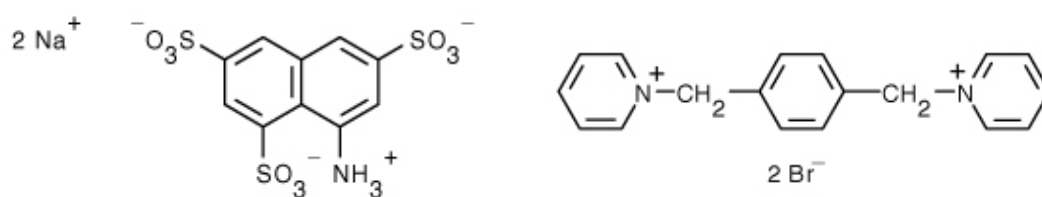


Рис. 4.8. Флуорофор ANTS (слева) и тушителя флуоресценции DPX (справа).

В отсутствие поры в мембране флуоресценция ANTS ($\lambda_{\text{МАКС}} \sim 520$ нм) почти полностью затухает при помощи тушителя флуоресценции DPX, находящегося почти в четырёхкратном избытке по отношению к количеству флуорофора. При образовании поры содержимое везикулы вытекает наружу: за пределами везикулы концентрация тушителя резко уменьшается за счет разбавления, расстояние флуорофор-тушитель увеличивается, что и приводит к возгоранию флуоресценции ANTS. Измеряя кинетику возгорания флуоресценции ANTS при помощи флуоресцентной спектроскопии при стационарном возбуждении можно проводить мониторинг процесса образования пор в липидных мембранах. Для количественной оценки эффективности мембранного порообразования в качестве точки отсчёта принимают интенсивность флуоресценции ANTS на длине волны 520 нм в отсутствие поры в мембране, содержащей ANTS и DPX, а состоянию 100%-ной эффективности порообразования отвечает интенсивность флуоресценции на длине волны 520 нм после полного разрушения везикулы, содержащей ANTS и DPX, при помощи детергента Triton X-100.

Прежде чем оценивать способность ТДЦТ к взаимодействию с липидными мембранами, нами была исследована возможность образования мембранных пор под воздействием ФПАВ (НФТАС, ФТАС-С6, ФТАС-С8), рис. 4.9.

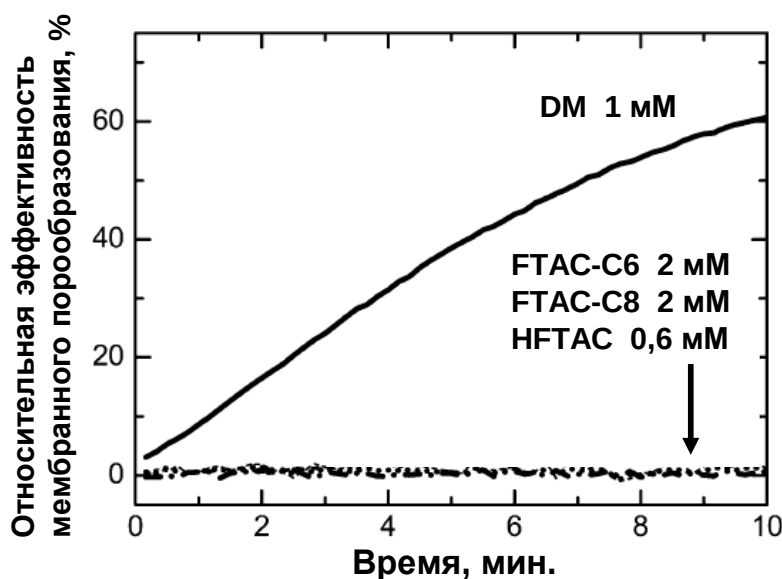


Рис. 4.9. Исследование возможности образования мембранных пор под действием различных поверхностно-активных веществ (ФПАВ и DM). Растворы поверхностно-активных веществ были смешаны с везикулами, содержащими внутри себя флуорофор и тушитель флуоресценции (ANTS и DPX). Об образовании поры судили по изменениям интенсивности флуоресценции флуорофора ANTS ($\lambda_{\text{МАКС}} \sim 520$ нм), происходящим с течением времени, которые нормировали на изменение флуоресценции после полного разрушения везикул с ANTS–DPX в 1% растворе детергента Triton (эффективность мембранного порообразования 100 %). Полученные после смешения растворы содержали 0,2 ммоль липидов и различные количества ФПАВ или DM (ККМ 0,17 мМ).

Как видно из рис. 4.9., даже при 6-10-кратном избытке ФПАВ по отношению к концентрации липида (т.е. при концентрациях НФТАС, ФТАС-С6 и ФТАС-С8 выше их ККМ: 0,03; 0,33; 0,45 мМ, соответственно) образования пор в мембранах, содержавших ANTS и DPX, не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии нарушений структуры липидного бислоя

при наличии ФПАВ. При наличии детергента DM (н-додецил- β -D-мальтопиранозид, ККМ~0,17 мМ), напротив, наблюдается значительное возрастание интенсивности флуорофора ANTS, свидетельствующее о разрушении мембраны под действием данного ПАВ.

Затем, тем же методом детекции мембранного порообразования оценивалась возможность применения ФПАВ для восстановления способности ТДДТ к взаимодействию с липидными мембранами. Для этого мы инкубировали ТДДТ в его мембранно-компетентной форме при низких рН (рН~4,5) при наличии различных количеств ФПАВ и исследовали способность ТДДТ в каждом из приготовленных растворов к мембранному порообразованию путём добавки ТДДТ+ФПАВ (рН 4,5) к раствору везикул (рН 4,5), содержащих ANTS и DPX.

На рис 4.10 приведены результаты оценки относительной эффективности мембранного порообразования, полученные измерением интенсивности флуоресценции ANTS через 20 минут после инициирования процесса порообразования.

При отсутствии ФПАВ при низких рН для ТДДТ характерна агрегация с последующим выпадением в осадок [42,179-181,250,252-254], что объясняет низкую относительную эффективность мембранного порообразования ТДДТ (т.е. низкую активность ТДДТ) при [ФПАВ]=0, рис. 4.10.

Добавка ФПАВ предотвращает агрегацию ТДДТ при рН 4,5 и, таким образом, увеличивает увеличивает способность ТДДТ к взаимодействию с липидными мембранами, рис. 4.10.

Зависимости относительной эффективности мембранного порообразования ТДДТ от мольной концентрации ФПАВ для НФТАС и ФТАС-С6 оказались достаточно похожими, и несколько отличающимися от соответствующей зависимости для ФТАС-С8 (рис. 4.10).

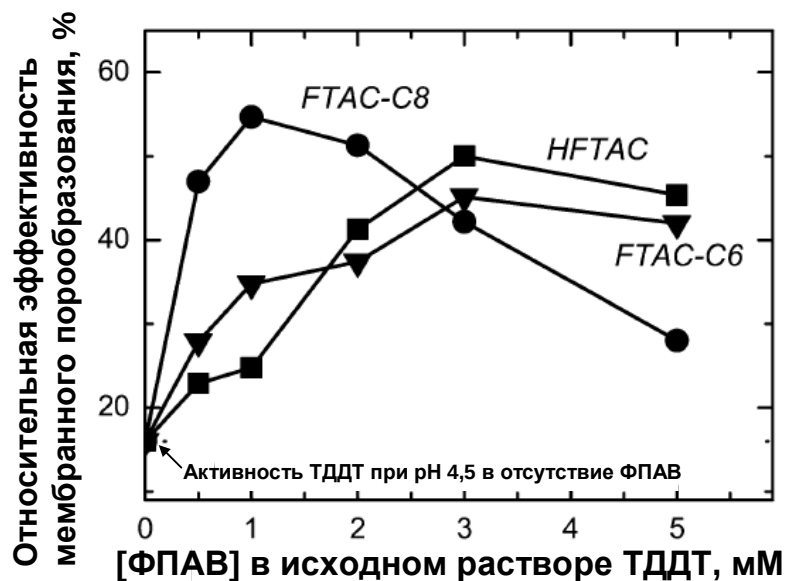


Рис. 4.10. Относительная эффективность мембранного порообразования ТДДТ при отсутствии (точечная линия) и при наличии ФПАВ различного строения при pH 4,5.

Некоторое уменьшение относительной эффективности мембранного порообразования при высоких концентрациях ФПАВ в исходном растворе ТДДТ (рис. 4.10) может объясняться удержанием молекул ТДДТ мицеллами FTAC-C8 в растворах, полученных при смешивании раствора ТДДТ (pH 4,5), содержащего FTAC-C8, с раствором везикул, содержащих ANTS и DPX (концентрация ФПАВ в конечном растворе составляла ~1% от соответствующей концентрации в исходном растворе ТДДТ). Подобного удержания молекул ТДДТ мицеллами не наблюдается в случае HFTAC и FTAC-C6, поскольку их ККМ (0,45 и 0,33 мМ, соответственно) более чем на порядок превышают эту величину для FTAC-C8 (0,03 мМ). Тем не менее, все исследованные ФПАВ в рассмотренном интервале концентраций увеличивают активность ТДДТ (т.е. способность ТДДТ к взаимодействию с липидными мембранами) по сравнению с таковой в отсутствие ФПАВ.

Таким образом, нами было показано, что исследованные ФПАВ (HFTAC, FTAC-C6, FTAC-C8) могут использоваться в качестве химических

шаперонов при взаимодействии модельного мембранного протеина (транслокационного домена дифтерийного токсина) с липидными мембранами.

Идеальный химический шаперон для исследования мембранных протеинов должен обладать следующими свойствами [170,173,176]: (1) устранять агрегацию и выпадение в осадок мембранного протеина при отсутствии липидных мембран; (2) не изменять конформацию мембранного протеина; (3) не связываться с липидной мембраной; (4) удаляться из сольватной оболочки молекулы мембранного протеина во время его встраивания в мембрану.

Нами было проведено исследование нескольких ФПАВ (НФТАС, ФТАС-С6, ФТАС-С8), которые потенциально обладают вышеназванными свойствами идеальных химических шаперонов.

При низких рН для ТДДТ характерна агрегация с последующим выпадением в осадок [42,179-181,250,252-254]. Способность ФПАВ устранять агрегацию и осаждение транслокационного домена дифтерийного токсина была показана при помощи флуоресцентной спектроскопии при стационарном и импульсном возбуждении. Степень агрегации ТДДТ определяли по наличию Фёрстеровского резонансного переноса энергии между молекулами ТДДТ, меченными флуорофором-донором энергии электронного возбуждения (Alexa532, см. раздел 1: рис. 1.4), и молекулами ТДДТ, меченными флуорофором-акцептором энергии электронного возбуждения (Alexa647, см. раздел 1: рис. 1.4).

При отсутствии ФПАВ снижение рН от 7,0 (50 мМ фосфатный буфер) до 4,6 (снижение рН достигалось путём добавления соответствующей аликвоты ацетатного буфера (рН 3,6)) приводит к появлению в спектрах возбуждения смеси ТДДТ-Alexa532 и ТДДТ-Alexa647 полосы возбуждения Alexa647 при 532 нм (максимум поглощения донора Alexa532), которая

свидетельствует о наличии переноса энергии между молекулами ТДДТ-Alexa532 и ТДДТ-Alexa647 (рис. 4.11, панель А).

Таким образом, появление пика при 532 нм в спектре возбуждения Alexa647 (рис. 4.11) может быть использовано в качестве аналитического признака, свидетельствующего об агрегации ТДДТ при низких рН.

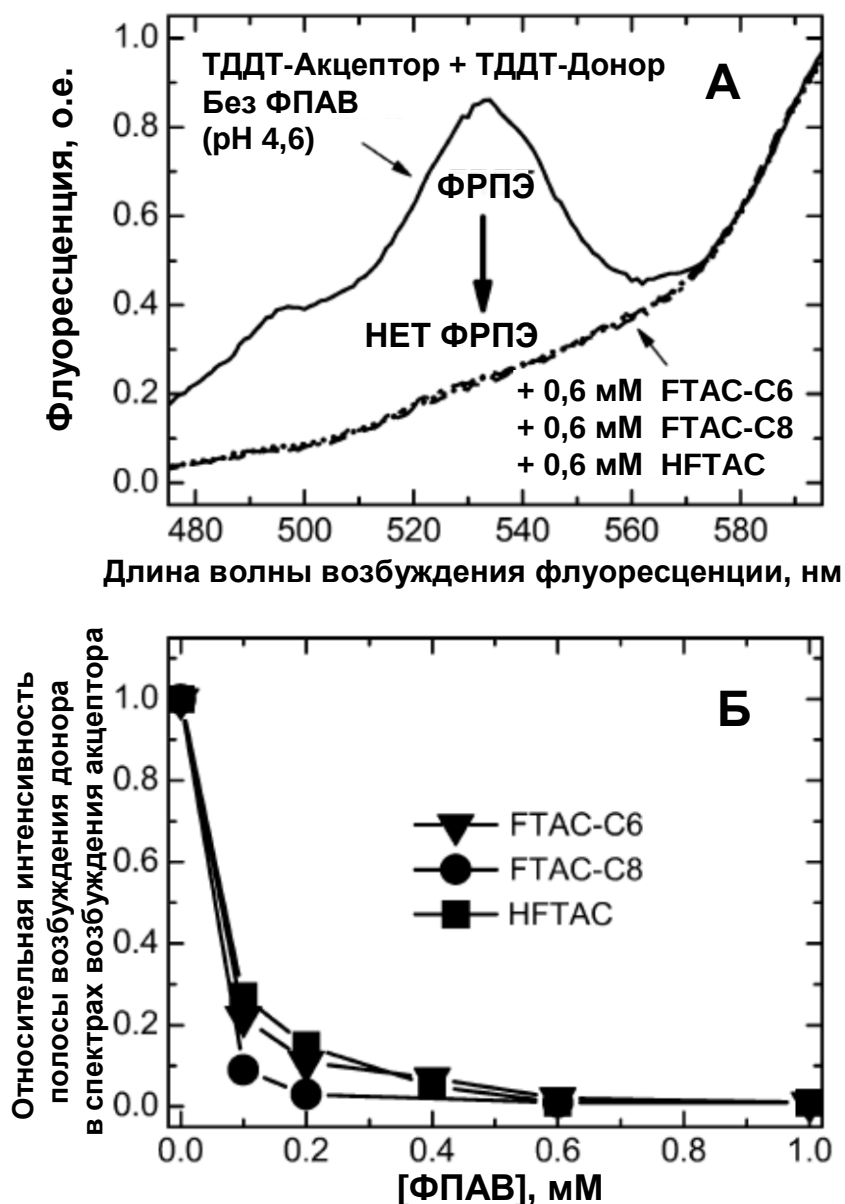


Рис. 4.11. Влияние фторированных поверхностно-активных веществ на образование агрегатов Т-домена дифтерийного токсина оценивали по наличию переноса энергии между молекулами ТДДТ, меченными донором (Alexa532), и молекулами ТДДТ, меченными акцептором (Alexa647). (А) спектры возбуждения смеси ТДДТ-Alexa532 и ТДДТ-Alexa647 при рН 4,6

при отсутствии ФПАВ (сплошная линия) и при наличии 0,6 мМ НФТАС (пунктирная линия), ФТАС-С6 (точечная линия), и ФТАС-С8 (штрих-пунктирная линия). (Б) Зависимость относительной интенсивности полосы возбуждения Alexa532 от концентрации ФПАВ (относительная интенсивность полосы принималась равной 1 при отсутствии ФПАВ и равной 0 для образцов, не содержащих ТДДТ, меченный донором (Alexa532)).

При наличии 0,6 мМ ФПАВ снижение pH с 7,0 до 4,6 не приводит к появлению в спектрах возбуждения смеси ТДДТ-Alexa532 и ТДДТ-Alexa647 полосы возбуждения Alexa647 с максимумом 532 нм (рис. 4.11, панель А), что свидетельствует об отсутствии агрегации ТДДТ.

На рис. 4.11 (панель Б) представлена зависимость относительной интенсивности полосы 532 нм в спектрах возбуждения Alexa647 от концентрации ФПАВ. Все исследованные ФПАВ достаточно хорошо предотвращают агрегацию ТДДТ даже при концентрациях 0,1-0,2 мМ, т.е. ниже их критической концентрации мицеллообразования для НФТАС (ККМ ~ 0,45 мМ) и ФТАС-С6 (ККМ ~ 0,33 мМ).

Обратимость агрегации ТДДТ при добавлении ФПАВ была показана измерением времени жизни флуоресценции зонда Alexa532, связанного с ТДДТ, который находился в смеси с ТДДТ-Alexa647 (рис. 4.12). При pH 7, т.е. при отсутствии агрегации ТДДТ, наблюдается моноэкспоненциальное затухание флуоресценции с временем жизни флуоресценции 3,5 нс (рис. 4.12, (1: pH 7)). При снижении pH в отсутствие ФПАВ (рис. 4.12, (2: pH 4,5)) наблюдается двухэкспоненциальное затухание флуоресценции ТДДТ-Alexa532 с временами жизни флуоресценции 3,5 нс и 1,3 нс и относительными амплитудами 0,59 и 0,41, соответственно. Короткая компонента (1,3 нс) свидетельствует о наличии переноса энергии между донором ТДДТ-Alexa532 и акцептором ТДДТ-Alexa647, и соответствует времени жизни флуоресценции ТДДТ-Alexa532 в составе агрегатов. Добавка

1 мМ ФПАВ НФТАС (рис. 4.12, (3: рН 4,5 + НФТАС)) к раствору, содержащему агрегаты ТДДТ, приводит к восстановлению моноэкспоненциального закона затухания флуоресценции ТДДТ-Alexa532 (3,5 нс), что свидетельствует о переходе агрегированных молекул ТДДТ в мономерное состояние под действием ФПАВ.

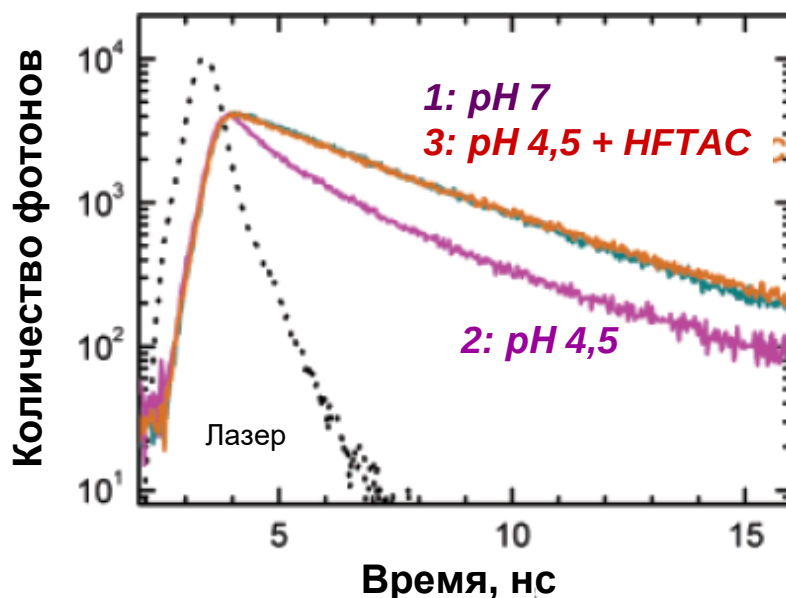


Рис. 4.12. Кинетика затухания флуоресценции (сплошные линии) для смеси ТДДТ-Alexa532 и ТДДТ-Alexa647: (1) в водном 50 мМ фосфатном буферном растворе при рН 7; (2) после снижения рН до 4,5 при добавлении аликвоты ацетатного буфера; (3) после добавки 1 мМ НФТАС к образцу с рН 4,5. Длина волны возбуждения ($\lambda_{\text{возб}}$) $\sim$ 504 нм, длина волны регистрации флуоресценции ($\lambda_{\text{фл.}}$) $\sim$ 550 нм.

Для исследования влияния ФПАВ на вторичную структуру транслокационного домена дифтерийного токсина нами использовалась спектроскопия кругового дихроизма [171,172], основанная на измерении способности оптически активного хромофора по-разному поглощать поляризованный по кругу вправо и влево свет в зависимости от длины волны [221]. Об изменениях вторичной структуры протеина судят по изменениям

формы спектра кругового дихроизма и по интенсивности КД сигнала (т.н. молярной эллиптичности (θ)) [221].

Спектры кругового дихроизма ТДДТ при наличии и при отсутствии ФПАВ, измеренные при температуре 293°К, показаны на рис. 4.13.

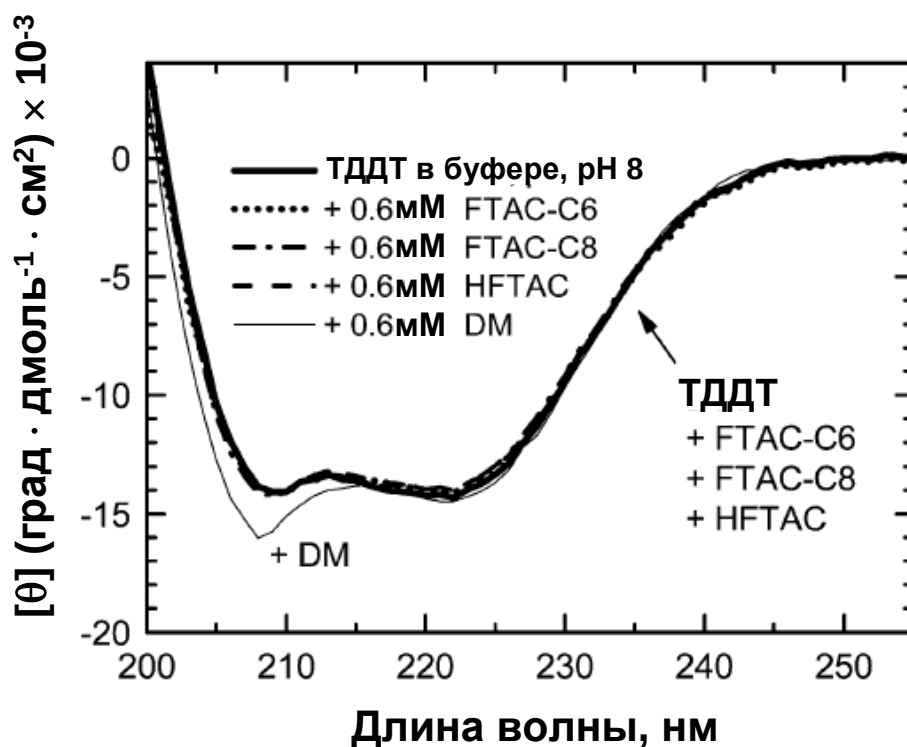


Рис. 4.13. Спектры кругового дихроизма 5 мкМ раствора транслокационного домена дифтерийного токсина при pH 8, 293°К. ТДДТ в буферном водном растворе (50 мМ фосфатный буфер), не содержащем ФПАВ (сплошная жирная линия) и при наличии 0,6 мМ поверхностно-активных веществ: HFTAC (пунктирная линия), FTAC-C6 (точечная линия), и FTAC-C8 (линия штрих-точка) и детергента DM (тонкая сплошная линия).

При pH 8,0 даже при концентрациях ФПАВ выше их ККМ (которые для FTAC-C8, FTAC-C6 и HFTAC составляют 0,03 мМ, 0,33 и 0,45 мМ, соответственно [173,175,176,249]) исследованные фторированные поверхностно-активные вещества не вызывают изменений вторичной структуры ТДДТ: форма спектра КД и интенсивность КД-сигнала не зависят от наличия ФПАВ. Напротив, детергент DM в концентрации 0,6 мМ (ККМ

0,17 мМ), по своей природе не относящийся к ФПАВ, приводит к изменению формы КД-спектра ТДДТ, что свидетельствует о изменении вторичной структуры этого протеина под влиянием данного ПАВ. Похожее изменение формы спектра КД наблюдалось для ТДДТ и в растворе додецил сульфата натрия (SDS) (не показано).

Таким образом, при помощи спектроскопии кругового дихроизма транслокационного домена дифтерийного токсина при температуре 293°К при наличии и при отсутствии фторированных поверхностно-активных веществ было показано, что ФПАВ не приводят к значительным изменениям вторичной структуры ТДДТ.

Отсутствие мембранного порообразования в системе ТДДТ-ФПАВ-везикулы (рис. 4.9) ещё не исключает возможности связывания самих ФПАВ с липидной мембраной без образования мембранной поры. Кроме того, можно предположить, что ФПАВ могут также взаимодействовать и с протеином, уже встроенным в липидные мембраны.

Для экспериментальной проверки предположения о возможности связывания ФПАВ с липидными мембранами, использовались фторированные поверхностно-активные соединения НФТАС, ФТАС-С6 и ФТАС-С8, помеченные зондом Oregon Green 488 (рис. 4.14). Поскольку полярный зонд Oregon Green 488 ковалентно присоединялся к полярным участкам ФПАВ, наличие зонда не должно было приводить к изменению характера межмолекулярных взаимодействий ФПАВ.

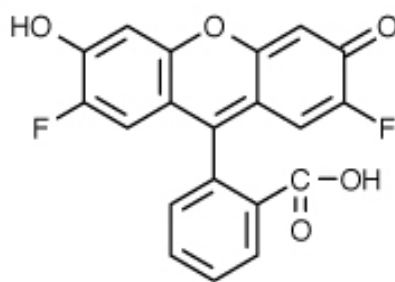


Рис. 4.14. Зонд Oregon Green488.

Флуоресцентная корреляционная спектроскопия [111-117,255], использовалась нами для оценки мобильности меченных флуорофором ФПАВ. Автокорреляционные кривые для HFTAC-Oregon Green488 представлены на рис. 4.15. Измеряемые образцы содержали 3 нМ HFTAC, меченного Oregon Green, смешанные с 50 мкМ немеченого HFTAC.

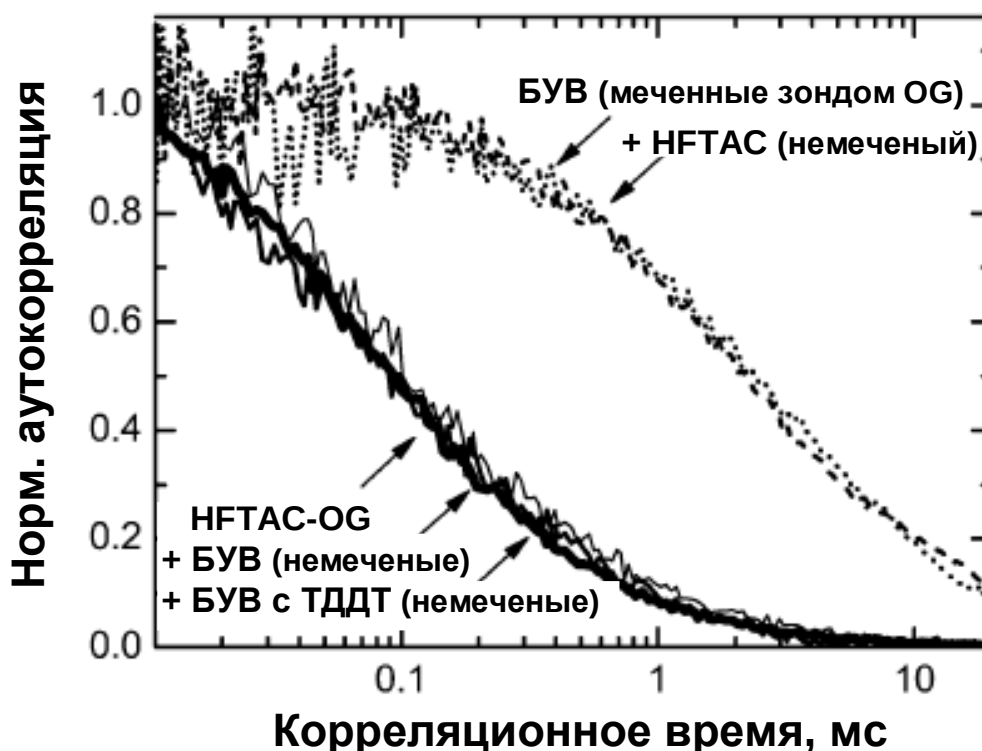


Рис. 4.15. Автокорреляционные кривые для HFTAC, меченого зондом Oregon Green488 (т.е. для HFTAC-OG) и для больших униламелярных везикул, содержащих липиды, меченые зондом Oregon Green488 (OG).

Автокорреляционная кривая для HFTAC-Oregon Green488 при наличии липидных мембран (жирная сплошная линия, рис. 4.15) совпадает с автокорреляционными кривыми для HFTAC-Oregon Green488 при отсутствии 0,5 мМ липидных везикул (сплошная линия, рис. 4.15) или при наличии липидных везикул с встроенным в них ТДДТ (тонкая сплошная

линия, рис. 4.15) и соответствует корреляционному времени $\sim 0,09$ мс. Отсутствие изменений мобильности HFTAC-Oregon Green488 при наличии липидных мембран указывает на то, что HFTAC не связывается с липидными мембранами, поскольку если бы это происходило, то аутокорреляционная кривая должна была бы сдвигаться в сторону кривой для липидных везикул, меченных зондом Oregon Green488, в отсутствие ФПАВ (пунктирная линия, рис. 4.15), а корреляционное время – возрастать. Аналогичное отсутствие изменений мобильности при наличии липидных мембран было зарегистрировано для FTAC-C6 и FTAC-C8, меченных Oregon Green488 (не показано).

Также нами была исследована возможность элиминирования липидов с поверхности везикул при наличии избытка ФПАВ. На рис. 4.15 показаны аутокорреляционные кривые для 50 мкМ липидных везикул, меченных зондом Oregon Green488, при отсутствии ФПАВ (пунктирная линия) и при наличии 1 мМ HFTAC (точечная линия). Если бы происходило элиминирование липидов с поверхности везикул, меченных зондом Oregon Green488, то аутокорреляционная кривая, соответствующая смеси везикул и элиминированных липидных фрагментов везикул, должна была бы сдвигаться в сторону аутокорреляционной кривой для HFTAC-Oregon Green488 без мембран (жирная сплошная линия, рис. 4.15), а соответствующее корреляционное время должно было бы уменьшаться. Однако, как видно из рис. 4.15, аутокорреляционные кривые для липидных везикул, меченных зондом Oregon Green488, при отсутствии ФПАВ (пунктирная линия) и при наличии HFTAC (точечная линия) соответствуют корреляционному времени $\sim 2,14$ мс. Отсутствие изменений мобильности липидных мембран, меченных зондом Oregon Green, при 20-кратном избытке HFTAC свидетельствует о том, что даже такое значительное преобладание HFTAC не приводит к элиминированию липидов из мембран. Аналогично, отсутствие изменений мобильности липидных мембран, меченных зондом

Oregon Green488, было также зарегистрировано и для 20-кратного избытка FTAC-C6 или FTAC-C8 (не показано).

Таким образом, при помощи флуоресцентной корреляционной спектроскопии было показано, что ФПАВ не связываются с липидными мембранами и не приводят к элиминированию липидов с их поверхности.

Поскольку ФПАВ связываются с ТДДТ в растворе, но не связываются с Т-доменом дифтерийного токсина, когда он встроен в мембрану, можно предположить, что молекулы ФПАВ будут удаляться из ближайшей сольватной оболочки протеина во время процесса его встраивания в липидную мембрану. Это предположение было проверено экспериментально: разрушение ассоциата ФПАВ-ТДДТ должно приводить к уменьшению эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии между молекулами FTAC-C6, меченными донором энергии электронного возбуждения (Oregon Green488, рис. 4.15), и молекулами ТДДТ, меченными акцептором энергии возбуждения (Alexa647).

При наличии липидных мембран (75ФХ:25ФГ БУВ) в условиях снижения рН от 7,0 (50 мМ фосфатный буфер) до 4,6 (подкисление раствора достигалось добавлением аликвоты ацетатного буфера с рН 3,6) в спектрах возбуждения флуоресценции смеси Oregon Green-FTAC-C6 и ТДДТ-Alexa647 наблюдается уменьшение интенсивности слабо структурированной полосы с колебательными подмаксимумами при 465 нм и 485 нм донора (Oregon Green488), когда аналитическая длина волны, выбранная для записи спектра, соответствует максимуму испускания Alexa647. Это свидетельствует об уменьшении эффективности резонансного переноса энергии между молекулами ТДДТ-Oregon Green488 и ТДДТ-Alexa647 (рис. 4.16).

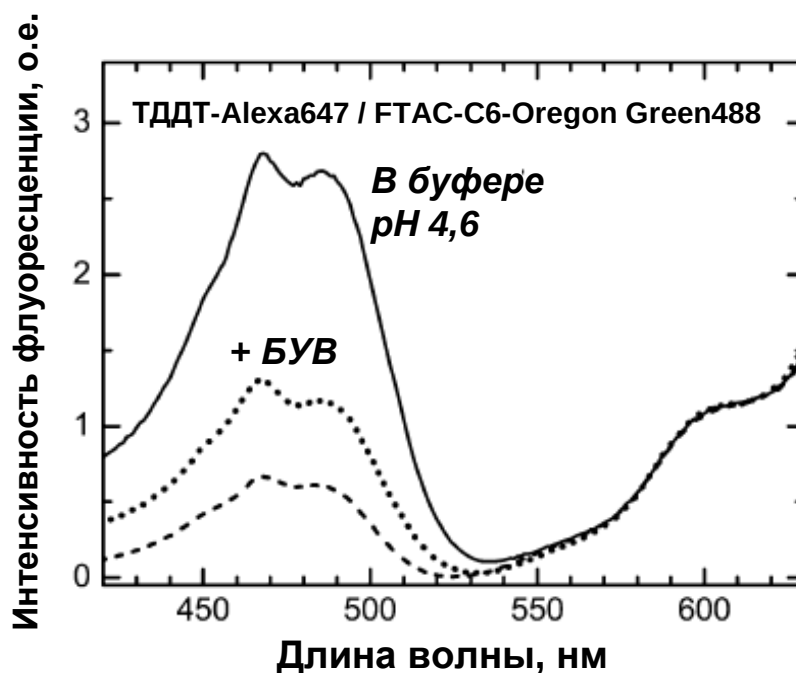


Рис. 4.16. Спектры возбуждения смеси 0,5 мМ ТДДТ, меченных зондом Alexa647 (акцептор), и 0,4 мМ FTAC-C6, содержащего 1% FTAC-C6-OG (OG – Oregon Green488, донор энергии возбуждения), в буферном растворе без мембран (сплошная линия) и после добавления 0,5 или 2 мМ больших униламелярных везикул (точечная и штриховая линии, соответственно).

Отмеченное уменьшение эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии, в свою очередь, доказывает, что при встраивании ТДДТ в липидную мембрану происходит удаление ФПАВ из ближайшей сольватной оболочки белковой молекулы.

Таким образом, комплексное применение набора методов оптической спектроскопии, а именно: спектроскопии кругового дихроизма, флуоресцентной корреляционной спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии при стационарном возбуждении, Фёрстеровского переноса энергии и метода флуоресцентной детекции мембранного порообразования, – впервые позволило показать, что фторированные поверхностно-активные вещества обладают свойствами химических шаперонов для Т-домена

дифтерийного токсина и могут использоваться в качестве среды для исследования мембранных протеинов.

4.4. Набор флуоресцентных зондов для исследования изменений физико-химических свойств липидных мембран

Со времени первого применения Григорио Вебером 1-анилин-8-нафталинсульфонат-аниона (АНС) для флуоресцентного зондирования биообъектов (в 50-х годах прошлого века [256]), появилось огромное количество флуоресцентных зондов, информация о которых приведена в статьях [257-260], книгах [261-263] и каталогах [110]. В последние два десятилетия в качестве флуорофоров для мечения биообъектов всё чаще начали использоваться флуоресцирующие протеины [264-272], которые при применении соответствующей биотехнологии клонируются самой исследуемой клеткой, что открыло возможность применения флуоресцентной спектроскопии для исследования клеточных процессов *in vivo*.

Однако, несмотря на разнообразие имеющихся флуоресцентных зондов, решение различных исследовательских задач при изучении тех или иных биообъектов или биологических процессов зависит от оптимального выбора конкретного флуорофора и наличия соответствующей методики, учитывающей особенности исследуемого биообъекта или биологического процесса. Это является движущей силой не прекращающегося поиска новых флуоресцентных зондов и методик их применения, позволяющих наилучшим образом исследовать те или иные специфические биологические объекты или процессы.

Флуоресцентные зонды, чувствительные к свойствам среды, как правило, характеризуются протеканием того или иного внутримолекулярного процесса в возбуждённом состоянии, который

регулируется природой их ближайшего микроокружения: например, внутримолекулярного фотопереноса заряда [263,273-284] или внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП) [285-288].

Как показал анализ литературы, в последнее десятилетие появились новые, чувствительные к свойствам среды флуоресцентные зонды на основе производных 3-гидроксифлавона, в которых в качестве процесса, чувствительного к параметрам среды, выступает ВМФПП [287-289]. Обсуждаемые зонды являются радиометрическими, т.е. величина соотношения интенсивностей по крайней мере двух их полос флуоресценции зависит от изменения параметров среды [290,291]. Некоторые из радиометрических флуоресцентных зондов на основе 3-гидроксифлавона были применены для оценки электростатического потенциала поверхности и трансмембранного потенциала липидных мембран [292-294], для определения степени гидратации модельных липидных мембран [295,296], в ходе исследований клеточных мембран при апоптозе [297,298], для исследования изменений структуры липопротеиновых частиц HBsAg, являющихся основой антигепатитовой вакцины [299].

Важной областью применения метода флуоресцентных зондов является исследование физико-химических свойств (полярности, вязкости, гидратированности) липидных мембран [261-263]. Проведение такого исследования основано на том, что в основе целого ряда патологических состояний (сердечно-сосудистые, гормональные нарушения, онкозаболевания) лежат изменения физико-химических свойств клеточных мембран, вызванные как факторами внешней среды (действие токсинов, облучение, изменение температуры и т.д.), так и внутренними функциональными изменениями (апоптоз и т.д.) или функциональными расстройствами (нарушение клеточного метаболизма и т.д.) [261-263].

В зависимости от типа внутриклеточного процесса или характера внешнего воздействия на клетку, изменения в мембранах могут происходить

в различных областях липидного бислоя. Например, при апоптозе происходят изменения гидратированности во внешних (полярных) областях липидного бислоя [297], в то же время, токсическое действие циклических углеводов (циклоалканов, ароматических углеводов) на микроорганизмы приводят к изменениям внутренних (гидрофобных) областей липидного бислоя [300].

Однако, как показал анализ литературных данных [261-263,292-298], подавляющее большинство исследований липидных мембран методом флуоресцентных зондов проводятся при помощи какого-то одного отдельно взятого флуоресцентного зонда, локализованного либо в более полярных, либо в более гидрофобных областях липидного бислоя. Подобный подход с использованием только одного флуоресцентного зонда не даёт достаточно полную информацию о локальных изменениях физико-химических свойств мембран, также с использованием единичного зонда невозможно заметить изменения физико-химических свойств липидных мембран, происходящие вне области его локализации.

Для детекции изменений физико-химических свойств в различных (как в относительно полярных, так и в более гидрофобных) областях клеточных или модельных липидных мембран автором [301] решено было составить набор из нескольких однотипных радиометрических флуоресцентных зондов, в котором в качестве зондов впервые используются орто-гидроксипроизводные 2,5-дифенил-1,3-оксазола, 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола, характеризующиеся протеканием ВМФПП, а также родственный им 2-фенил[9,10]фенантроксазол: при составлении набора зондов было решено выбрать флуорофоры, различающиеся по своей липофильности для того, чтобы области их локализации в мембране были различными. Кроме того, использование набора флуоресцентных зондов с различной локализацией в липидном бислое мембран позволяет повысить достоверность оценки

изменений структуры и физико-химических свойств липидных мембран [301].

Предложенный набор зондов [301] включает шесть флуорофоров (рис. 4.17): пять орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3-оксазола (рис. 4.17: **4.1-4.3**) или 1,3,4-оксадиазола (рис. 4.17: **4.4**, **4.5**), а также 2-фенил[9,10]фенантроксазол (рис. 4.17: **4.6**).

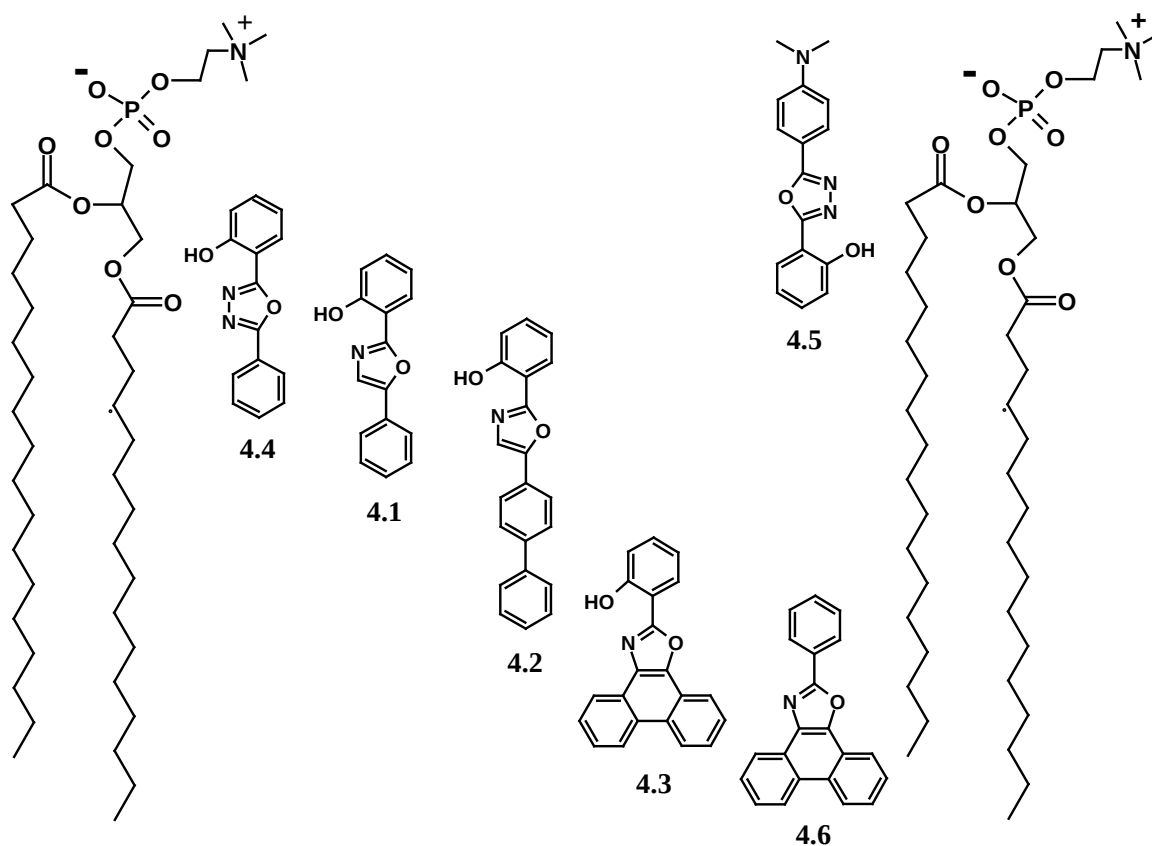


Рис. 4.17. Наиболее вероятная локализация и ориентация молекул флуоресцентных зондов обсуждаемого набора во внешнем липидном слое (относительно составляющих его молекул фосфатидилхолина).

Перечисленные зонды различаются по своей липофильности (рис. 4.17): значения LogP [302-304], вычисленные для **4.1**, **4.2**, **4.3**, составляют $4,4 \pm 0,4$; $6,1 \pm 0,63$ и $6,7 \pm 0,6$; соответственно. Предположение о локализации и ориентации молекул флуоресцентных зондов в фосфолипидных мембранах (рис. 4.17) было сделано на основании их флуоресцентных свойств в липидном бислое [305-308] и структурного сходства с флуоресцентными

зондами, локализация которых известна [261-263]: например, зонды **4.3** и **4.6** содержат фенантреновый фрагмент, локализующийся в наименее полярных (наиболее липофильных) областях мембраны [261-263], а достаточно полярный зонд **4.5** (дипольный момент $\mu \sim 5,2$ Д, расчёт по методу AM1 [309]) содержит диметиламиногруппу, подобно полярным зондам (**Prodan**, **DMX** и т.п. [262-263]), локализующимся в наиболее полярных областях липидной мембраны.

Ожидаемая локализация флуоресцентных зондов в мембранах [301,306-308] показана на рис. 4.17: зонд **4.5** (2-(2'-ОН-фенил)-5-(4'-N(CH₃)₂-фенил)-1,3,4-оксадиазол, локализуется в области полярных головок фосфолипидов и в области глицериновых остатков фосфолипидов; зонд **4.4** (2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3,4-оксадиазол) – в области глицериновых остатков фосфолипидов; зонд **4.1** (2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3-оксазол) – в области глицериновых остатков фосфолипидов (ближе к центру липидного бислоя), в области карбонильных групп фосфолипидов и в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов, прилегающих к области карбонильных групп; зонд **4.2** (2-(2'-ОН-фенил)-5-(4'-фенил-фенил)-1,3-оксазол) – в области карбонильных групп фосфолипидов и в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов (вблизи полярной части бислоя); зонд **4.3** (2-(2'-ОН-фенил)-9,10-фенантр-1,3-оксазол) – в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов (вблизи центра бислоя) и в центре липидного бислоя мембран; зонд **4.6** (2-фенил[9,10]фенантроксазол) – в центре липидного бислоя мембран.

В возбужденном состоянии для орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3-оксазола (R=CH) и 1,3,4-оксадиазола (R=N) характерно протекание реакции внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП) [310-313].

Результатом ВМФПП является образование фототаутомерной формы (T*), флуоресцирующей в существенно более длинноволновой области (в

диапазоне 450-640 нм) по сравнению с исходной, т.н. «нормальной» (N^*) формой (диапазон флуоресценции: 340-450 нм), рис. 4.18-4.19.

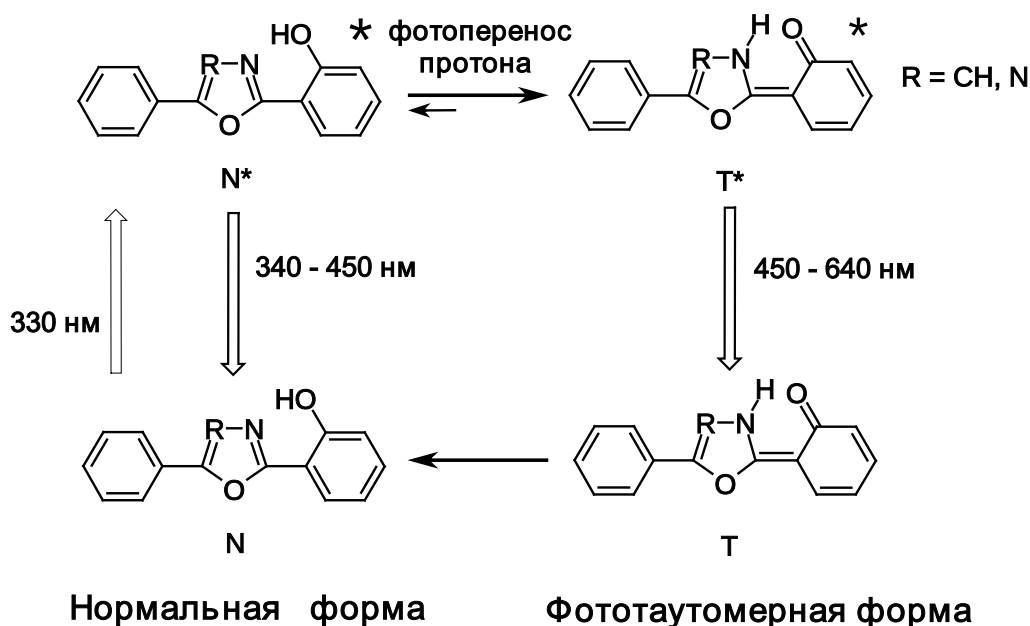


Рис. 4.18. Основное (внизу) и возбуждённое (вверху) электронные состояния орто-гидрокси производных 2,5-диарил-1,3-оксазола ($R=CH$) и 1,3,4-оксадиазола ($R=N$). Стрелка, направленная вверх, обозначает электронное возбуждение, а стрелки, направленные вниз – флуоресценцию. Около соответствующих стрелок приведены диапазоны испускания исходной и фототаутомерной форм (нм).

В качестве параметра, характеризующего изменения физико-химических параметров (полярность, вязкость, гидратированность) микросреды в случае **4.1-4.4** можно использовать соотношение интенсивностей флуоресценции их нормальной и фототаутомерной форм (I_{T^*}/I_{N^*}) [305-308,310-313], т.е. соединения **4.1-4.4** являются ратиометрическими флуоресцентными зондами [294,297].

Ратиометрические флуоресцентные зонды имеют несколько преимуществ по сравнению с традиционными флуорофорами: использование ратиометрических флуоресцентных зондов даёт возможность исключить как погрешности измерений, обусловленные девиацией концентрации

флуорофора (например, при его неравномерном содержании в различных мембранах), так и погрешности измерений, обусловленные девиацией настроек флуоресцентной техники (девиации интенсивности источника возбуждающего излучения, изменения в фокусировке, изменения в чувствительности фотодетектора и т.д.) [294,297].

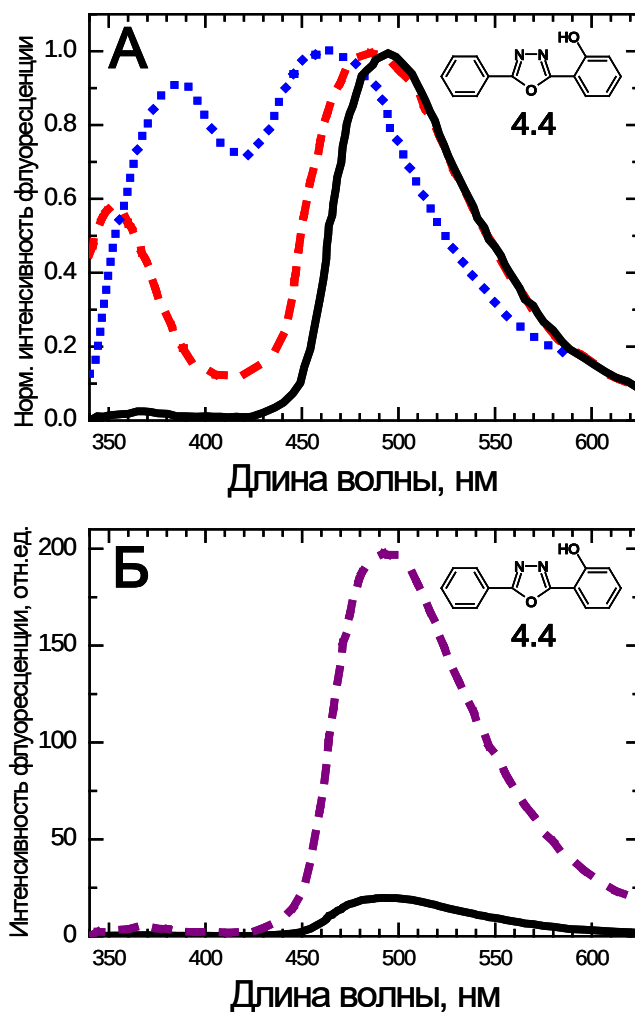


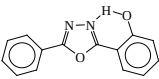
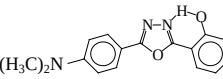
Рис. 4.19. Спектры флуоресценции зонда **4.4**: (А) нормализованные спектры в различных растворителях [311] – в октане (сплошная линия), в ацетонитриле (пунктирная линия), в воде (точечная линия); (Б) в октане (сплошная линия), в полистирольной плёнке (штриховая линия) [312].

В случае зонда **4.4**, при возрастании полярности и протонодонорной способности среды происходит относительное увеличение интенсивности

полосы флуоресценции нормальной формы по отношению к соответствующей интенсивности полосы флуоресценции фототаутомера [311,313] (рис. 4.19 (А)), т.о. происходит уменьшение величины соотношения I_{T^*}/I_{N^*} (табл. 4.3)

Таблица 4.3.

Спектральные характеристики зондов 4.4 и 4.5 (*орто*-гидрокси производных 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола) в октане, толуоле, ацетонитриле и смеси 5 об.% ацетонитрила и 95 об. % воды

Зонд		Растворитель	λ_{abs} , нм	$\lambda_{fl}^{N^*}$, нм	$\lambda_{fl}^{T^*}$, нм	I_{T^*}/I_{N^*}	$\tau_{fl}^{T^*}$, нс	Φ_f
4.4		Октан	326	365	503	52,5	0,18	0,021
		Толуол	316	358	501	25,0	0,30	0,010
		Ацетонитрил	312	358	500	1,8	-	0,010
		5 об. % ACN+ 95 об. % H ₂ O	-	385	464	1,1	-	0,002
4.5		Октан	331	388	503	1,4	0,22	0,013
		Толуол	331	405	503	0,44	0,26	0,036
		Ацетонитрил	329	447	-	-	-	0,051
		5 об. % ACN+ 95 об. % H ₂ O	-	-	-	-	-	< 10 ⁻⁴

λ_a - положение максимума длинноволновой полосы поглощения, $\lambda_f(N^*, T^*)$ - то же для полос флуоресценции нормальной формы и фототаутомера, I_{T^*}/I_{N^*} - отношение интенсивностей полос флуоресценции таутомерной и нормальной форм, $\tau_f^{T^*}$ - время жизни фототаутомерной формы (нс), Φ_f - суммарный квантовый выход флуоресценции нормальной и фототаутомерной форм. ACN – ацетонитрил. H₂O – вода.

Флуоресценция **4.4** характеризуется низким квантовым выходом в воде, который увеличивается в апротонных растворителях, например, до $\Phi_f \sim$

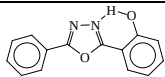
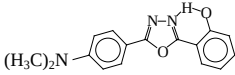
0,021 в октане, что на порядок превышает аналогичный показатель в воде ($\phi_f \sim 0,002$).

Для зонда **4.5** в полярной среде ацетонитрила наблюдается только одна полоса флуоресценции нормальной формы ($\lambda_{\max}=435$ нм). Квантовые выходы флуоресценции **4.5** в апротонных растворителях (табл. 4.3) в сотни раз выше чем его квантовый выход в водном растворе ($\phi_f < 10^{-4}$).

Увеличение вязкости микроокружения зонда **4.4** приводит как к абсолютному увеличению интенсивности флуоресценции фототаутомера [312] (табл. 4.4), так и к относительному увеличению интенсивности флуоресценции фототаутомера по отношению к соответствующей интенсивности нормальной формы (рис. 4.17. (Б)).

Таблица 4.4.

Спектральные характеристики зондов 4.4 и 4.5 (*орто*-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола) в полистирольных пленках

Зонд	Структура	ν_f^{N*}	ν_f^{T*}	τ_f^{T*}	ϕ_Σ
4.4		365	503	2,65	0,39
4.5		388	503	2,3	0,32

Здесь ν_f^{N*} , ν_f^{T*} - положения полос испускания нормальной и фототаутомерной форм (см^{-1}), τ_f^{T*} - время жизни фототаутомерной формы (нс), ϕ_Σ - суммарный квантовый выход флуоресценции нормальной и фототаутомерной форм [312].

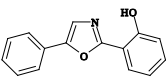
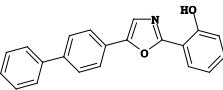
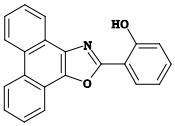
Увеличение интенсивности флуоресценции зондов **4.4** и **4.5** в полимерной среде сопровождается почти десятикратным увеличением времени жизни флуоресценции фототаутомерной формы **4.4** и **4.5** (табл. 4.4) по сравнению с соответствующими значениями в жидких растворах (табл. 4.3). Отмеченные изменения могут быть объяснены уменьшением

вероятности высокоамплитудных внутримолекулярных колебаний в возбуждённых фототаутомерных формах орто-гидроксипроизводных в полимерной среде [312,314,315].

В случае зондов **4.1-4.3** соотношение I_{T^*}/I_{N^*} уменьшается с ростом протонодонорной способности и полярности среды [310,313] (табл. 4.5).

Таблица 4.5.

Спектральные характеристики зондов 4.1-4.3 (орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3,4-оксазола) в октане, толуоле, ацетонитриле и смеси 5 об.% ацетонитрила и 95 об. % воды

Зонд	Структура	Растворитель	λ_{abs} , нм	$\lambda_{fl}^{N^*}$, нм	$\lambda_{fl}^{T^*}$, нм	I_{T^*}/I_{N^*}	$\tau_{fl}^{T^*}$, нс	Φ_f
4.1		Октан	328	367	492	210	0,96	0,227
		Толуол	329	371	490	360	1,80	0,242
		Ацетонитрил	327	374	489	41	-	0,124
		5 об. % ACN+ 95 об. % H ₂ O	-	410	481	3	-	-
4.2		Октан	349	383	498	9	0,39	0,069
		Толуол	351	383	497	22	0,55	0,112
		Ацетонитрил	349	389	492	7	-	0,033
		5 об. % ACN+ 95 об. % H ₂ O	-	430	490	3	-	-
4.3		Октан	338	387	491	5	0,23	0,246
		Толуол	340	392	490	18	0,39	0,286
		Ацетонитрил	337	397	490	2,8	-	0,175
		5 об. % ACN+ 95 об. % H ₂ O	-	425	490	1,3	-	-

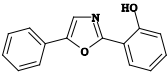
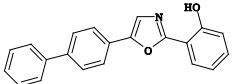
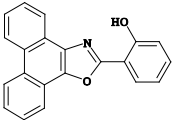
λ_a - положение максимума длинноволновой полосы поглощения, $\lambda_f(N^*, T^*)$ - то же для полос флуоресценции нормальной формы и фототаутомера, I_{T^*}/I_{N^*} - отношение интенсивностей полос флуоресценции таутомерной и нормальной форм, $\tau_f^{T^*}$ - время жизни фототаутомерной формы (нс), Φ_f -

суммарный квантовый выход флуоресценции нормальной и фототаутомерной форм. ACN – ацетонитрил. H₂O – вода.

Аналогично случаю зондов **4.4** и **4.5**, для соединений **4.1-4.3** наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции в полимерной среде, которое также сопровождается значительным увеличением времени жизни флуоресценции фототаутомерной формы **4.1-4.3** [313] (табл. 4.6) по сравнению с соответствующими значениями в жидких растворах [310,313] (табл. 4.5). Отмеченные изменения могут быть вызваны уменьшением вероятности процессов тушения, связанных с высокоамплитудными внутримолекулярными колебаниями в возбуждённых фототаутомерных формах орто-гидроксипроизводных в полимерной среде [312,314,315].

Таблица 4.6.

Спектральные характеристики зондов 4.1-4.3 (орто-гидроксипроизводных 2,5-диарил-1,3,4-оксазола) в полистирольных пленках

Зонд	Структура	ν_f^{N*}	ν_f^{T*}	τ_f^{PT} , нс	ϕ_Σ
4.1		367	493	3,35	0,48
4.2		386	497	2,33	0,45
4.3		386	491	3,19	0,49

Здесь ν_f^{N*} , ν_f^{T*} – положения полос испускания нормальной и фототаутомерной форм (см⁻¹), τ_f^{T*} – время жизни фототаутомерной формы (нс), ϕ_Σ – суммарный квантовый выход флуоресценции нормальной и фототаутомерной форм [312].

Поскольку увеличение гидратации липидного бислоя приводит к увеличению протонодонорной способности и полярности мембранной среды

[316,317], а также приводит к уменьшению вязкости мембранной среды [318,319], при помощи зондов **4.1-4.5** можно оценивать изменение степени гидратации липидных мембран.

Форма спектра флуоресценции зонда **4.6** зависит от протонодонорной способности среды (рис. 4.20): в протонных растворителях интенсивность колебательного максимума $\lambda = 365$ нм полосы флуоресценции снижается, а интенсивность колебательного максимума $\lambda = 403$ нм – возрастает [308].

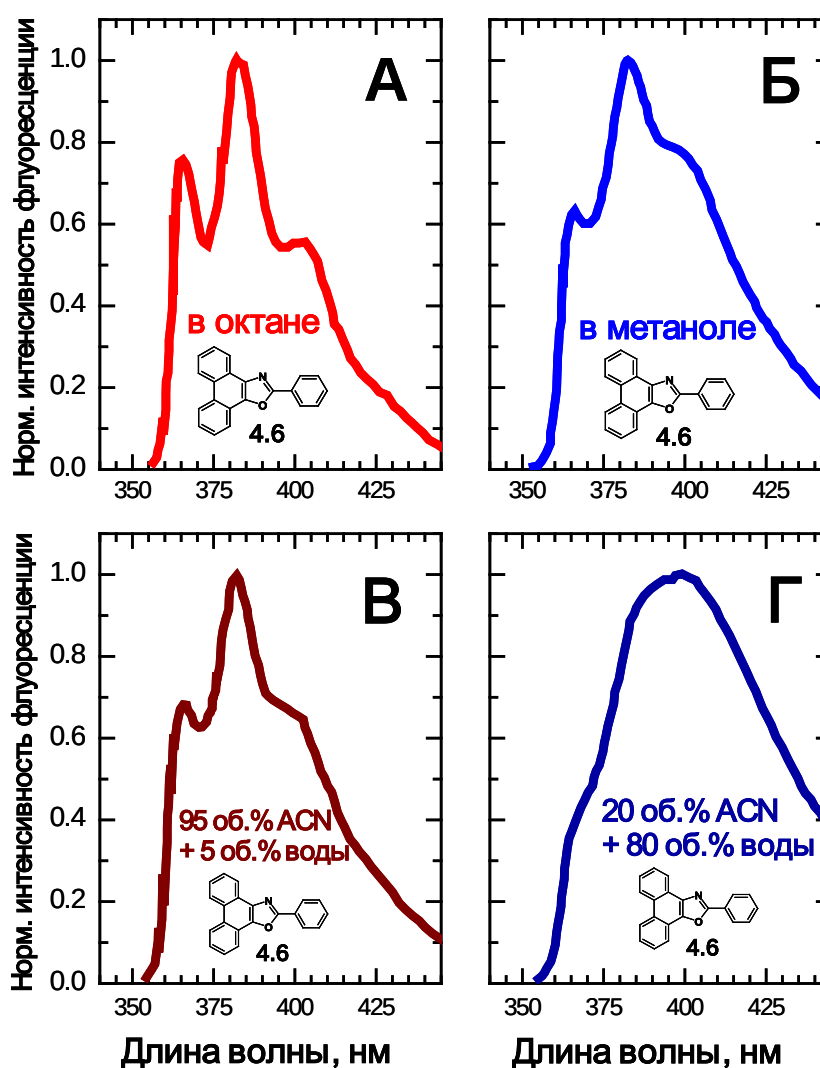


Рис. 4.20. Нормализованные спектры флуоресценции зонда **4.6** в различных растворителях: (А) в октане, (Б) в метаноле, (В) в ацетонитриле с добавкой

воды (95 об.% ацетонитрила и 5 об. % воды), (Г) в смеси 20 об.% ацетонитрила и 80 об. % воды.

Соотношение интенсивностей колебательных максимумов 365 нм и 403 нм (I_{365}/I_{403}) полосы флуоресценции зонда **4.6** изменяется в протонных растворителях: в апротонном октане (рис. 4.20) $I_{365}/I_{403} = 1,33$, в протонных метаноле и этаноле, а также в смеси 95 об.% ацетонитрила и 5 об. % воды I_{365}/I_{403} составляет 0,87; 0,89 и 1,05; соответственно. В водной среде максимум спектра флуоресценции **4.6** сдвигается в длинноволновую область по сравнению с соответствующим параметром для **4.6** в органических растворителях (рис. 4.20), колебательная структура спектра **4.6** в смеси 80 об. % воды и 20 об. % ацетонитрила является слабо выраженной, при этом $I_{365}/I_{403} = 0,44$.

Таким образом, зонд **4.6** может использоваться для оценки изменений степени гидратированности его микроокружения.

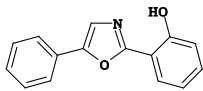
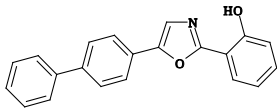
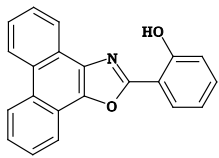
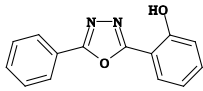
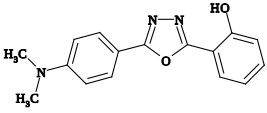
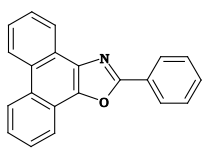
Нами были проведены измерения флуоресценции зондов предлагаемого набора в водных растворах, содержащих липидные везикулы на основе фосфатидилхолина и холестерина размером 40-50 нм, с различным соотношением холестерол/фосфолипиды (молярную долю холестерина варьировали от 0 до 50%) [305].

Здесь и далее флуоресцентные зонды набора растворяли в ацетонитриле до начальной концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М. Приготовленные растворы добавляли в количестве 10 мкл к 2 мл суспензии искусственных (или природных) мембран. Конечная концентрация зонда в суспензии исследуемых везикул (или клеток) составляла $1 \cdot 10^{-6}$ М. Плотность везикул (клеток) в суспензии для каждого из зондов была одинаковой (плотность везикул (клеток) в суспензии характеризовалась величиной пропускания (%T), при котором учитывалось рассеяние света: пропускание света через суспензию мембран на длине волны 400 нм находилось в пределах 56-57%).).

Мольное соотношение липид/зонд составляло не менее 1000:1. После внесения зондов суспензию везикул (или клеток) подвергали 60-минутной инкубации с зондами, затем измеряли их спектры флуоресценции (в диапазоне 340-630 нм) при длине волны возбуждения 330 нм. Результаты измерений представлены в табл. 4.7.

Таблица 4.7

Флуоресцентные характеристики предложенного набора зондов в липосомах на основе фосфатидилхолина с добавками холестерина

Зонд	Формула	$\lambda_{анал}$	Интенсивность флуоресценции			
			Вода	Липосомы с содержанием холестерина*		
				0%	25%	50%
4.1		486 нм	270	900	1300	1500
4.2		490 нм	60	370	500	580
4.3		425 нм	130	70	80	70
		494 нм	170	200	260	290
4.4		510 нм	3	26	38	42
4.5		435 нм	7	140	190	210
4.6		384 нм	60	700	1300	1600

*мольная доля холестерина в мембране; относительная погрешность значений интенсивности флуоресценции составляет менее 5%.

Как видно из данных табл. 4.7, интенсивность флуоресценции зондов **4.1-4.6** в водных растворах, не содержащих липидных везикул, значительно ниже, чем при наличии липосом. Такое увеличение интенсивности флуоресценции исследованных зондов вызвано их попаданием из амфипротной, полярной, невязкой водной среды в апротонную, малополярную и вязкую среду биологической мембраны: уменьшение гидратированности среды приводит к возгоранию флуоресценции зонда **4.5**; при уменьшении полярности среды происходит увеличение интенсивности флуоресценции зондов **4.1-4.4**; увеличение вязкости среды приводит к увеличению интенсивности флуоресценции зондов **4.1-4.5** вследствие уменьшения эффективности процессов безызлучательной дезактивации в фототаутомерной форме, возможно связанных с торсионным вращением 2-фенильного фрагмента относительно плоскости молекулы [312,314,315].

Ещё одной причиной увеличения интенсивности флуоресценции зондов после инкубации с липидными везикулами может являться уменьшение числа молекул зондов, выпавших в осадок за 1 час инкубации с мембранами, по сравнению с числом молекул зондов, выпавших в осадок за время инкубации в буфере без мембран (осаждение молекул зондов после добавления их ацетонитрильных растворов к буферу происходит вследствие низкой растворимости зондов в воде (< 1 мкМ)). Например, интенсивность флуоресценции **4.6** в липидных везикулах более чем в 12 раз выше соответствующей интенсивности этого зонда в буфере без мембран (табл. 4.7, рис. 4.21), в то же время, интенсивность флуоресценции **4.6** не зависит от полярности и протонности среды, и при переходе в вязкую среду может увеличиваться не более чем в 2 раза: квантовый выход **4.6** достаточно высокий как в аполярном апротонном октане ($\phi \sim 0,52$ [320]), так и в полярной протонной среде – в смеси 80 об.% воды и 20 об.% ацетонитрила ($\phi \sim 0,56$ [320]). Следовательно, наблюдаемое многократное увеличение интенсивности флуоресценции зонда **4.6** при наличии мембран главным

образом обусловлено увеличением количества молекул зонда, связавшихся с липофильными мембранами, и, таким образом, оставшихся в растворе.

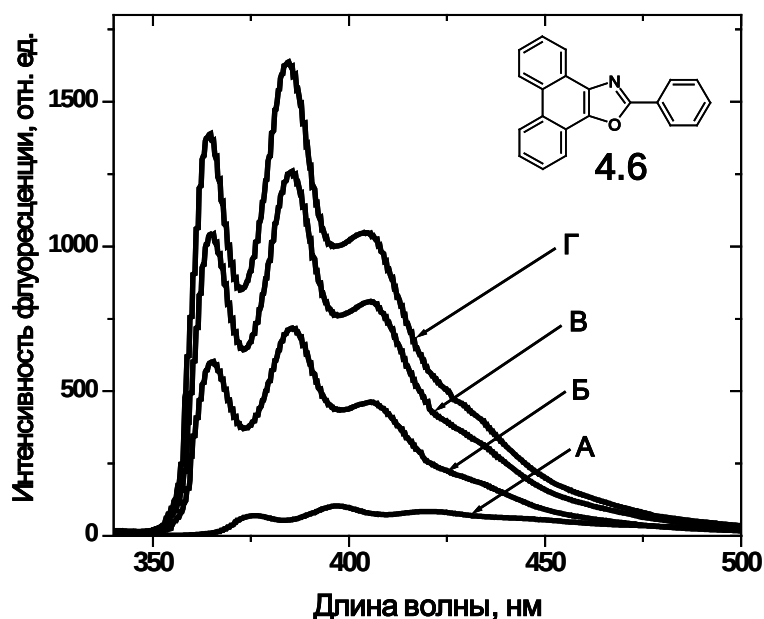


Рис. 4.21. Спектры флуоресценции зонда 4.6 в водном растворе: (А) не содержащем липидных везикул; (Б) содержащем липидные везикулы с молярной долей холестерина 0%; (В) содержащем липидные везикулы с молярной долей холестерина 25%; (Г) содержащем липидные везикулы с молярной долей холестерина 50%.

Зонды набора могут использоваться для оценки изменений липидного состава мембран: интенсивность флуоресценции зондов в липидных везикулах возрастает с увеличением содержания в них холестерина (табл. 4.7). Отмеченный рост интенсивности флуоресценции всех зондов набора хорошо согласуется с литературными данными [316-319], свидетельствующими о том, что увеличение содержания холестерина приводит к изменениям в гидратации, полярности и вязкости мембран. С увеличением содержания холестерина упорядоченность мембранных липидов возрастает (т.е. уменьшается мембранная текучесть) [318,319]. Такое возрастание упорядоченности затрудняет вращательные движения

молекул фосфолипидов. Поэтому микровязкость, как мера фрикционного сопротивления к вращательным и поступательным движениям молекул, возрастает. Также холестерол способствует дегидратации липидного бислоя [316,319] и, вследствие возрастания микровязкости, замедляет динамику релаксации воды в липидном бислое. Уменьшение гидратации липидного бислоя и снижение скорости релаксации растворителя, в свою очередь, приводит к снижению полярности бислоя [317].

Таким образом, предложенный набор зондов, состоящий из шести флуорофоров (4.1-4.6), может использоваться для оценки изменений степени гидратации липидных мембран и изменений липофильности клеточных или модельных мембран при изменении их липидного состава.

4.4.1. Определение патологических изменений в мембранах тромбоцитов пациентов с сосудистой патологией головного мозга

Предложенный набор флуоресцентных зондов использовался нами для мониторинга патологических изменений физико-химических свойств мембран тромбоцитов у пациентов с сосудистой патологией головного мозга.

Наиболее частыми этиологическими факторами различных сосудистых заболеваний являются гипертоническая болезнь и атеросклероз.

Атеросклероз - хроническое заболевание артерий эластического и мышечно-эластического типа, возникающее вследствие нарушения липидного обмена и сопровождающееся отложением холестерина и некоторых фракций липопротеидов на внутренней поверхности кровеносных сосудов. Отложения формируются в виде атероматозных бляшек. Последующее разрастание в них соединительной ткани (склероз) и кальциноз стенки сосуда приводят к деформации и сужению просвета вплоть до закупорки (облитерации) сосуда [321,322].

Визуализация патологических изменений при развитии атеросклероза является одной из важных целей для улучшения диагностики этого заболевания [323-330].

Одним из способов визуализации патологических изменений, вызванных атеросклерозом, является применение флуоресцентных методов [261,262,331]. Флуоресцентные методы используются для диагностики атеросклероза, тромбоза и других заболеваний сосудов [261,262,331]. Для выявления атеросклероза при помощи флуоресценции чаще всего исследуют стенки сосудов (выявление атеросклеротических бляшек), макрофаги, протеазы, липопротеины [332].

Поиск новых биологических объектов для спектроскопической визуализации патологических изменений при развитии атеросклероза является важным для дальнейшего изучения и улучшения диагностики этого заболевания [332].

В качестве биологического объекта для спектроскопической визуализации патологических изменений, вызванных атеросклерозом, нами были выбраны мембраны тромбоцитов. Как известно, тромбоциты принимают участие в процессе отвердевания артерий (атеросклероз) [333]. Тромбоциты транспортируют свободный холестерол к моноцитам, которые играют ведущую роль в образовании пенистой клетки (т.е. когда моноциты превращаются в макрофаги) [334] и, таким образом, участвуют в образовании атеросклеротических бляшек. Также установлено, что соотношение холестерол/фосфолипиды в мембранах тромбоцитов возрастает у больных с сосудистыми нарушениями атеросклеротического генеза [334,335].

Поскольку в литературе отсутствует информация об использовании флуоресцентных зондов для детекции патологических изменений в тромбоцитах при развитии атеросклероза, было решено провести экспериментальный поиск таких флуоресцентных зондов.

Принимая во внимание эффект увеличения содержания холестерина в мембранах тромбоцитов при атеросклерозе [334,335], а также тот факт, что увеличение содержания холестерина в липидных мембранах приводит к изменениям в гидратации, полярности и вязкости мембран [316-319], для детекции патологических изменений в тромбоцитах, возникающих при сосудистой патологии головного мозга, нами были отобраны флуоресцентные зонды, чувствительные к изменениям гидратации, полярности и вязкости их окружения.

При помощи флуоресцентных зондов исследовались мембраны тромбоцитов пациентов с атеросклеротическим или гипертоническим генезом дисциркуляторной энцефалопатии: пациентов с гипертонической болезнью (группа 1), пациентов с церебральным атеросклерозом (группа 2), людей без сосудистой патологии (контрольная группа). Тромбоциты получали из цитратной плазмы (1:9) центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут с последующей отмывкой физиологическим раствором и повторным центрифугированием в тех же условиях и диспергированием в 0,15 М фосфатном буфере (рН 7). Измерение спектров флуоресценции производилось через 60 минут после добавления зондов к суспензиям тромбоцитов.

На первом этапе исследования нами были протестированы широкоизвестные флуоресцентные зонды, традиционно применяемые для мониторинга содержания холестерина в липопротеинах [261,262]: 1-анилино-4-нафталинсульфо кислота (1,4-ANS), 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриен (DPH) и 4-диметиламинохалкон (ДМХ). Флуоресцентные характеристики 1,4-ANS зависят от физико-химических свойств его окружения: полярности, вязкости, способности к образованию водородных связей. Флуоресцентные характеристики ДМХ чувствительны к изменениям степени гидратации и вязкости его окружения. Флуоресцентные характеристики DPH чувствительны к изменениям вязкости его окружения. 1,4-ANS и ДМХ

локализуются в полярной области липидной мембраны, DPH локализуется в гидрофобных областях липидной мембраны [261,262].

Однако, было установлено, что за 1 час инкубации с мембранами тромбоцитов DPH и ДМХ практически не встраиваются в мембраны: возрастание интенсивности флуоресценции этих зондов оказалось незначительным (табл. 4.8). Такая низкая скорость встраивания DPH и ДМХ в мембраны тромбоцитов не позволяет использовать эти зонды в медико-биологических исследованиях тромбоцитов. Следует отметить, что в литературе [261,262] имеются сведения и о других случаях низкой скорости встраивания в мембраны зонда DPH.

Таблица 4.8

**Флуоресцентные характеристики зондов 1,4-ANS, DPH и ДМХ
после 1 часа инкубации с мембранами тромбоцитов**

Образец	Интенсивность флуоресценции, отн.ед.		
	1,4-ANS	DPH	ДМХ
	$\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} = 440 \text{ нм}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} = 440 \text{ нм}$	$\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}} = 585 \text{ нм}$
Буфер	27	6	6
Контрольная группа	341	7	13
Группа 1 (гипертоническая болезнь)	342	7	7
Группа 2 (церебральный атеросклероз)	313	15	10

Здесь $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$ – максимум в спектре флуоресценции. Относительная погрешность приведенных значений составляет менее 10%.

1,4-ANS успешно встраивается в мембраны тромбоцитов за 1 час инкубации, однако этот зонд не показывает большого различия между тромбоцитами контрольной группы и тромбоцитами пациентов с сосудистой патологией головного мозга (Рис. 4.22, табл. 4.8): уменьшение

интенсивности флуоресценции в максимуме флуоресценции ($\lambda=440$ нм) для зонда 1,4-ANS, связанного с тромбоцитами пациентов с сосудистой патологией, составляет менее 10% по сравнению с соответствующим значением для контрольной группы.

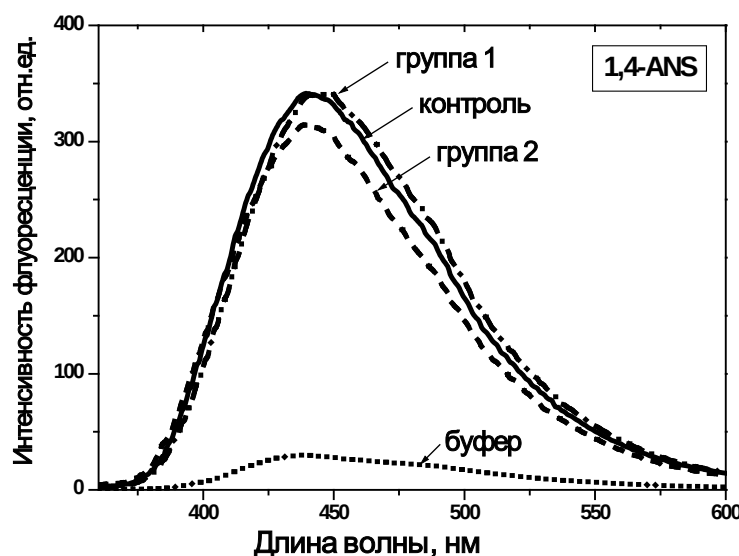


Рис. 4.22. Спектры флуоресценции зонда 1,4-ANS, связанного с тромбоцитами контрольной группы (контроль), с тромбоцитами пациентов с гипертонической болезнью (группа 1), с тромбоцитами пациентов с церебральным атеросклерозом (группа 2) и для зонда в фосфатном буфере, не содержащем тромбоцитов (буфер).

На следующем этапе поиска флуоресцентных зондов для детекции патологических изменений в мембранах тромбоцитов пациентов с сосудистой патологией головного мозга использовался набор флуоресцентных зондов, состоящий из зондов **4.1-4.6** (см. рис. 4.17). Результаты измерений представлены на рис. 4.23-4.29 и в табл.4.9-4.10.

В отличие от DPH, ДМХ и 1,4-ANS, все зонды набора показали значительную разницу между тромбоцитами представителей контрольной группы и тромбоцитами пациентов с сосудистой патологией головного мозга

гипертонического (группа 1) и атеросклеротического (группа 2) генеза [308,336,337].

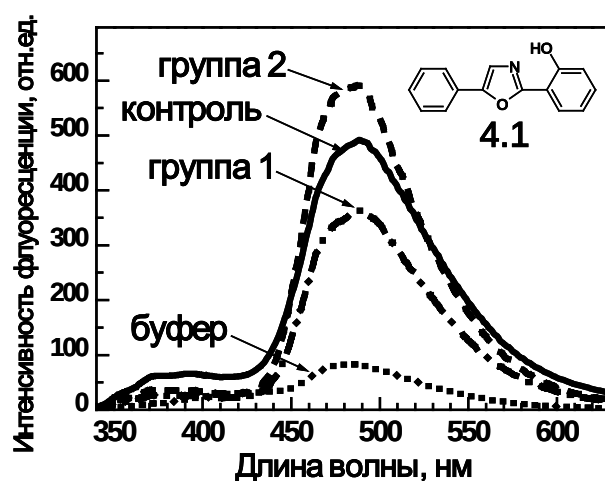


Рис. 4.23. Спектры флуоресценции зонда **4.1**, связанного с тромбоцитами контрольной группы (контроль), с тромбоцитами пациентов с гипертонической болезнью (группа 1) и с тромбоцитами пациентов с церебральным атеросклерозом (группа 2). Для сравнения приведен спектр зонда **4.1** в фосфатном буфере, не содержащем тромбоцитов (буфер).

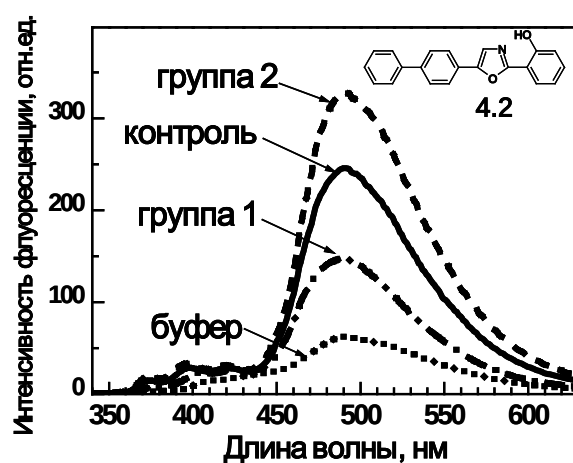


Рис. 4.24. Спектры флуоресценции зонда **4.2**, связанного с тромбоцитами контрольной группы (контроль), с тромбоцитами пациентов с гипертонической болезнью (группа 1) и с тромбоцитами пациентов с

церебральным атеросклерозом (группа 2). Для сравнения приведен спектр зонда **4.2** в фосфатном буфере, не содержащем тромбоцитов (буфер).

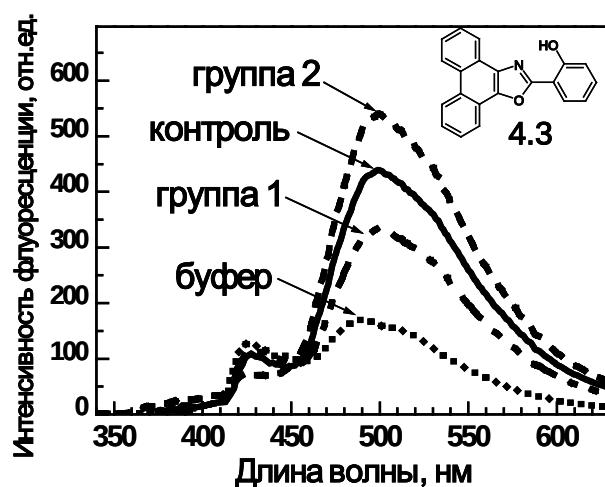


Рис. 4.25. Спектры флуоресценции зонда **4.3**, связанного с тромбоцитами контрольной группы (контроль), с тромбоцитами пациентов с гипертонической болезнью (группа 1) и с тромбоцитами пациентов с церебральным атеросклерозом (группа 2). Для сравнения приведен спектр зонда **4.3** в фосфатном буфере, не содержащем тромбоцитов (буфер).

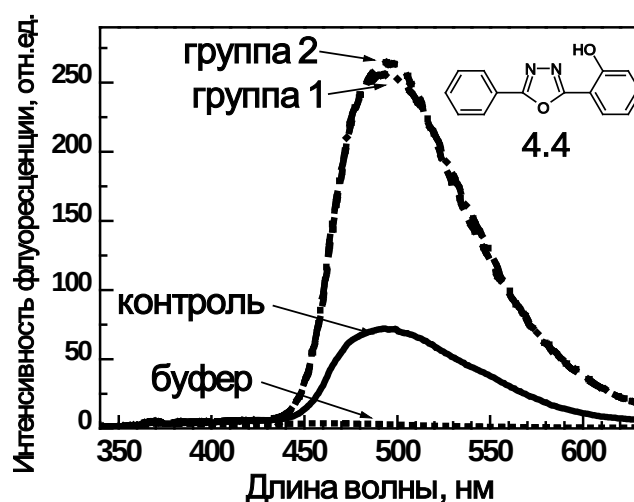


Рис. 4.26. Спектры флуоресценции зонда **4.4**, связанного с тромбоцитами контрольной группы (контроль), с тромбоцитами пациентов с гипертонической болезнью (группа 1) и с тромбоцитами пациентов с

церебральным атеросклерозом (группа 2). Для сравнения приведен спектр зонда **4.4** в фосфатном буфере, не содержащем тромбоцитов (буфер).

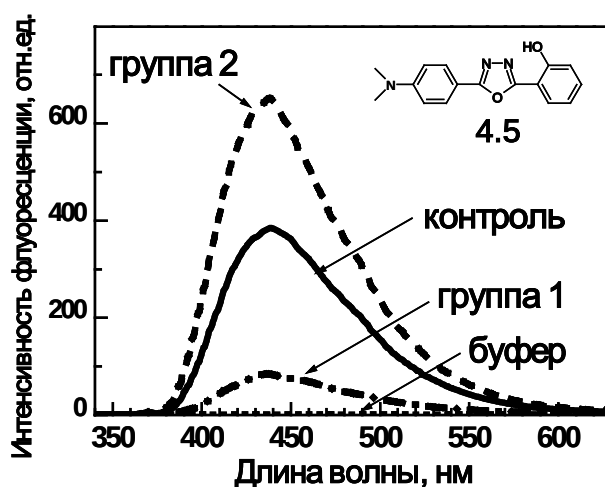


Рис. 4.27. Спектры флуоресценции зонда **4.5**, связанного с тромбоцитами контрольной группы (контроль), с тромбоцитами пациентов с гипертонической болезнью (группа 1) и с тромбоцитами пациентов с церебральным атеросклерозом (группа 2). Для сравнения приведен спектр зонда **4.5** в фосфатном буфере, не содержащем тромбоцитов (буфер).

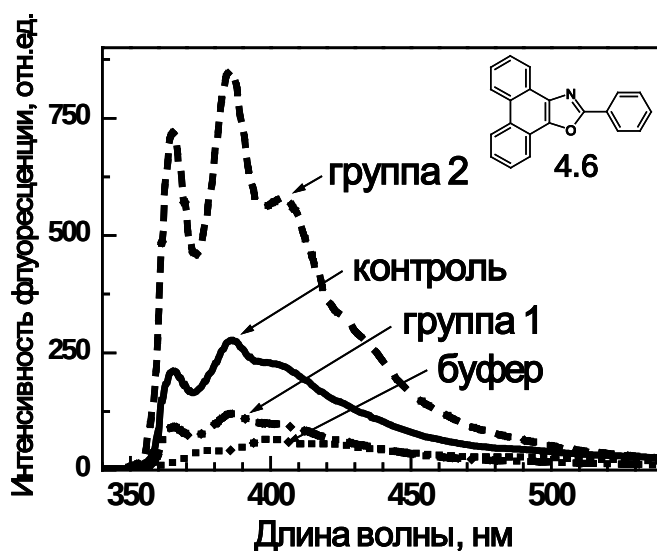


Рис. 4.28. Спектры флуоресценции зонда **4.6**, связанного с тромбоцитами контрольной группы (контроль), с тромбоцитами пациентов с

гипертонической болезнью (группа 1) и с тромбоцитами пациентов с церебральным атеросклерозом (группа 2). Для сравнения приведен спектр зонда **4.6** в фосфатном буфере, не содержащем тромбоцитов (буфер).

Таблица 4.9

Соотношение I_{T^*}/I_{N^*} зондов 4.1-4.4, связанных с мембранами тромбоцитов, у пациентов с сосудистой патологией и в контрольной группе

Зонд	I_{T^*}/I_{N^*}		
	контроль	гипертония	атеросклероз
4.1	8	15	17
4.2	9	6	12
4.3	3	2	8
4.4	18	51	53

Относительная погрешность значений соотношения I_{T^*}/I_{N^*} составляет менее 10%.

Таблица 4.10

Интенсивности флуоресценции (I_λ) зондов 4.5 и 4.6, связанных с мембранами тромбоцитов, у пациентов с сосудистой патологией и в контрольной группе

Зонд	λ , нм	I_λ , условные единицы*		
		контроль	гипертония	атеросклероз
4.5	435	380	84	650
4.6	385	280	120	860

*относительная погрешность составляет менее 5%.

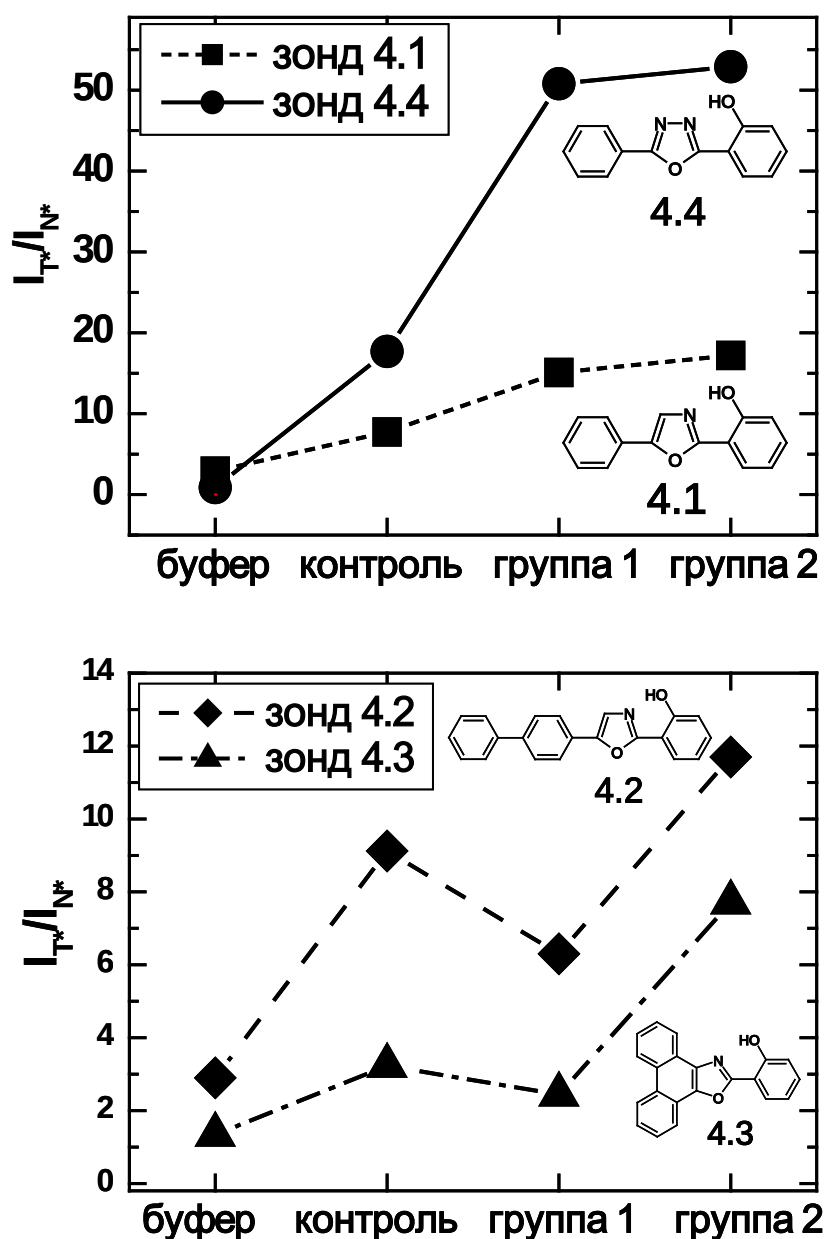


Рис. 4.29. Соотношение интенсивностей флуоресценции таутомерной и исходной формы I_{T^*}/I_{N^*} для зондов **4.1-4.4** в буфере без мембран (буфер), для контрольной группы (контроль), для пациентов с гипертонической болезнью (группа 1), для пациентов с церебральным атеросклерозом (группа 2).

При наличии мембран тромбоцитов наблюдается появление достаточно интенсивной флуоресценции зонда **4.5** (рис. 4.23), свидетельствующее о связывании зонда **4.5** с мембранами тромбоцитов:

наблюдаемое возгорание флуоресценции является результатом перехода молекул **4.5** из водной среды (где его флуоресценция полностью затухает) в липидную мембрану.

При связывании зондов **4.1-4.4** с мембранами тромбоцитов интенсивность флуоресценции их фототаутомерных форм (T^* , максимум флуоресценции $\sim 470-500$ нм) увеличивается по сравнению с соответствующей интенсивностью для **4.1-4.4** в буфере без тромбоцитов (рис. 4.23-2.26). Увеличение соотношения интенсивностей флуоресценции I_{T^*}/I_{N^*} для зондов **4.1-4.4** при связывании с мембранами тромбоцитов (рис. 4.29) свидетельствует об уменьшении протонодонорной способности, уменьшении полярности и росте вязкости микроокружения этих зондов при переходе из буфера в липидную биомембрану.

При связывании зонда **4.6** с мембранами тромбоцитов спектры его флуоресценции приобретают колебательную структуру, величина соотношения интенсивностей флуоресценции I_{365}/I_{403} увеличивается, интенсивность флуоресценции зонда **4.6** в максимуме флуоресценции увеличивается и максимум флуоресценции сдвигается в область более коротких длин волн ($\lambda=385$ нм), по сравнению с соответствующими спектрами **4.6** в буфере, не содержащем мембран тромбоцитов (рис. 4.28). Перечисленные факты указывают на уменьшение количества молекул воды в микроокружении зонда при его встраивании в липидную мембрану (при переходе из водной в гидрофобную среду).

Аналогично рассмотренному ранее случаю встраивания зонда **4.6** в липидные везикулы (см. рис. 4.21), в присутствие мембран тромбоцитов наблюдается многократное (в 4-8 раз) возрастание интенсивности флуоресценции зонда **4.6** по сравнению с соответствующей интенсивностью этого зонда в буфере без мембран (рис. 4.28).

В случае церебрального атеросклероза наблюдается увеличение интенсивностей флуоресценции зондов **4.5** (рис. 4.27, табл.4.10) и **4.6** (рис.

4.28, табл. 4.10), а также увеличение соотношения интенсивностей таутомерной и исходной формы I_{T^*}/I_{N^*} для зондов **4.1-4.4** (рис. 4.29, см. также рис. 4.23-4.26) по сравнению с соответствующими параметрами для контрольной группы: увеличение интенсивности флуоресценции **4.5** (рис. 4.27, табл. 4.10) свидетельствует о уменьшении гидратации его микроокружения в мембране, увеличение соотношения I_{T^*}/I_{N^*} для зондов **4.1-4.4** (рис. 4.23-4.26, рис. 4.29: группа 2)) свидетельствует об уменьшении полярности и протонодонорной способности в областях локализации этих зондов в мембране, трехкратное увеличение интенсивности флуоресценции **4.6** (рис. 4.28, табл. 4.10) свидетельствует об увеличении числа молекул зонда, связавшихся с тромбоцитами пациентов за время инкубации вследствие увеличения гидрофобности мембран при атеросклерозе, а увеличение величины соотношения интенсивностей полос флуоресценции I_{365}/I_{403} для **4.6** (с 0,98 для контрольных мембран до 1,23 для мембран тромбоцитов при атеросклерозе, рис. 4.28) указывает на уменьшение протонодонорной способности микроокружения этого зонда в мембранах тромбоцитов при церебральном атеросклерозе. Отмеченные изменения хорошо согласуются с увеличением содержания холестерина в мембранах тромбоцитов при церебральном атеросклерозе.

В случае гипертонической болезни наблюдается уменьшение интенсивностей флуоресценции зондов **4.5** (рис. 4.27, табл. 4.10) и **4.6** (рис. 4.28, табл. 4.10), слабо выраженная колебательная структура спектра **4.6** (рис. 4.28), увеличение соотношения интенсивностей таутомерной и исходной формы I_{T^*}/I_{N^*} для **4.1** и **4.4** (рис. 4.29, табл. 4.9), а также уменьшение соотношения I_{T^*}/I_{N^*} для зондов **4.2, 4.3** (рис. 4.29, табл. 4.9) по сравнению с соответствующими параметрами для контрольной группы: уменьшение интенсивности флуоресценции **4.5** (табл. 4.10) свидетельствует об увеличении гидратации его микроокружения в мембране, увеличение соотношения I_{T^*}/I_{N^*} для **4.1** и **4.4** (рис. 4.29: см. группа 1) свидетельствует об

уменьшении полярности и протонодонорной способности в областях локализации этих зондов в мембране. В то же время, уменьшение соотношения I_T^*/I_N^* для зондов **4.2** и **4.3** (рис. 4.29: см. группа 1), а также наличие слабо-выраженной колебательной структуры спектра и уменьшение интенсивности флуоресценции **4.6** (рис. 4.28) указывает на увеличение протонодонорной способности микроокружения этих наиболее липофильных зондов набора, предположительно вследствие того, что меньшее число молекул **4.2**, **4.3**, **4.6** встроилось в мембраны тромбоцитов пациентов с гипертонической болезнью за 60 минут инкубации, т.е. значительное число молекул этих зондов осталось в водной среде. Такое уменьшение скорости встраивания зондов **4.2**, **4.3**, **4.6** в мембраны тромбоцитов пациентов с гипертонической болезнью может быть связано с упомянутым увеличением гидратированности области локализации **4.5**: внешних наиболее полярных областей мембран тромбоцитов. Таким образом, флуоресцентные зонды **4.2**, **4.3**, **4.5**, **4.6** (рис. 4.24, 4.25, 4.27–4.29) позволяют дифференцировать патологические изменения в мембранах тромбоцитов, вызванные церебральным атеросклерозом от патологических изменений, вызванных гипертонической болезнью. Зонды **4.1** и **4.4** (рис. 4.23, 4.26, 4.29) позволяют выявить патологические изменения мембран тромбоцитов, общие для обоих видов генеза сосудистой патологии головного мозга.

Таким образом, в результате произведённого нами поиска флуоресцентных зондов для детекции патологических изменений в мембранах тромбоцитов при сосудистой патологии головного мозга было показано, что набор флуоресцентных зондов, состоящий из соед. **4.1-4.6** позволяет выявить патологические изменения мембран тромбоцитов как при церебральном атеросклерозе, так и при гипертонической болезни. Предлагаемый в диссертации флуоресцентный метод определения патологических изменений в мембранах тромбоцитов может использоваться

для диагностических целей, позволяет сократить время исследования и уменьшить трудоёмкость анализа по сравнению с существующими биохимическими методами определения патологических изменений в мембранах тромбоцитов (например, по сравнению с тонкослойной хроматографией, применяемой для исследования липидного состава мембран тромбоцитов).

4.4.2. Определение мембранотропной активности летучих органических соединений

Токсикомании, вызванные вдыханием летучих органических соединений (ЛОС), представляют одну из проблем наркологии [338]. Знание механизма воздействия ЛОС на клетки слизистого эпителия является важным для поиска химических блокаторов рецепторных белков этих клеток: предполагается, что их блокирование в носовой полости прерывает афферентацию, идущую к корковому отделу обонятельного анализатора (лобно-фронтальная область), и тем самым предотвращает формирование патологического влечения к ЛОС [338].

Нами предложен способ определения мембранотропной активности (т.е. способности изменять структуру и физико-химические свойства мембран [339-342]) летучих органических соединений, основанный на использовании набора флуоресцентных зондов, состоящего из соединений **4.1-4.5** (см. рис. 4.17). При помощи предложенного набора зондов исследовалось воздействие паров ацетона (полярного, способного к образованию водородных связей [343]) и уайт-спирита (неполярного, не образующего водородные связи [343]) на модельные липидные мембраны и на мембраны клеток обонятельного анализатора крыс.

Для выяснения механизма начального этапа формирования патологического влечения к ЛОС важно установить механизм воздействия

ЛОС на клетки слизистого эпителия. Среди возможных механизмов воздействия ЛОС на рецепторные белки клеток слизистого эпителия: (а) прямое связывание ЛОС с рецепторными протеинами [344]; (б) связывание ЛОС с липидным бислоем, сопровождающееся последующим связыванием ЛОС с рецепторными белками [193]; (в) связывание ЛОС с липидным бислоем, приводящее к изменению физико-химических свойств мембраны (упорядоченности липидов, вязкости, гидратированности) и, в ходе изменения протеин-липидных взаимодействий [345], влияющее на свойства рецепторных протеинов (например, на их конформацию) [346].

На первом этапе исследования возможности применения набора флуоресцентных зондов, состоящего из соединений **4.1-4.5**, для оценки воздействия ацетона и уайт-спирита на биомембраны использовались модельные мембраны (липидные везикулы) [305] размером 40-50 нм, с концентрацией липидов 0.5-2 мг/мл, и добавкой 25 мольных % холестерина, а также 5 мкг/л белка (сывороточного альбумина) [262]. В качестве фосфолипида использовался фосфатидилхолин. Суспензия модельных мембран подвергалась воздействию насыщенных паров ацетона или уайт-спирита (2 мл растворителя испаряли в 1 л объёма из чашки Петри диаметром 90 мм в течение 20 мин) в герметичном стеклянном сосуде в течение одного часа. В качестве контрольного образца использовали мембраны, не подвергавшиеся действию паров растворителей. Измерение спектров флуоресценции производилось через 60 минут после добавления зондов к суспензиям модельных мембран.

Результаты измерений спектров флуоресценции использованных зондов в растворах модельных мембран, подвергнувшихся действию насыщенных паров ацетона и уайт-спирита представлены в табл. 4.11.

Таблица 4.11

Флуоресцентные характеристики зондов 4.1-4.5 в растворах модельных мембран, подвергнувшихся действию насыщенных паров ацетона и уайт-спирита

Зонд	λ , нм	Интенсивность флуоресценции*, у.е.		
		контроль	ацетон	уайт - спирт
4.1	410	44	155	42
	490	1890	1840	1930
4.2	410	58	60	54
	490	880	880	930
4.3	410	52	52	53
	500	440	420	420
4.4	410	11	13	11
	500	69	67	66
4.5	435	154	149	155

*относительная погрешность значений интенсивности флуоресценции составляет менее 5%.

Как видно из данных табл. 4.11, в случае воздействия ацетона наблюдалось заметное увеличение интенсивности коротковолновой ($\lambda=410$ нм) полосы флуоресценции зонда **4.1** (рис. 4.30), сопровождавшееся также незначительным уменьшением интенсивности его длинноволновой полосы флуоресценции ($\lambda=490$ нм): таким образом, при воздействии ацетона величина соотношения I_{T^*}/I_N (I_{500}/I_{410}) уменьшилась с 42 до 12 (табл. 4.12). В отличие от **4.1**, при воздействии ацетона интенсивности полос флуоресценции зондов **4.2**, **4.3**, **4.4**, **4.5** существенно не изменялись по сравнению с соответствующими интенсивностями в случае контрольных мембран.

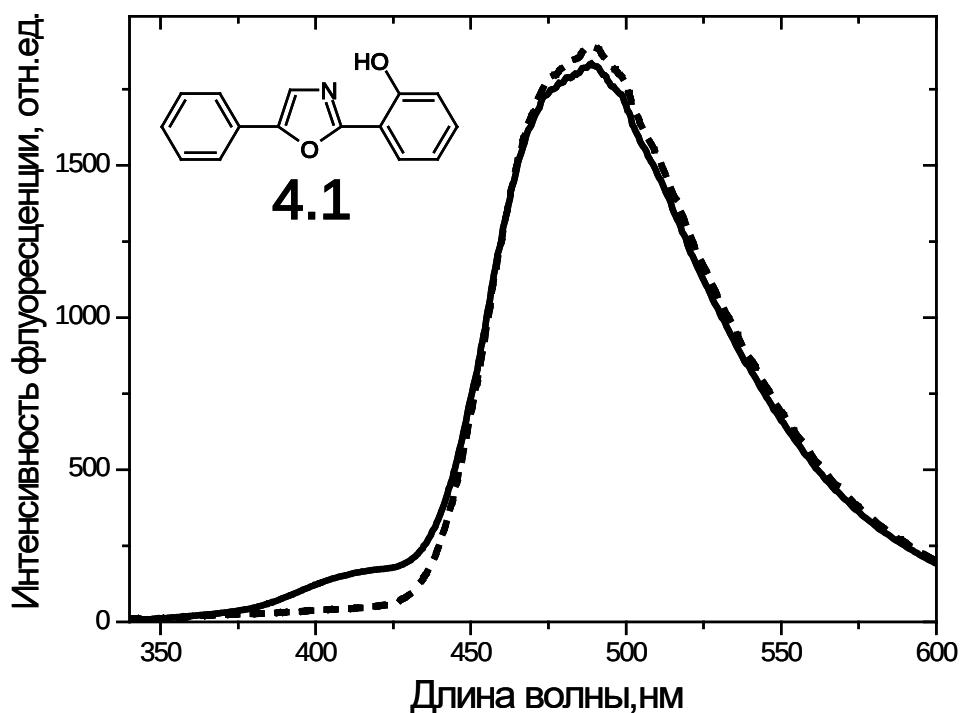


Рис. 4.30. Спектры флуоресценции зонда **4.1** в растворах липидных везикул, подвергшихся воздействию ацетона (сплошная линия), контроль – штриховая линия.

Таблица 4.12

Соотношение I_{T^*}/I_{N^*} зондов 4.1-4.4 в растворах модельных мембран, подвергнувшихся действию насыщенных паров ацетона и уайт-спирита

Зонд	I_{T^*}/I_{N^*} (I_{500}/I_{410})		
	контроль	ацетон	уайт-спирит
4.1	43	12	46
4.2	15	15	17
4.3	8	8	8
4.4	6	5	6

Здесь относительная погрешность значений соотношения I_{T^*}/I_{N^*} составляет менее 10%.

Наблюдаемое увеличение интенсивности коротковолновой полосы ($\lambda=410$ нм) в спектре флуоресценции зонда **4.1** может быть объяснено увеличением протонодонорной способности и/или полярности его микроокружения в мембране.

В литературе [316-319,347-350], в качестве основной причины увеличения протонодонорной способности и/или полярности мембранной микросреды чаще всего называют увеличение гидратации мембранного бислоя вследствие изменения упорядоченности молекул составляющих его фосфолипидов. Поскольку обычно гидратация мембранного бислоя является более выраженной в приповерхностных полярных областях мембраны и уменьшается по мере приближения к центру липидного бислоя [316-319,347-350] (т.е. уменьшается с ростом гидрофобности среды), можно было бы ожидать, что изменение флуоресцентных параметров для зондов **4.4** и **4.5**, локализованных ближе к поверхности мембраны, должно было бы быть более значительным, чем соответствующие изменения для зонда **4.1**, имеющего более глубокую локализацию в мембранном бислое (см. рис. 4.17).

Однако, экспериментальные результаты, полученные для модельных везикул не согласуются с предположением о увеличении гидратации поверхностных слоёв мембранного бислоя липидных везикул под действием ацетона: флуоресцентные параметры зондов **4.4** и **4.5** не изменялись по сравнению с контролем (табл. 4.12), а уменьшение соотношения I_T/I_N^* при воздействии ацетона наблюдалось только для зонда **4.1** (см. табл. 4.12).

Можно выдвинуть предположение, что одной из вероятных причин отмеченного повышения интенсивности коротковолновой полосы флуоресценции **4.1** может являться накопление гидратированных молекул ацетона в зоне предполагаемой локализации зонда **4.1** в мембране, а именно – в области глицериновых остатков фосфолипида [305].

Как видно из данных табл. 4.11, в случае воздействия на модельные мембраны насыщенных паров уайт-спирита изменений в спектрах флуоресценции зондов **4.1-4.5** не наблюдалось: интенсивность флуоресценции всех использованных зондов не изменялась по сравнению с контролем.

Данный факт свидетельствует о том, что в случае воздействия на модельную биологическую мембрану насыщенных паров уайт-спирита (изооктана) не происходит значительных изменений упорядоченности молекул фосфолипидов мембранного бислоя, и, следовательно, не происходит изменений гидратации последнего.

На следующем этапе исследования возможности применения набора флуоресцентных зондов, состоящего из зондов **4.1-4.5** для оценки воздействия ацетона и уайт-спирита на биомембраны использовались клетки обонятельного анализатора крыс (слизистого эпителия) [307,351]. В качестве контрольного образца использовали клетки, не подвергавшиеся действию паров растворителей. Измерение спектров флуоресценции производилось через 60 минут после добавления зондов к суспензиям клеток обонятельного анализатора крыс.

Влияние ингаляций ацетона или уайт-спирита на клеточные мембраны клеток обонятельного анализатора крыс изучалось у нелинейных лабораторных крыс. Предварительно, на протяжении одного часа колбы ёмкостью 0,5 л насыщали парами ацетона. Затем, в них помещали крыс. Время ингаляции насыщенными парами ацетона составляло 10 минут. После чего, ткани слизистого эпителия извлекались из носовой полости крыс и ресуспендировались в 15 мМ фосфатном буфере (pH 7).

Результаты измерений спектров флуоресценции использованных зондов в суспензиях клеток обонятельного анализатора крыс, подвергнувшихся действию насыщенных паров ацетона и уайт-спирита представлены в табл. 4.13.

Таблица 4.13

**Флуоресцентные характеристики зондов 4.1-4.5 в растворах мембран
клеток обонятельного анализатора крыс, подвергнувшихся действию
насыщенных паров ацетона и уайт-спирита**

Зонд	λ , нм	Интенсивность флуоресценции*, у.е.		
		контроль	ацетон	уайт-спирит
4.1	410	72	250	72
	490	1050	1050	1020
4.2	410	51	83	49
	490	570	530	560
4.3	410	120	120	120
	500	400	400	400
4.4	410	3,8	5,1	5,0
	500	34	35	34
4.5	435	51	50	44

*относительная погрешность значений интенсивности флуоресценции составляет менее 5%.

Как видно из данных табл. 4.13, в случае воздействия ацетона наблюдалось заметное увеличение интенсивности коротковолновой ($\lambda=410$ нм) полосы флуоресценции зондов **4.1, 4.2, 4.4** (рис. 4.31), сопровождавшееся также незначительным уменьшением интенсивности длинноволновой полосы флуоресценции ($\lambda=490$ нм): например, для **4.1** величина I_{490}/I_{410} уменьшилась с 15 для контрольных мембран до 4 для мембран после воздействия ацетона (табл. 4.14, рис 4.32). В отличие от **4.1, 4.2, 4.4**, при действии ацетона интенсивность полос флуоресценции зондов **4.3** и **4.5** не изменялась по сравнению с контролем.

Таблица 4.14

**Соотношение I_{T^*}/I_{N^*} зондов 4.1-4.4 в растворах мембран клеток
обонятельного анализатора крыс, подвергнувшихся действию
насыщенных паров ацетона и уайт-спирита**

Зонд	I_{T^*}/I_{N^*} (I_{500}/I_{410})		
	контроль	ацетон	уайт-спирит
4.1	15	4	15
4.2	11	7	11
4.3	4	4	4
4.4	9	7	7

Здесь относительная погрешность значений соотношения I_{T^*}/I_{N^*} составляет менее 10%.

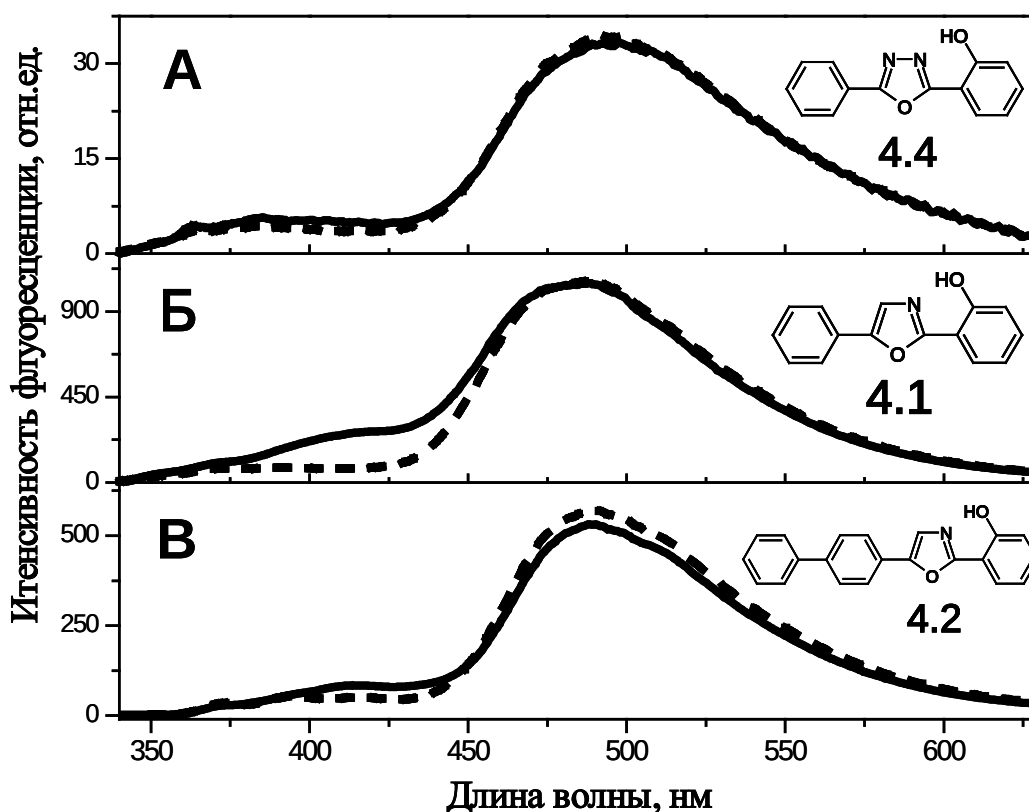


Рис. 4.31. Спектры флуоресценции зондов 4.4 (А), 4.1 (Б), 4.2 (В) в растворах клеток обонятельного анализатора крыс, подвергшихся воздействию ацетона (сплошная линия), контроль – штриховая линия.

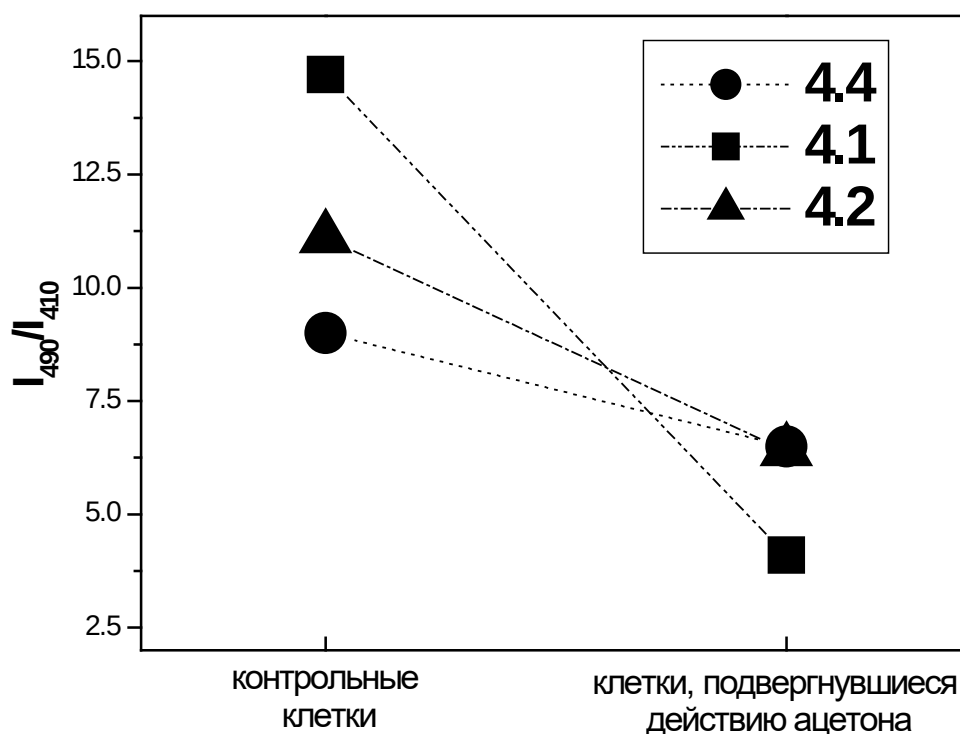


Рис. 4.32. Уменьшение соотношения интенсивностей таутомерной и исходной формы I_{T^*}/I_{N^*} (I_{490}/I_{410}) для **4.4**, **4.1**, **4.2** в результате воздействия ацетона на клетки обонятельного анализатора крыс. На врезке исследованные зонды расположены в соответствии с глубиной их погружения в липидную мембрану.

Наблюдаемое увеличение интенсивности коротковолновой полосы ($\lambda=410$ нм) и уменьшение соотношения интенсивностей фототаутомерной и нормальной формы (I_{T^*}/I_{N^*}) в спектрах флуоресценции зондов **4.1**, **4.2**, **4.4** (табл. 4.14, рис. 4.32) может быть объяснено увеличением протонодонорной способности и/или полярности их микроокружения в мембране.

Принимая во внимание отсутствие изменения флуоресценции зондов **4.3** и **4.5** при воздействии ацетона на мембраны клеток обонятельного анализатора крыс, отмеченное уменьшение величины I_{T^*}/I_{N^*} для **4.1**, **4.2**, **4.4**

(табл. 4.14, рис. 4.32) отнесено к накоплению гидратированных молекул ацетона в зонах локализации этих зондов в липидном бислое исследованных клеток, т.е. в области глицериновых остатков и карбонильных групп фосфолипидов.

Таким образом, воздействие ацетона на мембраны клеток обонятельного анализатора крыс оказалось подобным обсуждённому ранее соответствующему воздействию на модельные липидные мембраны.

Вместе с тем, следует отметить, что в случае действия ацетона на мембраны клеток обонятельного анализатора крыс изменение спектра флуоресценции наблюдалось для трёх зондов (**4.1**, **4.2**, **4.4**) с близкими областями предположительной локализации в липидном бислое, в то же время, при действии ацетона на модельные мембраны аналогичное изменение спектра флуоресценции отмечено только для зонда **4.1**. Такое различие может свидетельствовать о том, что, по-видимому, накопление гидратированного ацетона в мембранах клеток слизистого эпителия происходит в несколько более обширной области липидного бислоя, чем в случае модельных мембран.

Таким образом, полученные экспериментальные результаты свидетельствуют в пользу механизма взаимодействия ацетона с клеточными рецепторными белками, предполагающего, что его воздействие на рецепторные белки происходит посредством абсорбции его молекул липидным бислоем.

Нами было также установлено, что при воздействии паров уайт-спирита (основной компонент — изооктан [343]) на мембраны клеток обонятельного анализатора крыс происходит снижение интенсивности максимума флуоресценции зонда **4.5** (I_{435} уменьшилась на 15,5%, см. табл. 4.13) и уменьшение величины I_{T^*}/I_{N^*} для зонда **4.4** (с 9 для контрольных мембран до 7 для мембран после воздействия уайт-спирита, см. табл. 4.14) [351]. Принимая во внимание отсутствие значительных изменений

флуоресценции зондов **4.1, 4.2, 4.3** (см. табл. 4.13, 4.14), локализованных в более гидрофобных областях липидного бислоя (см. рис. 4.17), отмеченные изменения флуоресценции зондов **4.4** и **4.5** были объяснены увеличением гидратации поверхностных (полярных) областей липидного бислоя (области полярных головок фосфолипидов и области глицериновых остатков фосфолипидов) в результате воздействия уайт-спирита.

Принимая во внимание отсутствие изменений гидратации модельных мембран под действием паров уайт-спирита (см. табл. 4.13, 4.14), можно предположить, что увеличение гидратации поверхностных (полярных) областей мембран клеток обонятельного анализатора крыс под действием насыщенных паров этого растворителя вызвано изменением упорядоченности молекул фосфолипидов поверхностного слоя мембраны в результате изменений протеин-липидных взаимодействий вследствие возможного изменения конформации поверхностных белков биомембраны под действием уайт-спирита.

Таким образом, показано, что способ определения мембранотропной активности летучих органических соединений, основанный на использовании набора флуоресцентных зондов, состоящего из зондов **4.1-4.5**, позволяет выявить изменения в липидных мембранах, вызванные действием насыщенных паров ацетона или уайт-спирита. Показано, что предлагаемый способ определения мембранотропной активности ЛОС может использоваться в ходе токсикологических исследований биомембран.

4.4.3. Определение мембранотропной активности криопротекторов

Криопротекторы — вещества, которые ослабляют негативные последствия воздействия низких температур при криоконсервировании клеток человека, животных, растений и микроорганизмов [352,353]. Однако, высокие концентрации криопротекторов могут приводить к повреждению

мембран клеток и проявлять цитотоксическое действие ещё до замораживания, на этапе инкубации биологических препаратов в криозащитных растворах (т.н. этап эквilibрации): в частности, некоторые криопротекторы способны модифицировать липид-липидные и липид-белковые взаимодействия, изменять электростатический потенциал поверхности мембраны [354].

Влияние криопротектора на структуру мембран зависит как от типа клеток, так и от биологического вида животных, растений, микроорганизмов: даже один и тот же криопротектор может по-разному влиять на мембраны клеток одного типа, полученных из различных видов, что связано с видовыми различиями белок-липидного состава их цитоплазматических мембран [353]. Таким образом, как для тестирования новых веществ – потенциальных криопротекторов, так и для оценки эффективности действия криопротектора по отношению к определённому виду клеток, необходимо знание его влияния на структурное состояние клеточных мембран [352-355].

Одним из подходов, позволяющих производить оценку степени влияния криопротекторов на состояние липидного бислоя является использование флуоресцентных зондов, молекулы которых нековалентно связываются с мембранами. [354,355].

Нами проведено исследование возможности применения флуоресцентных зондов на основе орто-гидроксипроизводных 1,3-оксазола и 1,3,4-оксадиазола (см. рис. 4.17) для оценки влияния криопротекторов (диметилсульфоксида (ДМСО), 1,2-пропандиола, глицерина) на мембраны эритроцитов человека [356,357].

На первом этапе исследования воздействия криопротекторов на мембраны эритроцитов человека предполагалось использовать набор флуоресцентных зондов, состоящий из **4.1-4.5** (см. рис. 4.17).

Суспензия эритроцитов в физиологическом растворе подвергалась воздействию криопротекторов в течение 40 минут (суспензию эритроцитов смешивали с соответствующей криоконсервирующей средой 1:1 (гематокрит 40–45%)). В качестве контрольного образца использовали клетки, не подвергавшиеся действию криопротекторов. Измерение спектров флуоресценции производилось через 60 минут после добавления зондов к суспензиям эритроцитов. В условиях использованной нами плотности клеток эритроцитов в суспензии (пропускание света (%T), через суспензию клеток на длине волны 540 нм находилось в пределах 56-57%.) поглощения флуоресценции зондов гемоглобином эритроцитов не наблюдалось.

Однако, как оказалось, в отличие от рассмотренных в предыдущих разделах (см. разделы 4.4.1-4.4.3) случаев возгорания флуоресценции флуоресцентных зондов **4.4** и **4.5** при наличии модельных везикул, тромбоцитов человека и клеток обонятельного анализатора крыс, в случае эритроцитов человека не происходит возрастания флуоресценции этих зондов в условиях часовой инкубации с эритроцитами (не показано). По-видимому, зонды **4.4** и **4.5** либо не встраиваются в мембраны эритроцитов за это время (т.е. остаются в буфере), либо встраиваются в мембраны эритроцитов, но, вследствие значительной гидратации мембран эритроцитов в области локализации зондов **4.4** и **4.5** (полярная область мембраны) возрастания их флуоресценции не происходит. Таким образом, зонды **4.4** и **4.5** не позволяют производить мониторинг изменений в мембранах эритроцитов под действием криопротекторов [356].

На следующем этапе исследование воздействия криопротекторов на мембраны эритроцитов человека продолжилось при помощи зондов **4.1**, **4.2**, **4.3** [356,357].

В результате нами было установлено, что воздействие криопротекторов (диметилсульфоксида (ДМСО), 1,2-пропандиола, глицерина) на мембраны эритроцитов приводит к уменьшению

соотношения I_{T^*}/I_{N^*} для зондов **4.1**, **4.2**. в то время как соотношение I_{T^*}/I_{N^*} для **4.3** не изменяется (рис. 4.33).

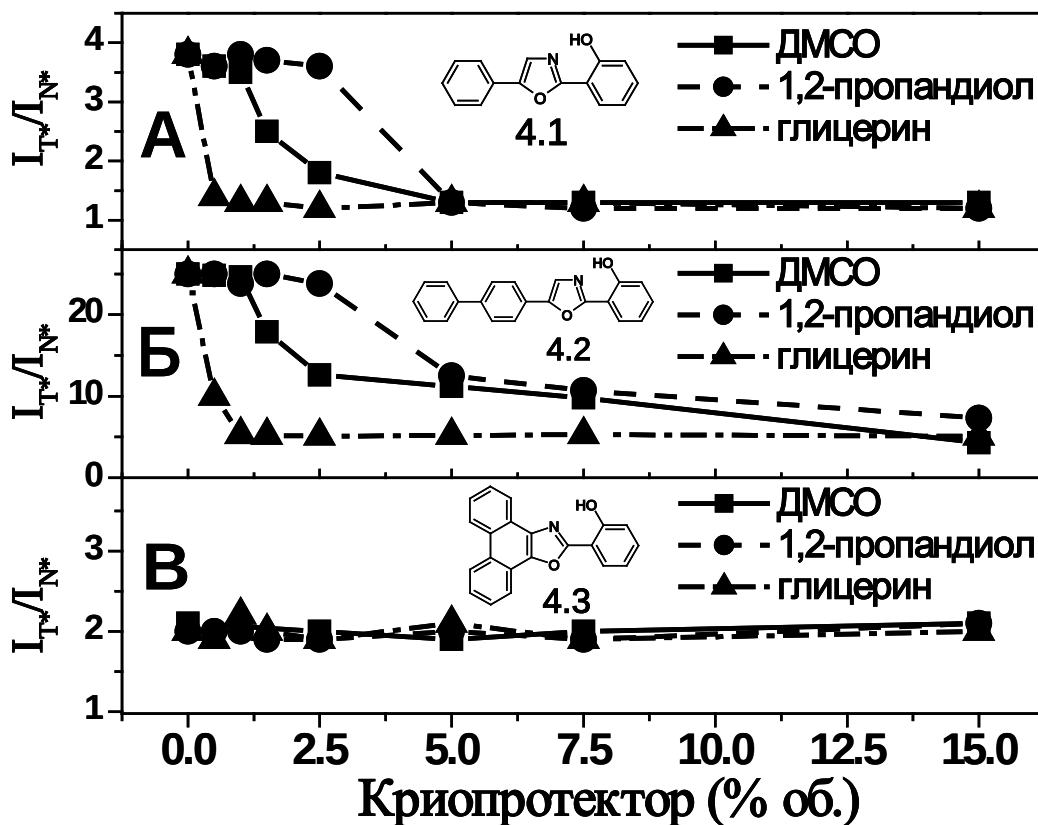


Рис. 4.33. Соотношение I_{T^*}/I_{N^*} для зондов **4.1** (А), **4.2** (Б), **4.3** (В) в мембранах эритроцитов, подвергшихся воздействию криопротекторов: ДМСО – квадраты, 1,2-пропандиола – круги и глицерина – треугольники.

Наблюдаемое уменьшение соотношения I_{T^*}/I_{N^*} для зондов **4.1**, **4.2** в мембранах эритроцитов, подвергшихся воздействию криопротекторов, свидетельствует об увеличении полярности и способности к образованию водородных связей микроокружения этих зондов вследствие накопления гидратированных молекул криопротекторов в области локализации зондов или вследствие увеличения гидратированности микроокружения **4.1**, **4.2** в результате нарушения упаковки фосфолипидов мембран эритроцитов под действием криопротекторов.

Установлено, что начальная концентрация криопротектора, вызывающая изменения структуры мембраны эритроцита человека составляет 1,5; 5,0 и 0,5 объемных % в случае ДМСО, 1,2-пропандиола и глицерина, соответственно.

Установлено, что при воздействии использованных криопротекторов изменения в мембранах эритроцитов происходят в областях локализации зондов **4.1** и **4.2**, т.е. в достаточно полярных областях мембраны (предположительно, в области глицериновых остатков фосфолипидов и в области карбонильных групп фосфолипидов), в то же время, не наблюдается изменений в области локализации зонда **4.3**, в более гидрофобных зонах мембран эритроцитов (предположительно, в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов и в центре бислоя).

Таким образом, нами произведён поиск флуоресцентных зондов для детекции воздействия криопротекторов (диметилсульфоксида, 1,2-пропандиола, глицерина) на мембраны эритроцитов человека. Показано, что набор флуоресцентных зондов, состоящий из соед. **4.1**, **4.2**, **4.3** позволяет выявить изменения в мембранах эритроцитов, вызванные воздействием криопротекторов. Предлагаемый флуоресцентный метод определения мембранотропной активности криопротекторов может оказаться полезным при выборе оптимальных условий криопротектирования биологических клеток: например, при подборе оптимального криопротектора, при подборе оптимальных концентраций криопротектирования.

4.4.4. Определение влияния магнитного поля или электромагнитного излучения на биологические мембраны

Магнитное поле и электромагнитное излучение оказывают воздействие на живые организмы на клеточном уровне [358-361], например приводят к структурным изменениям клеточных мембран [362-367]. Это обуславливает

необходимость разработки методов определения результатов воздействия магнитного поля или электромагнитного излучения на биологические мембраны.

Нами предложен метод определения влияния магнитного поля или электромагнитного излучения на биологические мембраны, основанный на использовании набора флуоресцентных зондов, состоящего из соед. **4.1**, **4.2**, **4.3** (см. рис. 4.17) [368]. При помощи этого набора зондов исследовалось воздействие постоянного магнитного поля с индукцией 25 мТл и воздействие микроволнового излучения мощности 100 мкВт/см² на мембраны клеток буккального эпителия человека (образец клеток был получен из защёчных мешков 6 человек).

Суспензию клеток буккального эпителия подвергали действию постоянного магнитного поля в течение 10 минут или подвергали воздействию электромагнитного излучения в течение 10 секунд, после чего к суспензии эритроцитов прибавлялись флуоресцентные зонды. В качестве контрольного образца использовались клетки, не подвергавшиеся воздействию вышеупомянутых физических факторов. Измерение спектров флуоресценции производилось через 60 минут после добавления зондов к суспензиям клеток.

Результаты измерений представлены на рис. 4.34, а соотношения интенсивностей полос флуоресценции нормальной и таутомерной форм (I_{T^*}/I_{N^*}) представлены в табл. 4.15.

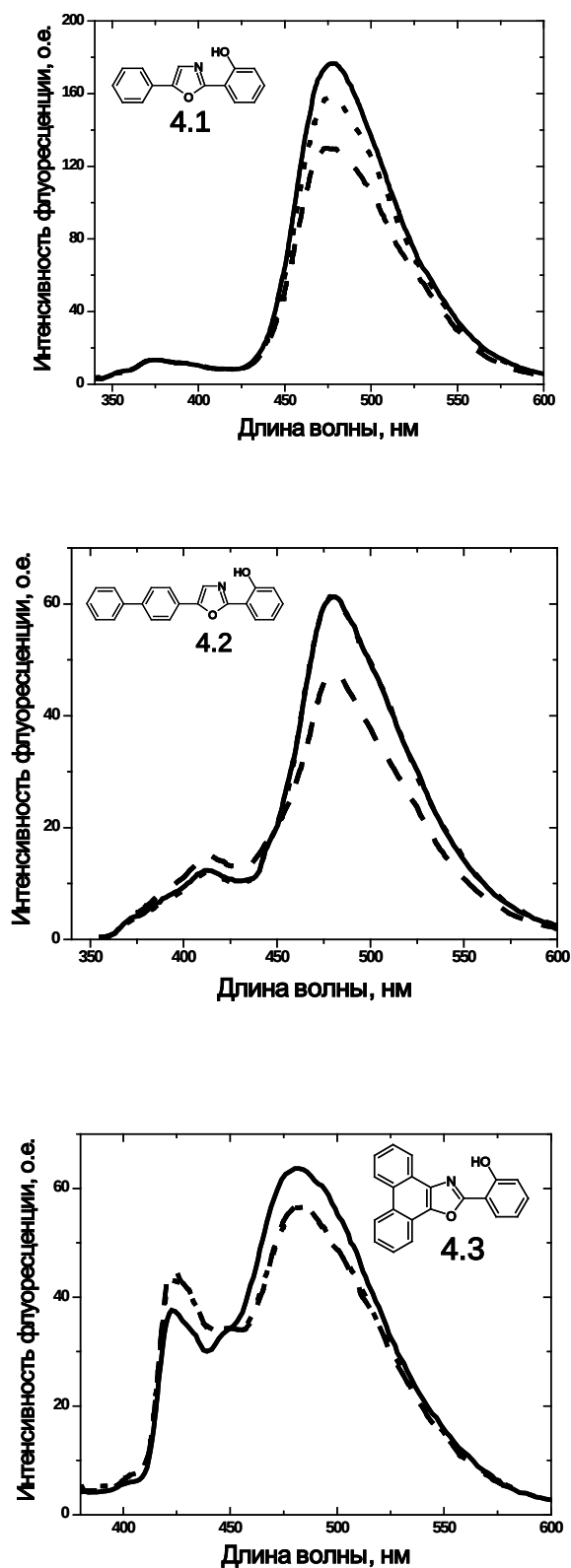


Рис. 4.34. Спектры флуоресценции зондов **4.1** (верхняя панель), **4.2** (средняя панель) и **4.3** (нижняя панель) в клетках буккального эпителия человека, подвергавшихся воздействию магнитного поля (пунктирная линия) или воздействию электромагнитного излучения (точечная линия), а также в

клетках буккального эпителия человека, не подвергавшихся воздействию магнитного поля или электромагнитного излучения (сплошная линия).

Таблица 4.15.

Величины соотношения I_T^*/I_N^* для зондов 4.1-4.3 в мембранах клеток буккального эпителия: для контрольных клеток и для клеток, подвергшихся воздействию магнитного поля или микроволнового излучения.

Зонд	контроль	после воздействия магнитного поля, (25 мТл, 10 минут)	после воздействия микроволнового излучения, (100 мкВТ/см ² , 10 секунд)
4.1	14	10	12
4.2	5	3	5
4.3	1,7	1,3	1,3

Здесь относительная погрешность значений соотношения I_T^*/I_N^* составляет менее 10%.

Из представленных в табл. 4.15 данных видно, что воздействие магнитного поля на мембраны клеток буккального эпителия приводит к уменьшению соотношения I_T^*/I_N^* для всех использованных зондов, которое было отнесено к увеличению степени гидратации клеточных мембран в областях предположительной локализации зондов **4.1-4.3**: в области глицериновых остатков, в области карбонильных групп и в области жирнокислотных цепочек фосфолипидов. Вместе с тем, уменьшение соотношения I_T^*/I_N^* в случае наиболее гидрофобного зонда **4.3** может быть следствием уменьшения числа молекул зонда **4.3**, встроенных в мембрану за 1 час инкубации: повышение гидратации наиболее поверхностной,

полярной области липидного бислоя может приводить к уменьшению скорости встраивания наиболее гидрофобных зондов (см. раздел 4.4.1).

Воздействие микроволнового излучения приводит к уменьшению соотношения I_T/I_N для зондов **4.1**, **4.3** (табл. 4.15). Наблюдаемое для **4.1** уменьшение соотношения I_T/I_N может быть объяснено увеличением гидратации в мембранах буккального эпителия в наиболее полярных областях предположительной локализации этого зонда: области глицериновых остатков и области карбонильных групп фосфолипидов. Принимая во внимание отсутствие изменений соотношения I_T/I_N для зонда **4.2** (табл. 4.15), менее гидрофобного, чем зонд **4.3**, а значит локализующегося в более полярных областях мембраны (см. рис. 4.17), уменьшение соотношения I_T/I_N для **4.3** отнесено к уменьшению числа его молекул, встроившихся в мембрану за 1 час инкубации.

Таким образом, показано, что набор флуоресцентных зондов, состоящий из соединений **4.1**, **4.2**, **4.3**, может использоваться для определения влияния постоянного магнитного поля или электромагнитного излучения на биологические мембраны.

В целом, нами показана возможность применения производных 1,3-оксазола и 1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для исследования биологических объектов: предложен набор флуоресцентных зондов для исследования изменений физико-химических свойств липидных мембран, который содержит несколько орто-гидрокси производных 2,5-дифенил-1,3-оксазола, 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола, а также 2-фенил[9,10]фенантроксазол. Установлено, что этот набор зондов позволяет выявлять изменения в мембранах тромбоцитов у пациентов с сосудистой патологией головного мозга гипертонического и атеросклеротического генеза, а также изменения в мембранах клеток обонятельного анализатора в ходе токсикологических исследований, проводить оценку мембранотропной

активности криопротекторов и влияния магнитного поля или электромагнитного излучения на биологические мембраны.

4.5. Поиск потенциальных флуоресцентных зондов среди 1,3,4-оксадиазола и 1,3-оксазола

С целью поиска потенциальных флуоресцентных зондов среди 1,3,4-оксадиазола и 1,3-оксазола нами были изучены спектрально-флуоресцентные и сольватохромные свойства 2-(3'-кумаринил)-5-(2'-(R-амино)-фенил)-1,3,4-оксадиазолов, 5-R-2-(хинолин-2-ил)- и 5-R-2-(хинолин-4-ил)-1,3-бензоксазолов.

4.5.1. Спектрально-флуоресцентные и сольватохромные свойства 2-(3'-кумаринил)-5-(2'-(R-амино)-фенил)-1,3,4-оксадиазолов

Несмотря на симметричность базовой молекулы 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола, в ряду его производных известны соединения, обладающие сольватохромными и сольватофлуорохромными свойствами [369-372].

В молекулах соединений **4.7-4.9** (рис. 4.35), содержащих электронодонорную аминогруппу и электроноакцепторные оксадиазольный и кумариниловый фрагменты при электронном возбуждении должно происходить существенное перераспределение электронной плотности, таким образом, вышеназванные молекулы могут демонстрировать зависимость спектральных свойств от полярности растворителя [126, 373-376].

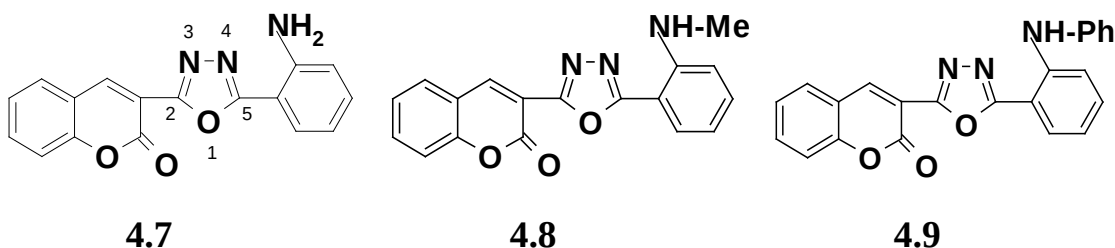


Рис. 4.35. Структурные формулы исследованных производных 2-(3'-кумаринил)-5-(2'-(R-амино)-фенил)-1,3,4-оксадиазола (**4.7-4.9**): 2-(3'-кумаринил)-5-(2'-(амино)-

фенил)-1,3,4-оксадиазола (**4.7**), 2 (3'-кумаринил)-5-(2'-(метиламино)-фенил)-1,3,4-оксадиазола (**4.8**), 2-(3'-кумаринил)-5-(2'-(фениламино)-фенил)-1,3,4-оксадиазола (**4.9**).

В статьях [313,369] сообщалось о зависимости скоростей внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП) и безызлучательной дезактивации фототаутомерной формы от молекулярной структуры орто-гидрокси производных 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола [313] и орто-гидрокси производных 2-(кумаринил-3)-5-дифенил-1,3,4-оксадиазола [313,369]. Орто-амино производные 2-(кумаринил-3)-5-дифенил-1,3,4-оксадиазола (соед. **4.7-4.9**) также представляют интерес в качестве модельных соединений для исследования возможности протекания внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП) в возбужденном состоянии от аминогруппы на атом азота оксадиазольного цикла.

Нами были изучены спектрально-флуоресцентные свойства впервые синтезированных 2-(3'-кумаринил)-5-(2'-(R-амино)-фенил)-1,3,4-оксадиазолов (**4.7-4.9**) в растворителях различной природы. [377] (табл.4.16).

Таблица 4.16

Положение максимума длинноволновой полосы поглощения соединений 4.7, 4.8 и 4.9 в растворителях различной полярности

Растворитель	ε	$\lambda_{\text{полг}}$		
		соед. 4.7	соед. 4.8	соед. 4.9
CCl ₄	2.24	377	400	402
Бензол	2.28	376	398	396

Растворитель	ε	$\lambda_{\text{погл}}$		
		соед. 4.7	соед. 4.8	соед. 4.9
Толуол	2.38	376	398	396
Хлороформ	4.70	375	396	395
Этилацетат	6.02	374	392	392
ТГФ	7.6	374	392	392
Дихлорметан	8.90	372	391	391
Изопропанол	18.3	375	391	390
Метанол	32.6	375	390	388
Ацетонитрил	36.2	369	386	383
ДМФА	36.7	375	386	383

* Здесь ε - диэлектрическая проницаемость растворителя; $\lambda_{\text{погл}}$ - положение максимума длинноволновой полосы поглощения (нм), ТГФ-тетрагидрофуран, ДМФА-диметилформамид.

Наиболее характерные спектры поглощений соед. **4.7** и **4.9** приведены на рис. 4.36 и 4.37, соответственно.

Длинноволновая полоса поглощения соед. **4.7** сдвинута bathochromно (~ 375 нм) по сравнению с соответствующей полосой орто-метокси-2-(кумаринил-3)-5-(2-фенил)-1,3,4-оксадиазола (~ 340 нм) вследствие большего электронодонорного эффекта аминогруппы по сравнению с метокси-группой [369]. Спектры поглощения **4.8** и **4.9**, в свою очередь,

сдвинуты в длинноволновую область (~ 400 нм) по сравнению со спектром поглощения **4.7** (~ 375 нм).

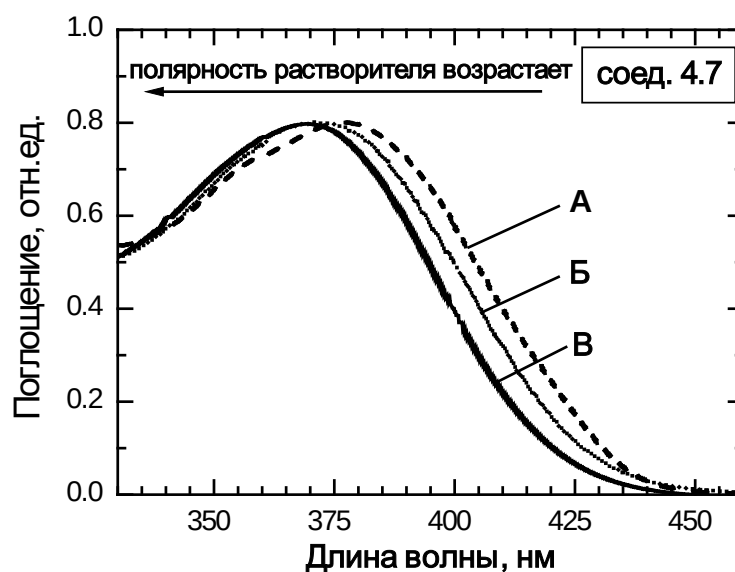


Рис. 4.36. Спектры поглощения соединения **4.7**: (А) в тетрахлорметане, (Б) в дихлорметане, (В) в ацетонитриле.

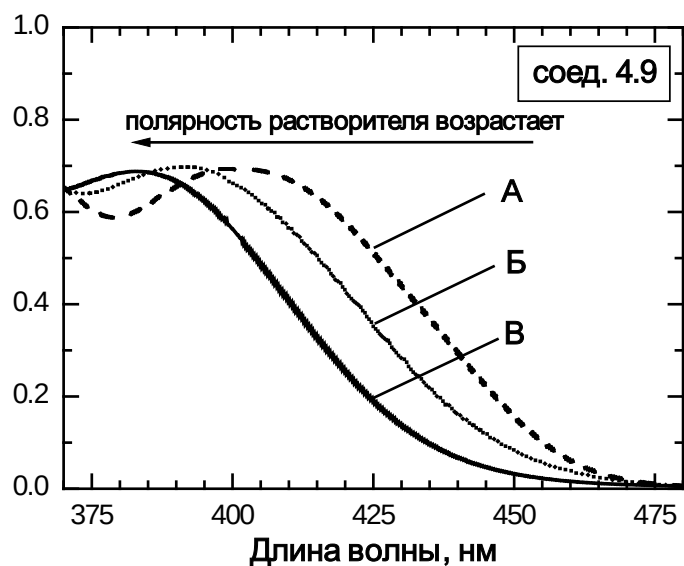


Рис. 4.37. Спектры поглощения соединения **4.9**: (А) в тетрахлорметане, (Б) в дихлорметане, (В) в ацетонитриле.

Длинноволновые максимумы поглощения **4.7-4.9** сдвигаются в коротковолновую область с увеличением полярности растворителя (например, при переходе от тетрахлорметана к ацетонитрилу, см. табл. 4.16 и рис. 4.36, 4.37). Этот факт указывает на то, что при условии однонаправленности векторов дипольных моментов в основном и возбуждённом состояниях, абсолютные величины дипольных моментов **4.7-4.9** в возбужденном состоянии уменьшаются по сравнению с соответствующими величинами в основном состоянии [374,375].

Флуоресцентные свойства соедин. **4.7-4.9** представлены в табл. 4.17.

Таблица 4.17

**Флуоресцентные характеристики соединений 4.7-4.9
в растворителях различной полярности**

Растворитель	соед. 4.7			соед. 4.8			соед. 4.9		
	λ_f	$\Delta\nu_{cm}$	φ	λ_f	$\Delta\nu_{cm}$	φ	λ_f	$\Delta\nu_{cm}$	φ
CCl ₄	468	5160	0,022	485	4380	0,007	490	4467	0,002
Бензол	506	6830	0,019	532	6330	0,005	535	6560	0.001
Толуол	507	6870	0,015	539	6570	0,005	-	-	-
Хлороформ	527	7690	0,004	553	7170	0,002	-	-	-
Дихлорметан	540	8360	0,003	567	7940	0,001	-	-	-

* Здесь λ_f и $\Delta\nu_{cm}$ - положения максимумов в спектрах флуоресценции (нм) и Стоксов сдвиг флуоресценции (см⁻¹), соответственно; φ - квантовый выход флуоресценции.

Спектры флуоресценции **4.7** и **4.8** малополярных растворителях приведены на рис. 4.38 и 4.39, соответственно.

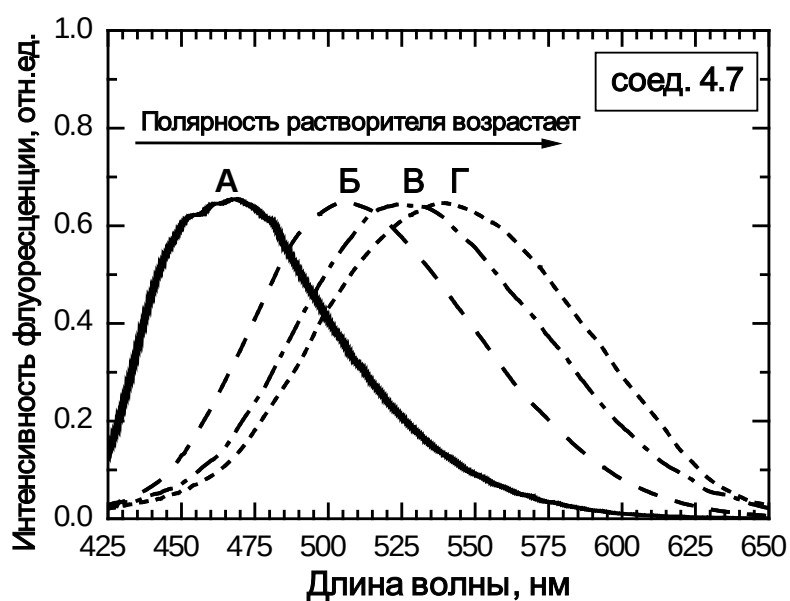


Рис. 4.38. Спектры флуоресценции соединения **4.7**: (А) в тетрахлорметане, (Б) в толуоле, (В) в хлороформе, (Г) в дихлорметане.

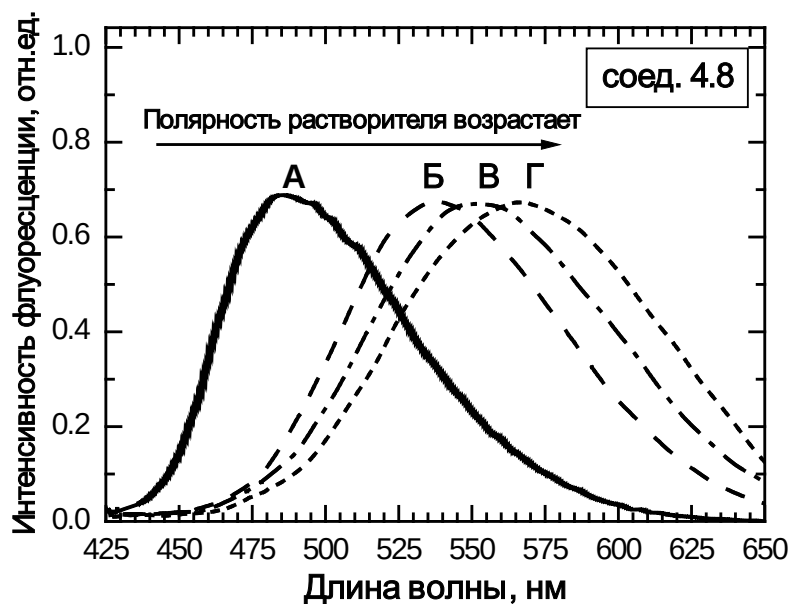


Рис. 4.39. Спектры флуоресценции соединения **4.8**: (А) в тетрахлорметане, (Б) в толуоле, (В) в хлороформе, (Г) в дихлорметане.

В спектрах флуоресценции соед. **4.7**, **4.8** и **4.9** в растворителях различной полярности присутствует только одна достаточно широкая полоса флуоресценции (табл. 4.17, рис. 4.38, 4.39), лишенная колебательной структуры даже в неполярных растворителях (рис. 4.38, 4.39).

Стоксовы сдвиги флуоресценции соединений **4.7**, **4.8** и **4.9** являются аномально большими даже в малополярных растворителях. Наличие увеличенного Стоксова сдвига флуоресценции может быть результатом протекания фотофизических процессов (например, сольватной или структурной релаксации) или являться результатом протекания фотохимических процессов, ведущих к образованию флуоресцирующего фотопродукта [378-380].

Принимая во внимание структуру **4.7-4.9**, ожидаемые фотохимические механизмы, ведущие к большим Стоксовым сдвигам флуоресценции для этих соединений могут быть: (а) внутримолекулярный перенос заряда [380-384] с электронодонорной части молекулы на её электроноакцепторный фрагмент (б) внутримолекулярный фотоперенос протона (ВМФПП, англ. ESIPT) [314,385] от кислотной функциональной группы молекулы к основной функциональной группе той же молекулы, соединенных внутримолекулярной водородной связью. Фотохимический механизм с участием внутримолекулярного переноса заряда реализуется вследствие наличия в составе соед. **4.7-4.9** электронодонорной аминогруппы и электроноакцепторных оксадиазольного и кумаринилового фрагмента. Возможность реализации второго механизма (внутримолекулярного фотопереноса протона) является менее очевидной.

Общепризнано, что основной движущей силой реакции ВМФПП является увеличение кислотности протонодонорной группы при электронном возбуждении, сопровождающееся одновременным увеличением основности протоноакцепторной группы. Такие изменения в протолитических свойствах являются следствием перераспределения

электронной плотности в возбужденном состоянии молекул, способных к внутримолекулярному фотопереносу протона [314,385].

В работах [311,313,369] отмечено, что для орто-гидроксидифенил-1,3,4-оксадиазола [311,313] и для орто-гидроксидифенил-2-(кумаринил-3)-5-дифенил-1,3,4-оксадиазола [313,369] кислотность ОН-группы в возбужденном состоянии зависит от природы заместителей, введенных в протоноакцепторную часть молекулы, в большей степени, чем соответствующее изменение основности атомов азота оксадиазольного гетероцикла в возбужденном состоянии. Например, при введении электронодонорной $N(CH_3)_2$ группы в протоноакцепторный фрагмент кумаринил-оксадиазольной молекулы ВМФПП не наблюдался: кислотность протонодонорного фрагмента (ОН-группы) в возбужденном состоянии в этом случае увеличена недостаточно для обеспечения протекания ВМФПП.

В то время как для орто-аминодифенил-1,3,4-оксадиазола ВМФПП не наблюдается [313,386], внутримолекулярный фотоперенос протона происходит в случае орто-бензоиламинодифенил-1,3,4-оксадиазола [313,386], когда наличие электроноакцепторной бензоильной группы повышает кислотность протонодонорного центра (NH) и делает возможной реакцию фотопереноса протона.

Таким образом, необходимо было выяснить, может ли введение электроноакцепторного кумаринилового фрагмента в протоноакцепторную часть молекулы привести к увеличению кислотности аминогруппы в возбужденном состоянии настолько, чтобы стало возможным наблюдать ВМФПП.

По данным квантово-химических расчетов AM1 [309,387] (табл. 4.18 и 4.19), основным направлением перераспределения заряда в возбужденных молекулах **4.7-4.9** является его перетекание с орто-аминозамещенного бензольного кольца на кумаринильный фрагмент (см. табл. 4.18).

Таблица 4.18

**Изменения зарядов (Δq)* на фрагментах в 4.7, 4.8 и 4.9
при электронном возбуждении.**

Соед.	Фрагмент			
	Кумарин	Оксадиазол	Анилинофенил	Фенил
4.7	-0.174	+0.023	+0.151	-
4.8	-0.186	+0.024	+0.162	-
4.9	-0.179	0.000	+0.139	+0.04

*Отрицательные значения Δq соответствуют увеличению электронной плотности [388-390], соответственно, положительные значения Δq соответствует снижению электронной плотности.

Таблица 4.19

**Изменения зарядов (Δq)* на гетероатомах фрагментах в 4.7, 4.8 и 4.9
при электронном возбуждении.**

Сое д.	Гетероатом				
	N Аминогруппа	N ₃ Оксадиазол	N ₄ Оксадиазол	O ₁ Оксадиазол	O _{c=o} Кумарин
4.7	+0.037	+0.091	+0.026	-0.016	-0.015
4.8	+0.038	+0.091	+0.028	-0.016	-0.017
4.9	+0.062	+0.081	+0.033	-0.012	-0.013

*см. примечание к табл. 4.18.

Согласно проведенным квантово-химическим расчетам, аминогруппа и атомы азота оксадиазола являются донорами электронной плотности при электронном возбуждении, в то время как карбонильные группы кумаринового фрагмента и атомы кислорода оксадиазольного цикла являются электроно-акцепторами (см. табл. 4.19).

Таким образом, квантово-химические расчеты AM1 предсказывают увеличение кислотности протонодонорной группы (аминогруппа) при электронном возбуждении одновременно со снижением основности протоноакцепторного центра (атом азота N₄ оксадиазольного цикла, см. рис. 4.35).

Мы также провели неэмпирические расчёты в рамках теории функционала электронной плотности (B3LYP/сс-pVDZ) [391]. Локализация граничных молекулярных орбиталей (ВЗМО и НСМО) для соединений **4.7-4.9** показана на рис. 4.40.

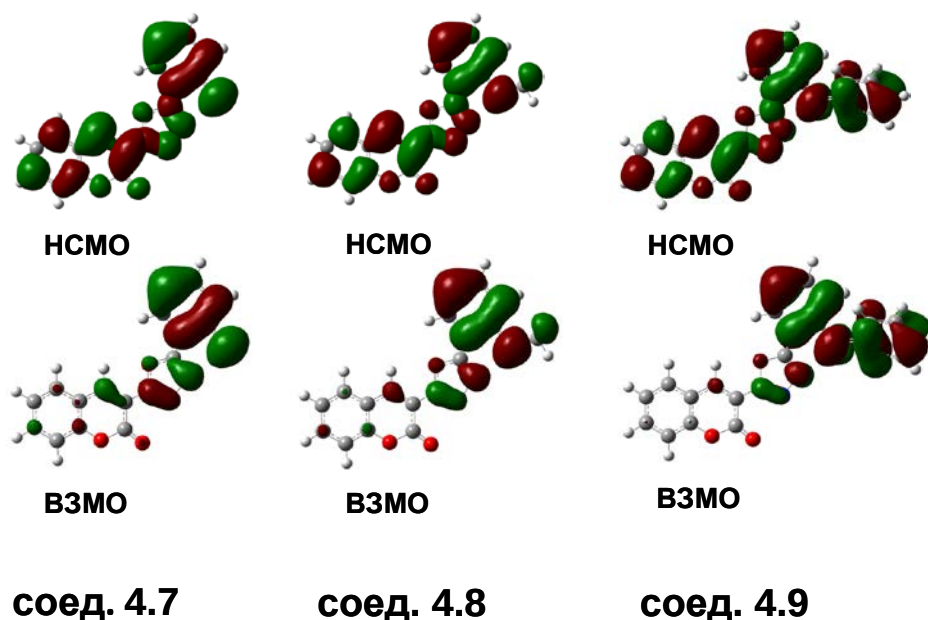


Рис. 4.40. Локализация ВЗМО и НСМО в молекулах **4.7-4.9**.

Было установлено, что ВЗМО в основном локализованы на анилинофенильном и оксадиазольном фрагментах молекул, в то время как

НСМО делокализованы по всей молекуле (рис. 4.40). Эти результаты указывают на то, что после электронного возбуждения от ВЗМО к НСМО, происходит перераспределение электронной плотности с арилоксадиазольного фрагмента на кумаринильный фрагмент, который, как представляется, является основным акцептором электронов.

Вместе с тем, электроноакцепторное влияние кумаринильного фрагмента оказалось недостаточным для настолько существенного увеличения кислотности аминогруппы в возбужденном состоянии, чтобы стало возможным наблюдать ВМФПП – никаких свидетельств протекания реакции внутримолекулярного фотопереноса протона для соедин. **4.7-4.9** обнаружено не было: (а) положения полос флуоресценции для соединения **4.7** и для ранее изученного 2-(кумаринил-3)-5-(2'-метоксифенил)-1,3,4-оксадиазола [369] в четырёххлористом углероде достаточно близки: 467 нм и 453 нм, соответственно, (б) ни для одного из соединений **4.7-4.9** не наблюдалось длинноволновой флуоресценции продукта реакции внутримолекулярного фотопереноса протона (т.н. фототаутомерной формы).

Заметный длинноволновый сдвиг полосы флуоресценции наблюдается для соединений **4.7-4.9** с увеличением полярности растворителя (например, при переходе от четырёххлористого углерода к дихлорметану, табл. 4.17).

Следует отметить, что флуоресцентные характеристики **4.7-4.9** представлены только для малополярных растворителей с низкой способностью к образованию водородных связей (см. табл. 4.17), поскольку в полярных растворителях и в растворителях с высокой способностью к образованию водородных связей соединения **4.7-4.9** не флуоресцируют.

Интересно, что с увеличением полярности растворителя максимумы полос флуоресценции соедин. **4.7-4.9** сдвигаются в длинноволновую область, в то время как соответствующие спектры поглощения сдвигаются в тех же условиях в сторону более коротких длин волн (см. табл. 4.16 и 4.17, рис. 4.36-4.39).

Это возможно в таких случаях, когда ориентация дипольного момента растворённого вещества в основном электронном состоянии существенно отличается от соответствующей ориентации в возбуждённом состоянии. Это обстоятельство обуславливает дополнительную диэлектрическую релаксацию сольватной оболочки молекулы растворённого вещества, находящегося в возбуждённом состоянии, и, таким образом, приводит к дополнительному сдвигу флуоресценции растворённого вещества в область больших длин волн [374,375].

Для анализа полученных сольватофлуорохромных данных мы выбрали P_y шкалу полярности, как основанную на флуоресценции [392].

Как видно из рис. 4.41, P_y шкала достаточно хорошо описывает сольватохромные сдвиги максимумов флуоресценции соед. 4.7-4.9, наблюдаемые с увеличением полярности растворителя.

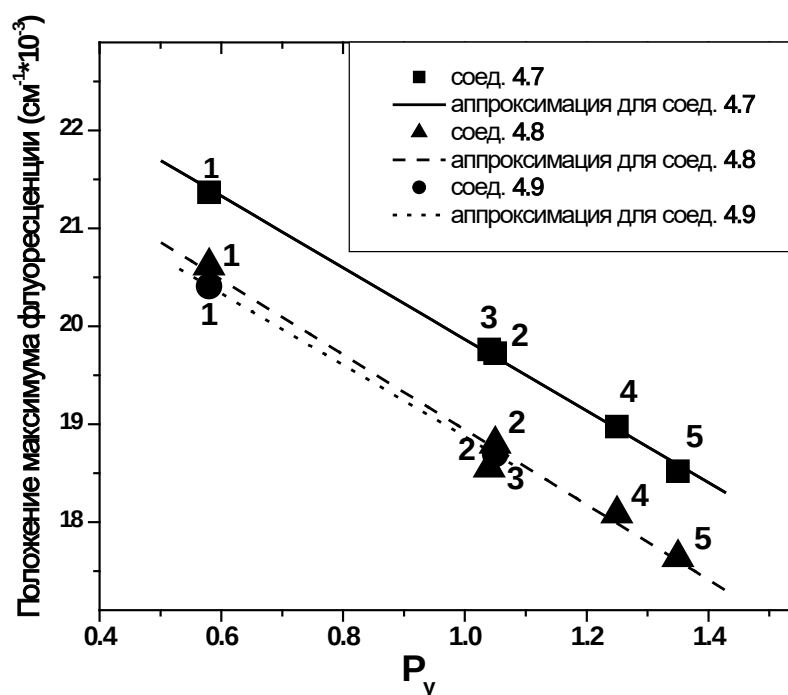


Рис. 4.41. График зависимости положения максимумов полос флуоресценции соед. 4.7, 4.8 и 4.9 от значений P_y растворителей: 1- CCl₄, 2-бензол, 3-толуол, 4-хлороформ, 5-дихлорметан.

Результаты линейной аппроксимации: для соединения **4.7**, $\nu_F = ((23,5 \pm 0,1) \cdot 10^3) - ((3,7 \pm 0,1) \cdot 10^3) \cdot P_y$, $R = -0,999$, $SD = 64 \text{ см}^{-1}$; для соединения **4.8**, $\nu_F = (22,8 \pm 0,3) - (3,8 \pm 0,2) \cdot P_y$, $R = -0,995$, $SD = 135 \text{ см}^{-1}$, для соединения **4.9**, $\nu_F = 22,53 - 3,65 \cdot P_y$.

Достаточно приблизительный и адекватный только для случая однонаправленности векторов дипольных моментов основного и возбужденного состояний (это условие не выполняется для соедин. **4.7-4.9**) метод Матаги-Липперта [393,394] использовался для оценки гипотетической разности абсолютных величин дипольных моментов в основном и возбуждённом состояниях соедин. **4.7** и **4.8** (рис. 4.42), которая должна была бы обуславливать наблюдение значительных длинноволновых сдвигов полос флуоресценции **4.7** и **4.8** в случае, если бы направления дипольных моментов для основного и возбуждённого электронного состояния соедин. **4.7** и **4.8** совпадали.

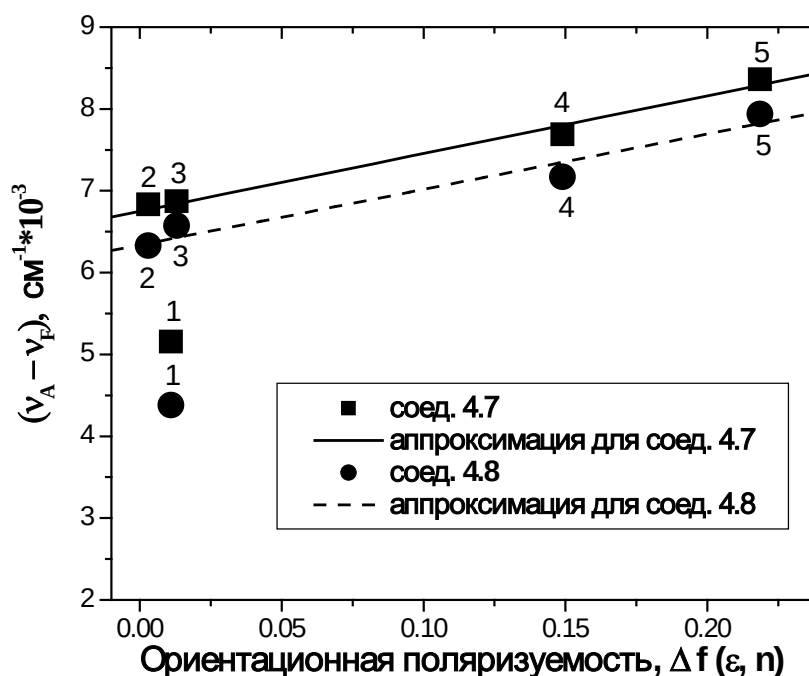


Рис. 4.42. График Матаги-Липперта для соединений **4.7** и **4.8**. Δf — ориентационная поляризуемость $((\epsilon-1)/(2\epsilon+1) - (2n^2-1)/(2n^2+1))$, где ϵ —

диэлектрическая проницаемость, n - показатель преломления растворителя).

Растворители: 1- CCl_4 , 2-бензол, толуол 3-, 4-хлороформ, 5-дихлорметан.

Результаты линейной аппроксимации: для соединения **4.7**, $\nu_A - \nu_F = ((6,75 \pm 0,07) \cdot 10^3) - ((7,1 \pm 0,5) \cdot 10^3) \cdot \Delta f$, $R = 0,994$, $SD = 95 \text{ см}^{-1}$, для соединения **4.8**, $\nu_A - \nu_F = ((6,3 \pm 0,1) \cdot 10^3) - ((6,8 \pm 1,1) \cdot 10^3) \cdot \Delta f$, $R = 0,976$, $SD = 193 \text{ см}^{-1}$. Значения радиуса полости Онзагера, использованные для оценки $\Delta\mu$, были определены из молекулярной геометрии соединений **4.7** и **4.8**, оцененной расчетом по методу AM1: 7,18 и 7,20 ангстрем для **4.7** и **4.8**, соответственно.

Найденная гипотетическая разница абсолютных величин векторов дипольных моментов для основного и возбуждённого электронных состояний оказалась довольно большой: т.е. 16,1 Д - для соединения **4.7** и 15,9 Д - для соединения **4.8**.

Существенное различие в пространственной ориентации векторов дипольных моментов в основном и возбужденном состоянии, наблюдаемое для соединений **4.7-4.9**, осложняет возможное использование этих соединений в качестве флуоресцентных зондов для мониторинга полярности среды, однако, позволяют нам предложить соединения **4.7** и **4.8** в качестве потенциальных ригидохромных флуоресцентных зондов [395-399]. В литературе [395-399] ригидохромным эффектом называют сдвиг полосы флуоресценции в коротковолновую область спектра (т.е. в «синюю область спектра») с увеличением жесткости локальной окружающей среды [395-399]. Причиной ригидохромного эффекта является то, что в жестких средах переориентация дипольных моментов молекул растворителя затруднена, что приводит к коротковолновому сдвигу полосы флуоресценции растворённого вещества, длина волны максимума испускания которого сильно зависит от релаксации растворителя и имеет значительное длинноволновое смещение в нежестких средах (т.е. в средах, где переориентация дипольных моментов

молекул растворителя происходит до испускания флуоресценции растворённого вещества) [395-399].

Квантовые выходы флуоресценции исследованных замещенных орто-амино-производных 2-(кумаринил-3)-5-фенил-1,3,4-оксадиазола (**4.7-4.9**) являются низкими (см. табл. 4.17): в малополярных апротонных растворителях они не превышают 0,02.

Значения квантового выхода для соединения **4.9** в малополярных апротонных растворителях существенно ниже по сравнению с соответствующими значениями для соединений **4.7**, **4.8**. В качестве одной из возможных причин такого увеличения эффективности процессов безызлучательной дезактивации в случае соединения **4.9** можно предположить высокоамплитудные колебания бензольного кольца анилинофенилового фрагмента.

Увеличение полярности растворителя может влиять на интенсивность флуоресценции **4.7-4.9** двояко. С одной стороны, если безызлучательная дезактивация **4.7-4.9** связана с участием низко-расположенных триплетных $\pi\pi^*$ возбужденных состояний карбонильной группы, увеличение полярности растворителя может изменить взаимное расположение $\pi\pi^*$ и $\pi\pi^*$ уровней. В случае если разность энергий S_1 ($\pi\pi^*$) и T ($\pi\pi^*$) уровней будет возрастать, вероятность процесса интеркомбинационной конверсии будет соответственно уменьшаться и, как следствие, получим возрастание интенсивности флуоресценции [373-375,400].

С другой стороны, увеличение полярности растворителя может привести и к противоположному эффекту. Тушение флуоресценции с увеличением полярности растворителя может быть связано с изменением энергии возбуждённого состояния (S_1): поскольку энергия возбуждённого состояния (S_1) снижается при сольватации в полярных растворителях, скорость безызлучательных переходов $S_1 \rightarrow S_0$ возрастает, и, в то же время,

скорость соответствующих излучательных переходов, которая зависит от частоты ν^3 , уменьшается.

Наши экспериментальные результаты показывают, что тушащее воздействие полярности растворителя является гораздо более выраженным – наблюдается резкое снижение значений квантового выхода соединений **4.7-4.9** с увеличением полярности растворителя (см. табл. 4.17).

Таким образом, спектральные свойства впервые синтезированных 2-(3'-кумаринил)-5-(2'-(R-амино)-фенил)-1,3,4-оксадиазолов были исследованы в различных растворителях с различной полярностью и способностью к образованию водородных связей. Было установлено, что для всех исследованных соединений не наблюдается реакции внутримолекулярного фотопереноса протона (ВМФПП): электроноакцепторного влияния кумаринильного фрагмента оказалось недостаточно для существенного увеличения кислотности аминогруппы в возбужденном состоянии. Наблюдаемое сочетание отрицательной сольватохромии и положительной сольватофлуорохромии позволяет предложить исследованные 2-(3'-кумаринил)-5-(2'-(R-амино)-фенил)-1,3,4-оксадиазолы в качестве флуоресцентных зондов для мониторинга релаксации растворителя в малополярных средах и в качестве потенциально ригидохромных флуоресцентных зондов.

4.5.2. Спектрально-флуоресцентные свойства 5-R-2-(хинолин-2-ил)- и 5-R-2-(хинолин-4-ил)-1,3-бензоксазолов

Производные 2-(хинолин-2-ил)-1,3-бензоксазола находят практическое применение в качестве лазерных красителей [400], а также являются лигандами для комплексообразования при сплавлении с хлоридами меди (II) [401], с хлоридами палладия (II), платины (II) [402], с хлоридами кобальта (II) и никеля (II) [403], с хлоридами цинка, кадмия и ртути [404].

В литературе имеются сведения о поглощении производных 2-(хинолин-2-ил)-1,3-бензоксазолов, содержащих заместители в хинолиновом фрагменте молекулы, в ультрафиолетовой и видимой областях спектра [405], а также сведения о флуоресцентных свойствах 2-(хинолин-2-ил)-1,3-бензоксазолов [406,407]. Тем не менее, насколько нам известно, в литературе отсутствуют сведения о спектральных данных производных хинолинилбензоксазолов с заместителями в бензоксазольном фрагменте.

В настоящем разделе будет показано, что чувствительность флуоресцентных характеристик хинолинилбензоксазолов к полярности и/или протонодонорной способности среды зависит от природы заместителя в 5-положении бензоксазольного фрагмента. Эти сведения могут оказаться полезными при поиске потенциальных флуоресцентных зондов среди производных хинолинилбензоксазолов.

Нами были исследованы спектрально-флуоресцентные свойства 2-(хинолин-2-ил)- и 2-(хинолин-4-ил)-1,3-бензоксазолов с заместителями (метильной группой и галогеном) в положении 5 бензоксазольного фрагмента (соединения **4.10-4.13**, рис. 4.43) [408].

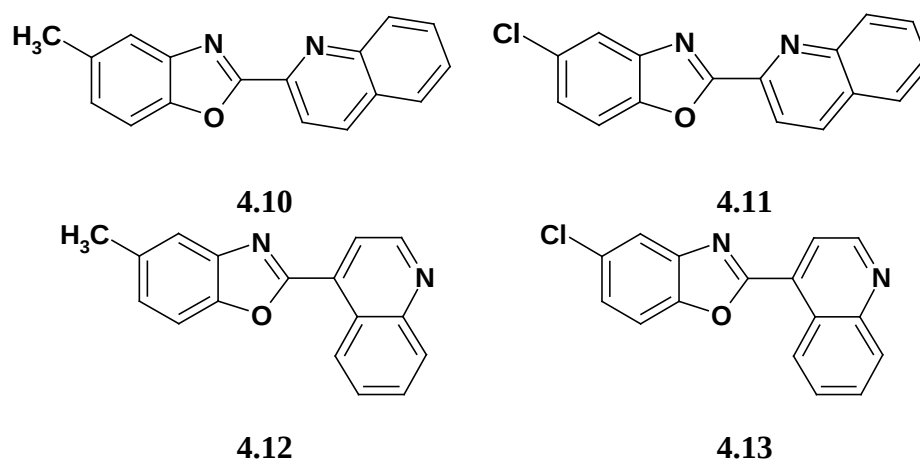


Рис. 4.43. Исследуемые 5-R-хинолинилбензоксазолы.

Данные спектров поглощения соед. **4.10-4.13** представлены в табл. 4.20 и на рис. 4.44.

Таблица 4.20.

**Спектральные характеристики соединений 4.10-4.13
в растворителях различной полярности и протонодонорной способности**

Соед.	Растворитель	ϵ	n	$\lambda^1_{\text{погл}}$ (плечо)	$\lambda^2_{\text{погл}}$	$\lambda^3_{\text{погл}}$ (плечо)	$\lambda^4_{\text{погл}}$	$\lambda^5_{\text{погл}}$
4.10	Толуол	2.38	1.4961	348	333	319	-	-
	Ацетонитрил	36.20	1.3441	347	331	319	277	241
	Метанол	32.63	1.3286	347	333	320	278	-
4.11	Толуол	2.38	1.4961	347	332	319	-	-
	Ацетонитрил	36.20	1.3441	345	330	319	265	241
	Метанол	32.63	1.3286	345	332	320	266	-
4.12	Толуол	2.38	1.4961	357	339	324	-	-
	Ацетонитрил	36.20	1.3441	355	336	322	-	238
	Метанол	32.63	1.3286	355	336	323	-	
4.13	Толуол	2.38	1.4961	357	339	324	-	-
	Ацетонитрил	36.20	1.3441	355	336	321	-	241
	Метанол	32.63	1.3286	355	336	322	-	

Здесь ϵ и n – диэлектрическая проницаемость и показатель преломления растворителя; $\lambda^{1-5}_{\text{погл}}$ - положения максимумов в спектрах поглощения (нм).

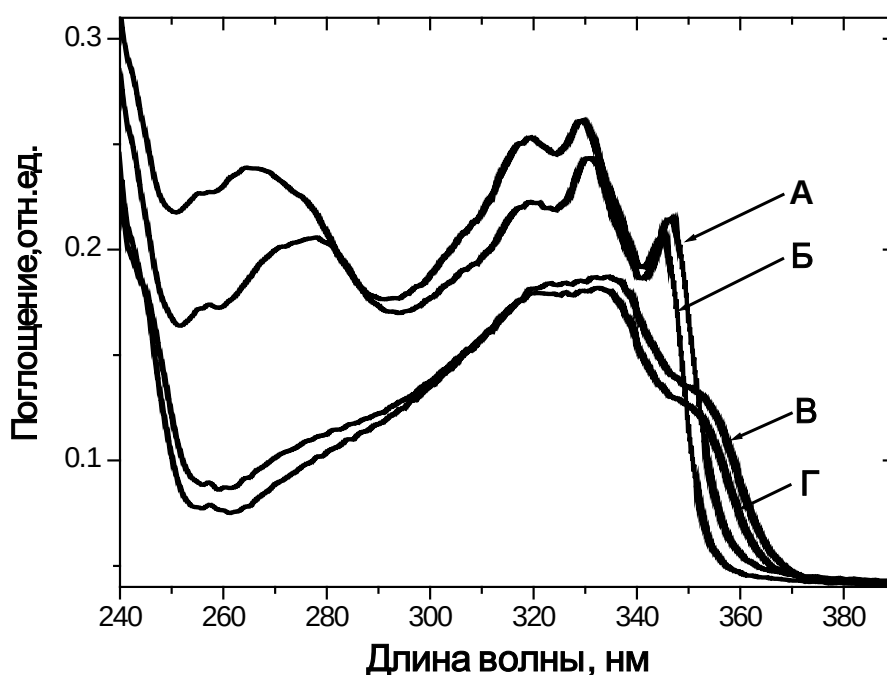


Рис. 4.44. Спектры поглощения соединений **4.10-4.13** в ацетонитриле: **4.10** (А), **4.11** (Б), **4.12** (В), **4.13** (Г).

Спектры поглощения исследованных соединений в области 200-380 нм состоят из трёх электронных переходов $\pi\pi^*$ типа. Как и в случае хинолина и N-бензанилина [400], $\pi\pi^*$ полосы поглощения исследованных соединений оказываются скрыты более интенсивными длинноволновыми полосами поглощения $\pi\pi^*$ типа.

С ростом полярности или протонодонорной способности растворителя, не наблюдается значительных сдвигов максимумов поглощения соед. **4.10-4.13**. Отсутствие сольватных эффектов в спектрах поглощения предполагает, что для всех использованных растворителей энергии сольватации исследуемых соединений в основном и в возбуждённом состояниях отличаются незначительно.

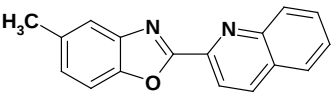
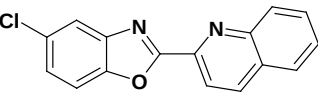
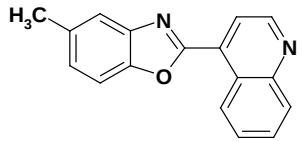
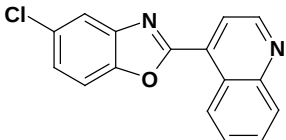
Если сравнивать спектры поглощения 2-(хинолин-2-ил) бензоксазола [406,407] с соответствующими спектрами соед. **4.10** и **4.11** (см. табл. 4.20, рис. 4.44), можно заметить, что сам факт наличия и природа заместителя в

положении 5 бензоксазольного фрагмента не оказывает существенного влияния на спектральные характеристики 5-R-2-(хинолин-2-ил)-1,3-бензоксазолов. То же самое может быть отмечено и для 5-R-2-(хинолин-4-ил)-1,3-бензоксазолов (соед. **4.12**, **4.13**): спектры поглощения **4.12** почти совпадают с таковыми для **4.13**.

Спектры испускания исследованных соединений представлены в табл. 4.21 и на рис. 4.45, 4.46.

Таблица 4.21

Флуоресцентные характеристики* соединений 4.10-4.13 в растворителях различной полярности и протонодонорной способности

Соединение		Растворитель	λ_{ϕ}	$\Delta\nu_{cm}$	ϕ
4.10		Толуол	376	3430	0,076
		Ацетонитрил	386	4300	0,308
		Метанол	391	4450	0,522
4.11		Толуол	375	3450	0,014
		Ацетонитрил	375	3640	0,028
		Метанол	379	3730	0,064
4.12		Толуол	390	3860	0,007
		Ацетонитрил	405	5070	0,116
		Метанол	415	5660	0,381
4.13		Толуол	390	3860	0,003
		Ацетонитрил	390	4120	0,008
		Метанол	395	4440	0,047

* Здесь λ_{ϕ} и $\Delta\nu_{cm}$ - соответственно положения максимумов в спектрах (нм) и Стоксов сдвиг флуоресценции (см^{-1}); ϕ - квантовый выход флуоресценции.

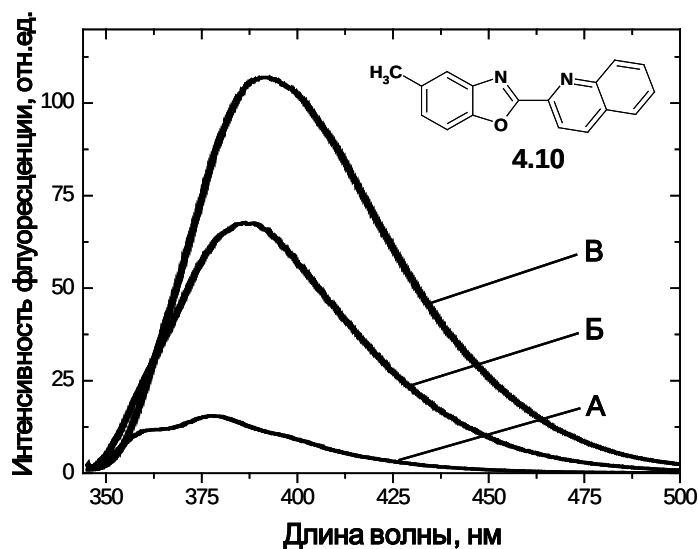


Рис. 4.45. Спектры флуоресценции 5-метил-2-(хинолин-2-ил)-1,3-бензоксазола (соед. **4.10**): (А) в толуоле, (Б) в ацетонитриле, (В) в метаноле. Оптическая плотность на длине волны возбуждения (345 нм) для всех растворов была 0,1.

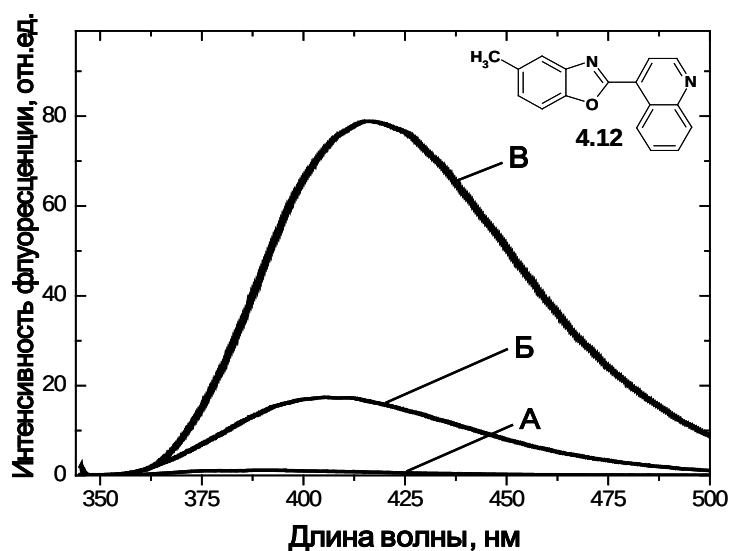


Рис. 4.46. Спектры флуоресценции 5-метил-2-(хинолин-2-ил)-1,3-бензоксазола (соед. **4.12**): (А) в толуоле, (Б) в ацетонитриле, (В) в метаноле. Оптическая плотность на длине волны возбуждения (345 нм) для всех растворов была 0,1.

Увеличение полярности растворителя не влияет на положение максимумов полос флуоресценции соед. **4.11**, **4.13** (см. данные для ацетонитрила в табл. 4.21), и, сравнительно небольшой длинноволновый сдвиг (до 5 нм (до 320 см^{-1})) максимумов полос флуоресценции **4.11**, **4.13** наблюдается с ростом протонодонорной способности растворителя (см. данные для метанола в табл. 4.21).

В случае соед. **4.10**, **4.12**, увеличение полярности растворителя приводит к длинноволновому (до 15 нм (до 950 см^{-1})) сдвигу (см. данные для ацетонитрила в табл. 4.21, рис 4.45, 4.46). Дальнейшее длинноволновое смещение полос флуоресценции соед. **4.10**, **4.12** наблюдается с ростом протонодонорной способности растворителя (см. данные для метанола в табл. 4.21, рис 4.45, 4.46). По-видимому, процессы релаксации растворителя в возбуждённом состоянии соед. **4.10**, **4.12** являются более выраженными, чем соответствующие процессы для **4.11**, **4.13**. Релаксация растворителя в первой сольватной сфере молекулы растворённого вещества, находящегося в возбуждённом состоянии, является причиной длинноволнового сдвига флуоресценции с ростом полярности растворителя, а также с ростом способности растворителя к образованию водородных связей [373].

В спектрах поглощения **4.10-4.13** (рис. 4.44) $S(\pi\pi^*)$ уровни оказываются выше по энергии, чем соответствующие $S(\pi\pi^*)$ уровни (полосы поглощения $\pi\pi^*$ типа у **4.10-4.13** скрыты более интенсивными длинноволновыми $\pi\pi^*$ полосами) и, следовательно, не принимают участия в тушении флуоресценции (тушение по механизму интеркомбинационной конверсии $S(\pi\pi^*)-T(\pi\pi^*)$ не реализуется). Этот факт указывает на то, что тушение флуоресценции соед. **4.10-4.13** может быть вызвано другой возможной причиной: интеркомбинационной конверсией $S(\pi\pi^*)-T(\pi\pi^*)$.

В тех случаях, когда самыми низколежащими возбужденными состояниями азотсодержащих гетероциклических соединений являются состояния $\pi\pi^*$ типа (как правило, такие случаи наблюдаются в неполярных и

не образующих водородные связи растворителях), флуоресценция не наблюдается [126,373-376],. Однако, если $\pi\pi^*$ состояния азотсодержащих гетероциклических соединений расположены лишь немного выше, чем $\pi\pi^*$ состояния, увеличение полярности растворителя или увеличение способности растворителя к образованию водородных связей могут изменить расположение $\pi\pi^*$ и $\pi\pi^*$ уровней и, таким образом, в полярных или в протонных растворителях можно наблюдать довольно интенсивную флуоресценцию [126, 373-376].

Тем не менее, по аналогии с незамещенным 2-(хинолин-2-ил)бензоксазолом [406,407], в случае соединений **4.11**, **4.13** интенсивность флуоресценции остается очень низкой даже в полярном (ацетонитрил) или протонном (метанол) растворителе, однако, небольшой рост квантового выхода **4.11**, **4.13** наблюдается при переходе от толуола к метанолу (см. табл. 4.21).

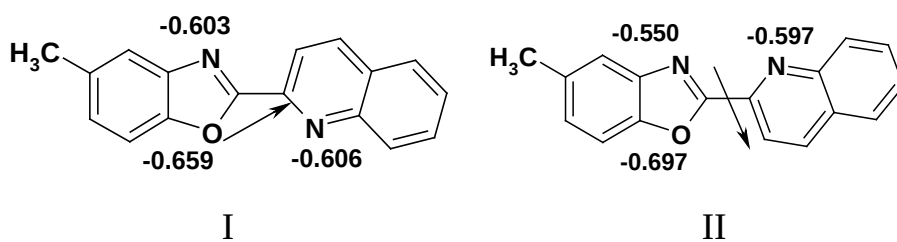
В отличие от случая соединений **4.11**, **4.13**, квантовые выходы флуоресценции соед. **4.10**, **4.12** увеличиваются до $\phi \sim 0,11-0,30$ с ростом полярности растворителя (например, при переходе от толуола к ацетонитрилу, см. табл. 4.21). Дополнительное увеличение квантовых выходов флуоресценции **4.10**, **4.12** (до $\phi \sim 0.38-0.52$) наблюдается с увеличением способности растворителя к образованию водородных связей, например, для **4.10**, **4.12** в метаноле (табл. 4.21). По аналогии с хинолином, увеличение квантовых выходов флуоресценции наблюдаемое для соединений **4.10**, **4.12** в полярном или протонном растворителе, может быть объяснено изменениями в расположении триплетного $\pi\pi^*$ и синглетного $\pi\pi^*$ уровней. По-видимому, процессы релаксации растворителя, происходящие в полярном или протонном растворителе после электронного возбуждения соед. **4.10**, **4.12** приводят к уменьшению энергии синглетных $\pi\pi^*$ уровней этих соединений (об этом свидетельствует наблюдаемый длинноволновый сдвиг полос флуоресценции **4.10**, **4.12** в полярном или протонном

растворителях), и, таким образом, приводят к изменениям во взаимном расположении триплетного $\pi\pi^*$ и синглетного $\pi\pi^*$ уровней.

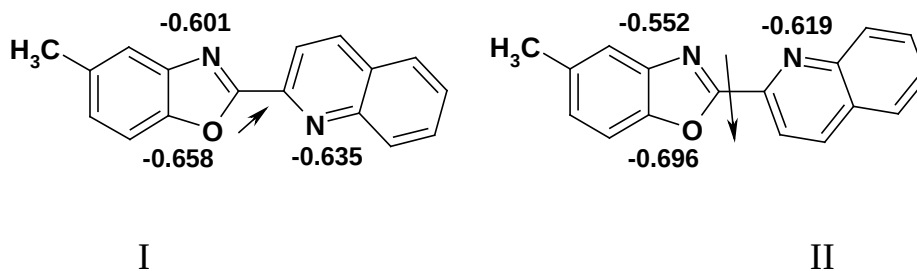
Процессы релаксации растворителя, происходящие в полярном или протонном растворителе после электронного возбуждения соед. **4.11**, **4.13**, не приводят к значительному длинноволновому сдвигу полос флуоресценции этих соединений и, таким образом, взаимное расположение триплетных $\pi\pi^*$ и синглетных $\pi\pi^*$ уровней соед. **4.11**, **4.13** существенно не изменяется в полярном или протонном растворителе по сравнению с соответствующим расположением этих уровней в неполярном толуоле.

Упомянутое различие в выраженности процессов релаксации растворителя для **4.10**, **4.12** и **4.11**, **4.13** может быть вызвано несколькими возможностями [373-375,409]: (А) если изменения величин дипольных моментов при электронном возбуждении в случае соед. **4.10**, **4.12** больше чем в случае соед. **4.11**, **4.13**; (Б), если изменения величин дипольных моментов при электронном возбуждении не являются значительными, но изменения в ориентации векторов дипольных моментов при электронном возбуждении в случае соед. **4.10**, **4.12** существенно больше, чем соответствующие изменения в случае соед. **4.11**, **4.13**.

Для того чтобы выяснить, какие из вышеупомянутых возможностей имеют место для исследованных соединений, методом B3LYP/6-31G (d,p) были рассчитаны абсолютные величины и пространственная ориентация векторов дипольных моментов основного и возбуждённого состояний двух наиболее стабильных конформеров **4.10-4.13**, обозначенных как I и II (рис. 4.47, 4.48), которые отличаются друг от друга взаимной ориентацией хинолинилового и бензоксазольного фрагментов. Результаты квантово-химических расчетов приведены на рис. 4.47, 4.48, а также в табл. 4.22.

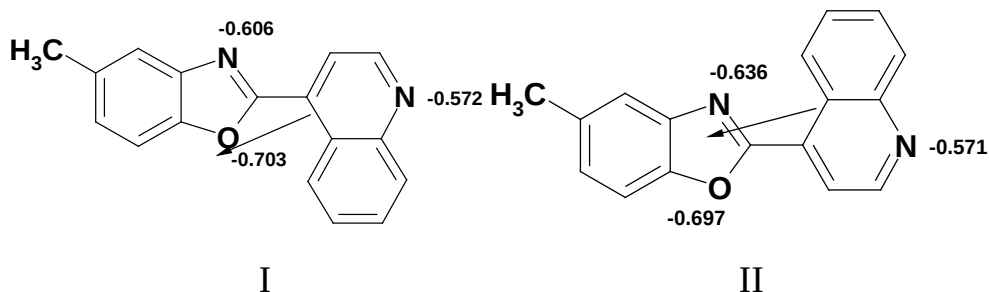


А) Основное электронное состояние

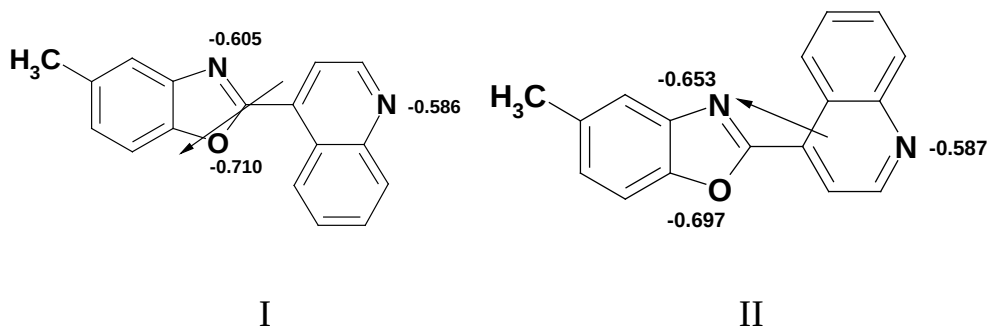


Б) Возбужденное электронное состояние

Рис. 4.47. Распределение зарядов на гетероатомах и направление дипольного момента, рассчитанные для электронных состояний S_0 (А) и S_1 (Б) самых стабильных конформеров (I и II) 5-метил-2-(хинолин-2-ил)-1,3-бензоксазола (соед. 4.10).



А) Основное электронное состояние



Б) Возбужденное электронное состояние

Рис. 4.48. Распределение зарядов на гетероатомах и направление дипольного момента, рассчитанные для электронных состояний S_0 (А) и S_1 (Б) самых

стабильных конформеров (I и II) 5-метил-2-(хинолин-4-ил)-1,3 –бензоксазола (соед. 4.12).

Таблица 4.22

Дипольные моменты* и разность полной электронной энергии ** (ΔE , ккал/моль) наиболее стабильных конформеров (I и II) соед. 4.10-4.13.

Соед.	Конформер	α_0	μ_g	μ_e	$\Delta\mu = \mu_e - \mu_g$	θ	ΔE
4.10	I	5,6	1,26	0,39	-0,73	28	0
	II	5,6	2,69	2,32	-0,27	16	2,5
4.11	I	5,3	3,99	4,12	0,15	6	0
	II	5,4	5,21	5,20	0,01	4	2,6
4.12	I	4,9	3,01	4,09	1,15	12	1,6
	II	4,9	2,89	3,02	0,44	27	0
4.13	I	4,8	2,34	3,82	1,49	5	1,5
	II	4,8	1,41	0,82	1,36	112	0

*Здесь, дипольные моменты в основном μ_g , и в возбужденном состоянии μ_e , а также их векторная разность $\Delta\mu$ выражены в дебаях (Д); значения радиуса Онзагера α_0 выражены в Ангстремах (Å); в соответствии с [393], величина радиуса Онзагера выбиралась равной 40% от длинной оси эллипсоида, описывающего молекулу; θ - угол между векторами дипольных моментов в основном и возбуждённом состояниях выражен в градусах.

** основное состояние конформеров I и II в вакууме.

По данным проведенного расчёта, наиболее стабильные конформеры соедин. **4.10-4.13** (т.е. конформеры I, II) оказались почти плоскими. Углы между плоскостями хинолинильного и бензоксазольного фрагментов оказываются: менее 0,1 градуса для конформеров I, II соединений **4.10, 4.11**, и 4 градуса (для конформера I) и менее 0,1 градуса (для конформера II) в случае **4.12, 4.13**.

На основании данных об относительной энергии конформеров, приведенных в таблице 4.22 можно оценить относительные популяции конформеров для соедин. **4.10-4.13**: для **4.10**: конформер I ~ 99%, конформер II ~ 1%; для **4.11**: конформер I ~ 99%, конформер II ~ 1%; для **4.12**: конформер I ~ 6%, конформер II ~ 94%; для **4.13**: конформер I ~ 7%, конформер II ~ 93%.

Как следует из результатов, представленных в табл. 4.22: (а) абсолютные величины дипольных моментов **4.10-4.13** при переходе в электронно-возбужденное состояние изменяются незначительно (т.е. $\Delta\mu \leq 1,5$ Д); (б) углы между векторами дипольных моментов в основном и в возбужденном состояниях **4.10-4.13** являются острыми (единственное исключение наблюдается для конформера II соединения **4.13**); (с) значения радиуса Онзагера для соедин. **4.10, 4.12** примерно на 0.3-0.1 Å больше, чем соответствующие значения для соедин. **4.11, 4.13**.

Результаты неэмпирических расчетов для **4.10** и **4.11** (см. табл. 4.22) показывают, что наблюдаемое различие в протекании процессов релаксации полярных или протонных растворителей для этих соединений может быть объяснено как большим изменением абсолютных величин дипольных моментов конформеров **4.10** при электронном возбуждении по сравнению с соответствующим изменением для **4.11**, так и большим изменением в ориентации векторов дипольных моментов конформеров **4.10** при электронном возбуждении по сравнению с соответствующим изменением для **4.11**.

В то же время, результаты расчётов для **4.12** и **4.13** (см. табл. 4.22) показывают, что большее изменение абсолютных величин дипольных

моментов и большее изменение в ориентации векторов дипольных моментов наблюдается для конформеров **4.13**. Возможно, различие в протекании процессов релаксации полярных или протонных растворителей для **4.12** и **4.13** может быть вызвано не только различиями в изменении абсолютных величин и ориентации векторов дипольных моментов этих соединений. Если принять во внимание разницу радиусов Онзагера соед. **4.10** и **4.11**, а также, соед. **4.12** и **4.13** (табл. 4.22), возможно и другое объяснение различий в протекании процессов релаксации полярного или протонного растворителя. В соответствии с ним, чем больше полость, которую занимает растворенное вещество в объёме растворителя (т.е. радиус Онзагера), тем большее количество молекул последнего вовлечено в сольватацию растворенного вещества и, следовательно, тем больше энергии необходимо затратить для реорганизации сольватной оболочки, состоящей из полярных или протонных молекул, после электронного возбуждения молекулы растворённого вещества в случае, когда оно сопровождается существенным изменением величины или ориентации вектора дипольного момента растворённого вещества. Такая дополнительная реорганизация сольватной оболочки, происходящая в полярных или протонных растворителях после электронного возбуждения молекул растворённого вещества, приводит к дополнительному длинноволновому смещению спектров флуоресценции, что и наблюдалось для **4.10** и **4.12**. Следует отметить, что больший радиус Онзагеровской полости в случае **4.10** и **4.13** является следствием объёмности метильных групп, введенных в 5-положение бензоксазольного фрагмента **4.11**, **4.13**.

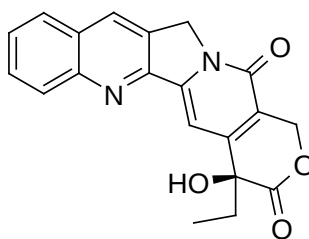
Таким образом, спектрально-флуоресцентные свойства 5-R-2-(хиолин-2-ил)- и 5-R-2-(хиолин-4-ил)-1,3-бензоксазолов ($R = \text{CH}_3$ и Cl) были изучены в растворителях различной полярности и протонодонорной способности. Было установлено, что все исследованные соединения имеют низкий квантовый выход флуоресценции в неполярных растворителях. С

ростом полярности и протонодонорной способности растворителя, для исследованных 5-метил-хинолинилбензоксазолов наблюдаются длинноволновые сдвиги максимумов и увеличение квантовых выходов флуоресценции, в то же время, в случае 5-хлоро-хинолинилбензоксазолов существенных изменений не наблюдалось. Различия в флуоресцентных характеристиках 5-метил- и 5-хлоро-хинолинилбензоксазолов в полярных или протонных растворителях объяснены различием в протекании процессов релаксации растворителя в возбуждённом состоянии этих соединений.

В целом, показано, что флуоресцентные свойства некоторых производных 2-кумаринил-1,3,4-осадиазола и 2-хинолинил-1,3-бензоксазола чувствительны к динамике релаксации молекул растворителя, что позволяет предложить эти соединения в качестве потенциальных ригидохромных флуоресцентных зондов.

4.6. Спектрально-флуоресцентные свойства антиракового препарата камптотецина

Камптотецин (**4.14**, рис. 4.49,) – пентациклический алкалоид, имеющий цитотоксическую активность по отношению к раковым клеткам [410,411].



4.14

Рис. 4.49. Противораковый препарат камптотецин.

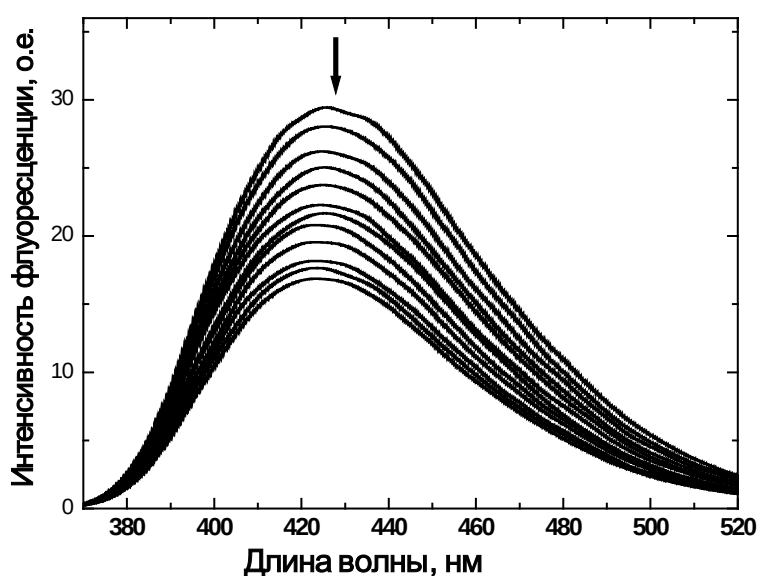
До недавнего времени его применение в качестве антиракового препарата было ограничено вследствие его низкой растворимости в воде и

нестабильности его лактонного кольца в водных растворах [412]: при физиологических pH происходит гидролиз лактонного кольца камптотецина (4.14) до карбоксилата. В гидролизованном состоянии исследуемый препарат связывается с сывороточным альбумином человека, что приводит к снижению эффективной концентрации камптотецина.

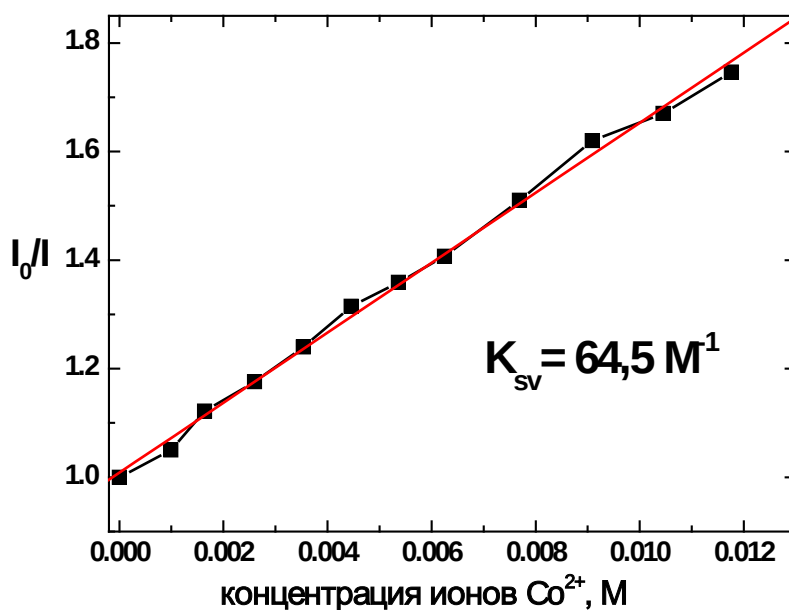
Для решения этой проблемы, Birke et al. [413] предложили использовать липосомы, которые способствуют как увеличению растворимости камптотецина, так и стабилизации его лактонного кольца (а значит – сохранению антираковой активности препарата).

В качестве индикатора связывания камптотецина (4.14) с липосомами, Birke et al. [413] предложили использовать тушение флуоресценции при помощи иодид-иона. Тушение флуоресценции иодид-ионом позволяет различить свободный и связанный с липидной мембраной камптотецин: константы тушения (K_{SV}) для них составляют 44,3 и 6,2 M^{-1} , соответственно.

С целью поиска более эффективного тушителя флуоресценции камптотецина, нами было исследовано тушение свободного камптотецина в водном растворе при помощи ионов кобальта (Co^{2+}), рис. 4.50.



A)



Б)

Рис. 4.50. Тушение флуоресценции камптотецина в водном растворе с увеличением концентрации Co^{2+} (А) и соответствующий график Штерна-Фольмера (Б).

Поскольку тушитель флуоресценции Co^{2+} является ионным, то его проникновение в мембрану будет ограниченным, таким образом он будет тушить флуоресценцию камптотецина, находящегося в водном растворе, с гораздо большей эффективностью по сравнению с тушением 4.14 в липидной мембране.

Установлено, что константа тушения (K_{sv}) свободного камптотецина ионами кобальта в водном растворе составляет $64,5 \text{ M}^{-1}$, т.е. является в 1,46 раза выше соответствующей величины для иодид-ионов. Таким образом, применение ионов кобальта вместо иодид-ионов может улучшить чувствительность метода определения камптотецина по тушению его флуоресценции.

В качестве ещё одного индикатора связывания камптотецина с липосомами, Birke et al. [413] предложили использовать коротковолновый

сдвиг максимума его полосы флуоресценции, наблюдаемый при связывании **4.14** с мембраной, который авторы [413] объясняли изменением полярности среды при переходе **4.14** из водной фазы в липидную мембрану. Вместе с тем, наблюдаемый коротковолновый сдвиг может быть вызван также и изменением протонодонорной способности среды в описываемых условиях.

Таким образом, для интерпретации изменений в спектре флуоресценции **4.14** при его связывании с мембранами, необходимо было проведение дополнительного исследования зависимости спектрально-флуоресцентных свойств камптотецина от полярности и протонодонорной способности среды [414].

Спектральные характеристики камптотецина представлены в табл. 4.23.

Таблица 4.23

Данные спектров поглощения* камптотецина в растворителях различной полярности и протонодонорной способности

Растворитель	ε	$\lambda^1_{\text{погл}}$	$\lambda^2_{\text{погл}}$	$\lambda^3_{\text{погл}}$	$\lambda^4_{\text{погл}}$
CCl ₄	2.24	370	290	-	-
Бензол	2.28	369	-	-	-
Толуоле	2.38	369	-	-	-
Дихлорметан	3.90	364	287	254	230
Хлороформ	4.70	363	289	256	244
Этилацетат	6.02	363	289	254	-
Тетрагидрофуран	7.6	365	290	254	247
Изопропанол	18.3	358	288	253	218
Ацетон	20.74	364	-	-	-

Растворитель	ϵ	$\lambda^1_{\text{погл}}$	$\lambda^2_{\text{погл}}$	$\lambda^3_{\text{погл}}$	$\lambda^4_{\text{погл}}$
Метанол	32.63	358	288	253	220
Бензонитрил	25.2	364	-	-	-
Ацетонитрил	36.2	362	287	253	223
Диметилформаид	36.7	362	-	-	-
Вода	78.3	354	287	253	218

* Здесь, ϵ – диэлектрическая проницаемость растворителя; $\lambda^{1-4}_{\text{погл}}$ - положения максимумов в спектрах поглощения (нм).

Спектры поглощения **4.14** в области 200-420 нм состоят из четырех полос, отнесенных к электронным переходам $\pi\pi^*$ -типа. Как и в случае хинолина [374,400], $n-\pi^*$ полоса поглощения **4.14** скрыта интенсивной длинноволновой $\pi-\pi^*$ полосой поглощения. С ростом полярности растворителя наблюдается коротковолновый сдвиг длинноволновой полосы поглощения (табл. 4.23, рис. 4.51).

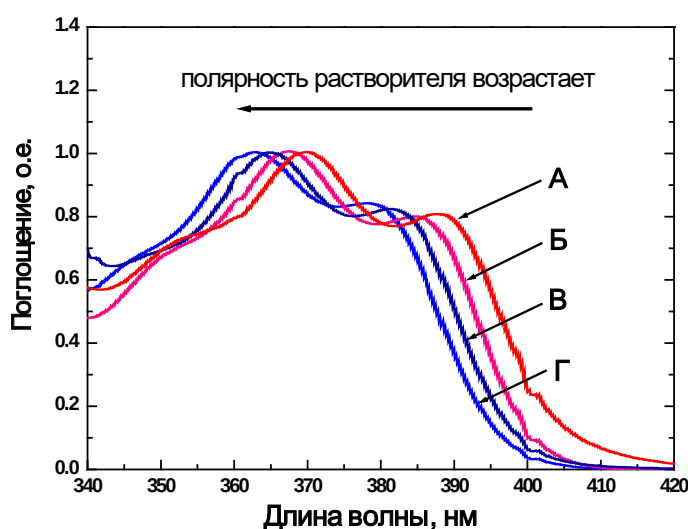


Рис. 4.51. Спектры поглощения **4.14** в растворителях различной полярности: А - толуол, Б - тетрагидрофуран, В - ацетон, Г – ацетонитрил.

Этот факт указывает на то, что при условии совпадения направлений векторов дипольных моментов в основном и возбужденном состояниях, абсолютная величина дипольного момента соединения **4.14** в возбужденном состоянии ниже, чем соответствующая величина в основном состоянии.

Ещё более существенное гипсохромное смещение наблюдается в спектрах **4.14** в протонодонорных растворителях: в изопропанолe, в метаноле, в воде (см. табл. 4.23). Принимая во внимание, что, согласно квантово-химическим расчетам по методу AM1 [309], при электронном возбуждении электронная плотность перераспределяется от находящейся в сопряжении с π -системой молекулы карбонильной группы на хинолиновый фрагмент [414] (не показано), дополнительные синие сдвиги длинноволновых максимумов поглощения камптотецина в протонодонорных растворителях можно объяснить образованием водородных связей с участием молекул растворителей и карбонильной группы (карбонильная группа **4.14**, находящаяся в сопряжении с π -системой молекулы, в возбуждённом состоянии является донором электронной плотности [414]). Упомянутое образование водородных связей препятствует переносу заряда в возбуждённом состоянии от карбонильной группы на хинолиновый фрагмент, и, следовательно, дестабилизирует возбужденное электронное состояние относительно основного электронного состояния, что и приводит к сдвигу спектров поглощения в область больших энергий при увеличении протонодонорной способности растворителя [373].

Камптотецин способен флуоресцировать благодаря наличию в его структуре хинолинового флуорофора с расширенной сопряжённой системой (рис. 4.49). Характеристики флуоресценции камптотецина представлены в табл. 4.24.

Таблица 4.24

**Флуоресцентные свойства* камптотецина в растворителях
различной полярности и протонодонорной способности**

Растворитель	ε	n	λ_{ϕ}	$\Delta\nu_{cm}$	ϕ
CCl_4	2.24	1.4574	424	3440	0.34
Бензол	2.28	1.5011	424	3510	0.56
Толуол	2.38	1.4961	424	3510	0.57
Дихлорметан	3.90	1.4242	420	3660	0.57
Хлороформ	4.70	1.4459	420	3740	0.61
Этилацетат	6.02	1.3723	422	3850	0.59
Тетрагидрофуран	7.6	1.4076	422	3700	0.62
Изопропанол	18.3	1.3747	420	4120	0.62
Ацетон	20.74	1.3588	423	3830	0.63
Метанол	32.63	1.3286	427	4510	0.62
Бензонитрил	25.2	1.5289	422	3780	0.64
Ацетонитрил	36.2	1.3441	420	3810	0.69
Диметилформамид	36.7	1.4303	420	3810	0.72
Вода	78.3	1.3333	428	4880	0.76

* Здесь ε and n – диэлектрическая проницаемость растворителя и показатель преломления растворителя; λ_{ϕ} – положения максимумов в спектрах флуоресценции (нм) и $\Delta\nu_{cm}$ – Стоксов сдвиг флуоресценции (cm^{-1}), соответственно; ϕ - квантовый выход флуоресценции.

Наиболее характерные спектры поглощения и флуоресценции **4.14** в растворителях различной природы представлены на рис. 4.52.

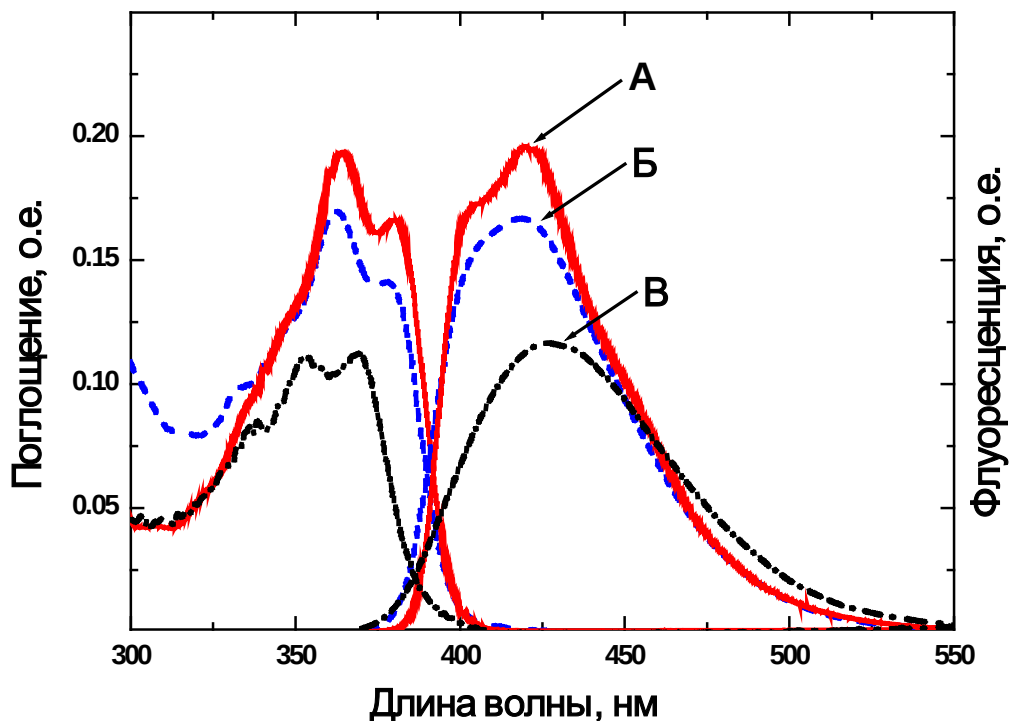


Рис. 4.52. Спектры поглощения и флуоресценции камптотецина: А - дихлорметан, Б - ацетонитрил, В - вода.

В отличие от полос поглощения (см. табл. 4.23), положение полосы флуоресценции **4.14** зависит от изменений полярности растворителя не столь значительно: в полярных апротонных растворителях наблюдается лишь небольшой (~ 110 - 220 см^{-1}) её коротковолновый сдвиг (табл. 4.24, рис. 4.52). Это может быть объяснено тем, что, несмотря на качественное сходство влияния полярности растворителя на спектры флуоресценции и поглощения **4.14**, процессы релаксации растворителя способствуют длинноволновому сдвигу спектра флуоресценции с увеличением полярности среды [373]. В результате, с увеличением полярности апротонного растворителя, полоса флуоресценции камптотецина смещается в сторону коротких длин волн менее значительно, чем его длинноволновая полоса поглощения.

В протонодонорных метаноле и воде наблюдается длинноволновый сдвиг ($\sim 160\text{-}220\text{ нм см}^{-1}$) максимума полосы флуоресценции **4.14** (табл. 4.24, рис. 4.52).

Таким образом, поскольку в полярных апротонных растворителях имеет место коротковолновый сдвиг полосы флуоресценции **4.14** с ростом полярности растворителя, а в протонодонорных метаноле и воде наблюдается длинноволновый сдвиг полосы флуоресценции **4.14**, описываемый Birke et al. [413] коротковолновый сдвиг максимума полосы флуоресценции камптотецина при его связывании с липидной мембраной следует отнести не столько к уменьшению полярности [413], сколько к уменьшению протонодонорной способности среды при переходе молекулы камптотецина из водной фазы в липидную мембрану.

Как видно из данных табл. 4.24, в отличие от хинолина [400], камптотексин имеет достаточно высокий квантовый выход флуоресценции даже в неполярных апротонных растворителях $\Phi \sim 0,34\text{-}0,57$ (хинолин не флуоресцирует в этих условиях). Этот факт указывает на отсутствие какого-либо значительного деактивирующего влияния $\pi\pi^*$ уровней хинолинового кольца и карбонильной группы на спектрально-люминесцентные характеристики камптотецина. По-видимому, триплетные уровни $\pi\pi^*$ типа, локализованные на карбонильной группе, расположены значительно выше по энергии, чем нижнее синглетное возбужденное состояние камптотецина и, следовательно, процессы дезактивации, связанные с интеркомбинационной конверсией, не могут эффективно конкурировать с флуоресценцией при комнатной температуре. С увеличением полярности растворителя квантовый выход флуоресценции **4.14** увеличивается до $\Phi \sim 0,61\text{-}0,76$.

На основании полученных экспериментальных данных (табл. 4.23, 4.24) нами была произведена оценка дипольных моментов в основном и

возбуждённом электронных состояниях **4.14** при помощи нескольких методов (уравнения 4.4-4.10):

А) Метод Матаги-Липперта [393,394,415]:

$$\nu_A - \nu_F = \frac{2(\mu_e - \mu_g)^2}{hca_0^3} \left[\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right] \quad (4.4)$$

Б) Метод Саппона [390]:

$$\frac{\mu_e}{\mu_g} = \frac{(\nu_f)_1 - (\nu_f)_2}{(\nu_a)_1 - (\nu_a)_2} \quad (4.5)$$

Г) Метод Бахшиева [416-418]:

$$\nu_s = C_2 \left(\frac{2n^2 + 1}{n^2 + 2} \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} + p_s \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) + \nu_s^0 \quad (4.6)$$

$$\Delta\nu_{af} = \Delta C_{af} \left(\frac{2n^2 + 1}{n^2 + 2} \left[\frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right] + p_{af} \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right) + \Delta\nu_{af}^0 \quad (4.7)$$

$$\mu_E = \sqrt{\mu_G^2 - C_2 hca^3} \quad (4.8)$$

$$\Delta\mu = \sqrt{0.5\Delta C_{af} hca^3} \quad (4.9)$$

$$\cos \theta = \frac{1}{2\mu_G \mu_E} \left[(\mu_G^2 + \mu_E^2) - \frac{\Delta C_{af}}{2C_2} (\mu_G^2 - \mu_E^2) \right] \quad (4.10)$$

где ν_A и ν_F – волновые числа (см^{-1}) максимумов поглощения и флуоресценции, соответственно; μ_g и μ_e – дипольные моменты основного и возбуждённого состояний, соответственно; a_0 – радиус Онзагеровской полости [419]; ε – диэлектрическая проницаемость растворителя и n – показатель преломления растворителя; h – постоянная Планка и C – скорость света; где $(\nu_f)_1 - (\nu_f)_2$ и $(\nu_a)_1 - (\nu_a)_2$ – разность волновых чисел максимумов флуоресценции для двух растворителей и разность волновых чисел максимумов поглощения для двух растворителей; где ν_s – полусумма волновых чисел максимумов флуоресценции и поглощения: $\nu_s = (\nu_F + \nu_A)/2$; $\Delta\nu_{af}$ – разность волновых чисел максимумов флуоресценции и поглощения (Стоксов сдвиг флуоресценции); S и p (с соответствующими индексами) – параметры, зависящие от т.н. деформационной поляризуемости молекулы [416-418]; ν_0 (с соответствующими индексами) – свободные члены – величины соответствующих спектральных параметров в вакууме; $\Delta\mu$ – векторная разность дипольных моментов μ_e и μ_g ; θ – угол между векторами дипольных моментов основного и возбуждённого состояний.

Два из применённых методов: Матаги-Липперта (уравн. 4.4), и Саппона (уравн. 4.5), – основаны на предположении, что вектор дипольного момента в основном электронном состоянии коллинеарен вектору дипольного момента в возбуждённом электронном состоянии. Метод Бахшиева (уравн. 4.6-4.10), напротив, предполагает наличие угла между векторами дипольных моментов основного и возбуждённого электронных состояний.

Результаты оценки дипольных моментов **4.14** в основном и возбуждённых состояниях приведены в табл. 4.25.

Дипольные моменты, рассчитанные различными способами*

Способ расчёта (уравнение)	a_0 ,	μ_g	μ_e ,	$\Delta\mu=\mu_g-\mu_e$	θ
Квантово-химические расчёты AM1	6.1 ^a	6.95 ^a	4.88	2.13	9
<i>Метод Матаги -Липперта</i> (уравнение 4.4)	6.1 ^a	6.95 ^a	0.65	6.30	-
<i>Метод Саппона</i> (уравнение 4.5)	-	6.95 ^a	2.19	4.76	-
<i>Метод Бахшиева</i> (уравнения 4.6-4.10)	6.1 ^a	6.95 ^a	5.05	3.77	32

* Дипольные моменты в основном (μ_g) и в возбуждённом (μ_e) электронных состояниях приведены в дебаях (Д); θ - угол между векторами дипольных моментов основного и возбуждённого электронных состояний **4.14**, градусы; величины с индексом ^a рассчитаны методом AM1.

Молекулярные параметры, необходимые для оценки дипольного момента **4.14** в возбужденном состоянии (радиус Онзагера ($\sim 6,1$ Å) и дипольный момент в основном состоянии ($\sim 6,9$ Д)) были рассчитаны методом AM1 [303]. Согласно с рекомендацией Липперта [430] по расчёту радиусов Онзагера (a_0) для несферических молекул, величина a_0 принималась равной 40% от величины длинной оси эллипсоида, описывающего молекулу.

Способ Саппона [390] (уравн. 4.5) позволяет избежать ошибки в определении величин дипольных моментов, вызванной неопределенностью в определении радиуса Онзагера, хотя возможность ошибки определения дипольного момента в возбуждённом состоянии всё ещё существует, поскольку этот способ основан на предположении коллинеарности дипольных

моментов для основного и возбужденного состояний, а в некоторых случаях [431-433] упомянутые дипольные моменты неколлинеарны.

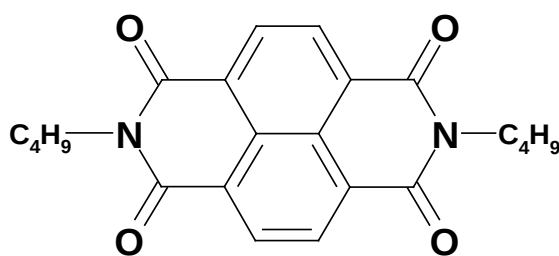
Как видно из табл. 4.25, абсолютная величина дипольного момента **4.14** в возбуждённом состоянии ($\mu_e \sim 5$ Д), оцененная с использованием уравнений 4.6-4.10, является наиболее близкой к соответствующей абсолютной величине μ_a ($\mu_e \sim 4,9$ Д), рассчитанной методом АМ1, в то же время, значение угла между векторами дипольных моментов основного и возбуждённого электронных состояний **4.14** (32°), оцененная при помощи метода Бахшиева (уравн. 4.10), больше соответствующего значения (9°), рассчитанного методом АМ1. В целом, уменьшение дипольного момента камптотецина при электронном возбуждении на $2,1 \div 6,3$ Д (табл. 2.25) хорошо согласуется с наблюдаемыми коротковолновыми сдвигами максимумов полос поглощения **4.14** с ростом полярности растворителя (табл. 4.23, рис. 4.51).

Таким образом, впервые систематически исследованы спектрально-флуоресцентные свойства противоракового препарата камптотецин. Показано, что коротковолновый сдвиг полосы флуоресценции камптотецина, который наблюдается при его связывании с липидной мембраной, следует отнести не столько к уменьшению полярности, а скорее к уменьшению протонодонорной способности среды при переходе молекулы камптотецина из водной фазы в липидную мембрану. Для улучшения чувствительности метода количественного определения камптотецина по тушению его флуоресценции предлагается использовать в качестве тушителя ион Co^{2+} , поскольку константа тушения флуоресценции свободного камптотецина в этом случае составляет $64,5 \text{ M}^{-1}$, т.е. является в 1,46 раза выше соответствующей величины для тушения иодид-ионами.

4.7. Исследование возможности детекции N,N'-бис-н-бутил-диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты

Производные диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты используются как модели фотосинтетического реакционного центра [420-422], а также в качестве соединений, интеркалирующих в ДНК [423] (такое свойство этих соединений используется для иммобилизации полинуклеотида на поверхности электрода при электрохимической детекции гибридизации ДНК [424-426]).

Для оценки возможности детекции N,N'-бис-н-бутил производного диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты (рис. 4.53) нами были исследованы его спектрально-люминесцентные свойства и способность к тушению флуоресценции нафталина, фенантрена, пирена и перилена [427].



4.18

Рис. 4.53. N,N'-бис-н-бутил-диимид-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты.

Спектры поглощения и флуоресценции **4.18** в ацетонитриле показаны на рис. 4.54. Спектральные и флуоресцентные свойства **4.18** представлены в табл. 4.26 и 4.27, соответственно.

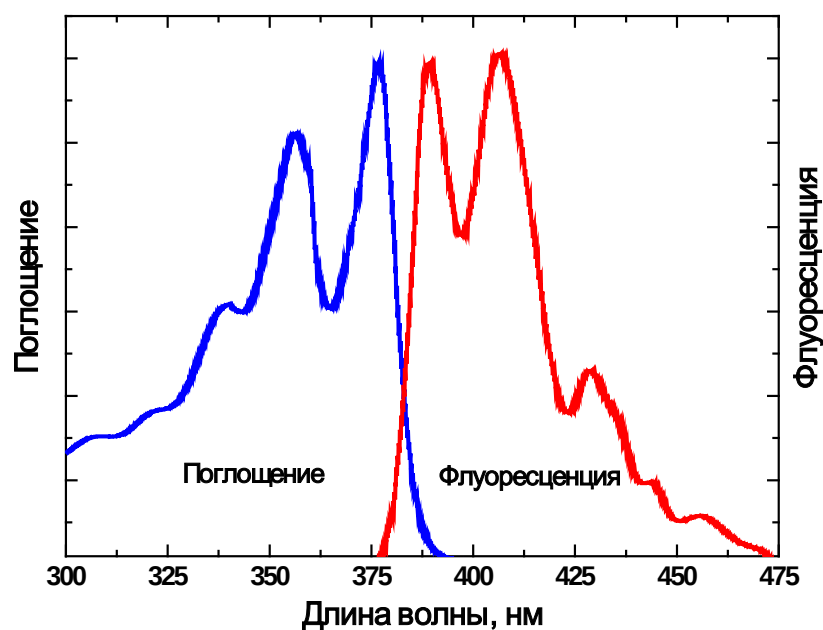


Рис. 4.54. Спектры поглощения и флуоресценции соед. **4.18** в ацетонитриле.

Таблица 4.26

**Положение и коэффициенты молярной экстинкции максимумов
поглощения* 4.18 в ацетонитриле.**

λ_1^{abs}	ε_1	λ_2^{abs}	ε_2	λ_3^{abs}	ε_3
377	52000	357	43200	340	25500

* $\lambda_{1-3}^{пол}$ - положения максимумов в спектре поглощения (нм), ε_{1-3} - коэффициенты молярной экстинкции ($\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ см}^{-1}$).

Таблица 4.27

Параметры флуоресценции* 4.18 в ацетонитриле.

λ_1^f	λ_2^f	λ_3^f	φ	τ_0	τ_f	k_f	k_d	E_{0-0}
390	407	429	0,002	1900	3,8	5,3	2,6	313

* λ_{1-3}^f - положения максимумов в спектре флуоресценции (нм), φ - квантовый выход флуоресценции, τ_0 – радиационное (излучательное) время жизни (пс),

τ_f – время жизни флуоресценции (пс), k_f – константа скорости флуоресценции, (10^8 с^{-1}); k_d – константа безызлучательной дезактивации, (10^{11} с^{-1}); E_{0-0} – энергия 0-0 перехода ($\text{кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$).

Спектры поглощения и флуоресценции **4.18** в ацетонитриле (рис. 4.57) зеркально симметричны друг другу, а величина Стоксова сдвига невелика (3440 см^{-1}). Спектры поглощения состоят из интенсивной коротковолновой полосы 235 нм (не показана) и более длинноволновой полосы поглощения с выраженной колебательной структурой с тремя максимумами 377 , 352 и 340 нм . Значения молярных коэффициентов поглощения (ϵ_{l-3} , табл. 4.26) порядка $10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ указывают на $\pi\pi^*$ характер перехода $S_0 \rightarrow S_1$. Энергия чисто электронного перехода с нижнего колебательного уровня S_0 состояния на нижний колебательный уровень S_1 состояния (т.н. 0-0 переход), оцененная по точке пересечения нормированных спектров поглощения и флуоресценции (рис. 4.54), составляет $313 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$. Это значение ниже, чем соответствующее значение для N-бутилимида-1,8-нафталин-дикарбоновой кислоты: $339 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ [428]. Уменьшение энергии 0-0 перехода в случае **4.18** обусловлено наличием второй имидной группировки.

Спектр флуоресценции отчётливо структурирован с колебательными максимумами при 429 , 407 и 390 нм (рис. 4.54, табл. 4.27), интенсивности которых соотносятся как $0,37:1:0,98$. Спектр возбуждения **4.18** (не показан) совпадает с соответствующим спектром поглощения.

Радиационное время жизни τ_o для **4.18** было вычислено по формуле [429]: $\tau_o = 3,5 \cdot 10^8 / (v_{\max}^2 \epsilon_{\max} \Delta v_{1/2})$, где $v_{\max}$ – волновое число максимума полосы поглощения в см^{-1} , $\epsilon_{\max}$ – молярный коэффициент экстинкции на длине волны максимума полосы поглощения, $\Delta v_{1/2}$ –полуширина выбранной полосы поглощения в см^{-1} . Время жизни флуоресценции **4.18** оценивалось по

формуле: $\tau_f = \tau_0 \cdot \varphi$, а скорость испускания флуоресценции - по формуле: $k_f = 1/\tau_0$.

Рассчитанное время жизни флуоресценции τ_f составило 3,8 пс (табл. 4.28). Это значение хорошо согласуется с литературными данными: Green и Fox [430] сообщают, что типичные времена жизни флуоресценции диимидов-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты являются ниже, чем 20 нс.

Исследованный N,N'-бис-н-бутил-диимид-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты имеет низкий квантовый выход флуоресценции ($\varphi \sim 0,002$; см. табл. 4.27), который обусловлен наличием высокоэффективного процесса безызлучательной дезактивации путём интеркомбинационной конверсии (ИКК) [430,431]. Для объяснения низких квантовых выходов диимидов-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты Wintgens et al. [431] предположили существование триплетного $\pi\pi^*$ состояния (T_2), расположенного только на 8,4 кДж моль⁻¹ выше по энергии, чем синглетное $\pi\pi^*$ состояние диимидов-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты. С другой стороны, Green и Fox [430] не выявили никаких триплетных уровней, близких по энергии к синглетным состояниям додецил-диимида N,N'-бис-додецил-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты (они оценили, что разность в энергии между S_1 и T_1 состояниями составляет 113 кДж·моль⁻¹) и предположили, что быстрая интеркомбинационная конверсия обусловлена сильным спин-орбитальным взаимодействием с участием $\pi\pi^*$ уровней четырёх карбонильных групп. Однако, поскольку выводы в [430] были основаны на результатах измерения спектров триплет-триплетного поглощения, нельзя исключить, что наблюдалось $T_1 \rightarrow T_n$ поглощение (где $n > 2$) и, таким образом, положение уровня T_2 осталось невыясненным.

Диимиды-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты, как известно [430,432,433], являются электронодефицитными соединениями и, таким образом, способны тушить флуоресценцию ароматических соединений по механизму переноса электрона [432,433]. Нами была протестирована способность соедин. **4.18** к тушению флуоресценции ряда ароматических

полициклических соединений – доноров электронов: нафталина, фенантрена, пирена и перилена (табл. 4.28).

Таблица 4.28

Константы тушения флуоресценции нафталина, фенантрена, пирена и перилена при помощи 4.18 в ацетонитриле.

Соединение	K_{SV}	τ_0 (нс)	k_q ($M^{-1} s^{-1}$)
Нафталин	1320	105*	$1,3 \cdot 10^{10}$
Фенантрен	790	61*	$1,3 \cdot 10^{10}$
Пирен	9360	475*	$1,9 \cdot 10^{10}$
Перилен	72	6*	$1,2 \cdot 10^{10}$

*по данным [429]; K_{SV} – константа Штерна-Фольмера; τ_0 – время жизни флуоресценции при отсутствии тушителя флуоресценции; k_q – бимолекулярная константа скорости тушения флуоресценции.

Согласно табл. 4.28, величины бимолекулярных констант скорости тушения ароматических электронодонорных соединений в присутствии исследуемого N,N'-бис-н-бутил-диимид-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты, вычисляемые как $k_q = K_{SV} / \tau_0$, оказались порядка $10^{10} s^{-1}$, что свидетельствует о диффузионно-контролируемом характере тушения флуоресценции. Отмеченный характер тушения флуоресценции указывает на то, что исследованный нами N,N'-бис-н-бутил-диимид-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты не образует π -электронных донорно-акцепторных комплексов с ароматическими молекулами – донорами π -электронов.

Для возможности детекции N,N'-бис-н-бутил-диимид-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты были исследованы его спектрально-

люминесцентные свойства. Установлено, что исследованный нафталиндииимид имеет низкий квантовый выход флуоресценции ($\phi \sim 0,002$) и, являясь акцептором электронов, способен тушить флуоресценцию нафталина, фенантрена, пирена и перилена. Константы тушения ароматических электронодонорных соединений при помощи исследуемого производного нафталиндииимида оценены $\sim$ в 10^{10} с^{-1} , что свидетельствуют о диффузионно-контролируемом характере тушения флуоресценции.

4.8. Оценка растворимости ряда производных N,N'-бис-диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты в органических растворителях различной природы

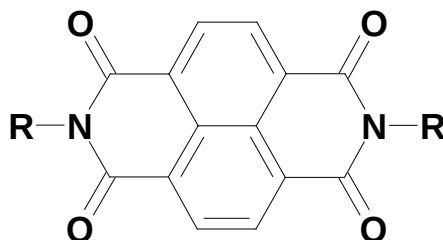
Кроме уже упомянутых в разделе 4.7 применений производных диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты как моделей фотосинтетического реакционного центра [420-422] и в качестве соединений, интеркалирующих в ДНК [423], эти соединения также применяются в качестве органических электропроводящих материалов [434-436].

Серьёзной проблемой в использовании производных диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты является их низкая растворимость в органических растворителях вследствие высокой степени агрегации их молекул [437,438].

Одним из способов решения проблемы низкой растворимости производных диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты является использование объёмных боковых N,N'-алифатических или N,N'-ароматических заместителей [439,440].

С целью выяснения связи между химической структурой производных N,N'-бис-диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты с различными боковыми заместителями (рис. 4.55) и их растворимостью нами использовалась электронная абсорбционная спектроскопия (UV/VIS)

[439,440], с помощью которой были получены данные для следующих растворителей: о-ксилола, толуола, хлороформа, этилацетата, тетрагидрофурана, дихлорметана, диметилформамида, ацетонитрила.



4.19

R = н-бутил, н-додецил, изоамил, 2-этилморфолинил, циклогексил, дегидроабиэтил, фенил, п-нитрофенил, п-хлорфенил, о-хлорфенил, п-бромфенил, п-толил, α-нафтил.

Рис. 4.55. Исследованные производные N,N'-бис-диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты.

Поскольку заместитель у имидных атомов азота не находится в сопряжении с системой π -электронов основного хромофорного фрагмента молекулы, положения максимумов полос поглощения для **4.19** с различными алкильными и арильными боковыми заместителями совпадают с соответствующими величинами для N,N'-бис-н-бутил производного, спектрально-флуоресцентные свойства которого были рассмотрены в разделе 4.7: например, в ацетонитриле наблюдается длинноволновая полоса поглощения, имеющая колебательную структуру с тремя максимумами 377, 352 и 340 нм (раздел 4.7, см. рис. 4.54). Положение длинноволновой полосы поглощения исследованных производных **4.19** в различных растворителях изменялось незначительно, в пределах 1-4 нм (не показано), что указывает на близость энергии их S_0 - S_1 переходов, и, следовательно, позволяет предположить, что и значения коэффициента молярной экстинкции [374] длинноволновой полосы поглощения для всех исследованных производных **4.19** будут близкими. Для определения растворимости (как

концентрации насыщенного раствора) использовали закон Бэра. Для всех исследованных производных **4.19** использовали коэффициент молярной экстинкции $\varepsilon = 52\ 000\ \text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, характерный для N,N'-бис-дегидроабиетил-производного в дихлорметане.

Растворимость соед. **4.19** с различными алкильными и арильными боковыми заместителями представлена в табл. 4.29.

Таблица 4.29

Растворимость алкильных и арильных производных N,N'-бис-диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты в органических растворителях различной природы

R	Растворитель			
	о-Ксилол	Толуол	Хлороформ	Этилацетат
н-бутил	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$	$4,6 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$
изоамил	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$
2-этилморфолинил	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$1,4 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$
циклогексил	$1,3 \cdot 10^{-5}$	$2,7 \cdot 10^{-5}$	$4,8 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$
дегидроабиэтил	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-5}$	$7,1 \cdot 10^{-5}$	$2,7 \cdot 10^{-5}$
фенил	$1,0 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$
п-нитрофенил	-	-	-	$4,7 \cdot 10^{-6}$
п-хлорфенил	$2,8 \cdot 10^{-6}$	$4,5 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$6,1 \cdot 10^{-6}$
о-хлорфенил	$3,3 \cdot 10^{-6}$	$4,5 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$9,9 \cdot 10^{-6}$
п-бромфенил	$3,9 \cdot 10^{-6}$	$3,7 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{-6}$
п-толил	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-6}$	$3,8 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$
α -нафтил	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$5,3 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$

Таблица 4.29 (продолжение)

R	Растворитель			
	ТГФ	ДХМ	ДМФ	А
н-бутил	$2,9 \cdot 10^{-5}$	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-5}$
н-додецил	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-6}$
изоамил	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{-6}$
2-этилморфолинил	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$
циклогексил	$2,3 \cdot 10^{-5}$	$4,2 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{-6}$
дегидроабиэтил	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$7,5 \cdot 10^{-5}$	$3,8 \cdot 10^{-5}$	$4,6 \cdot 10^{-5}$
R	Растворитель			
	ТГФ	ДХМ	ДМФ	А
фенил	$2,8 \cdot 10^{-5}$	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$3,3 \cdot 10^{-5}$	$2,3 \cdot 10^{-5}$
п-нитрофенил	$3,1 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$
п-хлорфенил	$5,4 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-5}$
о-хлорфенил	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$
п-бромфенил	$1,2 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$8,2 \cdot 10^{-6}$
п-толил	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$5,1 \cdot 10^{-5}$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-5}$
α -нафтил	$4,9 \cdot 10^{-5}$	$7,1 \cdot 10^{-5}$	$3,9 \cdot 10^{-5}$	$2,2 \cdot 10^{-5}$

Обозначения: ТГФ - тетрагидрофуран, ДХМ - дихлорметан, ДМФ - диметилформамид, А - ацетонитрил. Растворимость, как концентрация насыщенного раствора, представлена в моль·литр⁻¹.

Как видно из табл. 4.29, растворимость **4.19** повышается в случае объёмных боковых N,N'-алифатических (дегидроабиэтила, 2-этилморфолина

и циклогексила) или N,N'-ароматических заместителей (п-толила и α-нафтила): наибольшая концентрация насыщенного раствора **4.19** была достигнута в случае N,N'-бис-дегидроабиэтилового производного в дихлорметане ($7,5 \times 10^{-5}$ моль · литр⁻¹).

В целом, растворимость N,N'-ароматических производных **4.19** в органических растворителях ниже, чем соответствующая растворимость N,N'-алифатических производных (табл. 4.29): это можно объяснить более выраженным увеличением липофильности **4.19** при введении арильных заместителей, что способствует агрегации и, таким образом, уменьшает растворимость.

Согласно табл. 4.29, растворимость производных N,N'-бис-диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты возрастает в последовательности: о-ксилол < толуол < этилацетат < ДМФА < ацетонитрил < ТГФ < хлороформ < дихлорметан, т.е. наибольшая растворимость **4.19** наблюдается в полярных растворителях.

Таким образом, при помощи электронной абсорбционной спектроскопии (UV/VIS) было проведено систематическое количественное исследование растворимости алкильных и арильных производных N,N'-бис-диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты в органических растворителях различной природы: установлено, что наибольшая растворимость наблюдается в полярном растворителе дихлорметане, а наименьшая растворимость – в малополярном растворителе орто-ксилоле. Установлено, что введение объемных алифатических заместителей является наиболее подходящим способом для того, чтобы улучшить растворимость производных N,N'-бис-диимида-1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты в органических растворителях: наибольшая концентрация насыщенного раствора была достигнута для N,N'-бис-дегидроабиэтилового производного в дихлорметане ($7,5 \times 10^{-5}$ моль · литр⁻¹).

4.9. Исследование спектральных свойств новых физиологически активных соединений, полученных из турецких лишайников

Метаболиты лишайников находят широкое применение при производстве косметики и антимикробических [441-460], антираковых [461], антиаллергенных средств [462-465].

Сведения о спектральных свойствах химических соединений, выделенных из лишайников, могут использоваться для детекции этих соединений при проведении биохимического анализа [466,467].

В работе [468] была установлена структура трёх новых натуральных продуктов (рис.4.56), выделенных из турецких лишайников *Pseudevernia furfuracea*, *Evernia prunastri* и *Letharia vulpine*, соответственно.

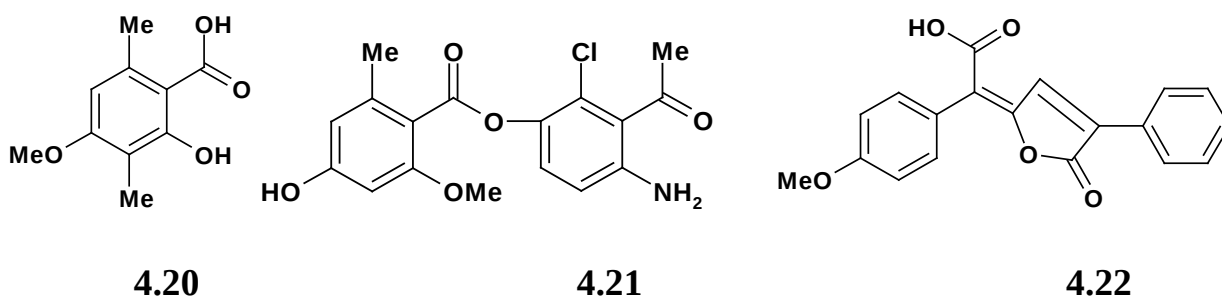


Рис. 4.56. Структура трёх метаболитов, выделенных из турецких лишайников [468].

Нами было исследованы спектральные свойства соединений **4.20-4.22** (рис. 4.56) в растворителях различной полярности и протонодонорной способности [469]. Спектры поглощения соединений **4.20-4.22** представлены на рис. 4.57-4.59, соответственно. Положение максимумов полос поглощения **4.20-4.22** в растворителях с различной полярностью и протонодонорной способностью представлено в табл.4.30-4.32, соответственно.

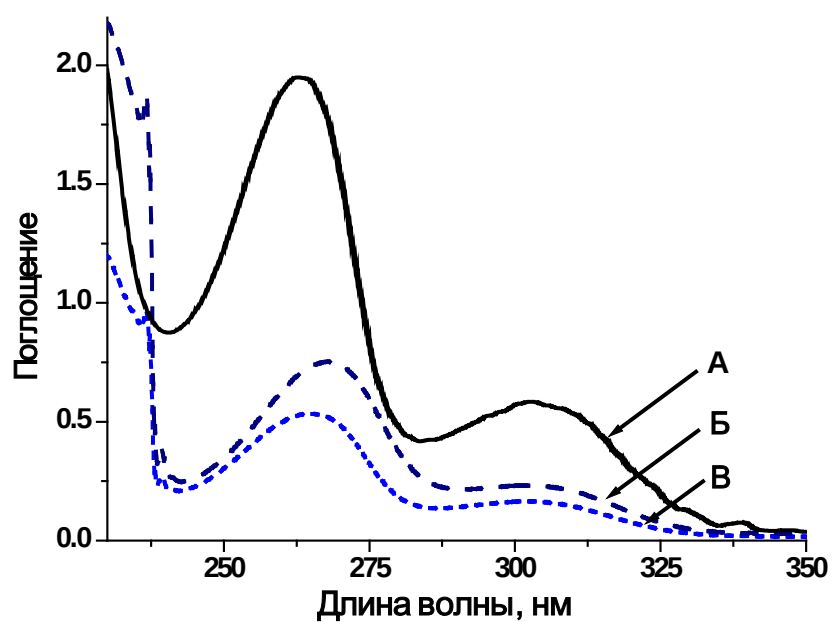


Рис. 4.57. Спектры поглощения соединения **4.20**: А - в дихлорметане, Б – в ацетонитриле, В – в изопропанолe.

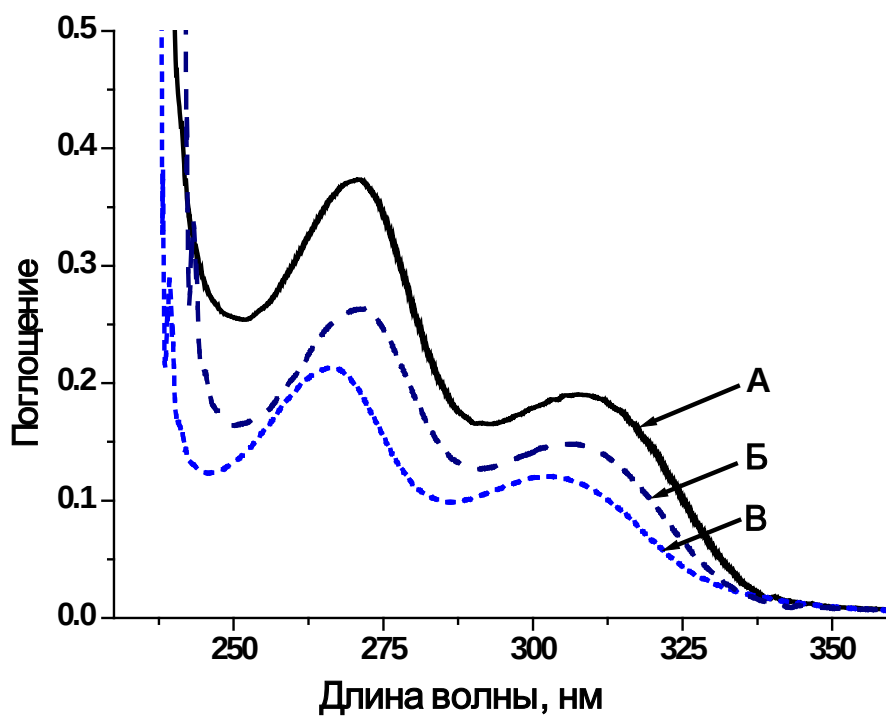


Рис. 4.58. Спектры поглощения соединения **4.21**: А - в дихлорметане, Б – в ацетонитриле, В – в изопропанолe.

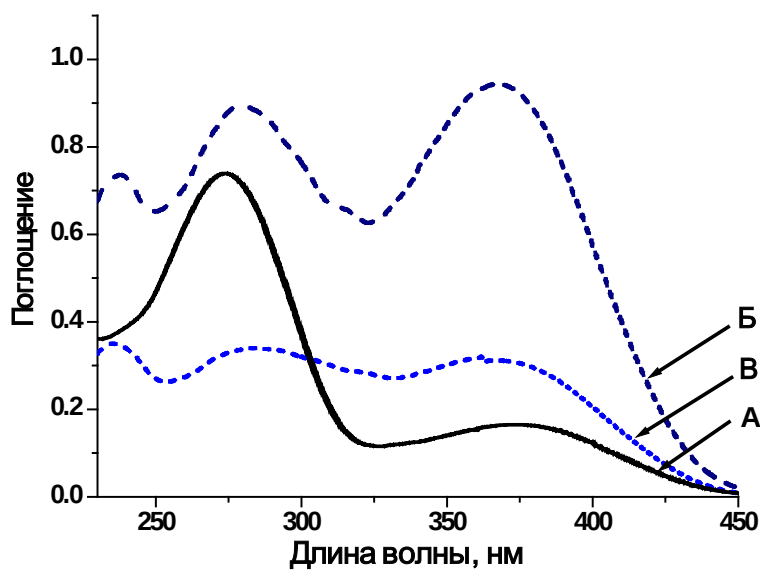


Рис. 4.59. Спектры поглощения соединения **4.22**: А - в дихлорметане, Б – в ацетонитриле, В – в изопропанолe.

Таблица 4.30

**Положение максимумов полос поглощения 4.20
в органических растворителях различной природы.**

Растворитель	ε	$\lambda^1_{\text{погл}}$	$\lambda^2_{\text{погл}}$	$\lambda^3_{\text{погл}}$	$\lambda^4_{\text{погл}}$
CCl_4	2.24	307	266	-	-
Бензол	2.28	306	-	-	-
Толуол	2.38	306	-	-	-
Хлороформ	4.70	305	266	-	-
Этилацетат	6.02	304	267	-	-
Тетрагидрофуран	7.6	304	266	237	214
Дихлорметан*	8.90	303	264	227	-
Изопропанол	18.3	303	266	220	-
Метанол	32.63	303	268	219	-

Растворитель	ε	$\lambda^1_{\text{погл}}$	$\lambda^2_{\text{погл}}$	$\lambda^3_{\text{погл}}$	$\lambda^4_{\text{погл}}$
Ацетонитрил**	36.2	302	268	217	-
Диметилформамид	36.7	302	268	-	-

ε – диэлектрическая проницаемость растворителя; $\lambda^{1-4}_{\text{погл}}$ – положения максимумов в спектре поглощения (нм). *- коэффициенты молярной экстинкции для $\lambda^{1-3}_{\text{погл}}$: 9300 и 33000 л·моль⁻¹ см⁻¹, соответственно. **- коэффициенты молярной экстинкции для $\lambda^{1-2}_{\text{погл}}$: 9500 и 30500 л·моль⁻¹ см⁻¹, соответственно.

Таблица 4.31

**Положение максимумов полос поглощения 4.21
в органических растворителях различной природы.**

Растворитель	ε	$\lambda^1_{\text{погл}}$	$\lambda^2_{\text{погл}}$	$\lambda^3_{\text{погл}}$
CCl ₄	2.24	312	-	-
Бензол	2.28	312	-	-
Толуол	2.38	311	-	-
Хлороформ	4.70	310	270	242
Этилацетат	6.02	309	268	-
Тетрагидрофуран	7.6	309	-	-
Дихлорметан*	8.90	309	270	237
Изопропанол	18.3	303	268	214
Метанол	32.63	303	268	209
Ацетонитрил**	36.2	306	270	214
Диметилформамид	36.7	306	268	-

ε – диэлектрическая проницаемость растворителя; $\lambda^{1-3}_{\text{погл}}$ – положения максимумов в спектре поглощения (нм). *- коэффициенты молярной экстинкции

для $\lambda^{1-2}_{\text{погл}}$: 15600 и 32400 л·моль⁻¹ см⁻¹, соответственно. **- коэффициенты молярной экстинкции для $\lambda^{1-2}_{\text{погл}}$: 16700 и 29100 л·моль⁻¹ см⁻¹, соответственно.

Таблица 4.32

**Положение максимумов полос поглощения 4.22
в органических растворителях различной природы.**

Растворитель	ε	$\lambda^1_{\text{погл}}$	$\lambda^2_{\text{погл}}$	$\lambda^3_{\text{погл}}$	$\lambda^4_{\text{погл}}$
CCl ₄	2.24	379	278	-	
Бензол	2.28	379	-	-	
Толуол	2.38	378	-	-	
Хлороформ	4.70	377	275	249	
Этилацетат	6.02	376	275	-	
Дихлорметан*	8.90	374	275	237	-
Изопропанол	18.3	371	282	235	206
Метанол	32.63	370	277	232	207
Ацетонитрил**	36.2	369	279	238	209

ε – диэлектрическая проницаемость растворителя; $\lambda^{1-4}_{\text{погл}}$ – положения максимумов в спектре поглощения (нм). *- коэффициенты молярной экстинкции для $\lambda^{1-2}_{\text{погл}}$: 21900 и 96120 л·моль⁻¹ см⁻¹, соответственно. **- коэффициенты молярной экстинкции для $\lambda^{1-2}_{\text{погл}}$: 34900 и 33100 л·моль⁻¹ см⁻¹, соответственно.

Спектры поглощения **4.20** и **4.22** состоят из четырёх полос электронных переходов $\pi\pi^*$ типа (табл. 4.30, 4.32), а **4.21** – из трёх $\pi\pi^*$ полос (табл. 4.31). $\pi\pi^*$ полосы поглощения **4.20-4.22** перекрыты более интенсивными полосами $\pi\pi^*$ типа (рис. 4.57-4.59).

Спектры поглощения **4.20** можно рассматривать как спектры замещённой салициловой кислоты – в **4.20** можно выделить такие хромофорные фрагменты: бензойную кислоту ($\lambda^1_{\text{погл}} = 227$ нм, $\lambda^2_{\text{погл}} = 267$ нм), фенол ($\lambda^1_{\text{погл}} = 215$ нм, $\lambda^2_{\text{погл}} = 273$ нм), толуол ($\lambda_{\text{погл}} = 262$ нм) [470,471]. Наличие донорных орто-гидрокси и метокси групп приводит к появлению длинноволновой полосы 302-307 нм (табл. 4.30). Поглощение **4.21** также является поглощением замещённой салициловой кислоты: наличие ещё одного фрагмента (замещённого ацетофенона) обуславливает небольшой (~5 нм) батохромный сдвиг спектра поглощения **4.21** по сравнению с соответствующими спектрами **4.20** – положение длинноволновой полосы 306-312 нм (табл.4.31). Поглощение **4.22** обусловлено наличием в составе молекулы двух хромофорных фрагментов: 1,4-дифенил-*транс-транс*-бутадиена-1,3 и *транс-транс*-муконовой кислоты [470,471].

С ростом полярности растворителя (при переходе от тетрахлорметана к ацетонитрилу, см. табл. 4.30-4.32) наблюдается гипсохромный сдвиг спектров поглощения **4.20**, **4.21** и **4.22** на 5, 6 и 10 нм, соответственно. Это указывает на уменьшение дипольного момента **4.20-4.22** при переходе из основного в возбуждённое состояние.

В полярных протонодонорных растворителях (изопропанол, метанол) гипсохромные сдвиги спектров поглощения **4.20** и **4.22** являются близкими к соответствующим величинам в ацетонитриле (табл. 4.30, 4.32). Для соединения **4.21** величина гипсохромный сдвиг спектра поглощения в полярных протонодонорных растворителях на 3 нм превышает соответствующую величину в полярном апротонном ацетонитриле (табл. 4.31).

Принимая во внимание, что по данным квантово-химических расчетов (AM1, PM3, ZINDO/S) [469] аминогруппа соединения **4.21** является донором электронной плотности в возбужденном состоянии (не показано), дополнительный гипсохромный сдвиг спектра поглощения **4.21** в протонных

растворителях можно объяснить взаимодействием атомов водорода протонодонорных растворителей с неподеленной парой электронов аминогруппы. Это взаимодействие препятствует переносу электронной плотности от аминогруппы в возбужденном состоянии, и, следовательно приводит к дестабилизации возбужденного состояния по отношению к основному состоянию [373]. В результате, в протонных растворителях для **4.21** наблюдается сдвиг спектра поглощения в сторону более высоких энергий.

Соединения **4.20-4.22** очень слабо флуоресцируют (квантовый выход флуоресценции $\sim 10^{-4}$, не показано) во всех растворителях (даже полярных и протонных). Отсутствие интенсивной флуоресценции **4.20** может быть вызвано протеканием внутримолекулярного фотопереноса протона от орто-гидрокси группы к карбонильной группе с последующим эффективным тушением в образовавшейся фототаутомерной форме [385]. Принимая во внимание, что S ($\pi\pi^*$) уровни соед. **4.20-4.22** расположены выше по энергии, чем соответствующие S ($\pi\pi^*$) уровни ($\pi\pi^*$ полосы поглощения **4.21** и **4.22** заслонены более интенсивными $\pi\pi^*$ полосами, см. рис. 4.57-4.59), очень низкая интенсивность флуоресценции соед. **4.21** и **4.22** может являться следствием протекания эффективного процесса интеркомбинационной конверсии S ($\pi\pi^*$)-T ($\pi\pi^*$) (триплетные $\pi\pi^*$ уровни внесены в систему энергетических уровней молекул исследованных соединений присутствием карбонильных групп [374,400]).

Таким образом, спектральные свойства трёх новых натуральных продуктов, выделенных из турецких лишайников *Pseudevernia furfuracea*, *Evernia prunastri*, *Letharia vulpina*, соответственно, были исследованы в растворителях с различной полярностью и протонодонорной способностью: установлено, что с ростом полярности растворителя наблюдается гипсохромный сдвиг спектров поглощения для всех трёх соединений.

Полученные результаты могут оказаться полезными для детекции этих соединений в ходе биохимического анализа.

4.10. Исследование спектральных свойств некоторых производных 2- и 4-(N-арилимино)-хинолина

Интерес к производным 2- и 4-(N-арилимино)-хинолина вызван их потенциальной биологической активностью, например, антираковой активностью [472] и способностью выступать в качестве анальгетиков [473].

С целью дальнейшего поиска биоактивных соединений нами были синтезированы новые производные 2- и 4-(N-арилимино)-хинолина [474] (рис. 4.60).

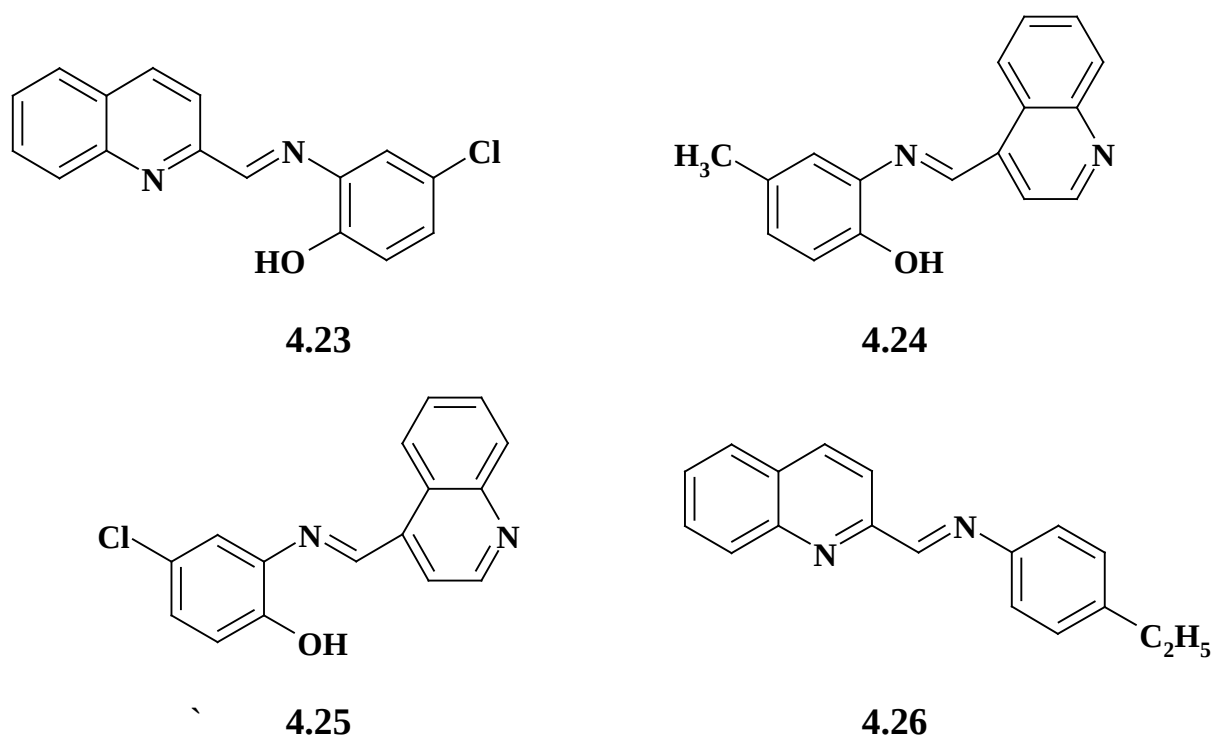


Рис. 4.60. Структура исследованных производных 2- и 4-(N-арилимино)-хинолина [474].

Для оценки возможности детекции этих соединений при помощи электронной абсорбционной спектроскопии нами исследовались спектры

поглощения этих соединений в органических растворителях с различной полярностью и протонодонорной способностью [474,475]: результаты исследования приведены в табл. 4.33.

Таблица 4.33

Положение максимумов полос поглощения исследованных производных 2- и 4-(N-арилимино)-хинолина в органических растворителях различной природы.

Соед.	Растворитель	ε	$\lambda^1_{\text{погл}}$	$\lambda^2_{\text{погл}}$	$\lambda^3_{\text{погл}}$ (плечо)	$\lambda^4_{\text{погл}}$	$\lambda^5_{\text{погл}}$
4.23	Толуол	2,38	376	309	296	-	-
	Ацетонитрил	36,20	367	303	266	252	231
	Метанол	32,63	371	301	-	251	232
4.24	Толуол	2,38	390	333	-	-	-
	Ацетонитрил	36,20	382	330	268	244	230
	Метанол	32,63	388	317	269	251	232
4.25	Толуол	2,38	384	338	-	-	-
	Ацетонитрил	36,20	375	334	-	248	229
	Метанол	32,63	377	302	-	246	227
4.26	Толуол	2,38	341	302	-	-	-
	Ацетонитрил	36,20	334	299	258	243	228
	Метанол	32,63	340	305	-	263	245

ε – диэлектрическая проницаемость растворителя; $\lambda^{1-5}_{\text{погл}}$ – положения максимумов в спектре поглощения (нм).

Согласно данным табл. 4.33, спектры поглощения **4.23-4.26** состоят из пяти $\pi\pi^*$ полос поглощения. $\pi\pi^*$ полосы поглощения заслонены более интенсивными $\pi\pi^*$ полосами (рис. 4.61).

Спектры поглощения **4.23-4.26** в ацетонитриле приведены на рис. 4.61.

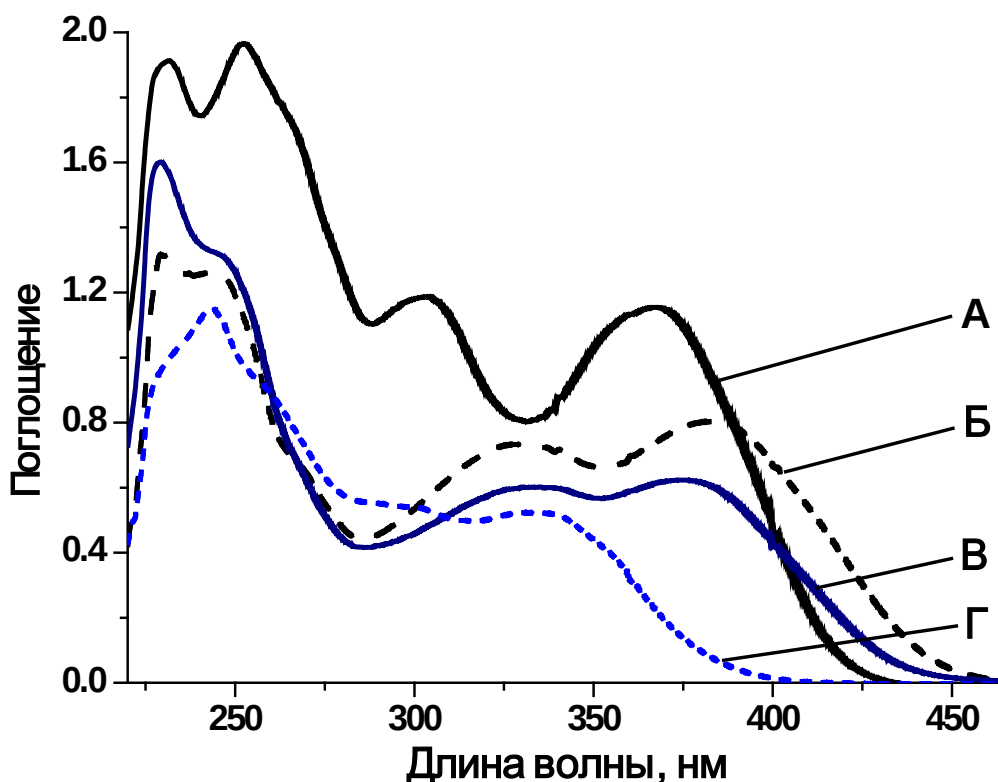


Рис. 4.61. Спектры поглощения **4.23-4.26** в ацетонитриле: **4.23** (А), **4.24** (Б), **4.25** (В), **4.26** (Г).

Если сравнить спектры поглощения **4.23** с соответствующими спектрами поглощения **4.26**, можно заметить, что наличие электронодонорного заместителя (гидроксильной группы) в фенильном кольце **4.23** способствует сдвигу спектров поглощения этого соединения в длинноволновую область (см. рис. 4.61 и табл. 4.33).

Установлено, что спектры поглощения 4-хинолинзамещённых соединений **4.24** и **4.25** наблюдаются в более длинноволновой области (например, длинноволновые максимумы в толуоле: 390 нм и 384 нм, соответственно), чем соответствующие спектры 2-хинолинзамещённых соединений **4.23** и **4.26** (например, длинноволновые максимумы в толуоле: 376 нм и 341 нм, соответственно).

С ростом полярности растворителя (см. данные для ацетонитрила в табл. 4.33) для всех исследованных соединений наблюдаются коротковолновые сдвиги спектров поглощения (до 9 нм), что указывает на то, что дипольный момент исследуемых соединений в возбуждённом состоянии уменьшаются по сравнению с таковым в основном состоянии: увеличение полярности растворителя в большей степени способствует стабилизации основного состояния по сравнению с возбуждённым состоянием и, таким образом, приводит к коротковолновому сдвигу спектра поглощения [373-375].

В полярном протонном метаноле (табл. 4.33) коротковолновый сдвиг спектров поглощения **4.23-4.26** является незначительным: образование водородных связей с атомами, которые являются акцепторами электронной плотности при возбуждении (атомы азота хинолинового и азометинового фрагментов (согласно квантово-химического расчёта PM3 [474])), способствует стабилизации возбуждённого состояния по сравнению с основным состоянием и, таким образом, способствует сдвигу спектра поглощения в длинноволновую область [373-375], в результате, комбинированное влияние полярности и протонодонорной способности растворителя не приводит к значительному сдвигу спектров поглощения **4.23-4.26** по сравнению с соответствующими спектрами в малополярном апротонном толуоле.

Соединения **4.23-4.26** очень слабо флуоресцируют в малополярном толуоле (квантовый выход флуоресценции $\phi \sim 10^{-4}$, не показано). Даже в полярном ацетонитриле и в полярном протонном метаноле флуоресценция **4.23-4.26** остаётся малоинтенсивной ($\lambda_{\text{фл}}^{\text{макс}} \sim 432$ нм, $\phi \sim 10^{-3}$, не показано). Отсутствие интенсивной флуоресценции **4.23-4.26** может быть вызвано: 1) протеканием интеркомбинационной конверсии S ($\pi\pi^*$)-T ($\pi\pi^*$) (расположенный низко по энергии T ($\pi\pi^*$) уровень наиболее вероятно внесён в систему энергетических уровней каждой из исследованных молекул

присутствием хинолинового фрагмента, так как соответствующие уровни азометинового фрагмента с внутримолекулярной водородной связью расположены достаточно высоко по энергии [400] и, следовательно, не принимают участие в тушении флуоресценции); 2) процесс тушения, связанный с крутильными колебаниями структурно-нефиксированного азометинового фрагмента [400].

Дополнительной возможностью детекции соединений **4.23** и **4.25** является способность этих соединений образовывать окрашенные комплексы с ионами двухвалентной меди [474-476]: например, полоса поглощения комплекса соединения **4.23** в метаноле (рис. 4.62: $\lambda_{\text{погл}}^{\text{макс}} = 540$ нм) наблюдается при концентрациях Cu^{2+} выше $5,7 \cdot 10^{-6}$ М, а полоса поглощения комплекса соединения **4.25** в метаноле (рис. 4.63: $\lambda_{\text{погл}}^{\text{макс}} = 420$ нм) – при концентрациях Cu^{2+} выше $5,6 \cdot 10^{-4}$ М.

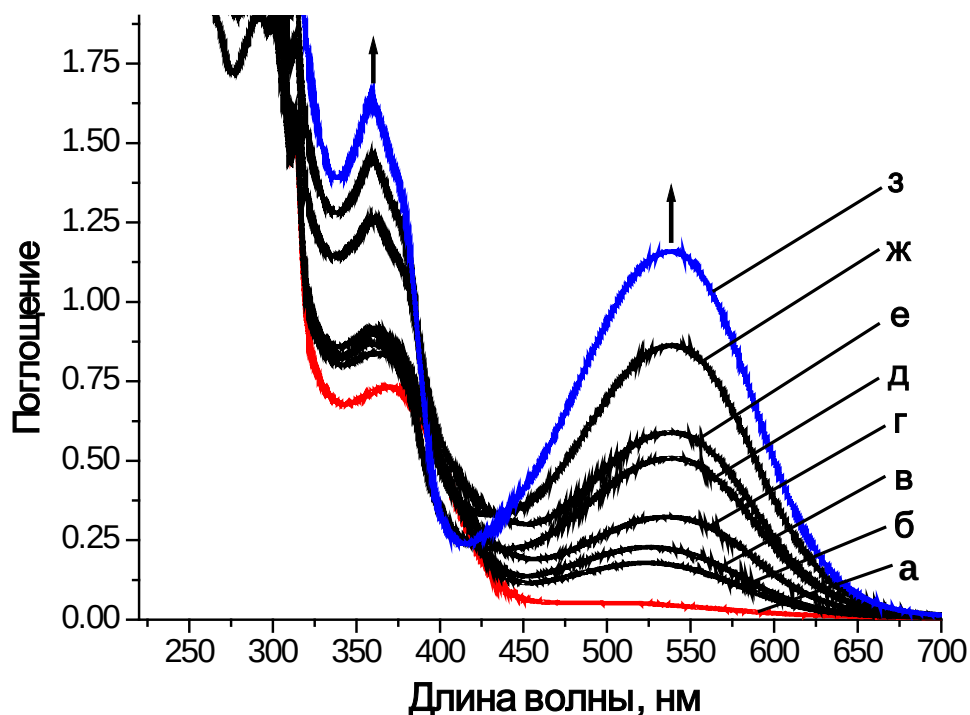


Рис. 4.62. Изменения спектра поглощения соединения **4.23** (4-хлоро-2-{[(1*E*)-хинолин-2-ил-метилен]амино} фенола) при образовании комплекса с ионами Cu^{2+} в метаноле. Концентрация лиганда: $2 \cdot 10^{-4}$ М. Стрелки

показывают изменения спектра поглощения с ростом молярной концентрации ионов Cu^{2+} : 0 (а), $5.7 \cdot 10^{-6}$ (б), $8.5 \cdot 10^{-6}$ (в), $2.4 \cdot 10^{-5}$ (г), $4.2 \cdot 10^{-5}$ (д), $5.7 \cdot 10^{-5}$ (е), $8.4 \cdot 10^{-5}$ (ж), $1.5 \cdot 10^{-4}$ (з).

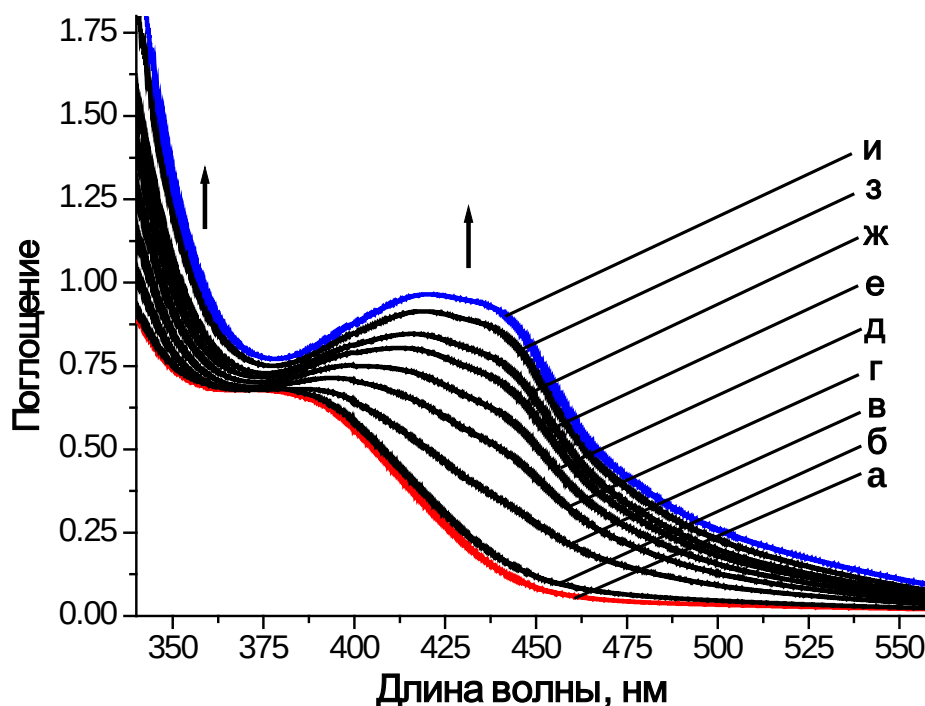


Рис. 4.63. Изменения спектра поглощения соединения **4.25** (4-хлоро-2- $\{[(1E)\text{-хинолин-4-ил-метилен}]\text{амино}\}$ фенола) при образовании комплекса с ионами Cu^{2+} в метаноле. Концентрация лиганда: $2 \cdot 10^{-4}$ М. Стрелки показывают изменения спектра поглощения с ростом молярной концентрации ионов Cu^{2+} : 0 (а), $5.7 \cdot 10^{-5}$ (б), $5.6 \cdot 10^{-4}$ (в), $1.7 \cdot 10^{-3}$ (г), $2.3 \cdot 10^{-3}$ (д), $3.3 \cdot 10^{-3}$ (е), $3.9 \cdot 10^{-3}$ (ж), $5.4 \cdot 10^{-3}$ (з), $6.4 \cdot 10^{-3}$ (и).

Константы стабильности и стехиометрия комплексов **4.23** с ионами меди Cu^{2+} [476] определялись по методу Адамовича (т.е. из зависимости поглощения на выбранной длине волны от концентрации иона металла) [477]: результаты приведены в табл. 4.34.

**Спектральные характеристики и константы стабильности (K_c)
комплекса соединения 4.23 с ионами меди Cu^{2+} в различных
растворителях.**

Растворитель	$\lambda_{\text{макс погл}}$ (нм)	$\varepsilon_{\text{макс}}$ (л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹)	Стехиометрия комплекса лиганд - Cu^{2+}	K_c (л·моль ⁻¹)
н-Бутанол	555	9300	2:1	$(2,6 \pm 1,1) \times 10^8$
Этанол	550	11400	2:1	$(5,1 \pm 2,1) \times 10^8$
Метанол	540	11600 ^a	2:1	$[(2,2 \pm 1,1) \times 10^9]$
Ацетонитрил	460	4500	2:1	$[(1,6 \pm 1,2) \times 10^{10}]$

$\lambda_{\text{макс погл}}$ и $\varepsilon_{\text{макс}}$ – положение (нм) и коэффициент молярной экстинкции (л·моль⁻¹·см⁻¹) длинноволнового максимума поглощения комплекса с ионами меди Cu^{2+} ; K_s – константа стабильности комплекса (л·моль⁻¹); в квадратных скобках [] – значения K_s , определённые с меньшей точностью (т.е. когда $K_s \geq (50/L_0)^2$, где L_0 – концентрация лиганда [476]).

Таким образом, спектральные свойства четырёх новых соединений – производных 2- и 4-(N-арилимино)-хинолина были исследованы в органических растворителях различной природы: показано, что спектры поглощения производных 2- и 4-(N-арилимино)-хинолина сдвигаются в коротковолновую область с ростом полярности растворителя, в тоже время, в полярном протонном растворителе коротковолновый сдвиг спектров поглощения является незначительным. Показано, что 4-хлоро-2-{[(1E)-хинолин-2-ил-метилен]амино}фенол и 4-хлоро-2-{[(1E)-хинолин-4-ил-метилен]амино}фенол образуют окрашенные комплексы с ионами

двухвалентной меди в спиртах. Полученные результаты могут оказаться полезными для детекции этих соединений в ходе биохимического анализа.

4.11. Идентификация продукта фототрансформации β -тиоксокетонов

β -Тиоксокетоны относятся к структурным аналогам β -дикетонов. Последние являются интермедиатами в микробном метаболизме [478-481], а также демонстрируют антиоксидантные свойства в биологических системах [482]. β -Тиоксокетоны известны своими хелатными свойствами [483,484], фотохромными свойствами [485-489], а также в качестве моделей таутомерного (енол-тиоенольного) и конформационного равновесий [485-490].

В литературе [490,491] было предложено использовать β -тиоксокетоны в качестве удобной модели для изучения индуцированной лазером обратимой фототрансформации. Однако, основным препятствием для использования β -тиоксокетонов в качестве такой модели является то, что в литературе отсутствует единое мнение о структуре их фотопродукта [488,492]. Это и обусловило проведение настоящего исследования.

Согласно результатов ЯМР исследований [492] в растворах для β -тиоксокетонов характерна енол-тиоенольная таутомерия с преобладанием хелатной (Z)-енольной формы (рис. 4.64, структура А):

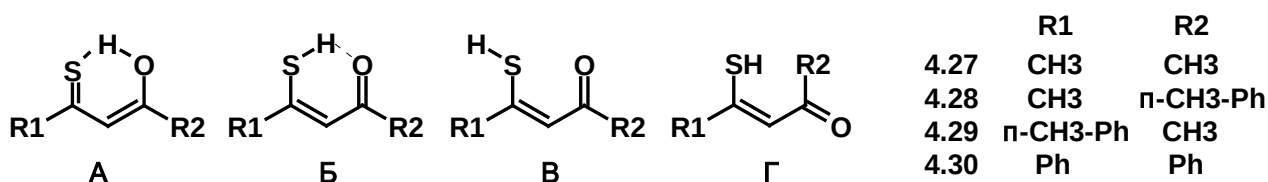


Рис. 4.64. Возможные таутомерные и ротамерные формы исследованных β -тиоксокетонов: хелатная (Z)-енольная форма (А), хелатная (Z)-тиоенольная форма (Б), нехелатная (Z)-тиоенольная форма (SH-ротамер) (В), нехелатная (Z)-тиоенольная форма (C-C ротамер) (Г).

При низких температурах (≤ 90 K) β -тиоксокетонны обладают фотохромными свойствами, т.е. способны к обратимой фототрансформации [492]. Однако, как уже упоминалось выше, в литературе [488,492] отсутствует единое мнение о структуре их фотопродукта: Carlsen et al. [492] на основании исследования фотоизомеризации β -тиоксокетоннов в 3-метилпентане при 77 K относят фотопродукт к образованию хелатной (Z)-тиоенольной формы (рис.4.64, структура Б), а Gebicki et al. [488] на основании исследования фотоизомеризации тиацетилацетона (рис. 4.64: соед. 4.27) в аргоновых матрицах при 20 K относят фотопродукт к образованию нехелатной (Z)-тиоенольной формы (C-C ротамер, рис. 4.64: структура Г), полученной из исходной хелатной (Z)-тиоенольной формы (рис. 4.64: структура Б) вращением вокруг C-S связи.

С другой стороны, авторами [488] при помощи электронной абсорбционной спектроскопии было установлено, что при температуре 130 K процесс обратный фотоизомеризации (т.е. образование исходной формы из фотопродукта) для тиацетилацетона протекает за время 1-10 минут. По нашему мнению, такое время образования исходной формы из фотопродукта может быть следствием вращения вокруг C-S связи (барьер вращения вокруг C-S связи для тиоуксусной кислоты ~ 7 ккал/моль [493]), поэтому SH-ротамер тиоенола (рис. 4.64: структура В) был принят нами во внимание в качестве возможного фотопродукта для β -тиоксокетоннов.

Соединения 4.27-4.30 способны к фотоизомеризации при облучении светом в условиях низких температур [492]: при температуре жидкого азота в электронных спектрах поглощения этих соединений наблюдаются фотоиндуцированные изменения, показанные на рис. 4.65.

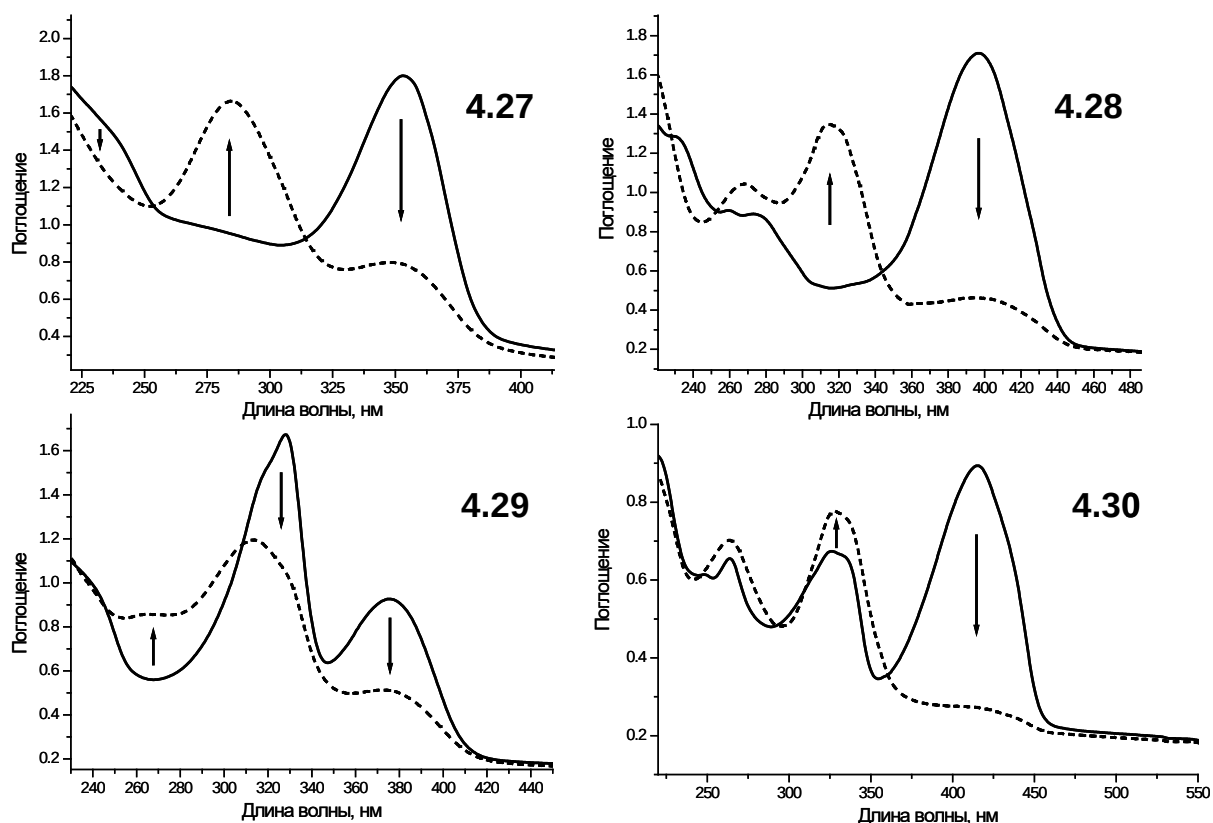


Рис. 4.65. Электронные спектры поглощения соед. **4.27-4.30** в 3-метилпентане при 77 К. Сплошные линии – спектры до облучения светом. Штриховые линии – спектры после 30 минут облучения на длинах волн: 360 нм (**4.27**), 400 нм (**4.28**), 380 нм (**4.29**), и 410 нм (**4.30**).

При помощи инфракрасной спектроскопии с Фурье преобразованием и матричной изоляции в инертном газе (аргон) при низких температурах (15-25 К) нами были исследованы колебательные спектры и структура продуктов фотоизомеризации нескольких вышеупомянутых β -тиоксокетонов: тиацетилацетона [494-496], п-метилбензоилтиоацетона [497], п-метил(тиобензоил)ацетона [498] и монотиодибензоилметана [499-502] (см. рис. 4.64: соед. **4.27-4.30**, соответственно). Низкотемпературная изоляция молекул β -тиоксокетонов в аргоновых матрицах использовалась нами для минимизации влияния среды на колебательные спектры β -тиоксокетонов.

Для идентификации исходной формы и фотопродукта экспериментальные ИК-спектры сравнивались с рассчитанными (B3LYP/сс-рVDZ) спектрами нескольких возможных таутомерных и ротамерных форм β -тиоксокетонов (рис. 4.66-4.72) [494-502].

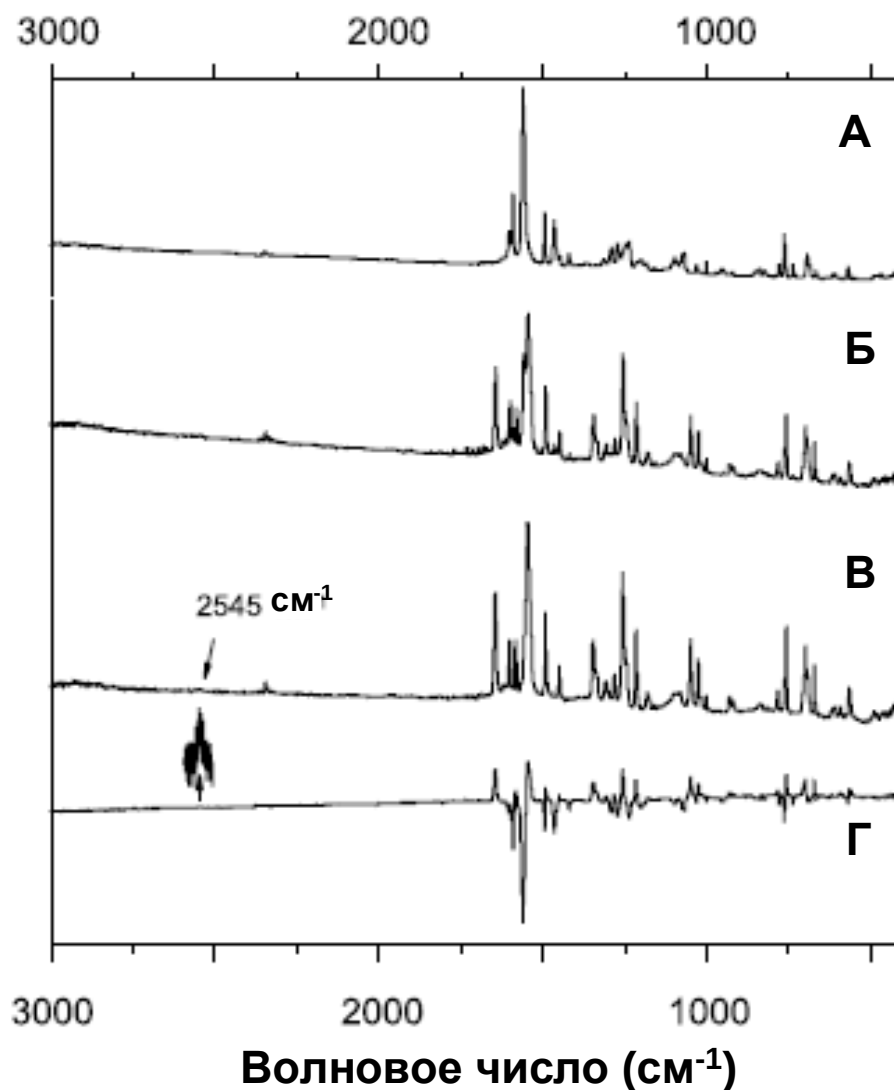


Рис. 4.66. ИК-спектры, измеренные для монотиодибензоилметана (**4.30**) в аргонной матрице при 20 К перед (А) и после двух стадий облучения (Б,В). Кривая Г представляет разность спектров В и А (в спектрах В и Г показана полоса колебания SH нехелатной (Z)-тиоенольной формы: 2545 cm^{-1}).

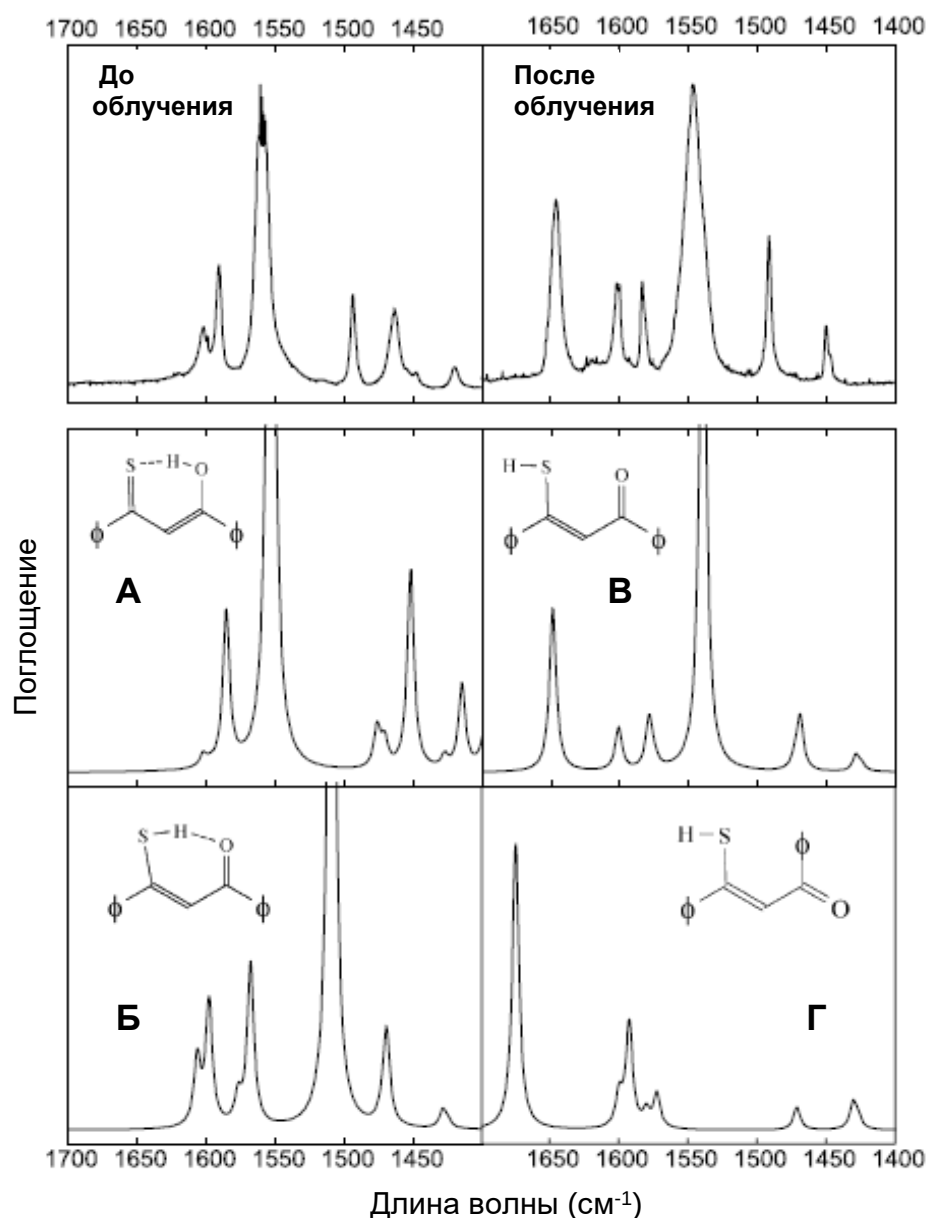


Рис. 4.67. Экспериментальные ИК-спектры монотиодибензоилметана (**4.30**), до и после облучения **4.30** в аргоновой матрице (верхние левая и правая панель, соответственно), а также спектры, рассчитанные в схеме B3LYP/сс-рVDZ для различных форм этого соединения. Рассчитанные теоретически частоты колебаний корректировались на скалирующий коэффициент 0,97. Для сопоставимого с экспериментом представления теоретически рассчитанных ИК-спектров использовали распределение Лоренца, как функцию, аппроксимирующую форму индивидуальной полосы с шириной на середине её интенсивности равной 3 см⁻¹.

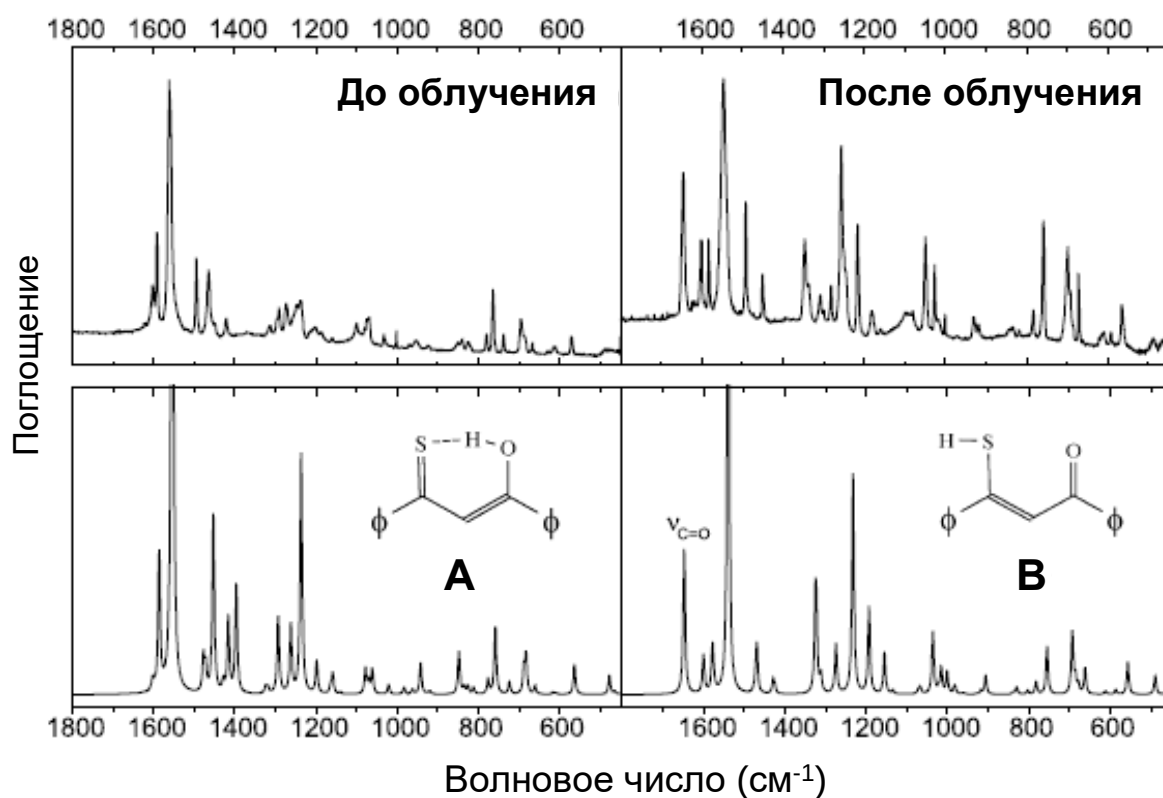


Рис. 4.68. Сравнение ИК-спектров монотиодибензоилметана (**4.30**), измеренных экспериментально, до и после облучения **4.30** в аргоновой матрице (верхние левая и правая панель, соответственно), со спектрами, рассчитанными в схеме B3LYP/сс-pVDZ для исходной формы (структура А, рис. 4.64) и фотопродукта (структура В, рис. 4.64) монотиодибензоилметана.

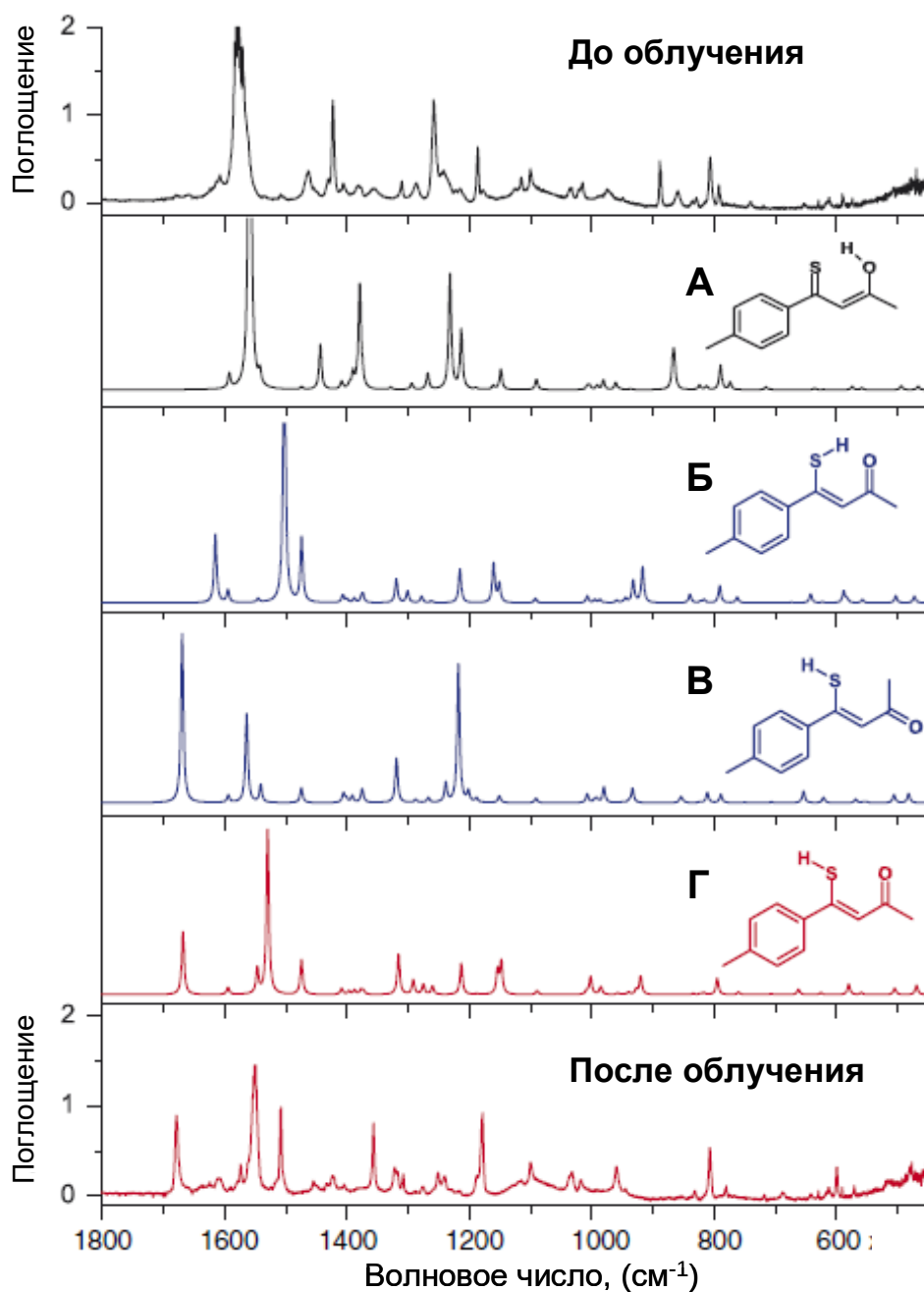


Рис. 4.69. Экспериментальные ИК-спектры п-метил(тиобензоил)ацетона (**4.29**) до и после облучения **4.29** в аргоновой матрице (самая верхняя и самая нижняя панель, соответственно), а также спектры, рассчитанные в схеме B3LYP/сс-pVDZ для различных форм этого соединения.

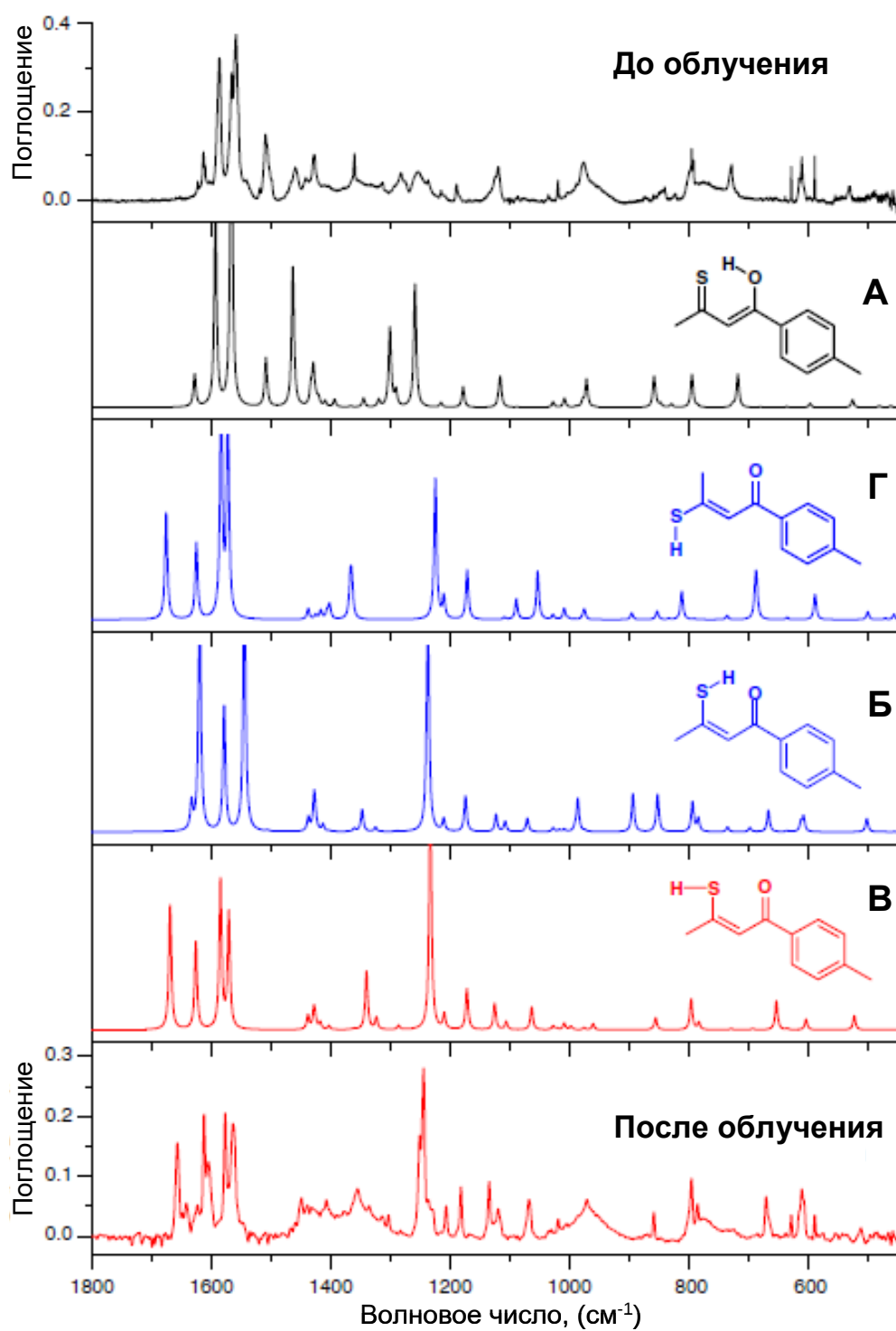


Рис. 4.70. Экспериментальные ИК-спектры п-метилбензоилтиоацетона (**4.28**) до и после облучения **4.28** в аргоновой матрице (самая верхняя и самая нижняя панель, соответственно), а также спектры, рассчитанные в схеме B3LYP/сс-pVDZ для различных форм этого соединения.

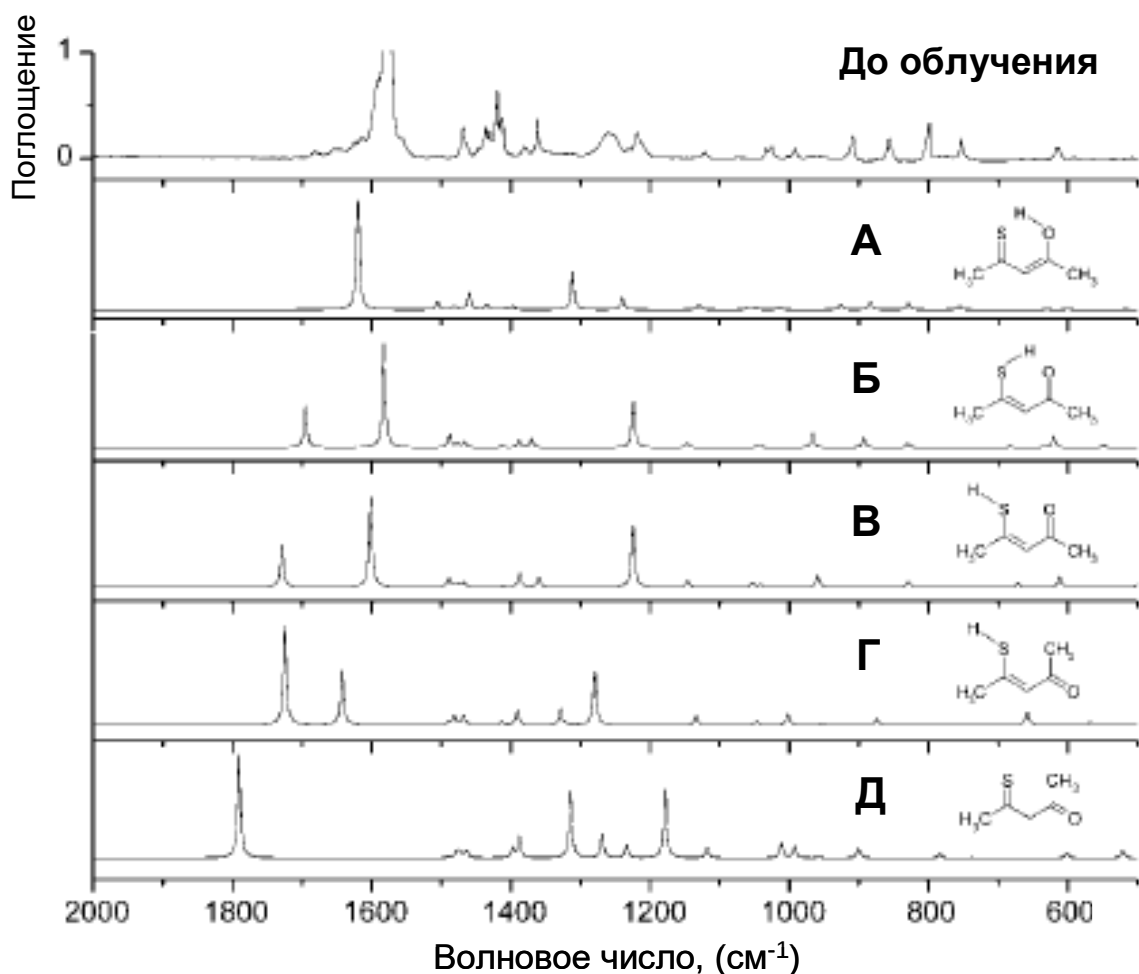


Рис. 4.71. Экспериментальный ИК-спектр тиацетилаcetона (**4.27**) до его облучения в аргоновой матрице (самая верхняя панель), а также спектры, рассчитанные в схеме B3LYP/сс-pVDZ для различных форм этого соединения. Структура Д включена в число возможных форм **4.27** как одна из наиболее стабильных структур согласно расчётам оптимизации геометрии (B3LYP/6-31G*) [494].

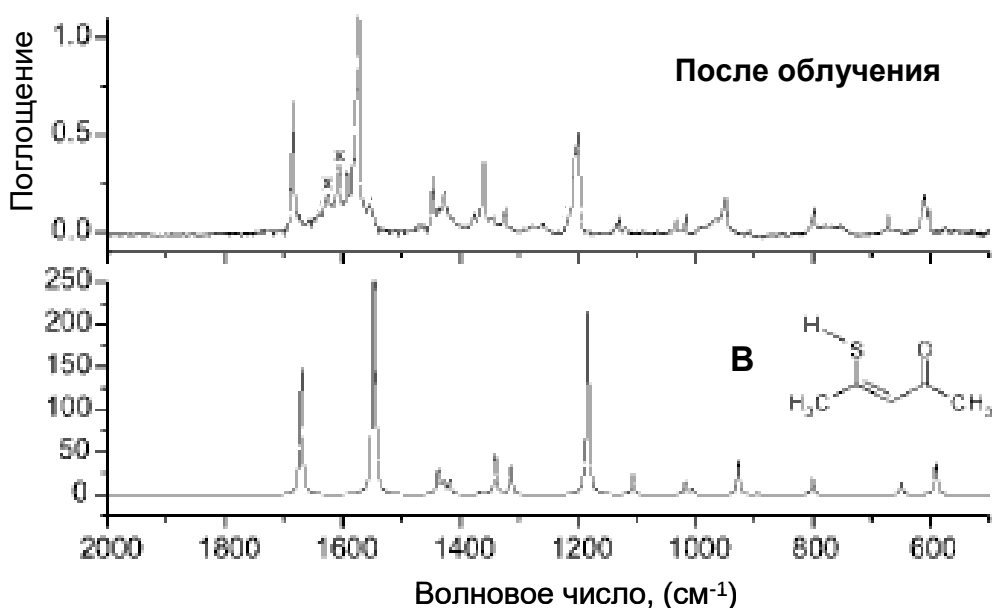


Рис. 4.72. Экспериментальный ИК-спектр тиацетилацетона (**4.27**) после его облучения в аргоновой матрице (верхняя панель), а также спектр, рассчитанный в схеме B3LYP/сс-pVDZ для нехелатной (Z)-тиоенольной формы (SH-ротамера) этого соединения.

Сравнение экспериментально полученных ИК-спектров исследованных β -тиоксокетонов (см. рис. 4.64: соед. **4.27-4.30**) с соответствующими теоретически рассчитанными спектрами возможных таутомерных и ротамерных форм (структуры А-Г, рис. 4.64) показало, что в аргоновых матрицах тиоксокетоны **4.28**, **4.29**, **4.30** до облучения находятся только в виде хелатной формы енола (структура А, рис. 4.64), а тиоксокетон **4.27** – в виде смеси хелатных форм енола и тioenола (структуры А и Б, соответственно, рис. 4.64), с преобладанием енольной формы. После облучения единственным фотопродуктом для **4.27**, **4.29**, **4.30** и преобладающим фотопродуктом для **4.28** является нехелатная форма тioenола (SH-ротамер, структура В, рис. 4.64), полученная из исходной хелатной (Z)-енольной формы превращением в хелатную (Z)-тиоенольную форму с последующим вращением вокруг C-S связи (рис. 4.73):

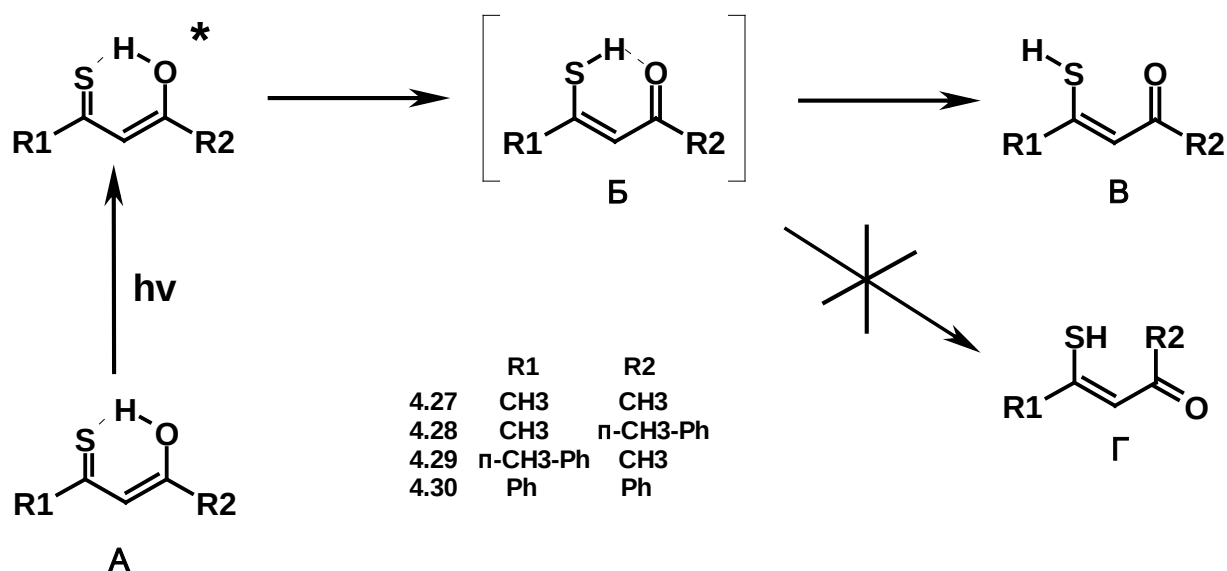


Рис. 4.73. Последовательность фотопревращений исходной формы А в фотопродукт Б. Звёздочка обозначает возбуждённое состояние. В скобках показана структура, которая может находиться либо в возбуждённом, либо в основном состоянии с избытком колебательной энергии.

Как следует из рис. 4.70, наряду с SH-ротамером ещё одним фотопродуктом для **4.28** является хелатная (Z)-тиоенольная форма, количество которой в аргоновой матрице примерно в три раза меньше, чем преобладающего SH-ротамера [497].

Таким образом, при помощи инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье и в условиях матричной изоляции в инертном газе при низких температурах впервые показано, что п-метилбензоилтиоацетон, п-метил(тиобензоил)ацетон и монотиодибензоилметан до облучения светом находятся только в виде хелатной формы (Z)-енола, а тиацетилацетон – в виде смеси хелатных форм (Z)-енола и (Z)-тиоенола, с преобладанием енольной формы. Впервые установлено, что единственным продуктом фототрансформации тиацетилацетона, п-метил(тиобензоил)ацетона, монотиодибензоилметана и преобладающим фотопродуктом п-

метилбензоилтиоацетона является нехелатная форма (Z)-тиоенола (SH-ротамер), полученная из исходной хелатной (Z)-енольной формы превращением в хелатную (Z)-тиоенольную форму с последующим вращением вокруг C-S связи.

Для более точного отнесения колебательных полос в ИК-спектрах β -тиоксокетонов и продуктов их фототрансформации [494-498,500-502] нами впервые была использована поляризационная ИК-спектроскопия.

Использование линейно поляризованного света для генерации фотоиндуцированных превращений вещества, находящегося в матрице из инертного газа при низкой температуре, приводит к частичной ориентации субстрата и фотопродукта [503-510]. Последующие измерения линейного дихроизма (ЛД) таких фото-ориентированных образцов позволяют получить информацию о направлении моментов колебательных переходов по отношению к направлению вектора дипольного момента электронного перехода, использованного для возбуждения при облучении [503-509].

Моменты колебательных переходов могут быть поляризованы 1) в любом направлении в плоскости молекулы или 2) вдоль направления, перпендикулярного к плоскости молекулы.

Облучение светом исследованных β -тиоксокетонов проводилось в интервале полос их электронных переходов π - π^* типа (рис. 4.65), поляризованных в плоскости молекулы. Поэтому остающаяся после облучения популяция молекул исходной формы должна состоять из молекул, плоскости которых перпендикулярны направлению электрического вектора поляризованного света, использованного для облучения. Следовательно, значения величины ИК линейного дихроизма (ИКЛД) для колебаний, поляризованных вне плоскости молекулы, будут положительными.

Обратная ситуация наблюдается для фотопродукта, для которого ожидаются отрицательные значения ИКЛД для колебаний, поляризованных вне плоскости молекулы.

ЛД определяется как разница между значениями светопоглощения, измеренными для двух лучей света с различной поляризацией: $E_Z - E_Y$, где Z – соответствует направлению поляризации света, использованного для облучения, а Y – направление, перпендикулярное как к направлению Z , так и направлению облучающего света [507-509]. При фотоизомеризации, модуль анизотропии поглощения в ИК диапазоне, выраженный как $|(E_Z - E_Y) / (E_Z + 2 \cdot E_Y)|$ для фотопродукта будет наибольшим на начальных этапах облучения, в условиях наличия небольшого количества молекул фотоиндуцированной формы [503-509]. Обратное наблюдается для исходной формы: абсолютная величина анизотропии будет наибольшей на конечных этапах облучения, когда остаётся лишь небольшое количество молекул исходной формы, не поглощающих Z -поляризованный свет, поскольку их моменты переходов перпендикулярны к направлению Z .

Таким образом, используя поляризационную ИК-спектроскопию можно различить: (1) колебания исходной формы и фотопродукта; (2) колебания, поляризованные в плоскости молекулы, и колебания, поляризованные вне плоскости молекулы.

Пример использования обсуждаемого подхода для анализа колебаний исходной формы и фототатуомера тиацетилацетона [494] (соед. **4.27**, рис. 4.64) в аргоновой матрице после облучения линейно поляризованным светом представлен на рис. 4.74.

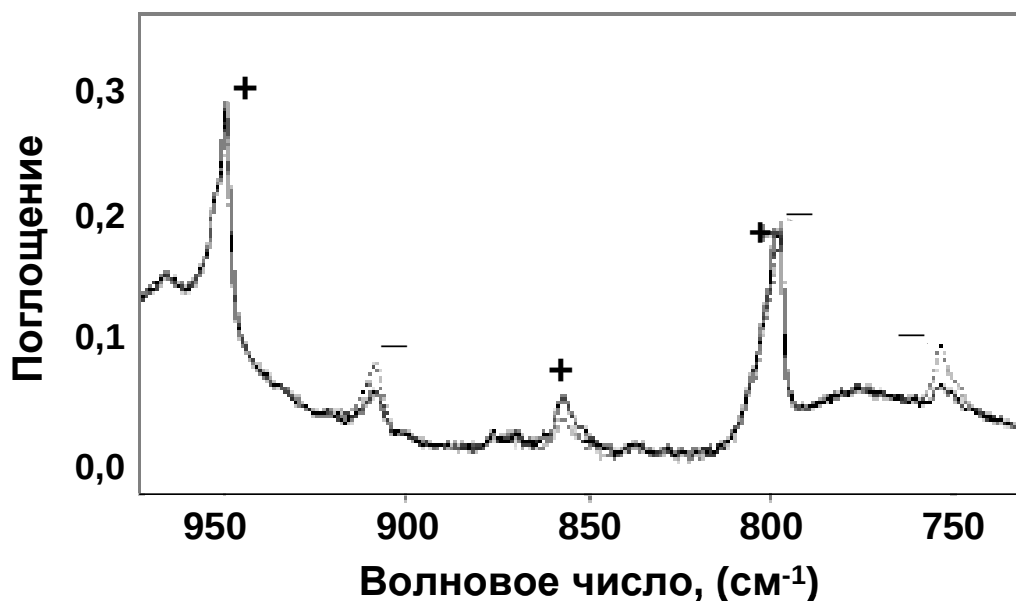


Рис. 4.74. Фрагмент поляризационного ИК-спектра тиацетилацетона (соед. 4.27, рис. 4.64) в аргоновой матрице (15 К) после облучения линейно поляризованным светом (350 нм): E_z , сплошная линия, E_y , точечная линия. Положительные и отрицательные значения ЛД для полос поглощения обозначены символами плюс и минус, соответственно.

Согласно данным рис. 4.74, позитивный ЛД наблюдается для колебательных переходов исходной формы 857 и 799 см^{-1} , поляризованных вне плоскости молекулы, в то же время, колебательные переходы исходной формы 909 и 753 см^{-1} , поляризованные в плоскости молекулы, имеют отрицательный знак ЛД.

В случае фотопродукта, негативный ЛД отмечался для колебательного перехода 797 см^{-1} , поляризованного вне плоскости молекулы, а позитивный ЛД наблюдался для колебательного перехода 949 см^{-1} , поляризованного в плоскости молекулы.

Таким образом, применение поляризационной ИК-спектроскопии позволило установить поляризацию колебательных переходов и различить близкорасположенные колебания исходной формы и фотопродукта,

например, отнести полосу 799 см^{-1} к колебаниям исходной формы, а полосу 797 см^{-1} – к колебаниям фотопродукта [494].

Также поляризационная ИК-спектроскопия использовалась нами для нахождения степени ориентации колебаний молекул по отношению к выбранному направлению в молекулах [494-498,500-502], которая описывается при помощи ориентационного фактора K :

$$K_i = \langle \cos^2(M_i, U) \rangle \quad (4.11)$$

где K_i – ориентационный фактор i -го колебательного перехода, (M_i, U) – угол между вектором момента i -го колебательного перехода и выбранным направлением U , усреднённый для всех облучаемых молекул.

В качестве примера определения K приводим случай поляризационных измерений соединения **4.30** в растянутой (для придания оптической асимметрии) полиэтиленовой плёнке [500]. В этом случае направление U – это направление растяжения плёнки. Значения K_i определяют путём вычисления показателя r_K : [503-509]:

$$r_K = (1 - K)E_u - 2KE_v \quad (4.12)$$

где E_u – ИК-спектр, измеренный, когда электрический вектор облучающего света был ориентирован параллельно направлению растяжения плёнки (направление U), E_v – ИК-спектр, измеренный, когда электрический вектор облучающего света был ориентирован перпендикулярно направлению U . В обоих случаях электрический вектор облучающего света был перпендикулярен плоскости плёнки с исследуемым веществом. Значение K варьирует от 0,0 до 1,0: полоса i -го колебательного перехода исчезает при $K = K_i$, и, таким образом, K_i можно определить визуально [510]. Пример кривых r_K показан на рис. 4.75.

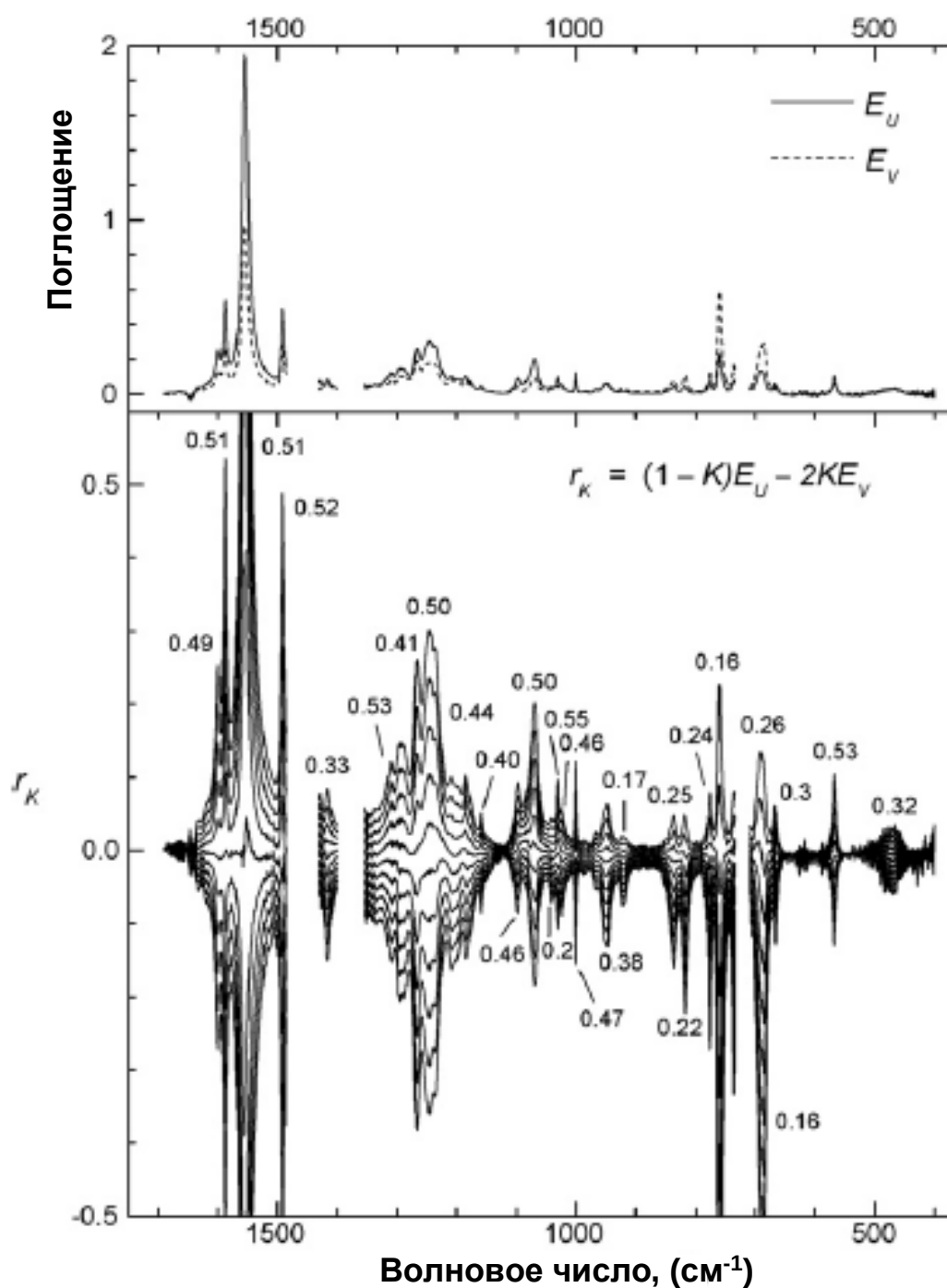


Рис. 4.75. Монотиодибензоилметан (4.30) в растянутой (для придания оптической асимметрии) полиэтиленовой плёнке: (верхняя панель) E_u – ИК-спектр, измеренный, когда электрический вектор облучающего света был ориентирован параллельно направлению растяжения плёнки (направление U), E_v – ИК-спектр, измеренный, когда электрический вектор облучающего света был перпендикулярен направлению U ; (нижняя панель) кривые r_K (см. формулу 4.12), рассчитанные для K изменяющегося от 0,0 до 1,0 с шагом 0,1.

Найденные значения ориентационного фактора K показаны возле соответствующих полос поглощения.

Для удобства анализа поляризации колебательных переходов соед. **4.30** были выбраны направления вдоль длинной (x) и короткой (y) осей молекулы.

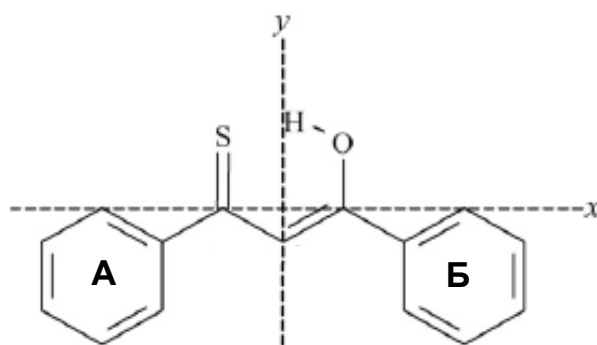


Рис. 4.76. Ориентация координатных осей для молекулы монотиодибензоилметана (соед. **4.30**).

Некоторые найденные значения K представлены в табл. 4.35.

Таблица 4.35

Отнесение полос, наблюдаемых в ИК-спектре монотиодибензоилметана (соед. 4.30) в полиэтиленовой плёнке, к колебательным переходам, рассчитанным для хелатной (Z)-енольной формы.

в полиэтиленовой плёнке		B3LYP/cc-pVTZ		
ν	K	ν	$ \alpha $	отнесение ИК-полосы
922	0,17	929	77°	CH вне плоскости (A)
836	0,25	828	79°	C2H вне плоскости, OH тор
818	0,22	838	64°	C2H вне плоскости, OH тор, C=S вал
777	0,22	784	62°	CH вне плоскости (A,B)
760	0,16	768	82°	CH вне плоскости (A)
690	0,26	690	84°	CH вне плоскости (B)
687	0,16	686	78°	C2H вне плоскости, OH тор

в полиэтиленовой плёнке		B3LYP/cc-pVTZ		
667	0,3	669	70°	скел деф (А,Б)
622	0,45	620	17°	скел деф (Б)
569	0,53	579	9°	скел деф
469	0,32	486	63°	скел деф, СН вне плоскости

ν - волновое число (см^{-1}), K – ориентационный фактор (см. текст), α - угол между колебательным переходом и «длинной осью» x (рис. 4.76), А и Б – фрагменты соед. **4.30** (рис. 4.76), Обозначения типов колебаний: вал и деф – валентные и деформационные, тор – торсионные, скел – скелетные, вне плоскости – вне плоскости молекулы,.

Величины K для соед. **4.30** изменяются от 0,16 до 0,53 (см. табл. 4.35), что указывает на то, что значения K были получены относительно «длинной оси» молекулы [507-509] (рис. 4.76).

Относительно большие значения K указывают на ориентацию колебательных переходов параллельно оси x соед. **4.30** (рис. 4.76), а колебательные переходы с малыми значениями K образуют большие углы с осью x соед. **4.30**.

Найденные величины K использовались для соотнесения полос, в экспериментальном ИК-спектре, с соответствующими теоретически рассчитанными полосами, для которых одним из результатов расчёта являлись углы между моментом колебательного перехода и «длинной осью» молекулы (ось x , рис. 4.76).

Определение ИК линейного дихроизма и ориентационного фактора K для колебательных переходов аналогично примерам, приведенным выше, использовалось нами также и для отнесения колебательных переходов к колебаниям исходной формы и фотопродукта при исследовании фототаутомеризации п-метилбензоилтиоацетона (соед. **4.28**) и п-метил(тиобензоил)ацетона (соед. **4.29**) в аргоновых матрицах: полученные результаты представлены в работах [497] и [498], соответственно.

Таким образом, применение поляризационной ИК-спектроскопии позволило установить поляризацию колебательных переходов (колебания, поляризованные в плоскости молекулы, и колебания, поляризованные вне плоскости молекулы) и различить близкорасположенные полосы поглощения исходной формы и фотопродукта, например, отнести полосу 799 см^{-1} к колебаниям исходной формы, а полосу 797 см^{-1} – к колебаниям фотопродукта. Результаты исследований колебательных спектров β -тиоксокетонс могут быть использованы для сравнения в ходе исследования колебательных переходов β -дикетонс.

Идентификация продукта фототрансформации β -тиоксокетонс возможна не только при помощи ИК-спектроскопии, а также и при помощи электронной абсорбционной UV/VIS спектроскопии [494-502].

Как уже упоминалось выше, фотоиндуцированное превращение β -тиоксокетонс происходит при низких температурах ($\leq 77\text{ K}$) при облучении на длинах волн в интервале 360-440 нм, в процессе которого для соединений **4.27-4.30** (см. рис. 4.64) наблюдается исчезновение их длинноволновых полос поглощения с максимумами 353, 397, 375 и 415 нм, соответственно [494-502], сопровождающееся ростом интенсивности их коротковолновых полос [494-502].

В зависимости от температуры, фотопревращение **4.27-4.30** может быть обратимым [494-502]: при температуре ниже 90 K фотопродукт остаётся неизменным неопределённо долгое время, напротив, при температуре выше 90 K достаточно быстро происходит темновой процесс обратной трансформации (рис. 4.77).

Поскольку спектры поглощения исходной формы и фототаутомера β -тиоксокетонс различаются (рис. 4.77), при помощи электронной абсорбционной спектроскопии можно регистрировать образование исходной формы из фотопродукта в зависимости от времени при различных температурах в интервале 93-120 °K [494-502].

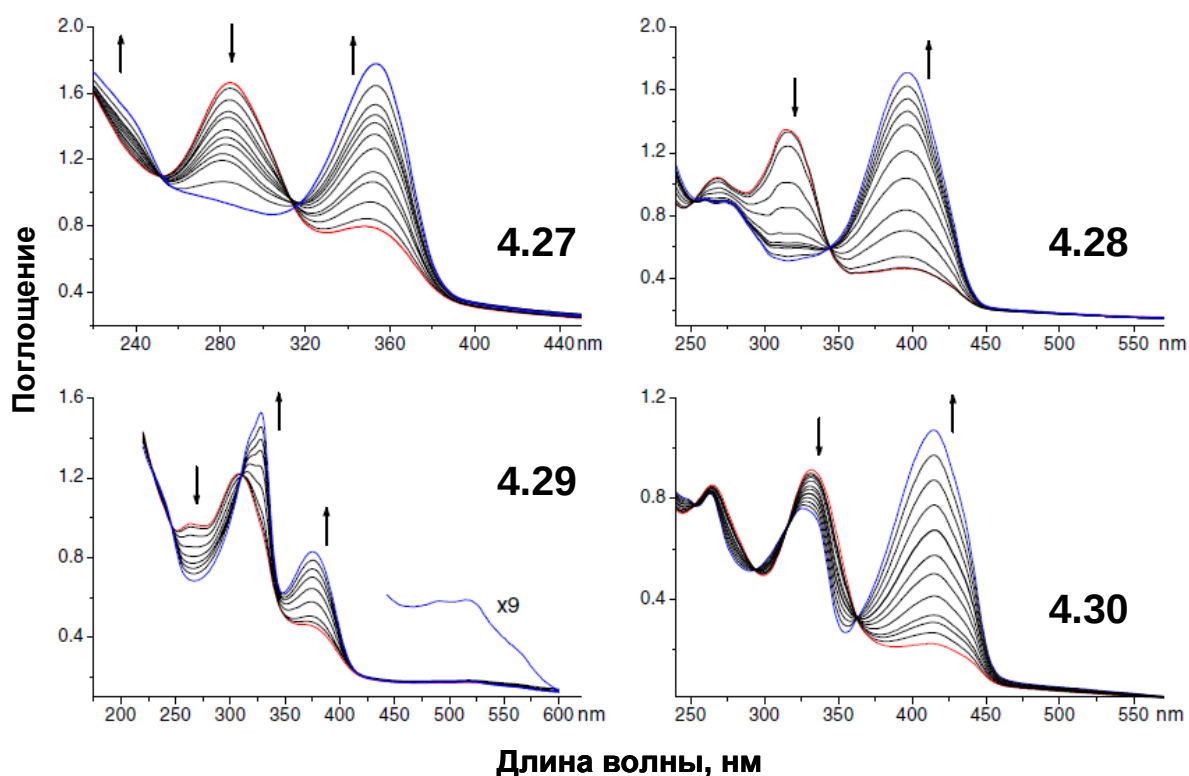


Рис. 4.77. Изменения электронных спектров поглощения соединений **4.27-4.30** (рис. 4.64) в ходе образования исходной формы из фотопродукта, полученного после облучения **4.27-4.30** в 3-метилпентане при 77 К. Спектры регистрировались при 110 К для **4.27** и **4.28**, и при 115 К для **4.29**, и при 100 К для **4.30**.

В результате таких измерений были получены кинетические кривые обратной реакции в **4.27-4.30** при различных температурах (рис. 4.78).

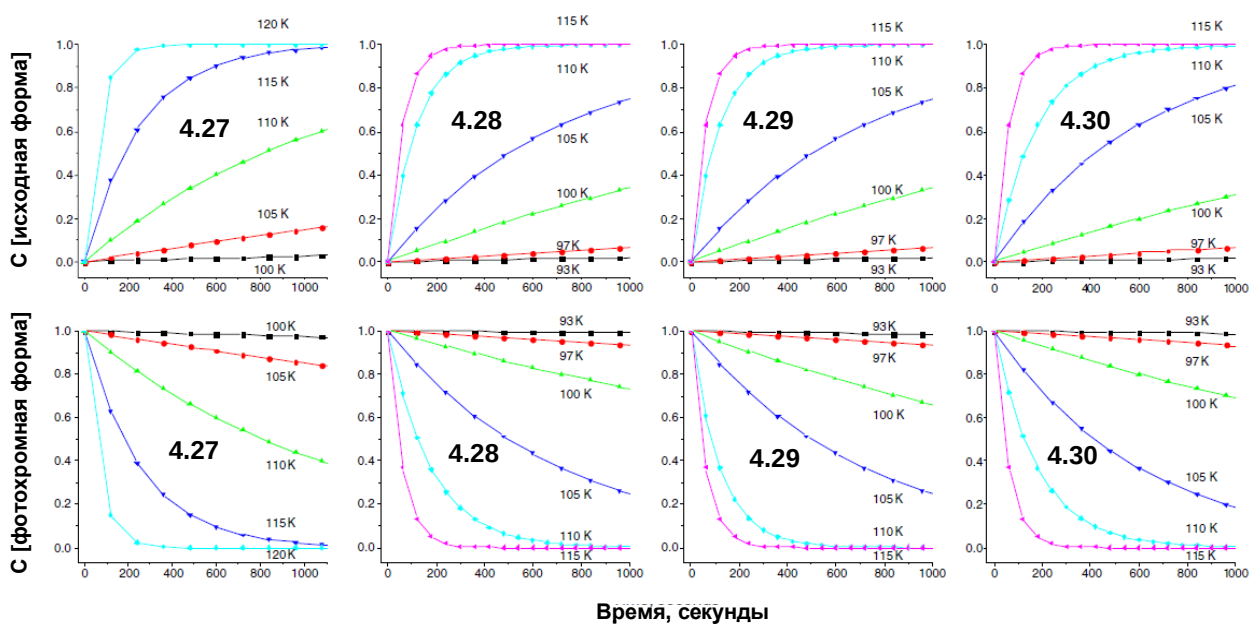


Рис. 4.78. Кинетические кривые обратной реакции для **4.27-4.30** в 3-метилпентане при различных температурах в интервале 93-120 K: верхние графики представляют образование исходной формы, а нижние графики показывают исчезновение фотоиндуцированной формы.

На основании полученных кинетических кривых (рис. 4.78) для **4.27-4.30** были построены графики Аррениуса (рис. 4.79) по которым вычислялись значения энергии активации обратного темнового превращения фотоиндуцированной формы исследованных β -тиоксокетонев.

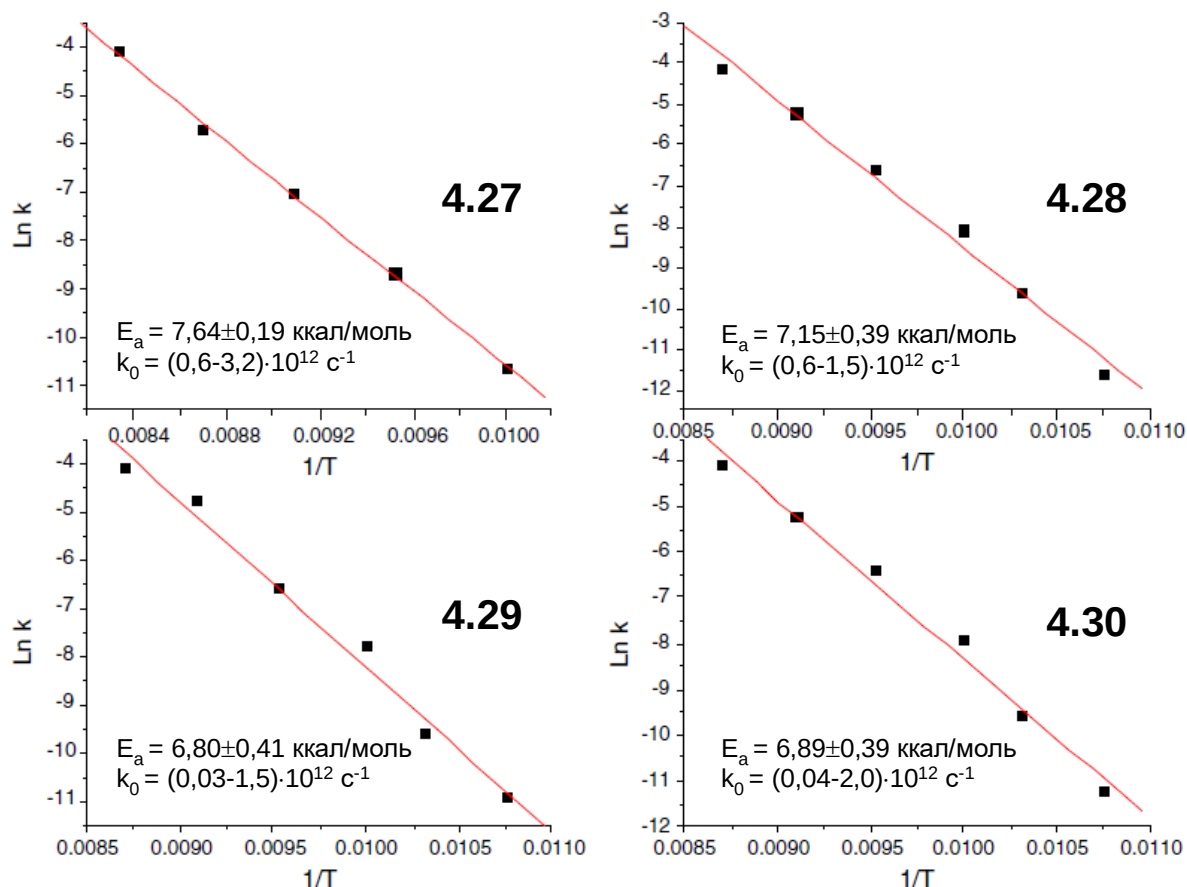


Рис. 4.79. Графики Аррениуса для обратной темновой реакции (образования исходного вещества из его фотоиндуцированной формы) в основном состоянии для β -тиоксокетонов **4.27-4.30** в 3-метилпентане.

Расчитанные энергии активации образования исходной формы исследованных β -тиоксокетонов оказались близкими [497]: $7,64 \pm 0,19$ ккал/моль для **4.27**; $7,15 \pm 0,39$ ккал/моль для **4.28**; $6,80 \pm 0,41$ ккал/моль для **4.29**; $6,89 \pm 0,39$ ккал/моль для **4.30**.

С одной стороны, полученные значения энергии активации (6,8-7,6 ккал/моль) позволяют исключить из числа возможных фотопродуктов β -тиоксокетонов структуры: (1) полученные вращением вокруг двойной C=C связи, поскольку величина активационного барьера в этом случае должна составлять 20-25 ккал/моль [511]; (2) структуру, полученную вращением вокруг одинарной C-C связи тиоенола (рис. 4.64: структура Г, предложенная

Gebicki et al. [488] в качестве фотопродукта), поскольку барьер вращения вокруг С-С связи для α,β -ненасыщенных кетонов ~ 5 ккал/моль [488]; (3) хелатную форму тioenола (рис. 4.64: структура Б), предложенную Carlsen et al. [492] в качестве фотопродукта, поскольку энергия активации таутомерной перестройки хелатный енол–хелатный тioenол оценивается в 0,21-0,22 ккал/моль [490].

С другой стороны, полученные значения энергии активации (6,8-7,6 ккал/моль) являются близкими к литературным значениям для вращения вокруг связи С–S в молекуле тиоуксусной кислоты (7,0÷7,3 ккал/моль [493]), что указывает на то, что фотопродуктом для всех β -тиоксокетон в условиях низких температур является нехелатная форма тioenола (SH-ротaмер, рис. 4.64: структура В). Сделанное заключение о природе продукта фототрансформации β -тиоксокетон хорошо согласуется с результатом, полученным при помощи ИК-спектроскопии.

Таким образом, комплексное применение электронной абсорбционной UV/VIS спектроскопии и инфракрасной спектроскопии позволило показать, что при низких температурах ($\leq 77^\circ \text{ K}$) продуктом фототрансформации β -тиоксокетон является тioenольная форма без внутримолекулярной водородной связи (SH-ротaмер).

ВЫВОДЫ

Определены физические и химические факторы, регулирующие механизмы взаимодействия с липидными мембранами мембранных протеинов и цистеиновых пептидов. Расширены возможности изучения термодинамических и кинетических параметров взаимодействий биологически ориентированных соединений (БОС) с липидными мембранами, в частности пептид-липидного взаимодействия цистеиновых и гидрофобных пептидов и протеин-липидного взаимодействия мембранных протеинов, а также физических и химических свойств и структуры липидных мембран и БОС путем разработки и внедрения новых методологических подходов и методов оптической спектроскопии. Изучены природа и эффективность первичных фотофизических и фотохимических процессов, происходящих в возбужденном состоянии молекул некоторых флуоресцентных зондов, способных к флуоресценции физиологически активных соединений и меченных органическими флуорофорами БОС.

1. С помощью методов оптической спектроскопии были выяснены механизмы взаимодействия мембранных протеинов (аннексина B12 и транслокационного домена дифтерийного токсина) с липидными мембранами:

а) разработанным нами методом оценки количества мембранно-компетентной формы модельных мембранных протеинов с рН-регулируемым встраиванием (аннексина B12 и Т-домена дифтерийного токсина), основанным на применении флуоресцентной корреляционной спектроскопии, установлено, что образование мембранно-компетентной формы аннексина происходит у поверхности липидных мембран, в то время как аналогичный процесс для Т-домена дифтерийного токсина происходит в объеме раствора;

б) с помощью разработанного нами нового метода оценки мембранной топологии протеинов, основанного на использовании флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении, было показано, что для аннексина B12 и транслокационного домена дифтерийного токсина существует интермедиат встраивания в липидные мембраны, который локализуется на поверхности липидного бислоя. Установлено, что интермедиат встраивания может быть стабилизирован в зависимости от липидного состава мембран: в случае аннексина B12 – при высоком содержании анионного липида в составе мембран, тогда как в случае транслокационного домена дифтерийного токсина стабилизация интермедиата происходит при низком содержании анионного липида;

в) предложенным нами методом оценки количества мембранно-компетентной формы транслокационного домена дифтерийного токсина (ТДДТ) в зависимости от pH среды, основанным на применении Фёрстеровского резонансного переноса энергии (ФРПЭ) и позволяющим проводить кинетические исследования процесса связывания протеина с мембраной, было установлено, что мембранное связывание ТДДТ происходит достаточно быстро (за время < 1 минуты), а скорость связывания не зависит от pH и количества анионного липида в составе мембран;

г) методом, основанным на измерении динамики изменения интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении, установлено, что pH-зависимое встраивание транслокационного домена дифтерийного токсина в липидные мембраны происходит быстро (< 2 минут) в случае мембран с большим содержанием анионного липида при низких значениях pH ($\sim 4,5$), в то же время, встраивание ТДДТ в мембраны происходит медленно (десятки минут) при более высоких значениях pH ($\sim 6,0$), а также при низких значениях pH в случае мембран с малым содержанием анионного липида. Наличие более медленного встраивания было объяснено существованием pH-зависимого интермедиата встраивания,

стабилизированного при высоких рН или в случае мембран с малым содержанием анионного липида;

д) комплексное применение Фёрстеровского резонансного переноса энергии и измерений динамики изменения интенсивности флуоресценции при стационарном возбуждении позволило выявить две стадии рН-зависимого взаимодействия транслокационного домена дифтерийного токсина (ТДДТ) с липидными мембранами, а именно: быстрое рН-зависимое связывание с мембранами и медленное рН-зависимое встраивание в мембраны, а также впервые установить, что эти стадии не следуют одна за другой, а встраивание ТДДТ в мембраны начинается еще до достижения его полного связывания с ними.

2. Флуоресцентная корреляционная спектроскопия впервые использована для исследования термодинамики мембранных взаимодействий мембранных протеинов и гидрофобных трансмембранных пептидов:

а) впервые оценена свободная энергия связывания с липидными мембранами для аннексина B12, которая составила $-11,8 \pm 0,2$ ккал/моль при связывании с мембранами с высоким содержанием анионного липида при рН 5,0;

б) для оценки термодинамики протеин-липидного взаимодействия малорастворимых в воде мембранных протеинов впервые предложен метод с использованием фторированных поверхностно-активных веществ, который позволил корректно оценить свободную энергию связывания с липидными мембранами при низких рН для транслокационного домена дифтерийного токсина при отсутствии его агрегации и осаждения: найденная ΔG связывания Т-домена с мембранами с высоким содержанием анионного липида составила $-12,0 \pm 0,1$ ккал/моль;

в) впервые предложен метод оценки термодинамики пептид-липидного взаимодействия малорастворимых в воде гидрофобных

трансмембранных пептидов с использованием поверхностно-активных веществ, который позволил оценить свободную энергию встраивания в липидную мембрану для гидрофобных пептидов различной длины, а именно WALP23 и WALP27: найденные ΔG их встраивания в мембраны из цвитерионного липида равны $-9,0 \pm 0,1$ и $-10,0 \pm 0,1$ ккал/моль, соответственно. Полученные данные по термодинамике взаимодействия с липидными мембранами использованы для проверки и уточнения октанольной шкалы Вимли-Вайта - экспериментальной шкалы гидрофобности аминокислотных остатков пептидов и протеинов.

3. Для улучшения точности оценки термодинамических параметров мембранного связывания цистеиновых пептидов – блокаторов ионных каналов, была усовершенствована методика флуоресцентного титрования при наличии водорастворимого тушителя флуоресценции. Предложенная методика была успешно использована для выяснения механизма действия цистеиновых пептидов – было показано, что, несмотря на структурное подобие, они разделяются на три типа в зависимости от способности к взаимодействию с липидными мембранами: первый тип – пептиды, которые связываются как с цвитерионными, так и с анионными мембранами, второй тип – блокаторы, которые связываются только с анионными мембранами, третий тип – пептиды, которые не связываются с мембранами при физиологических значениях pH. Применение методов флуоресцентной спектроскопии при стационарном возбуждении (измерение флуоресценции триптофановых аминокислотных остатков цистеинового пептида GsMTx4 при встраивании в липидную мембрану, не содержащую тушителей флуоресценции, и соответствующее измерение флуоресценции этого пептида при встраивании в липидные мембраны, содержащие тушитель флуоресценции с различной глубиной локализации в мембране), а также компьютерное моделирование методом молекулярной динамики впервые позволили установить, что при встраивании в липидную мембрану

ингибитора ионных каналов GsMTx4 не происходит полной дегидратации его триптофановых аминокислотных остатков.

4. Предложен способ экспериментальной коррекции в оценке эффективности Фёрстеровского резонансного переноса энергии при изучении самоассоциации пептидов/протеинов в мембранах, основанный на применении флуоресцентной спектроскопии при импульсном возбуждении. Вышеупомянутый способ использован для проведения экспериментальной коррекции при изучении димеризации пептида FGFR3 в липидных мембранах. В отличие от общепринятого в настоящее время способа теоретической коррекции, предложенный подход является более простым и может применяться даже в случае неравномерного распределения молекул доноров и акцепторов энергии электронного возбуждения в мембране.

5. Флуоресцентная спектроскопия при импульсном возбуждении была применена для выяснения механизма тушения флуоресценции в меченных органическими флуорофорами гистидин-содержащих пептидах, образующих комплексы с катионами переходных металлов: установлено, что Фёрстеровский резонансный перенос энергии в рассматриваемом случае не является механизмом тушения флуоресценции. Полученные сведения о механизме тушения флуоресценции в гистидин-содержащих пептидах имеют значение при проектировании новых флуоресцентных систем для мониторинга структурных изменений в пептидах.

6. Комплексное применение набора методов оптической спектроскопии, а именно: спектроскопии кругового дихроизма, флуоресцентной корреляционной спектроскопии, флуоресцентной спектроскопии при стационарном возбуждении, Фёрстеровского резонансного переноса энергии и метода флуоресцентной детекции мембранного порообразования, – впервые позволило показать, что фторированные поверхностно-активные вещества обладают свойствами

химических шаперонов для Т-домена дифтерийного токсина и могут использоваться в качестве среды для исследования мембранных протеинов.

7. Показана возможность применения производных 1,3-оксазола и 1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для исследования биологических объектов: предложен набор зондов для выявления изменений физико-химических свойств липидных мембран, который включает несколько орто-гидрокси производных 2,5-дифенил-1,3-оксазола, 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола, а также 2-фенил[9,10] фенантроксазол. Установлено, что предлагаемый набор флуоресцентных зондов позволяет выявлять изменения в мембранах тромбоцитов у пациентов с сосудистой патологией головного мозга гипертонического и атеросклеротического генеза, а также изменения в мембранах клеток обонятельного анализатора в ходе токсикологических исследований, проводить оценку мембранотропной активности криопротекторов и влияния магнитного поля или электромагнитного излучения на биологические мембраны. Показано, что флуоресцентные свойства некоторых производных 2-кумаринил-1,3,4-оксадиазола и 2-хинолинил-1,3-бензоксазола чувствительны к динамике релаксации молекул растворителя, что позволяет предложить эти соединения в качестве потенциальных ригидохромных флуоресцентных зондов.

8. Для выяснения возможности детекции с помощью оптической спектроскопии впервые систематически исследованы спектрально-флуоресцентные свойства противоракового препарата камптотецина, некоторых новых физиологически-активных продуктов, выделенных из турецких лишайников, а также ряда производных арилиминохинолина. С помощью электронной абсорбционной спектроскопии впервые была оценена растворимость ряда производных диимида 1,4,5,8-нафталин-тетракарбоновой кислоты в органических растворителях различной природы.

9. С помощью комплексного исследования методами инфракрасной и электронной абсорбционной спектроскопии показано, что при низких температурах ($\leq 77^\circ \text{ K}$) продуктом фотоиндуцированной трансформации β -тиоксокетонов является тиоенольная форма без внутримолекулярной водородной связи (SH-ротамер).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

- [1] Booth P. J. Membrane protein folding / P. J. Booth, A. R. Curran // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 1999. – V. 9. – P. 115–121.
- [2] Watts A. Biophysics of the membrane interface / A. Watts // *Biochem. Soc. Trans.* – 1995. – V. 23. – P. 959–965.
- [3] Induction of secondary structure in the peptide hormone motilin by interaction with phospholipid vesicles / B. M. Backlund, G. Wikander, T. L. Peeters, A. Graslund // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – V. 1190. – P. 337–344.
- [4] Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore / K. Matsuzaki, O. Murase, N. Fujii, K. Miyajima // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – P. 6521–6526.
- [5] Zhang L. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes / L. Zhang, A. Rozek, R. E. Hancock, // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 35714–35722.
- [6] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms / M. Zasloff // *Nature.* – 2002. – V. 415. – P. 389–395.
- [7] Shai Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides / Y. Shai // *Biopolymers.* – 2002. – V. 66. – P. 236–248.
- [8] Membrane insertion: the strategy of toxins / C. Lesieur, B. Vecsey-Semjen, L. Abrami [et al.] // *Mol. Membr. Biol.* – 1997. – V. 14. – P. 45–64.
- [9] Murphy J. R. Mechanism of diphtheria toxin catalytic domain delivery to the eukaryotic cell cytosol and the cellular factors that directly participate in the process / Murphy J. R. // *Toxins.* – 2011. – V. 3. – P. 294–308.
- [10] Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: Relevance to translocation of proteins / D. H. Hoch, M. Romero-Mira, B. E. Ehrlich [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1985. – V. 82. – P. 1692–1696.

- [11] Neale E. A. Moving across membranes / E. A. Neale // *Nat. Struct. Biol.* – 2003. – V. 10. – P. 2–3.
- [12] Koriazova L. K. Translocation of botulinum neurotoxin light chain protease through the heavy chain channel / L. K. Koriazova, M. Montal // *Nat. Struct. Biol.* – 2003. – V. 10. – P. 13–18.
- [13] Collier R. J. Anthrax toxin / R. J. Collier, J. A. Young // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 2003. – V. 19. – P. 45–70.
- [14] White S. H. Peptides in lipid bilayers: Structural and thermodynamic basis for partitioning and folding / S. H. White, W. C. Wimley // *Curr Opin Struct Biol.* – 1994. – V. 4. – P. 79–86.
- [15] Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2 / K. Matsuzaki, K. Sugishita, N. Fujii, K. Miyajima // *Biochemistry.* – 1995. – V. 34. – P. 3423–3429.
- [16] Mosior M. Mechanism of interaction of protein kinase C with phorbol esters / M. Mosior, A. C. Newton // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – P. 25526–25533.
- [17] Smith E. R. The adipocyte fatty acid-binding protein binds to membranes by electrostatic interactions / E. R. Smith, J. Storch // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 35325–35330.
- [18] Stahelin R. V. Differential Roles of Ionic, Aliphatic, and Aromatic Residues in Membrane-Protein Interactions: A Surface Plasmon Resonance Study on Phospholipases A2 / R. V. Stahelin, W. Cho // *Biochemistry.* – V. 2001. – V. 40. – P.
- [19] Nilsson I. Fine-tuning the topology of a polytopic membrane protein: role of positively and negatively charged amino acids / I. Nilsson, I., G. von Heijne // *Cell.* – V. 62. – P. 1135–1141.
- [20] Binding of peptides with basic residues to membranes containing acidic phospholipids / J. Kim, M. Mosior, L. A. Chung [et al.] // *Biophys. J.* – 1991. – V. 60. – P. 135–148.

- [21] Liu L. P. Anionic phospholipids modulate peptide insertion into membranes / L. P. Liu, C. M. Deber // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36. – P. 5476–5482.
- [22] Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes / M. Dathe, M. Schumann, T. Wieprecht [et al.] // *Biochemistry*. – 1996. – P. 12612–12622.
- [23] Anionic phospholipids can mediate membrane insertion of the anionic part of a bound peptide / J. M. Leenhouts, P. W. van den Wijngaard, A. I. de Kroon, B. de Kruijff // *FEBS Lett.* – 1995. – V. 370. – P. 189–192.
- [24] Spontaneous, pH-dependent membrane-insertion of a transbilayer α -helix / J. F. Hunt, P. Rath, K. J. Rothschild, D. M. Engelman // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36. – P. 15177–15192.
- [25] Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin / X. Han, J. H. Bushweller, D. S. Cafiso, L. K. Tamm // *Nat. Struct. Biol.* – 2001. – V. 8. – P. 715–720.
- [26] Modulation of magainin 2-lipid bilayer interactions by peptide charge / K. Matsuzaki, A. Nakamura, O. Murase [et al.] // *Biochemistry*. – 1997. – V. 36. – P. 2104–2111.
- [27] Characterization of electrostatic and nonelectrostatic components of protein-membrane binding interactions / J. B. Heymann, S. D. Zakharov, Y. L. Zhang, W. A. Cramer // *Biochemistry*. – 1996. – V. 35. – P. 2717–2725.
- [28] Mindell J. A. Swimming through the hydrophobic sea: New insights in protein translocation / J. A. Mindell // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1998. – V. 95. – P. 4081–4083.
- [29] Rankin S. E. Electrostatic and hydrophobic contributions to the folding mechanism of apocytochrome c driven by the interaction with lipid / S. E. Rankin, A. Watts, T. J. Pinheiro // *Biochemistry*. – 1998. – V. 37. – P. 12588–12595.

- [30] Ladokhin A. S. Protein chemistry at membrane interfaces: non-additivity of electrostatic and hydrophobic interactions / A. S. Ladokhin, S. H. White // J. Mol. Biol. – 2001. – V. 309. – P. 543–552.
- [31] Wimley W. C. Experimentally determined hydrophobicity scale for proteins at membrane interfaces / W. C. Wimley, S. H. White // Nat. Struct. Biol. – 1996. – V. 3. – P. 842–848.
- [32] Hristova K. An experiment-based algorithm for predicting the partitioning of unfolded peptides into phosphatidylcholine bilayer interfaces / K. Hristova, S. H. White // Biochemistry. – 2005. – V. 44. – P. 12614-12619.
- [33] Ladokhin A. S. Folding of amphipathic α -helices on membranes: Energetics of helix formation by melittin / A. S. Ladokhin, S. H. White // J. Mol. Biol. – 1999. – V. 285. – P. 1363-1369.
- [34] Folding of amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity / M. Fernandez-Vidal, S. Jayasinghe, A. S. Ladokhin, S. H. White // J. Mol. Biol. – 2007. – V. 370. – P. 459–470.
- [35] Protein folding in membranes: determining the energetics of peptide-bilayer interactions / S. H. White, W. C. Wimley, A. S. Ladokhin, K. Hristova // Methods Enzymol. – 1998. – V. 295. – P. 62–87.
- [36] Folding of β -sheet membrane proteins: A hydrophobic hexapeptide model / W. C. Wimley, K. Hristova, A. S. Ladokhin [et al.] // J. Mol. Biol. – 1998. – V. 277. – P. 1091-1110.
- [37] Membrane binding of the colicin E1 channel: Activity requires an electrostatic interaction of intermediate magnitude / S. D. Zakharov, J. B. Heymann, Y. L. Zhang, W. A. Cramer // Biophys. J. – 1996. – V. 70. – P. 2774–2783.
- [38] Membrane-bound state of the colicin e1 channel domain as an extended two-dimensional helical array / S. D. Zakharov, M. Lindeberg, Y. Griko [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1998. – V. 95. – P. 4282–4287.

- [39] Zakharov S.D. Kinetic description of structural changes linked to membrane import of the colicin E1 channel protein / S. D. Zakharov, M. Lindeberg, W.A. Cramer // *Biochemistry*. – 1999. – V. 38. – P. 11325–11332.
- [40] Tuning the membrane surface potential for efficient toxin import / S. D. Zakharov, T. I. Rokitskaya, V. L. Shapovalov [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2002. – V. 99. – P. 8654–8659.
- [41] Identification of shallow and deep membranepenetrating forms of diphtheria toxin T domain that are regulated by protein concentration and bilayer width / Y. Wang, S. E. Malenbaum, K. Kachel [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 25091–25098.
- [42] Membrane protein insertion regulated by bringing electrostatic and hydrophobic interactions into play. A case study with the translocation domain of the diphtheria toxin / A. Chenal, P. Savarin, P. Nizard [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – P. 43425–43432.
- [43] Reversible refolding of the diphtheria toxin T-domain on lipid membranes / A. S. Ladokhin, R. Legmann, R. J. Collier, S. H. White // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43. – P. 7451–7458.
- [44] Behavior of the *N*-terminal helices of the diphtheria toxin T domain during the successive steps of membrane interaction / C. Montagner, A. Perier, S. Pichard [et al.] // *Biochemistry*. – 2007. – V. 46. – P. 1878–1887.
- [45] Concerted protonation of key histidines triggers membrane interaction of the diphtheria toxin T domain / A. Perier, A. Chassaing, S. Raffestin [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – P. 24239–24245.
- [46] Determining the membrane topology of proteins: Insertion pathway of a transmembrane helix of annexin 12 / A. S. Ladokhin, J. M. Isas, H. T. Haigler, S. H. White // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41. – P. 13617–13626.
- [47] White S. H Membrane protein folding and stability: physical principles / S. H. White, W. C. Wimley // *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 1999. – V. 28. – P. 319–365.

- [48] How membranes shape protein structure / S. H. White, A. S. Ladokhin, S. Jayasinghe, K. Hristova // *Journ. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – P. 32395–32398.
- [49] Translocation of the catalytic domain of diphtheria toxin across planar phospholipid bilayers by its own T domain / K. J. Oh, L. Senzel, R. J. Collier, A. Finkelstein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1999. – V. 96. – P. 8467–8470.
- [50] Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: Relevance to translocation of proteins / D. H. Hoch, M. Romero-Mira, B. E. Ehrlich [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 1985. – V. 82. – P. 1692–1696.
- [51] Ladokhin A. S. pH-Triggered conformational switching along the membrane insertion pathway of the diphtheria toxin T-domain / A. S. Ladokhin // *Toxins.* – 2013. – V. 5. – P. 1362–1380.
- [52] Arnon S. S. Botulinum toxin as a biological weapon: Medical and public health management / S. S. Arnon // *JAMA* – 2001. – V. 285. – P. 1059-1070.
- [53] Miller C. J. Anthrax protective antigen: Prepore-to-pore conversion / C. J. Miller, J. L. Elliott, R. J. Collier // *Biochemistry* . – 1999. – V. 38. – P. 10432–10441.
- [54] The mechanism of membrane insertion for a cholesterol-dependent cytolysin: A novel paradigm for poreforming toxins / O. Shatursky, A. P. Heuck, L. A. Shepard L.A. [et al.] // *Cell* – 1999. – V. 99. – P. 293–299.
- [55] Topography of diphtheria toxins T domain in the open channel state / L. Senzel., M. Gordon, R. O. Blaustein [et al.] // *J. Gen. Physiol.* – 2000. – V. 115 – P. 421–434.
- [56] A transmembrane form of annexin XII detected by site-directed spin labeling / R. Langen, J. M. Isas, W. L. Hubbell, H. T. Haigler // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1998. – V. 95. – P. 14060–14065.

- [57] Annexins V and XII insert into bilayers at mildly acidic pH and form ion channels / J. M. Isas, J. P. Cartailier, Y. Sokolov [et al.] // *Biochemistry*. – 2000. – V. 39. – P. 3015–3022.
- [58] Gerke V. Annexins: Linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics / V. Gerke, C. E. Creutz, S. E. Moss // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – V. 6. – P. 449-461.
- [59] Rescher U. Annexins: Unique membrane binding proteins with diverse functions / U. Rescher, V. Gerke // *J. Cell Sci.* – 2004. – V. 117. - P. 2631-2639.
- [60] Chenal A. Structure and function of diphtheria toxin: from pathology to engineering / A. Chenal, P. Nizard, D. Gillet // *J. Toxicol. Toxin. Rev.* – 2002. – V. 21. – P. 321–359.
- [61] Bennett M. J. Refined structure of dimeric diphtheria toxin at 2.0 Å resolution / M. J. Bennett, S. Choe, D. Eisenberg // *Protein Sci.* – 1994. – V. 3. – P. 1444-1663.
- [62] Bennett M. J. Refined structure of monomeric diphtheria toxin at 2.3 Å resolution / M. J. Bennett, D. Eisenberg // *Protein Sci.* – 1994. – V. 3. – P. 1464-1475.
- [63] Bell C. E. Crystal structure of nucleotide-free diphtheria toxin / C. E. Bell, D. Eisenberg // *Biochemistry* – 1997. – V. 36. – P. 481-488.
- [64] Roscony M. P. Analyzing topography of membrane-inserted diphtheria toxin T domain using BODIPY-streptavidin: at low pH, helices 8 and 9 form a transmembrane hairpin but helices 5-7 form stable nonclassical inserted segments on the cis side of the bilayer / M. P. Roscony, G. Zhao, E. London // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43. – P. 9127-9139.
- [65] Calcium- and membrane-induced changes in the structure and dynamics of three helical hairpins in annexin B12 / J. M. Isas, Y. E. Kim, C. C. Jao [et al.] // *Biochemistry*. – 2005. – V. 44. – P. 16435-16444.

- [66] Organization of diphtheria toxin T domain in bilayers: A site-directed spin labeling study / K. J. Oh, H. Zhan, C. Cui [et al.] // Science – 1996. – V. 273. – P. 810–812.
- [67] Conformation of the diphtheria toxin t domain in membranes: A site-directed spin-labeling study of the TH8 helix and TL5 loop / K. J. Oh, H. Zhan, C. Cui [et al.] // Biochemistry. – V. 1999. – V. 38. – P. 10336–10343.
- [68] Structure of the isolated catalytic domain of diphtheria toxin / M. S. Weiss, S. R. Blanke, R. J. Collier, D. Eisenberg // Biochemistry. – 1995. – V. 34. – P. 773–781.
- [69] Structure function relationships in diphtheria toxin channels. II. A residue responsible for the channel's dependence on *trans* pH / J. A. Mindell, J. A. Silverman, R. J. Collier, A. Finkelstein // J. Membr. Biol. – 1994. – V. 137. – P. 29–44.
- [70] Structure-function relationships in diphtheria toxin channels. III. Residues which affect the *cis* pH dependence of channel conductance / J. A. Mindell, J. A. Silverman, R. J. Collier, A. Finkelstein // J. Membr. Biol. – 1994. – V. 137. – P. 45–57.
- [71] Probing the structure of the diphtheria toxin channel: Reactivity in planar lipid bilayer membranes of cysteine-substituted mutant channels with methanethiosulfonate derivatives / P. D. Huynh, C. Cui, H. J. Zhan [et al.] // J. Gen. Physiol. – 1997. – V. 110. – P. 229–242.
- [72] Gordon M. The number of subunits comprising the channel formed by the T-domain of diphtheria toxin / M. Gordon, A. Finkelstein // J. Gen. Physiol. – 2001. – V. 118. – P. 471–480.
- [73] Identifying transmembrane states and defining the membrane insertion boundaries of hydrophobic helices in membrane-inserted diphtheria toxin T domain / K. Kachel, J. H. Ren, R. J. Collier, E. London // J. Biol. Chem. – 1998. – V. 273. – P. 22950–22956.

- [74] Rosconi M. P. Topography of helices 5-7 in membrane-inserted diphtheria toxin T domain / M. P. Rosconi, E. London // *Journ. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277 – P. 16517–16527.
- [75] Hayashibara M. Topography of diphtheria toxin A chain inserted into lipid vesicles / M. Hayashibara, E. London // *Biochemistry.* – 2005. – V. 44 – P. 2183–2196.
- [76] Wang J. Topography of the hydrophilic helices of membrane-inserted diphtheria toxin T domain: TH1-TH3 as a hydrophobic tether / J. Wang, M. P. Rosconi, E. London // *Biochemistry.* – 2006. – V. 45 – P. 8124–8134.
- [77] Lai B. Behavior of the deeply inserted helices in diphtheria toxin T domain: helices 5,8, and 9 interact strongly and promote pore formation, while helices 6/7 limit pore formation / B. Lai, G. Zhao, E. London // *Biochemistry.* – 2008. – V. 47 – P. 4565–4574.
- [78] Generation of multilamellar and unilamellar phospholipids vesicles / M. J. Hope, M. B. Bally, L. D. Mayer [et al.] // *Chem. Phys. Lipids.* – 1986. – V. 40. – P. 89-107.
- [79] Ladokhin A. S. How to measure and analyze tryptophan fluorescence in membranes properly, and why bother? / A. S. Ladokhin, S. Jayasinghe, S. H. White // *Anal. Biochem.* – 2000. – V. 285. – P. 235–245.
- [80] Ladokhin A. S. Interfacial folding and membrane insertion of a designed helical peptide / A. S. Ladokhin, S. H. White // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43. – P. 5782–5791.
- [81] Tory M. C. Adventures in membrane protein topology: A study of the membrane-bound state of colicin E1 / M. C. Tory, A. R. Merrill // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – P. 24539–24549.
- [82] Insights into membrane insertion based on studies of colicins / M.W. Parker, A. D. Tucker, D. Tsernoglou, F. Pattus // *Trends Biochem. Sci.* – 1990. – V. 15. – P. 126–129.

- [83] Johnson A. E. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane / A. E. Johnson, M. A. van Waes // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* – 1999. – V. 15. – P. 799–842.
- [84] Alder N. N. Cotranslational membrane protein biogenesis at the endoplasmic reticulum / N. N. Alder, A. E. Johnson // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 22787–22790.
- [85] Membrane–protein integration and the role of the translocation channel / T. A. Rapoport, V. Goder, S. U. Heinrich, K. E. S. Matlack, // *Trends Cell Biol.* – 2004. – V. 14 – P. 568–575.
- [86] Recognition of transmembrane helices by the endoplasmic reticulum translocon / T. Hessa, H. Kim, K. Bihlmaler [et al.] // *Nature.* – 2005. – V. 433. – P. 377–381.
- [87] Bowie J. U. Border crossing / J. U. Bowie // *Nature.* – 2005. – V. 433. – P. 367–369.
- [88] Membrane insertion pathway of annexin B12: thermodynamic and kinetic characterization by fluorescence correlation spectroscopy and fluorescence quenching / Y. O. Posokhov, M. V. Rodnin, L. Lu, A. S. Ladokhin // *Biochemistry.* – 2008. – V. 47, No. 18. – P. 5078-5087.
- [89] Kinetic intermediate reveals staggered pH-dependent transitions along the membrane insertion pathway of the diphtheria toxin T-domain / A. Kyrychenko, Y. O. Posokhov, M. V. Rodnin, A. S. Ladokhin // *Biochemistry.* – 2009. – V. 48, No. 32. – P. 7584-7594.
- [90] Schwille P. Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications / P. Schwille // *Cell Biochem. Biophys.* — 2001. — V. 34. — P. 383–408.
- [91] Study of molecular events in cells by fluorescence correlation / V. Vukojevic, A. Pramanik, T. Yakovleva [et al.] // *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – V. 62. – P. 535–550.

- [92] Meyer-Almes F.J., Auer M. Enzyme inhibition assays using fluorescence correlation spectroscopy: a new algorithm for the derivation of k_{cat}/K_M and K_I values at substrate concentrations much lower than the Michaelis constant / F. J. Meyer-Almes, M. Auer // *Biochemistry*. — 2000. — V. 39. — P. 13261–13268.
- [93] Determination of critical micelle concentrations and aggregation numbers by fluorescence correlation spectroscopy: aggregation of a lipopolysaccharide / L. L. Yu, M. Y. Tan, B. Ho [et al.] // *Anal. Chim. Acta*. — 2006. — V. 556. — P. 216–225.
- [94] Terada S. Oligomeric tubulin in large transporting complex is transported via kinesin in squid giant axons / S. Terada, M. Kinjo, N. Hirokawa // *Cell*. — 2000. — V.103. — P. 141–155.
- [95] Analysis of interaction between chaperonin GroEL and its substrate using fluorescence correlation spectroscopy / C. G. Pack, G. Nishimura, M. Tamura [et al.] // *Cytometry*. — 1999. — V. 36. — P. 247–253.
- [96] Insulin binding monitored by fluorescence correlation spectroscopy / Z.H. Zhong, A. Pramanik, K. Ekberg [et al.] // *Diabetologia*. — 2001. — V. 44. — P. 1184–1188.
- [97] Elson E. L Fluorescence correlation spectroscopy measures molecular transport in cells / E. L. Elson // *Traffic*. — 2001. — V. 2. — P. 789–796.
- [98] Monitoring the interaction between DNA and a transcription factor (MEF2A) using fluorescence correlation spectroscopy / G. Octobre, C. Lemerrier, S. Khochbin, M. Robert-Nicoud, C. Souchier // *C. R. Biol.* — 2005. — V. 328. — P. 1033–1040.
- [99] Kinjo M. Ultrasensitive hybridization analysis using fluorescence correlation spectroscopy / M. Kinjo, R. Rigler // *Nucleic Acids Res.* — 1995. — V. 23. — P. 1795–1799.

- [100] Wennmalm S. Conformational fluctuations in single DNA molecules / S. Wennmalm, E. Edman, R. Rigler // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1997. — V. 94. — P. 10641–10646.
- [101] Denaturation of dsDNA by p53: fluorescence correlation spectroscopy study / V. Vukojević, T. Yakovleva, L. Terenius [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* — 2004. — V. 316 — P. 1150–1155.
- [102] Detection of oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage using fluorescence correlation spectroscopy / Y. Nomura, H. Fuchigami, H. Kii [et al.] // *Anal. Biochem.* — 2006. — V. 350. — P. 196–201.
- [103] A two-photon fluorescence correlation study of lectins interacting with carbohydrate 20 nm beads / W. H. Pohl, H. Hellmuth, M. Hilbert [et al.] // *Chembiochem.* — 2006. — V. 7. — P. 268–274.
- [104] Dorn I. T. Molecular recognition of histidine-tagged molecules by metal-chelating lipids monitored by fluorescence energy transfer and correlation spectroscopy / I. T. Dorn, K. R. Neumaier, R. Tampe // *J. Am. Chem. Soc.* — 1998. — V. 120. — P. 2753–2763.
- [105] In vivo quantitative studies of dynamic intracellular processes using fluorescence correlation spectroscopy / Z. F. Wang, J. V. Shah, M. W. Berns, D. W. Cleveland // *Biophys. J.* — 2006. — V. 91. — P. 343–351.
- [106] Measuring protein-protein interactions inside living cells using single color fluorescence correlation spectroscopy. Application to human immunodeficiency virus type I integrase and LEDGF/p75 / G. Maertens, J. Vercammen, Z. Debyser, Y. Engelborghs // *FASEB J.* — 2005. — V. 19. — P. 1039–1041.
- [107] Characterization of simian virus 40 on its infectious entry pathway in cells using fluorescence correlation spectroscopy / S. Bernacchi, G. Mueller, J. Langowski, W. Waldeck // *Biochem. Soc. Trans.* — 2004. — V. 32. — P. 746–749.

- [108] Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation / P. Schwille, U. Haupts, S. Maiti, W.W. Webb // *Biophys. J.* — 1999. — V. 77. — P. 2251–2265.
- [109] Fluorescence correlation spectroscopy studies of peptide and protein binding to phospholipid vesicles / L. Rusu, A. Gambhir, S. McLaughlin, J. Radler // *Biophys. J.* — 2004. — V. 87. — P. 1044–1053.
- [110] *The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* / R. P. Haugland, M. T. Z. Spence, I. D. Johnson, A. Basey. — [10th ed.]. — Eugene, OR: Molecular Probes, 2005. — 1126 p.
- [111] Elson E. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory / E. Elson, D. Magde // *Biopolymers.* — 1974. — V. 13. — P. 1–27.
- [112] Magde D. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization / D. Magde, E. L. Elson, W. W. Webb // *Biopolymers* — 1974. — V. 13. — P. 29–61.
- [113] Thompson N. L. Fluorescence correlations spectroscopy / N. L. Thompson // *Topics in Fluorescence Spectroscopy* [ed. Lakowicz R.]. — N.Y.: Plenum Press, 1991. — P. 337–378.
- [114] Tian Y. Fluorescence correlation spectroscopy: A review of biochemical and microfluidic applications / Y. Tian, M. M. Martinez, D. Pappas // *Applied Spectroscopy.* -2011. — V. 65. — P. 115A–124A.
- [115] Elson E. L. Fluorescence Correlation Spectroscopy: Past, Present, Future / E. L. Elson // *Biophys. J.* — 2011. — V. 101. — P. 2855–2870.
- [116] Haustein E. Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique / E. Haustein, P. Schwille // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* — 2007. — V. 36. — P. 151–169.
- [117] Digman M.A., Gratton E. Lessons in fluctuation correlation spectroscopy / M. A. Digman, E. Gratton // *Ann. Rev. Phys. Chem.* — 2011. — V. 62. — P. 645-668.

- [118] Biological and chemical applications of fluorescence correlation spectroscopy: a review / S.T. Hess, S. Huang, A. A. Heikal, W.W. Webb // *Biochemistry*. -2002. – V. 41. – P. 697–705.
- [119] Haustein E. Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy / E. Haustein, P. Schwille // *Methods* – 2003. – V. 29. – P. 153–166.
- [120] Clamme J. P. Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy / J. P. Clamme, J. Azoulay, Y. Mely // *Biophys. J.* – 2003. – V. 84. – P. 1960–1968.
- [121] Quantification of α -synuclein binding to lipid vesicles using fluorescence correlation spectroscopy / E. Rhoades, T. F. Ramlall, W. W. Webb, D. Eliezer // *Biophys. J.* – 2006. – V. 90. – P. 4692–4700.
- [122] Fluorescence correlation spectroscopy analysis of the hydrophobic interactions of protein 4.1 with phosphatidyl serine liposomes / Y. Takakuwa, C. G. Pack, X. L. An [et al.] // *Biophys. Chem.* - 1999. – V. 82. – P. 149–155.
- [123] Fernandez M. S. Lipoid pH indicators as probes of electrical potential and polarity in micelles / M. S. Fernandez, P. Fromherz // *J. Phys. Chem.* – 1977. – V. 81. – P. 1755–1761.
- [124] McLaughlin S. The electrostatic properties of membranes / S. McLaughlin // *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* - 1989. – V. 18. - P. 113-136.
- [125] Posokhov Y.O. Lifetime fluorescence method for determining membrane topology of proteins / Y.O. Posokhov, A.S. Ladokhin // *Analytical Biochemistry*. – 2006 – V. 348. – P. 87-93.
- [126] Lakowicz J. R. Principles of fluorescence spectroscopy / J. R. Lakowicz. – N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publisher, 1999. – 698 p.

- [127] Straume M. Least-squares analysis of fluorescence data / M. Straume, S. G. Frasier-Cadoret, M. L. Johnson // Topics in Fluorescence Spectroscopy [ed. Lakowicz J. R.]. – N.Y.: Plenum Press, 1991. – V. 2 – P. 177-240.
- [128] pH-Triggered membrane insertion pathway of the diphtheria toxin T-domain: 1. insertion/refolding intermediate / A. Kyrychenko, M.V. Rodnin, Y.O. Posokhov, A.S. Ladokhin // BPS 53-rd Annual Meeting, February 28 - March 4, 2009: CD of abstracts. – Boston, Massachusetts, USA, 2009. – 2231-Pos.
- [129] Spence M.T.Z. The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies. / M. T. Z. Spence, I. D. Johnson. – [10th ed.]. – Eugene, OR: Molecular Probes, 2005. Eugene, – 1126 p.
- [130] Ghosh P.B. 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: A new fluorogenic reagent for amino acids and other amines / P.B. Ghosh, M.W. Whitehouse // Biochem. J. – 1968. – V. 108. – P. 155–156.
- [131] Andrews J. L. Ammonium 4-chloro-7-sulfobenzofurazan: A new fluorogenic [sic] thiol-specific reagent / J. L. Andrews, P. Ghosh, B. Ternai, M. W. Whitehouse // Arch. Biochem. Biophys. – 1982. – V. 214. – P. 386–396.
- [132] Fluorescent fructose derivatives for imaging breast cancer cells / J. Levi, Z. Cheng, O. Gheysens [et al.] // Bioconjugate Chem. – 2007. – V. 18. – P. 628–634.
- [133] Lin S. Time-resolved fluorescence of nitrobenzoxadiazole aminohexanoic acid: Effect of intermolecular hydrogen-bonding on nonradiative decay / S. Lin, W. S. Struve // Photochem. Photobiol. – 1991. – V.54. – P. 361–365.
- [134] Chattopadhyay A. Chemistry and biology of *N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: Fluorescent probes of biological and model membranes / A. Chattopadhyay // Chem. Phys. Lipids. – 1990. – V. 53. – P. 1–15.

- [135] Visual snapshots of intracellular kinase activity at the onset of mitosis / Z. Dai, N. G. Dulyaninova, S. Kumar [et al.] // *Chem. Biol.* – 2007. – V. 14. – P. 1254–1260.
- [136] Li W. GALA: A designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery / W. Li, F. Nicol, F. C. Szoka // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2004. – V. 56. – P. 967–985.
- [137] A monomeric membrane peptide that lives in three worlds: In solution, attached to, and inserted across lipid bilayers / Y. K. Reshetnyak, M. Segala, O. A. Andreev, D. M. Engelman // *Biophys. J.* – 2007. – V. 93. – P. 2363–2372.
- [138] Kamp F. How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion / F. Kamp, J. A. Hamilton // *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty Acids.* – 2006. – V. 75. – P. 149–159.
- [139] Bechinger B. Towards membrane protein design: pH-sensitive topology of histidine-containing polypeptides / B. Bechinger // *J. Mol. Biol.* – 1996. – V. 263. – P. 768–775.
- [140] White S. H. How hydrogen bonds shape membrane protein structure / S. H. White // *Adv. Prot. Chem.* - 2006. – V. 72. – P. 157–173.
- [141] Popot J. L. Helical membrane protein folding, stability, and evolution / J. L. Popot, D. M. Engelman // *Ann. Rev. Biochem.* - 2000. – V. 69. – P. 881–922.
- [142] Sachs J. N. Introduction to the membrane protein reviews: the interplay of structure, dynamics, and environment in membrane protein function / J. N. Sachs, D. M. Engelman // *Ann. Rev. Biochem.* – 2006. – V. 75. – P. 707–712.
- [143] White S. H. Do protein–lipid interactions determine the recognition of transmembrane helices at the ER translocon? / S. H. White, G. von Heijne // *Biochem. Soc. Trans.* – 2005. – V. 33. – P. 1012–1015.

- [144] Reversible topological organization within a polytopic membrane protein is governed by a change in membrane phospholipid composition / W. Zhang, M. Bogdanov, J. Pi [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – P. 50128–50135.
- [145]. Reorientation of aquaporin-1 topology during maturation in the endoplasmic reticulum / Y. Lu, I. R. Turnbull, A. Bragin [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* – 2000. – V. 11. – P. 2973–2985.
- [146] Identification and evolution of dual-topology membrane proteins / M. Rapp, E. Granseth, S. Seppala, G. von Heijne // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2006. – V. 13. – P. 112–116.
- [147] Bogdanov M. Lipid–protein interactions drive membrane protein topogenesis in accordance with the positive inside rule / M. Bogdanov, J. Xie, W. Dowhan // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – P. 9637–9641.
- [148] Sanders C. R. Disease-related misassembly of membrane proteins / C. R. Sanders, J. K. Myers // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2004. – V. 33. – P. 25–51.
- [149] Dowhan W. Lipid-dependent membrane protein topogenesis / W. Dowhan, M. Bogdanov // *Annu. Rev. Biochem.* – 2009. – V. 78. – P. 515–540.
- [150] Haltia T. Forces and factors that contribute to the structural stability of membrane proteins / T. Haltia T, E. Freire // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – V. 1241. – P. 295–322.
- [151] Serdiuk I. N. Methods in molecular biophysics / I. N. Serdiuk, N. R. Zaccai, J. Zaccai — New York: Cambridge university press, 2007. — 1120 p.
- [152] Ladokhin A. S. Fluorescence spectroscopy in peptide and protein analysis / A. S. Ladokhin // *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [ed. Meyers R. A.] – Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000. – P. 5762–5779.
- [153] Royer C. A. Probing protein folding and conformational transitions with fluorescence / C. A. Royer // *Chem. Rev.* — 2006. — V. 106. — P. 1769–1784.

- [154] Jacobs R. E. The nature of the hydrophobic binding of small peptides at the bilayer interface: implications for the insertion of transbilayer helices / R. E. Jacobs, S. H. White // *Biochemistry*. – 1989. – V. 28. – P. 3421-3437.
- [155] Engelman D. M. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins / D. M. Engelman, T. A. Steitz, A. Goldman // *Annu. Rev. Biophys. Chem.* – 1986. – V. 15. – P. 321-353.
- [156] von Heine G. Trans-membrane translocation of proteins: the direct transfer model / G. von Heine, C. Blomberg // *Eur. J. Biochem.* – 1979. – V. 97. – P. 175-181.
- [157] Roseman M. A. Hydrophobicity of polar amino acid side-chains is markedly reduced by flanking bonds / M. A. Roseman // *J. Mol. Biol.* – 1988. – V. 200. – P. 513-523.
- [158] Direct determination of the membrane affinities of individual amino acids / T. E. Thorgeirsson, C. J. Russell, D. S. King, Y. K. Shin // *Biochemistry*. – 1996. – V. 35. – P. 1803-1809.
- [159] Moon C. P. Side-chain hydrophobicity scale derived from transmembrane protein folding into lipid bilayers / C. P. Moon, K. G. Fleming // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2011. – V. 108. – P. 10174–10177.
- [160] Snider C. MPEx: a tool for exploring membrane proteins / C. Snider, S. Jayasinghe, K. Hristova, S. H. White // *Protein Sci.* – 2009. – V. 18. – P. 2624–2628.
- [161] Wimley W. C. Designing transmembrane alpha-helices that insert spontaneously / W. C. Wimley, S. H. White // *Biochemistry*. – 2000. – V. 39. – P. 4432–4442.
- [162] Ben-Tal N. Free-energy determinants of alpha-helix insertion into lipid bilayers / N. Ben-Tal, A. Ben-Shaul, A. Nicholls, B. Honig // *Biophys. J.* – 1996. – V. 70. – P. 1803–1812.

- [163] Ben-Shaul A. Statistical thermodynamic analysis of peptide and protein insertion into lipid membranes / A. Ben-Shaul, N. Ben-Tal, B. Honig // *Biophys. J.* – 1996. – V. 71. – P. 130–137.
- [164] Jayasinghe S. Energetics, stability, and prediction of transmembrane helices / S. Jayasinghe, K. Hristova, S. H. White // *J. Mol. Biol.* – 2001. – V. 312. – P. 927–934.
- [165] Jayasinghe S. MPtopo: A database of membrane protein topology / S. Jayasinghe, K. Hristova, S. H. White // *Protein Science.* – 2001. – V. 10. – P. 455–458.
- [166] Killian J. A. Peptides in lipid bilayers: the power of simple models / J. A. Killian, T. K. Nyholm // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2006. – V. 16. – P. 473–479.
- [167] Holt A. Orientation and dynamics of transmembrane peptides: the power of simple models / A. Holt, J. A. Killian // *Eur. Biophys. J.* – 2010. – V. 39. – P. 609–621.
- [168] Posokhov Y. O. Thermodynamics of membrane protein insertion/folding: fluorescence correlation spectroscopy study of annexin B12 / Y. O. Posokhov, M. V. Rodnin, A. S. Ladokhin // BPS 52-th Annual Meeting/16-th International Biophysics Congress, 2-6 February 2008: CD of abstracts. – Long Beach, California, USA, 2008. – 1929-Pos.
- [169] Ladokhin A. S. Bilayer interactions of indolicidin , a small antimicrobial peptide rich in tryptophan, proline, and basic amino acids / A. S. Ladokhin, M. E. Selsted, S. H. White // *Biophys. J.* – 1997. – V. 137. – P. 794–805.
- [170] Loo T. W. Application of chemical chaperones to the rescue of folding defects / T. W. Loo, D. M. Clarke // *Methods Mol. Biol.* – 2003. - V. 232. – P. 231-243.
- [171] Interactions of fluorinated surfactants with diphtheria toxin T-domain: testing new media for studies of membrane proteins / M. V. Rodnin, Y .O.

- Posokhov, C. Contino-Pepin [et al.] // *Biophys J.* – 2008. – V. 94, No. 11. – P. 4348-4357.
- [172] Fluorinated surfactants as chaperones for insertion/folding of membrane proteins / Y. O. Posokhov, A. Kyrychenko, M. V. Rodnin [et al.] // BPS 52-th Annual Meeting/16-th International Biophysics Congress, 2-6 February 2008: CD of abstracts. – Long Beach, California, USA, 2008. – 1859-Plat.
- [173] French swimwear for membrane proteins / C. R. Sanders, B. Kuhn, A. Hoffmann A. [et al.] // *ChemBioChem.* - 2004. - V. 5. – P. 423-426.
- [174] Stabilization of integral membrane proteins in aqueous solution using fluorinated surfactants / E. Chabaud, P. Barthelemy, N. Mora [et al.] // *Biochimie.* – 1998. – V. 80. – P. 515-530.
- [175] Synthesis and preliminary assessments of ethylterminated perfluoroalkyl nonionic surfactants derived from tris- (hydroxymethyl)acrylamidomethane / P. Barthelemy, B. Ameduri, E. Chabaud [et al.] // *Org. Lett.* – 1999. – V. 1. – P. 1689-1692.
- [176] Hemifluorinated surfactants: A non-dissociating environment for handling membrane proteins in aqueous solutions? / C. Breyton, E. Chabaud, Y. Chaudier [et al.] // *FEBS Lett.* – 2004. – V. 564. – P. 312-318.
- [177] FCS study of thermodynamic of membrane protein insertion into the lipid bilayer chaperoned by fluorinated surfactants / Y. O. Posokhov, M. V. Rodnin, S. K. Das [et al.] // *Biophys J.* – 2008. – V. 9, No. 8. – P. L54-L56.
- [178] Thermodynamic of interfacial membrane binding and transmembrane insertion of diphtheria toxin T-domain: fluorescence correlation spectroscopy study / Y. O. Posokhov, M. V. Rodnin, A. Kyrychenko [et al.] // BPS 54-th Annual Meeting, 20-24 February 2010: CD of abstracts. – San Francisco, USA, 2010. – 3245-Plat.
- [179] Chaperoning of membrane protein insertion into lipid bilayers by hemifluorinated surfactants: application to diphtheria toxin / S. S.

- Palchevskyy, Y. O. Posokhov, B. Olivier [et al.] // *Biochemistry*. – 2006. – V. 45. – P. 2629-2635.
- [180] Fluorinated surfactants chaperone bilayer insertion of a model membrane protein / S. S. Palchevskyy, Y. O. Posokhov, B. Olivier [et al.] // BPS 50-th Annual Meeting, 18-22 February 2006: CD of abstracts. – Salt Lake City, Utah, USA, 2006. – 1529-Plat.
- [181] Comparison of chaperone-like ability of various fluorinated surfactants for bilayer insertion of a model membrane protein / M. V. Rodnin, D. Pechak, S. S. Palchevskyy [et al.] // BPS 51-th Annual Meeting, 3-7 March 2007: CD of abstracts. – Baltimore, Maryland, USA, 2007. – 323-Pos.
- [182] Biogenesis of tail-anchored proteins: the beginning for the end? / C. Rabu, V. Schmid, B. Schwappach, S. High // *J. Cell Sci.* – 2009. – V. 122. – P. 3605–3612.
- [183] Renthall R. Helix insertion into bilayers and the evolution of membrane proteins / R. Renthall // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2010. – V. 67. – P. 1077–1088.
- [184] Thermodynamic measurements of bilayer insertion of a single transmembrane helix chaperoned by fluorinated surfactants / A. Kyrychenko, M. V. Rodnin, Y. O. Posokhov [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. – 2012. – V. 416. – P. 328-334.
- [185] Thermodynamic measurements of bilayer insertion of a single transmembrane helix / A. Kyrychenko, M. V. Rodnin, Y. O. Posokhov [et al.] // BPS 56-th Annual Meeting, 25-29 February 2012: CD of abstracts. – San Diego, California, USA, 2012. – 2398-Pos.
- [186] Can we measure the thermodynamic stability of membrane proteins in a lipid bilayer environment? / Y. O. Posokhov, M. V. Rodnin, A. Kyrychenko [et al.] // BPS 53-rd Annual Meeting, 28 February – 4 March 2009: CD of abstracts. – Boston, Massachusetts, USA, 2009. – 1706-Pos.
- [187] Hirota N., Mizuno K., Goto, Y. Group additive contributions to the alcohol-induced α -helix formation of melittin: implication for the mechanism of the

- alcohol effects on proteins / N. Hirota, K. Mizuno, Y. Goto // J.Mol. Biol. – 1998. – V. 275. – P. 365–378.
- [188] Фундаментальная и клиническая физиология / [ред. Камкин А. Г., Каменский А. А.]. — М.: Изд. центр «Академия», 2004. — 1072 с.
- [189] Зефилов А. Л. Ионные каналы возбудимой клетки (структура, функция, патология) / А. Л. Зефилов, Г. Ф. Ситдикова – Казань: Арт-кафе, 2010. – 271 с.
- [190] Сазонов В. Ф. Функциональная классификация мембранных ионных каналов / В. Ф. Сазонов // Научные труды III Съезда физиологов СНГ. – М.: Медицина-Здоровье. – 2011. – С. 72.
- [191] Lee S. Y. A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom / S. Y. Lee, R. MacKinnon // Nature. - 2004. - V. 430. P. 232–235.
- [192] Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers / T. M. Suchyna, S. E. Tape, R. E. Koeppe [et al.] // Nature. - 2004. – V. 430. P. 235–240.
- [193] Garcia M. L. Ion channels: gate expectations / M. L. Garcia // Nature. - 2004. – V. 430. - P. 153–155.
- [194] Solution structure of hpTX2, a toxin from Heteropoda venatoria spider that blocks Kv4.2 potassium channel / C. Bernard, C. Legros, G. Ferrat [et al.] // Protein Sci. – 2000. – V. 9. – P. 2059–2067.
- [195] Solution structure of peptide toxins that block mechanosensitive ion channels / R. E. Oswald, T. M. Suchyna, R. McFeeters [et al.] // J. Biol. Chem. – 2002. – V. 277. – P. 34443–34450.
- [196] Solution structure and functional characterization of SGTx1, a modifier of Kv2.1 channel gating / C. W. Lee, S. Kim, S.H. Roh [et al.] // Biochemistry. – 2004. – V. 43. - P. 890–897.

- [197] Heteropoda toxin 2 is a gating modifier toxin specific for voltage-gated K1 channels of the Kv4 family / V. V. Zarayskiy, G. Balasubramanian, V. E. Bondarenko, M. J. Morales // *Toxicon*. – 2005. – V. 45. – P. 431–442.
- [198] Solution structure and lipid membrane partitioning of VSTx1, an inhibitor of the KvAP potassium channel / H. J. Jung, J. Y. Lee, S. H. Kim [et al.] // *Biochemistry*. – 2005. – V. 44. – P. 6015–6023.
- [199] Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo / R. L. Phillips, M. Milescu, Y. Li-Smerin [et al.] // *Nature*. – 2005. – V. 430. – P. 857–860.
- [200] Wiggins P. Membrane-protein interactions in mechanosensitive channels / P. Wiggins, R. Phillips // *Biophys. J.* – 2005. – V. 88. – P. 880-902.
- [201] Winterfield J. R. A hot spot for the interaction of gating modifier toxins with voltage-dependent ion channels / J. R. Winterfield, K. J. Swartz // *Gen Physiol.* – 2000. – V. 116. – P. 637-644.
- [202] Molecular surface of tarantula toxins interacting with voltage sensors in K(v) channels / J. M. Wang, S. H. Roh, S. Kim [et al.] // *J. Gen. Physiol.* – 2004. – V. 123. – P. 455-467.
- [203] Swartz K. J. Towards a structural view of gating in potassium channels / Swartz K. J. // *Nat .Rev. Neurosci.* – 2004. – V. 5. – P. 905-916.
- [204] Swartz K. J. Greasing the gears of potassium channels / Swartz K. J. // *Nat. Chem. Biol.* – 2006. – V. 2. – P. 401-402.
- [205] Bode F. Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation / F. Bode, F. Sachs, F., Franz, M. R. // *Nature*. – 2001. – V. 409. – P. 35-36.
- [206] Voet D. *Biochemistry* / D. Voet, J. G. Voet. – [3rd ed.]. – N.Y.: Wiley, 2004. – 1600 p.
- [207] X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel / Y. X. Jiang, A. Lee, J. Y. Chen [et al.] // *Nature*. – 2003. – V. 423. – P. 33-41.
- [208] The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel / Y. X Jiang, V. Ruta, J. Y. Chen [et al.] // *Nature*. – 2003. – V. 423. – P. 42-48.

- [209] Posokhov Y. O. Quenching-enhanced fluorescence titration protocol for accurate determination of free energy of membrane binding / Y. O. Posokhov, P. A. Gottlieb, A. S. Ladokhin // *Analytical Biochemistry*. – 2007. – V. 362. – P. 290-292.
- [210] Quantitative characterization of membrane interactions of the cysteine knot (CK) family of ion-channel blockers / Y. O. Posokhov, P. Gottlieb, M. J. Morales [et al.] // *BPS 50-th Annual Meeting, 18-22 February 2006: CD of abstracts*. – Salt Lake City, Utah, USA, 2006. – 301-Pos.
- [211] Ladokhin A. S. Fluorescence quenching study of melittin-membrane interactions / A. S. Ladokhin, P. W. Holloway // *Ukrainian Biochemical Journal*. – 1995. – V. 67. – P. 34-40.
- [212] Ladokhin A.S. Distribution analysis of membrane penetration of proteins by depth-dependent fluorescence quenching / A. S. Ladokhin, P. W. Holloway, E. G. Kostrzhevskaya // *J. Fluorescence*. – 1993 – V. 3. – P. 195-197.
- [213] Is lipid bilayer binding a common property of inhibitor cysteine knot ion-channel blockers? / Y. O. Posokhov, P. A. Gottlieb, M. J. Morales [et al.] // *Biophys J*. – 2007. – V. 93, No. 4. – P. L20-L22.
- [214] Experimental and molecular dynamics (MD) characterization of membrane interactions of the cysteine knot (CK) family of ion-channel blockers / Y. O. Posokhov, J. A. Freites, P. A. Gottlieb [et al.] // *BPS 51-th Annual Meeting, 3-7 March 2007: CD of abstracts*. – Baltimore, Maryland, USA, 2007. – 2595-Plat.
- [215] Posokhov Y. O. Membrane partitioning of mechanosensitive channel inhibitor GsMTx4: characterization by depth-dependent fluorescence quenching and molecular dynamics simulations / Y. O. Posokhov // *BPS 53-rd Annual Meeting, 28 February – 4 March 2009: CD of abstracts*. – Boston, Massachusetts, USA, 2009. – 3154-Pos.

- [216] Ladokhin A. S. Distribution analysis of membrane penetration by depth dependent fluorescence quenching / A. S Ladokhin. // Biophys. J. – 1993. – V. 64. – P. 290a.
- [217] Ladokhin A. S. Fluorescence of membraneboundtryptophan octyl ester: a model for studying intrinsic fluorescence of protein membrane interactions / A. S. Ladokhin, P. W. Holloway // Biophys. J. – 1995. – V. 69. – P. 506 – 517.
- [218] Ladokhin A. S. Distribution analysis of depth-dependent fluorescence quenching in membranes: a practical guide / A. S Ladokhin. // Methods Enzymol. – 1997. – V. 278. – P. 462–473.
- [219] Ladokhin A. S. Analysis of protein and peptide penetration into membranes by depth-dependent fluorescence quenching / A. S Ladokhin // Theoretical considerations // Biophys.J. – 1999. – V. 76. – P. 946-955.
- [220] Kleinschmidt J. H. Time-resolved distance determination by tryptophan fluorescence quenching probing intermediates in membrane protein folding / J. H. Kleinschmidt, L. K. Tamm // Biochemistry. – 1999. – V. 38 – P. 4996-5005.
- [221] Фрайфелдер Д. Физическая биохимия / Д. Фрайфелдер – М.: Мир, 1980. — 582 с.
- [222] Incomplete dehydration of the hydrophobic face of the mechanosensitive channel inhibitor GsMTx4 during membrane partitioning / Y. O. Posokhov, J. Alfredo Freites, P. A. Gottlieb [et al.] // BPS 52-th Annual Meeting/16-th International Biophysics Congress, 2-6 February 2008: CD of abstracts. – Long Beach, California, USA, 2008. – 2042-Pos.
- [223] Шатурский О. Я. Закономерности образования и функционирования ионпроводящих каналов цитолитических протеинов при реконструкции в искусственных липидных бислоях / О. Я. Шатурский // Біотехнологія. – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 20-33.

- [224] Asymmetry of syringomycin E channel studied by polymer partitioning / O. S. Ostroumova, P. A. Gurnev, L. V. Schagina, S. M. Bezrukov // *FEBS Letters*. – 2007. – V. 581. – P. 804–808.
- [225] Ali H. M. Protein oligomerization: How and why / H. M. Ali, B. Imperiali B. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2005. – V. 13. – P. 5013–5020.
- [226] You M. The achondroplasia mutation does not alter the dimerization energetics of the fibroblast growth factor receptor 3 transmembrane domain / M. You, E. Li, K. Hristova // *Biochemistry* – 2006. – V. 45. – P. 5551–5556.
- [227] You M. Förster resonance energy transfer in liposomes: Measurements of transmembrane helix dimerization in the native bilayer environment / M. You, E. Li, W.C. Wimley, K. Hristova // *Anal. Biochem.* – 2005. – V. 340. – P. 154–164.
- [228] Li E. Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and Förster resonance energy transfer suggest weak interactions between fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane domains in the absence of extracellular domains and ligands / E. Li, M. You, K. Hristova // *Biochemistry* – 2005. – V. 44. – P. 352–360.
- [229] Wolber P. K. An analytic solution to the Förster energy transfer problem in two dimensions / P. K. Wolber, B. S. Hudson // *Biophys. J.* – 1979. – V. 28. – P. 197–210.
- [230] A simple “proximity” correction for Förster resonance energy transfer efficiency determination in membranes using lifetime measurements / Y. O. Posokhov, M. Merzlyakov, K. Hristova, A. S. Ladokhin // *Analytical Biochemistry*. – 2008. – V. 380. – P. 134–136.
- [231] Sandtner W. In vivo measurement of intramolecular distances using genetically encoded reporters / W. Sandtner, F. Bezanilla, A. M. Correa // *Biophys. J.* – 2007. – V. 93. – P. L45–L47.

- [232] Horrocks W. D. Energy transfer between terbium (III) and cobalt (II) in thermolysin: a new class of metal–metal distance probes / W. D. Horrocks, B. Holmquist, B. L. Vallee // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1975. – V. 72. – P. 4764–4768.
- [233] Franz K. J. Lanthanide-binding tags as versatile protein coexpression probes / K. J. Franz, M. Nitz, B. Imperiali // *Chembiochem.* – 2003. – V. 4. – P. 265–271.
- [234] Selvin P. R. Principles and biophysical applications of lanthanide-based probes / P. R. Selvin // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* – 2002. – V. 31. – P. 275–302.
- [235] Selvin P. R. Luminescence energy transfer using a terbium chelate: Improvements on fluorescence energy transfer / P. R. Selvin, J. E. Hearst // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1994. – V. 91. – P. 10024–10028.
- [236] Distance measurements reveal a common topology of prokaryotic voltage-gated ion channels in the lipid bilayer / J. Richardson J., R. Blunck R., P. Ge [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2006. – V. 103. – P. 15865–15870.
- [237] Forster T. Experimentelle und theoretische untersuchung des zwischenmolekularen ubergangs von elektronenanregungsenergie / T. Forster // *Z. Naturforsch A.* – 1949. – V. 4. – P. 321–327.
- [238] Selvin P. R. Fluorescence resonance energy transfer / P. R. Selvin // *Methods Enzymol.* – 1995. – V. 246. – P. 300–334.
- [239] Stryer L. Energy transfer: Aspects of spectroscopic ruler / L. Stryer L., R. P. Haugland // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1967. – V. 58. – P. 719–726.
- [240] Structural origin of the high affinity of a chemically evolved lanthanide-binding peptide / M. Nitz, M. Sherawat, K. J. Franz [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2004. – V. 43. – P. 3682–3685.
- [241] Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation / J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage // *Nature* – 1975. – V. 258. – P. 598–599.

- [242] Taraska J. W. Short-distance probes for protein backbone structure based on energy transfer between bimane and transition metal ions / J. W. Taraska, M. C. Puljung, W.N. Zagotta // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2009. – V. 106. – P. 16227–16732.
- [243] Mapping the structure and conformational movements of proteins with transition metal ion FRET / J. W. Taraska, M. C. Puljung, N. B. Olivier // *Nat. Methods* – 2009. – V. 6. – P. 532–537.
- [244] Posokhov Y. O., Steady-state and time-resolved fluorescence quenching with transition metal ions as short-distance probes for protein conformation / Y. O. Posokhov, A. Kyrychenko, A. S. Ladokhin // *Analytical Biochemistry*. – 2010. – V. 407. – P. 284-286.
- [245] Schaftenaar G. Molden: a pre- and post-processing program for molecular and electronic structures / G. Schaftenaar, J. H. Noordik // *J. Comput. Aided Mol. Des.* – 2000. – V. 14. – P. 123– 134.
- [246] Crystal structure of a two-domain multicopper oxidase: implications for the evolution of multicopper blue proteins / T. J. Lawton, L. A. Sayavedra-Soto, D. J. Arp, A. C. Rosenzweig // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – P. 10174–10180.
- [247] Wong K.F. Distance and orientation dependence of excitation transfer rates in conjugated systems: beyond the Förster theory / K. F. Wong, B. Bagchi, P. J. Rossky // *J. Phys. Chem. A* – 2004. – V, 108. – P. 5752–5763.
- [248] Gelman M. S. Rescuing protein conformation: Prospects for pharmacological therapy in cystic fibrosis / M. S. Gelman, R. R. Kopito // *J. Clin. Invest.* – 2002. – V. 110. – P. 1591-1597.
- [249] Stabilization of integral membrane proteins in aqueous solution using fluorinated surfactants / E. Chabaud., P. Barthelemy, N. Mora [et al.] // *Biochimie.* – 1998. – V. 80. – P. 515-530.

- [250] Mutational analysis of the helical hairpin region of diphtheria toxin transmembrane domain / J. A. Silverman, J. A. Mindell, A. Finkelstein [et al.] // J. Biol. Chem. - 1994. – V. 269. – P. 22524-22532.
- [251] Mechanism of leakage of contents of membrane vesicles determined by fluorescence reequenching / A. S. Ladokhin., W. C. Wimley, K. Hristova, S. H. White, // Methods Enzymol. – 1997. – V. 278. – P. 474-486.
- [252] Oligomerization of a 45 kilodalton fragment of diphtheria toxin at pH 5.0 to a molecule of 20-24 subunits / C. E. Bell, P. H. Poon, V. N. Schumaker, D. Eisenberg // Biochemistry – 1997. – V. 36. – P. 15201-15207.
- [253] Sharpe J.C. Diphtheria toxin forms pores of different sizes depending on its concentration in membranes: Probable relationship to oligomerization / J. C. Sharpe, E. London // J. Membr. Biol. – 1999. – V. 171. – P. 209-221.
- [254] Identification of shallow and deep membrane-penetrating forms of diphtheria toxin T domain that are regulated by protein concentration and bilayer width / Y. Wang, S. E. Malenbaum, K. Kachel [et al.] // J. Biol. Chem. - 1997. – V. 272. P. 25091-25098.
- [255] Eftink M. R. The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins / M. R. Eftink // Biophys. J. – 1994. – V. 66. – P. 482–501.
- [256] Weber G. Fluorescent indicators of adsorption in aqueous solution and on the solid phase / G. Weber, D. J. R. Lawrence // Biochem. J. — 1954. — V. 56. — P. xxxi.
- [257] Hawe A. Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization / A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot // Pharm. Research — 2008. — V.25. — No. 7. — P. 1487-1499.
- [258] Wainwright M. The use of dyes in modern biomedicine / M. Wainwright // Biotech. Histochem. — 2003. — V.78. — P.147-155.
- [259] Lavis L. D. Bright ideas for chemical biology / L. D. Lavis, R. T. Raines // Chemical Biology. 2008. — V.3. — No. 3. — P. 142-155.

- [260] Johnsson N. Chemical tools for biomolecular imaging / N. Johnsson, K. Johnsson // *ACS Chem. Biol.* — 2007. — V. 2. — P. 31-38.
- [261] Владимиров Ю.А. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран / Ю.А. Владимиров, Г.Е. Добрецов. — М.: Наука, 1980. — 324 с.
- [262] Добрецов Г. Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов / Г. Е. Добрецов. — М.: Наука, 1989. - 277 с.
- [263] Valeur B. Fluorescent probes for evaluation of local physical and structural parameters / B. Valeur // *Molecular luminescence spectroscopy. Methods and applications: Part 3.* — [ed. Schulman S. G.] — New York: John Wiley, 2003. — P. 25-84.
- [264] Green fluorescent protein as a marker for gene expression / M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen [et al.] // *Science.* — 1994. — V. 263. — P. 802–805.
- [265] Shaner N. C. A guide to choosing fluorescent proteins / N. C. Shaner, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien // *Nat. Methods.* — 2005. — V. 2. — P. 905–909.
- [266] Patterson G. H. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells / G. H. Patterson, J. Lippincott-Schwartz // *Science.* — 2002. — V. 297. — P. 1873–1877.
- [267] Miyawaki A. Mechanisms of protein fluorophore formation and engineering / A. Miyawaki, T. Nagai, H. Mizuno // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 2003. — V. 7. — P. 557–562.
- [268] VanEngelenburg S. B., Fluorescent biosensors of protein function / S. B. VanEngelenburg, A. E. Palmer // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 2008. — V. 12. — P. 60–65.
- [269] Schmid J. Fluorescent proteins and fluorescence resonance energy transfer (FRET) as tools in signaling research/ J. Schmid, A. Birbach // *Thromb. Haemost.* — 2007. — V. 97. — P. 378–384.
- [270] Miyawaki A. Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent

- protein / A. Miyawaki, R. Y. Tsien // *Meth. Enz.* — V. 2000. — V. 327. — P. 436-472.
- [271] Nagai T. A high-throughput method for development of FRET-based indicators for proteolysis / T. Nagai, A. Miyawaki // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* — 2004. — V. 319. — P. 72-77.
- [272] Quantitative understanding of the energy transfer between fluorescent proteins connected via flexible peptide linkers / T. H. Evers, E. M. van Dongen, A. C. Faesen [et al.] // *Biochemistry.* — 2006. — V. 45. — P. 13183-13192.
- [273] Epand R. M. Fluorescent probes used to monitor membrane interfacial polarity / R. M. Epand, R. Kraayenhof // *Chem. Phys. Lipids.* — 1999. — V. 101. — P.57-64.
- [274] Nonradiative pathways of aniline-naphthalene sulphonates: twisted intramolecular charge transfer versus intersystem crossing / K. Das, N. Sarkar, D. Nath, K. Bhattacharyya // *Spectrochim. Acta.* — 1992. — V. 48A. — P. 1701–1705.
- [275] Twisted charge transfer process of Nile Red in homogeneous solution and in faujasite zeolite / N. Sarkar, K. Das, D. N. Nath, K. Bhattacharyya // *Langmuir.* — 1994. — V. 10. — P. 326–329.
- [276] Cholesterol modifies water concentration and dynamics in phospholipids bilayers: a fluorescence study using Laurdan probe / T. Parasassi, M. Di Stefano, M. Loiero [et al.] // *Biophys. J.* — 1994. — V. 66. — P. 763–768.
- [277] ABA-C-15: A new dye for probing solvent relaxation in phospholipid bilayers / J. Sykora, V. Mudogo, R. Hutterer [et al.] // *Langmuir.* — 2002. — V. 18. — No. 24. — P. 9276–9282.
- [278] On what time scale does solvent relaxation in phospholipid bilayers happen? / J. Sykora, P. Kapusta, V. Fidler, M. Hof // *Langmuir.* — 2002. — V. 18. — P. 571–574.

- [279] Analysis of the solvent effect on the photophysics properties of 6-propionyl-2-(dimethylamino) naphthalene (PRODAN) / J. Catalan, P. Perez, J. Laynez, F. G. Blanco // *J. Fluoresc.* — 1991. — V. 1. — P. 215–223.
- [280] Kung C. E. Fluorescent Molecular Rotors: A new class of probes for tubulin structure and assembly / C. E. Kung, J. K. Reed // *Biochemistry.* — 1989. — V. 28. — P. 6678–6686.
- [281] Effects of solvent polarity and solvent viscosity on the fluorescent properties of molecular rotors and related probes / M. A. Haidekker, T. P. Brady, D. Lichlyter, E. A. Theodorakis // *Bioorg. Chem. E. A.* — 2005. — V. 33. — P. 415–425.
- [282] Akers W. J. Interaction of fluorescent molecular rotors with blood plasma proteins / W. J. Akers, J. M. Cupps, M. A. Haidekker // *Biorheol.* — 2005. — V. 42. — P. 335–344.
- [283] 9-(Dicyanovinyl) julolidine binding to bovine brain calmodulin / T. Iio, M. Itakura, S. Takahashi, S. Sawada // *J. Biochem. (Tokyo).* — 1991. — V. 109. — P. 449–502.
- [284] Haidekker M. A. Molecular rotors — fluorescent biosensors for viscosity and flow / M. A. Haidekker, E. A. Theodorakis // *Org. Biomol. Chem.* — 2007. — V. 5. — P. 1669–1678.
- [285] Sytnik A. Energy transfer to a proton-transfer fluorescence probe: tryptophan to a flavonol in human serum albumin / A. Sytnik, I. Litvinyuk // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — V. 93. — P. 12959–12963.
- [286] Dennison S. M. Excited-state intramolecular proton transfer (ESIPT) and charge transfer (CT) fluorescence probe for model membranes / S. M. Dennison, J. Guharay, P. K. Sengupta // *Spectrochim. Acta A.* — 1999. — V. 55. — P. 1127–1132.
- [287] Multiparametric color-changing fluorescence probes / A. P. Demchenko, A. S. Klymchenko, V. G. Pivovarenko [et al.] // *J. Fluoresc.* — 2003. — V. 13. — P. 291–295.

- [288] Klymchenko A. S. Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer / A. S. Klymchenko, A. P. Demchenko // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2003. — V. 5. — P. 461–468.
- [289] Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes / A. P. Demchenko, Y. Mely, G. Duportail, A. S. Klymchenko // *Biophys. J.* — 2009. — V. 96. — P. 3461–3470.
- [290] Demchenko A. P. Visualization and sensing of intermolecular interactions with two-color fluorescent probes / A. P. Demchenko // *FEBS Letters.* — 2006. — V. 580. — P. 2951–2957.
- [291] Klymchenko A. S. Multiparametric probing of microenvironment with solvatochromic fluorescent dyes / A. S. Klymchenko, A. P. Demchenko // *Methods Enzymol.* — 2008. — V. 450. — P. 37–58.
- [292] Ultrasensitive two-color fluorescence probes for dipole potential in phospholipids membranes / A. S. Klymchenko, G. Duportail, Y. Mely, A. P. Demchenko // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2003. — V. 100. — P. 11219–11224.
- [293] Two-color fluorescent probes for imaging the dipole potential of cell plasma membranes / V. V. Shynkar, A. S. Klymchenko, G. Duportail [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2005. — V. 1712. — P. 128–136.
- [294] Fluorescent probe based on intramolecular proton transfer for fast ratiometric measurement of cellular transmembrane potential / A. S. Klymchenko, H. Stoeckel, K. Takeda, Y. Mely // *J. Phys. Chem. B.* — 2006. — V. 110. — P. 13624–13632.
- [295] Simultaneous probing of hydration and polarity of lipid bilayers with 3-hydroxyflavone fluorescent dyes / A. S. Klymchenko, Y. Mely, A. P. Demchenko, G. Duportail // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2004. — V. 1665. — P. 6–19.

- [296] Liquid ordered and gel phases of lipid bilayers: fluorescent probes reveal close fluidity but different hydration / G. M'Baye, Y. Mely, G. Duportail, A. S. Klymchenko // *Biophys. J.* — 2008. — V. 95. — P. 1217–1225.
- [297] Fluorescent biomembrane probe for ratiometric detection of apoptosis / V. V. Shynkar, A. S. Klymchenko, C. Kunzelmann [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* — 2007. — V. 129. — P. 2187–2193.
- [298] Darwich Z. Detection of apoptosis through the lipid order of the outer plasma membrane leaflet / Z. Darwich, A. S. Klymchenko, O. A. Kucherak, L. Richert, Y. Mély // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2012. — V. 1818. — P. 3048–3054.
- [299] The structure of HBsAg particles is not modified upon their adsorption on aluminium hydroxide gel / V. J. Greinera, F. Ronzon, E. Larquet [et al.] // *Vaccine.* — 2012. — V. 30. — P. 5240– 5245.
- [300] Sikkema J. Interactions of Cyclic Hydrocarbons with Biological Membranes / J. Sikkema, J. A. M. Bont, B. Poolmann // *J. Biol. Chem.* — 1994. — V. 268, No. 11. — P. 8022-8028.
- [301] Пат. 68871 Україна. МПК G01N 33/483, G01N 21/64 (2006.01). Набір флуоресцентних зондів для визначення фізико-хімічних властивостей ліпідних мембран/ Є. О. Посохов; заявник і власник патенту Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – №U201112552; заявл. 26.10.2011; опубл. 10.04.2012, Бюл. №7.
- [302] Rekker R.F. The hydrophobic fragmental constant. An Extension to a 1000 data point set / R. F. Rekker, H. M. de Kort // *Eur. J. Med. Chem., Chimica Therapeutica.* – 1979. – V.14. – P.479-488.
- [303] Mayer J. M. A comparison between the hydrophobic fragmental methods of Rekker and Leo / J. M. Mayer, H. van der Waterbeemd, B. Testa // *Eur. J. Med.Chem., Chimica Therapeutica.* – 1982. – V.17. – P.17-25.

- [304] Kellogg G. E. Hydrophobicity: is $\text{LogP}_{o/w}$ more than the sum of its parts? / G. E. Kellogg, D. J. Abraham / G. E. Kellogg // Eur. J. Med. Chem. – 2000. – V.35. – P. 651-661.
- [305] *Орто*-гидроксипроизводные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для медико-биологических исследований / Е. А. Посохов, Н. А. Абманова, Т. П. Бойко, А. О. Дорошенко // Вестник Харьк. университета. – 1999. – № 454. – Химия. Вып. 4(27). – С. 188-190.
- [306] Посохов Е. А. Орто-гидроксипроизводные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований модельных биомембран / Е. А. Посохов, Т. П. Бойко, Д. А. Бевзюк // Вестник Харьковского национального университета. – 2001. – №. 532, серия «хімія», вип. 7 (30). – С. 192-194.
- [307] Посохов Е. А. Орто-гидроксипроизводные 2,5-дифенил-1,3-оксазола и 2,5-дифенил-1,3,4-оксадиазола в качестве флуоресцентных зондов для токсикологических исследований мембран клеток обонятельного анализатора крыс / Е. А. Посохов // Вісник Харківського національного університету. – 2011. – № .976, серия «хімія», вип. 20 (43). – С. 92-99.
- [308] Посохов Е. А. 2-фенил[9,10]фенантроксазол и 2-(2'-ОН-фенил)-5-фенил-1,3,4-оксадиазол в качестве флуоресцентных зондов для исследования изменений в мембранах тромбоцитов при атеросклерозе / Е. А. Посохов // Вісник Харківського національного університету. – 2012. – №. 1026, серия «хімія», вип. 21 (44). – С. 112-121.
- [309] AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model / M. J. S. Dewar, E. G. Zoebich, E. F. Healy, J. J. P. Stewart // J. Amer. Chem. Soc. – 1985. – V.107. – P. 3902-3908.
- [310] Реакция фотопереноса протона в возбуждённом состоянии в ряду орто-окси-производных 2,5-диарилоксазола / А. О. Дорошенко, Е. А. Посохов,

- В. М. Шершуков [и др.] // Химия высоких энергий. – 1997. – Т. 31, № 6. – С. 428-435.
- [311] Excited State Intramolecular Proton Transfer Reaction and Luminescent Properties of the Ortho-Hydroxy Derivatives of 2,5-Diphenyl-1,3,4-oxadiazole / A. O. Doroshenko, E. A. Posokhov, A. A. Verezubova, L. M. Ptyagina // J. Physical Organic Chemistry. – 2000. – V. 13. – P. 253-265.
- [312] Дорошенко А.О.. Реакция фотопереноса протона в ряду орто-гидрокси производных 2,5-диарил-1,3-оксазола и 2,5-диарил-1,3,4-оксадиазола в полистирольных пленках / А. О. Дорошенко, Е. А. Посохов // Теор. и exper. Химия. – 1999. – Т. 35, №6. – С. 357-361.
- [313] Radiationless deactivation of excited phototautomer form and molecular structure of ESIPT- compounds / A. O. Doroshenko, E. A. Posokhov, A. A. Verezubova [et al.] // Photochem. Photobiol. Sci. – 2002. – No. 1. – P. 92-99.
- [314] Ormson S. Excited-State Intramolecular Proton-Transfer .1. ESIPT to nitrogen / S. Ormson, R. Brown // Progress In Reaction Kinetics – 1994 – V. 19 – №.1 – P. 45-91.
- [315] Formosinho J. S. Exited state proton transfers reactions. Fundamental and intermolecular reactions / J. S. Formosinho, G. L. Arnaut // J. Photocem. Photobiol. A: Chem. – 1993. – V. 75. – P. 1-20.
- [316] Structural and functional properties of hydration and confined water in membrane interfaces / E. A. Disalvo, F. Larion, F. Martini [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 2008. – V. 1778. – P. 2655-2670.
- [317] Gabdouliline R. R. Molecular origin of the internal dipole potential in lipid bilayers: role of the electrostatic potential of water / R. R. Gabdouliline, C. Zheng, G. Vanderkooi // Chem Phys Lipid. – 1996. – V. 84. – P. 139-146.
- [318] Straume M. Equilibrium and dynamic structure of large, unilamellar, unsaturated acyl chain phosphatidylcholine vesicles. Higher order analysis of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and 1-[4-(trimethylammonio)phenyl]-6-phenyl-

- 1,3,5-hexatriene anisotropy decay / M. Straume, B. J. Littman // *Biochemistry*. – 1987. – V. 26. – P. 5121-5126.
- [319] Ho C. Hydration and order in lipid bilayers / C. Ho, S J. Slater, C. D. Stubbs // *Biochemistry*. – 1995. – V. 34. – P. 6188-6195.
- [320] Спектрально-люминесцентные свойства производных 2-арил-[9,10]-фенантроксазола / А. О. Дорошенко, Е. А. Посохов, В. М. Шершуков [и др.]. // *Химия гетероцикл. соед.* – 1995. – № 4. – С. 558-566.
- [321] Нестеров Ю. И. Атеросклероз: диагностика, лечение, профилактика / Ю. И. Нестеров - Ростов-на-Дону: «Феникс», 2007. – 253 с.
- [322] White C. J. Atherosclerotic peripheral arterial disease / C. J. White // *Cecil Medicine 24th* [eds. Goldman L., Ausiello D.]. – Philadelphia: Pa: Saunders Elsevier, 2011. – chap. 70.
- [323] Fayad Z. A. Cardiovascular molecular imaging / Z. A. Fayad // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – V. 29. – P. 981-982.
- [324] Choudhury R.P. Molecular imaging in atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation / R. P. Choudhury, E. A. Fisher // *Arterioscler. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – V. 29. – P. 983-991.
- [325] Saraste A. Cardiovascular molecular imaging: an overview / A. Saraste, S. G. Nekolla, M. Schwaiger // *Cardiovasc. Res.* – 2009. – V. 83. – P. 643-652.
- [326] Desai M. Y. Emergence of targeted molecular imaging in atherosclerotic cardiovascular disease / M. Y. Desai, P. Schoenhagen // *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* – 2009. – V. 7. – P. 197-203.
- [327] Sanz J. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease / J. Sanz, Z. A. Fayad // *Nature*. – 2008. – V. 451. – P. 953-957.
- [328] Nanotechnology in medical imaging: probe design and applications / D. P. Cormode, T. Skajaa, Z. A. Fayad, W. J. M. Mulder // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – V. 29. – P. 992-1000.

- [329] Rudd J. H. F. Inflammation imaging in atherosclerosis / J. H. F. Rudd, F. Hyafil, Z. A. Fayad // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – V. 29. – P. 1009-1016.
- [330] Laufer E. M. Imaging of cell death in atherosclerosis / E. M. Laufer, M. H. M. Winkens, J. Narula, L. Hofstra // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – V. 29. – P. 1031-1038.
- [331] Jaffer F. A. Optical and multimodality molecular imaging: insights into atherosclerosis / F. A. Jaffer, P. Libby, R. Weissleder // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2009. – V. 29. – P. 1017-1024.
- [332] Libby P. The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets / P. Libby, M. DiCarli, R. Weissleder // *J. Nucl. Med.* – 2010. – V. 51. – P.:33S-37S.
- [333] Bakic M. Pathogenetic aspects of atherosclerosis / M. Bakic // *Acta Medica Medianae.* – 2007 – V. 46. – P. 25-29.
- [334] Wanner C. Lipids and atherosclerosis / C. Wanner // *Replacement of renal function by dialysis* [ed. Horl W. H]. – Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 2004. – P. 791-805.
- [335] Ремяняк И. В. Изменение липидного состава мембран тромбоцитов у больных с сосудистой патологией гипертонического и атеросклеротического генеза / И. В. Ремяняк, Т. П. Бойко // *Український вісник психоневрології.* – 1999. – Т. 7, Вип. 4 (22). – С. 14-16.
- [336] Пат. 65766 Україна. МПК G01N 1/28 (2006.01). Спосіб експрес-визначення змін фізико-хімічних властивостей мембран тромбоцитів у хворих з судинною патологією головного мозку / Є. О. Посохов; заявник і власник патенту Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – №U201107649; заявл. 17.06.2011; опубл. 12.12.2011, Бюл. №23.
- [337] Ремяняк И. В. Изучение физико-химических свойств мембран тромбоцитов у больных с сосудистой патологией головного мозга

- гипертонического и атеросклеротического генеза / И. В. Реминяк, Т. П. Бойко, Е. А. Посохов // Український вісник психоневрології.– 2001.– Т. 9, Вип. 4 (29). – С. 31-33.
- [338] Берченко О. Г. Электрофизиологические корреляты эмоциогенных механизмов формирования влечения к летучим органическим соединениям у крыс / О. Г.Берченко, Т. М. Воробьёва, З. М. Бобрицкая // Український вісник психоневрології.– 2002.– Т. 10, Вип. 1 (30). – С. 248-249.
- [339] Накагаки М. Физическая химия мембран / М. Накагаки. – М: Мир, 1991. – 256 с.
- [340] Брагина Н. А. Мембранология. Учебно-методическое пособие / Н. А. Брагина, А. Ф. Миронов. – Москва: ИПЦ МИТХТ, 2002. – 98 с.
- [341] Лишко В. К. Мембраны и жизнь клетки / В. К.Лишко, М. И. Шевченко. – К.: Наук. думка, 1987. – 104 с.
- [342] Сим Э. Биохимия мембран / Э. Сим. – М.: Мир, 1985. – 111 с.
- [343] Дринберг С. А. Растворители для лакокрасочных материалов: Справочное пособие / С. А. Дринберг, Э. Ф. Ицко. – [2-е изд.]. – Л.: Химия, 1986. – 208 с.
- [344] Voet D. Biochemistry / D. Voet, J. G. Voet. – [4th ed.]. –N.Y.: Wiley, 2007. – 1758 p.
- [345] Protein-lipid interactions: from membrane domains to cellular networks / [ed. Tamm L. K.]. –Weinheim: Wiley-VCH, 2005. – 437 p.
- [346] Yoshimura K. Mechanosensitivity of ion channels based on protein-lipid interactions / K. Yoshimura, M. Sokabe // J.R. Soc. Interface.– 2010.– V. 7.– P. S301-S320.
- [347] Ho C. Hydration at the membrane protein-lipid interface / C. Ho, C. D. Stubbs// Biophysical Journal. –1992. – V.63. – P. 897-902.

- [348] Binder H. Effect of unsaturated lipid chains on dimensions, molecular order and hydration of membranes / H. Binder, K. Garwisch // *Journ. Phys. Chem. B.* – 1994. – V.105. – P. 12378-12390.
- [349] Membrane dipole potentials, hydration forces and the ordering of water at membrane surfaces / K. Garwisch, D. Ruston, J. Zimmerberg [et al.] // *Biophys. J.* – 1992. – V.61. – P. 1213-1223.
- [350] Marsh D. Polarity and permeation profiles in lipid membranes / D. Marsh // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2001. – V. 98. – P. 7777-7782.
- [351] Пат. 66256 Україна. МПК G01N 1/28, G01N 33/52 (2006.01). Спосіб визначення мембранотропної активності летких органічних сполук / Є. О. Посохов; заявник і власник патенту Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – №U201107786; заявл. 20.06.2011; опубл. 26.12.2011, Бюл. № 24.
- [352] Белоус А. М. Замораживание и криоконсервация / А. М. Белоус, Е. А. Гордиенко, Л. Ф. Розанов. – М.: Высшая школа, 1987. – 80 с.
- [353] Коваленко Г. В. Механизм транспорта ДМСО, глицерина и этиленгликоля через мембраны эритроцитов крысы и кролика / Г. В. Коваленко, И. Ф. Коваленко, Т. П. Линник // *Вісник Харківського національного університету.* – 2009. – №878. – Біологія. Вип. 10. – С 109-116.
- [354] Линник Т. П. Взаимодействие криопротекторов с липосомами из суммарных липидов спермиев петуха / Т. П. Линник, Т. С. Дюбко, Мартынюк, А. В. Терещенко // *Пробл. криобиологии.* – 2010. – Т. 20. – №1. – С. 34-46.
- [355] Dyubko T. S. Influence of freezing and low molecular weight cryoprotectants on microsomal membrane structure: a study by multiparametric fluorescent probe / T. S. Dyubko, E. V. Onishchenko, V. G. Pivovarenko // *J. Fluoresc.* – 2006. – V. 16. – P. 817–823.

- [356] Корниенко Е.М. Локализация проникающего криопротектора диметилсульфоксида в мембране эритроцитов: исследование методом флуоресцентных зондов / Е.М. Корниенко, Е.А. Посохов // Вісник Харківського національного університету.– 2011. - № 971. – Біологія. Вып. 14. – С. 135-139.
- [357] Пат. 71516 Україна. МПК G01N 33/483 (2006.01). Спосіб визначення мембранотропної активності криопротектора / Є. О. Посохов, Є.М. Корнієнко; заявник і власник патенту Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – №U201202917; заявл. 12.03.2012; опубл. 10.07.2012, Бюл. № 13.
- [358] Bianchi C. Natural and man-made terrestrial electromagnetic noise: an outlook / C. Bianchi C., A. Meloni A. // Annals of geophysics.– 2007. – V. 50.– P. 435-445.
- [359] Rosch P. J. Bioelectromagnetic Medicine / P. J. Rosch, M. S. Markov.– N.Y.:Marcel Dekker Inc, 2004. – 850 p.
- [360] Bassett A. C. L. Beneficial effects of electromagnetic fields / A. C. L. Bassett // J. Cell Biochem.– 1993. – V. 51. – P. 387-393.
- [361] Durney C. H. Basic Introduction to Bioelectromagnetics / C. H. Durney, D. A. Christensen – Boca Raton, New York, Washington: CRC Press INC, 2000. – 169 p.
- [362] Vorst A.V. RF/Microwave Interaction with Biological Tissues (Wiley Series in Microwave and Optical Engineering) / A. V. Vorst, A. Rosen, Y. Kotsuka. – N.Y.: Wiley-IEEE Press, 2006. – 315 p.
- [363] Michaelson S. M. Microwave biological effects: An overview / S. M. Michaelson // Proceedings of the IEEE.– 1980.– V. 68.–P. 40-49.
- [364] Effects of electromagnetic radiation in the millimeter and centimeter on the state of human epithelial cells / Y. G. Shckorbatov, V. G. Shahbazov, N. N. Gorobets [et al.] // Mater. 10th International. Crimean Conference.

"Microwave and Telecommunication Technology." - Sevastopol, 2000. - S.557-558.

- [365] Alekseev S. I. Millimeter microwave effect on ion transport across lipid bilayer membranes / S. I. Alekseev, M. C. Ziskin // Bioelectromagnetics.– 1995.– V. 16.– P. 124-131.
- [366] Ovchinnikova G. I. The mechanism of absorption of microwave radiation by biological membranes / G. I. Ovchinnikova, J. F. Korosteleva // Biofizika.– 1994. – V. 39.– P. 485-489.
- [367] Electrokinetic properties of nuclei and membrane permeability in human buccal epithelium cells influenced by the low-level microwave radiation / Y. G. Shckorbatov, V. G. Shakhbazov, V. V. Navrotskaya [et al.] // Electrophoresis.– 2002.– V. 23.– P. 2074-2079.
- [368] Пат. 76399 Україна. МПК G01N 33/483, G01N 21/64 (2006.01). Спосіб визначення впливу магнітного або електромагнітного поля на біологічні мембрани/ Є. О. Посохов, В. М. Пасюга, М. М. Колчигін, Ю. Г. Шкорбатов; заявник і власник патенту Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – № U201204116; заявл. 03.04.2012; опубл. 10.01.2013, Бюл. № 1.
- [369] Intramolecular proton phototransfer of proton reaction and quenching of fluorescence of 5-(o-hydroxyphenyl)-2-(coumarinyl-3)-1,3,4-oxadiazole derivatives / A.O. Doroshenko, E. A. Posokhov, K. M. Sytnik, S. N. Kovalenko // Chem. Heterocycl. Comp. – 2001. – V. 407. – P. 633-644.
- [370] Signaling recognition events with fluorescent sensors and switches / A. P. De Silva, H. Q. N. Gunaratne, T. Gunnlaugsson [et al.] // Chem. Rev. – 1997. – V. 97. – P. 1515-1556.
- [371] Efficient intramolecular charge transfer in oligoynes-linked donor– π –acceptor molecules / L. O. Palsson, C. Wang, A. S. Batsanov [et al.] // Chem. Eur. J. – 2010. – V. 16. – P. 1470-1479.

- [372] Efficient Deep-Blue Electroluminescence from an Ambipolar Fluorescent Emitter in a Single-Active-Layer Device / A. L. Fisher, K. E. Linton, K. T. Kamtekar [et al.] // *Chem. Mater.* – 2011. – V. 23. – P. 1640-1642.
- [373] Sharma A. *Introduction to Fluorescence Spectroscopy* / A. Sharma, S. G. Schulman. – N.Y.: John Willey & Sons, 1999. – 173 p.
- [374] Valeur B. *Molecular fluorescence* / B. Valeur. – Weinheim (FRG): Wiley-VCH, 2002. – 387 p.
- [375] Suppan P. *Solvatochromism* / P. Suppan, N. Ghoneim. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1997. – 457 p.
- [376] Valeur B. *Probe Design and Chemical Sensing* / B. Valeur // *Topics in Fluorescence Spectroscopy* [ed. Lakowicz R.]. – N.Y.: Plenum, 1994. – Vol. 4. – P. 25-83.
- [377] Spectral-luminescent and solvatochromic properties of 2-(3'-coumarinyl)-5-(2'-(R-amino)-phenyl)-1,3,4-oxadiazoles / Y. Posokhov, K. Sytnik, K. Ocakoglu, M. Kus, S. Icli // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* – 2012. – V. 227. – P. 25-31.
- [378] Turro N. J. *Adiabatic photoreactions of organic molecules* / N. J. Turro, J. McVey, V. Ramamurthy, P. Lechtken // *Angew. Chem.* – 1979. – V. 91. – P. 572-586.
- [379] *Multidimensional photochemistry in flexible dye systems* / W. Rettig, W. Majenz, R. Lapouyade, M. Vogel // *J. Photochem. Photobiol. A.Chem.* – 1992. – V. 62. – P. 415-427.
- [380] Vollmer F. *Photochemical mechanisms producing large fluorescence Stokes shifts* / F. Vollmer, W. Rettig, E. Birckner // *J. Fluorescence.* – 1994. – V. 4. – P. 65-69.
- [381] *Twisted intramolecular charge transfer states (TICT). A new class of excited states with a full charge separations* / Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, A. Siemiarczuk [et al.] // *Nouv. J. Chim.* – 1979. – V. 3. – P. 443-453.

- [382] Rettig W. Charge separation in excited states of decoupled systems – TICT compounds and implications regarding the development of new laser dyes and the primary processes of vision and photosynthesis / W. Rettig // *Angew.Chem. Int. Edit. Engl.* – 1986. – V. 25. – P. 971-988.
- [383] Grabowski Z. R. Structural changes accompanying intramolecular electron transfer: focus on Twisted Intramolecular Charge Transfer states and structures / Z. R. Grabowski, K. Rotkiewicz, W. Rettig // *Chem. Revs.* – 2003. – V. 103. – P. 3899-4031.
- [384] Intramolecular charge transfer assisted by conformational changes in the excited state of fluorene-dibenzothiophene-S,S-dioxide co-oligomers / F. B. Dias, S. Pollock, G. Hedley [et al.] // *J. Phys. Chem. B.* – 2006. – V. 110, №.39 – P. 19329-19339.
- [385] Le Gourrierc D. Excited-state intramolecular proton-transfer .2. ESIPT to oxygen / D. Le Gourrierc, S. M. Ormson, R. G. Brown // *Prog.React.Kinet.* – 1994. – V. 19. – P. 221-275.
- [386] Спектрально-люминесцентные свойства и реакция внутримолекулярного фотопереноса протона в молекуле 2-(2'-бензамидофенил)-5-фенил-1,3,4-оксадиазола / Е. А. Посохов, А. О. Дорошенко, В. Т. Скрипкина, В. М. Шершуков // *Вестник Харьк. университета.* – 2000. – № 477. – Химия. Вып. 5(28).- С. 97-101.
- [387] Stewart J. J. P. Semiempirical molecular orbital methods / J. J. P. Stewart //, *Reviews in Computational Chemistry* [eds. Lipkowitz K. B., Boyd D. B.]. – New York: VCH, 1990.
- [388] Luzanov A. V. The structure of the electronic excitation of molecules in quantum-chemical models / A. V. Luzanov // *Russ. Chem. Rev.* – 1980. – V. 49. – P. 1033-1048.
- [389] Wisor A. K. Electronic structure and classification of electronic transitions in some parapyridinophanes / A. K. Wisor, L. Czuchajowski // *J. Phys. Chem.* – 1986. – V. 90. – P. 1541-1547.

- [390] Flavonols and crown-flavonols as metal cation chelators. Different nature of Ba^{2+} and Mg^{2+} complexes / A. D. Roshal, A. V. Grigorovich, A. O. Doroshenko [et al.] // J. Phys. Chem. A. – 1998. – V. 102. – P. 5907-5914.
- [391] General atomic molecular electronic structure system / M. W. Schmidt, K. K. Baldrige, J. A. Boatz [et al.] // J. Comput. Chem. – 1993. – V. 14. – P. 1347–1363.
- [392] Dong D. C. The Py scale of solvent polarities / D. C. Dong, M. A. Winnik // Can. J. Chem. – 1984. – V. 62. – P. 2560-2565.
- [393] Lippert E. Dipolmoment und Elektronstrukturen von angeregten Molekülen / E. Lippert. // Z. Naturforsch. – 1955. – V. 10a. – P. 541-545.
- [394] Mataga N. Electronic Structure and Spectra of Some Nitrogen Heterocycles / N. Mataga, Y. Kaifu, M. Koizumi // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 1956. – V. 29. – P. 456.
- [395] Lees A. J. The Luminescence rigidochromic effect exhibited by organometallic complexes: rationale and applications / A. J. Lees // Comments Inorg.Chem. – 1995. – V. 17. – P. 319-346.
- [396] Kunkely H. Luminescence rigidochromism as a probe for the setting of gypsum plaster / H. Kunkely, A. Vogler // Materials Chemistry and Physics. – 2008. – V. 109. – P. 506-509.
- [397] Spectroscopic characterization of red perylimide/surfactant nanocomposites / F. Castiglione, G. Lanzani, A. Mele [et al.] // J. Mater. Sci. – 2011. – V. 46. – P. 6402-6407.
- [398] Solvatochromic and rigidochromic fluorescent probes based on D– π -A diaryl ethylene and butadiene derivatives for UV-curing monitoring / C. Peinado, E. F. Salvador, F. Catalina, A. E. Lozano // Polymer. – 2001. – V. 42. – P. 2815-2825.
- [399] Itokazu M. K. Luminescent rigidochromism of *fac*-[Re(CO)₃(phen)(*cis*-bpe)]⁺ and its binuclear complex as photosensors / M. K. Itokazu, A. S. Polo, N. Y. Iha // J. Photochem. Photobiol. A: Chem. – 2003. – V. 160. – P. 27-32.

- [400] Krasovitskii B. M. Organic Luminescent Materials / B. M. Krasovitskii, B. M. Bolotin. – Weinheim: VCH, 1988. – 340 p.
- [401] Copper(II) chloride complexes of 2-(4'-methyl-2'-pyridyl)benzoxazole, their sulfur and nitrogen analogs and 2-(4'-methyl-2' {or 8'}-quinolyl)benzoxazoles / M. Massacesi, G. Ponticelli, G. Devoto [et al.] // Trans. Metal Chem. – 1984. – V. 9. – P. 362-366.
- [402] Palladium (II) and platinum (II) chloride and bromide complexes with some 2-methylpyridyl- or methylquinolyl-benzimidazole, benzoxazole, or benzthiazole / G. Coni, M. Massacesi, G. Ponticelli [et al.] // Trans. Metal Chem. – 1987. – V. 12. – P. 379-381.
- [403] Cobalt (II) and nickel (II) chloride complexes with some 2-(4'-methyl-2'-pyridyl and 2'- or 8'-quinolyl)benz-X-azoles / M. Massacesi, R. Pinna, G. Devoto [et al.] // Trans. Metal Chem. – 1984. – V. 9. – P. 351-355.
- [404] Group IIB metal chloride complexes with some 2-(methylpyridyl or -quinolyl)benz-X-azoles / M. Massacesi, M. Biddau, G. Devoto [et al.] // Chim. Acta. – 1984. – V. 82. – P. 27-29.
- [405] Barni E. 2-(Methylpyridyl or quinolyl)benz-X-azoles / E. Barni, P. Savarino // J. Heterocycl. Chem. – 1977. – V. 14. – P. 937-940.
- [406] Effect of the aggregate state on conjugation in the 2-(2'-quinolyl)benzoxazole system / N. A. Klyuev, P. B. Kurapov, G. G. Aleksandrov, I. I. Grandberg // Khim. Geterotsikl. Soed. – 1982. – V. 6. – P. 775-779.
- [407] Spectral properties of 2-(2'-quinolyl)benzoxazole system / P. B. Kurapov, N. Klyuev, I. I. Grandberg, A. K. Sheinkman // Izvest. Timiryaz. Sel'skokhozyaistv. Akadem. – 1981. – V. 1. – P. 155-158.
- [408] Spectral-fluorescent properties of new 5-R-2-(quinolin-2-yl)-and 5-R-2-(quinolin-4-yl)-1,3-benzoxazoles / Y. Posokhov, K. Ocakoglu, G. Gonul [et al.] // Asian Journal of Chemistry. – 2006. – V. 18. – P. 827-839.

- [409] Applied Fluorescence in Chemistry, Biology and Medicine / [eds. Rettig W., Strehmel B., Schrader S., Seifert H.]. – Berlin: Springer-Verlag, 1999. – 562 p.
- [410] Plant Antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata* / M. E. Wall, M. C. Wani, C. E. Cook [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 1966. – V. 88, No. 16. – P. 3888-3890.
- [411] Mechanism of action of camptothecin / L. F. Liu, S. D. Desai, T. K. Li [et al.] // Annals of New York Academy of Sciences. – 2000. – V. 922. – P. 1-10.
- [412] Mi Z. Differential interactions of camptothecin lactone and carboxylate forms with human blood components / Z. Mi, T. G. Burke // Biochemistry. – 1994. – V. 33, No. 34. – P. 10325-10336.
- [413] Burke T. G. Liposomal stabilization of camptothecin's lactone ring / T. G. Burke, A. E. Staubus, A. K. Mishra // J. Am. Chem. Soc. – 1992. – V. 114, No. 21. – P. 8318-8319.
- [414] Posokhov Y. Spectral-luminescent and solvatochromic properties of anticancer drug camptothecin / Y. Posokhov, H. Biner, S. Icli // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2003. – V. 158. – P. 13-20.
- [415] Lippert E. spectroscopische untersuchung der fluorezzenz von nitroverbindungen / E. Lippert // Z. Phys. Chem. (N.F.). – 1954. – V.2, № 5-6. – P. 328-335.
- [416] Экспериментальное определение дипольных моментов в электронновозбужденных состояниях / Н. Г. Бахшиев, М. И. Княжанский, В. И. Минкин [и др.] // Успехи химии. – 1969. – Т. 38, № 9. – С. 1644-1673.
- [417] Бахшиев Н. Г. Спектроскопия межмолекулярных взаимодействий / Н. Г. Бахшиев. – Л.: Наука, 1972. – 263 с.

- [418] Сольватохромия: Проблемы и методы / [под ред. Бахшиева Н.Г.]. – Л.: Изд-во ЛГУ, 1989. – 320 с.
- [419] Onsager L. Electric moments of molecules in liquids / L. Onsager // J. Amer. Chem. Soc. – 1936. – V.58, № 8. – P.1486-1493.
- [420] Mimicry of the radical pair and triplet states in photosynthetic reaction centers with a synthetic model / K. Hasharoni, H. Levanon, S. R. Greenfield [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 1995. – V. 117. – P. 8055-8056.
- [421] Photophysical characterization of a 1,4,5,8-naphthalenediimide derivative / T. C. Barros, S. Brochsztain, V. G. Toscano [et al.] // J. Photochem. Photobiol. A. – 1997. – V. 111. – P. 97-104.
- [422] Meissner D. Photovoltaics of interconnected networks / D. Meissner, J. Rostalski // Syn. Met. 2001. – V. 121. – P. 1551-1552.
- [423] Sato S. Immobilization of a naphthalene diimide-DNA complex on the gold through dithiolane moieties / S. Sato, K. Ohtsuka, S. Takenaka // Nucleic Acid Symposium Series. – 2009. – No. 53. – P. 147-148.
- [424] Synthesis of a naphthalene diimide derivative having four ferrocene moieties as an electrochemical DNA hybridization indicator / S. Sato, M. Tsueda, S. Watanabe [et al.] // Nucleic Acid Symposium Series. – 2008. – No. 52. – P. 239-240.
- [425] Electrochemical telomerase assay with ferrocenylnaphthalene diimide as a tetraplex DNA-specific binder / S. Sato, H. Kondo, T. Nojima, S. Takenaka // Anal. Chem. – 2005. – V. 77. – P. 7304-7309.
- [426] Electrochemical assay for deoxyribonuclease I activity / S. Sato, K. Fujita, M. Kanazawa [et al.] // Anal. Biochem. – 2008. – V. 381. – P. 233-239.
- [427] Photophysical properties and electrochemistry of the N,N'-bis-n-butyl derivative of naphthalene diimide / Y. Posokhov, S. Alp, B. Köz, Y. Dilgin, S. İçli // Turk J. Chem. – 2004. – V. 28. – P. 415-424.

- [428] Photophysical properties of N-alkylnaphthalimides and analogs / T. C. Barros, G. R. Molinari, P. B. Filho [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* - 1993. - V. 76. P. 55-60.
- [429] Turro N.J. *Molecular Photochemistry* / N. J. Turro - London: Benjamin, 1965. - 286 p.
- [430] Green S. Intramolecular photoinduced electron-transfer from nitroxyl radicals / S. Green, A. Fox // *J. Phys. Chem.* - 1995. - V. 99. - P. 14752-14757.
- [431] Spectroscopic properties of aromatic dicarboximides. Part1.—N—H and N-methyl-substituted naphthalimides / V. Wintgens, P. Valat, J. Kossanyi [et al.] // *J.Chem.Soc., Faraday Trans.* - 1994. - V. 90. - 411-421.
- [432] Photoinduced energy–electron transfer studies with naphthalene diimides / S. Alp, S. Erten, C. Karapire [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* - 2000. - V. 135. - P. 103-110.
- [433] Icil H. Synthesis and properties of a new photostable polymer - perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic acid bis-(n,n'-dodecylpolyimide) / H. Icil, S. Icli // *J. Polym. Sci. A: Polym. Chem.* - 1997. - V. 35. - P. 2137-2142.
- [434] Mackinnon S. M. Synthesis and characterization of poly(aryl ether amide)s containing electroactive perylene diimide and naphthalene diimide units / S. M. Mackinnon, Z. Y. Wang // *Journ. Polimer Sci.* - 2000. - V. 38, Iss. 19. - P. 3467-3475.
- [435] Soluble derivatives of perylene and naphthalene diimide for n-channel organic field effect transistors / Th. B. Singh, S. Erten, S. Gunes [et al.] // *Organic Electronics* - 2006. - V. 7, Iss. 6. - P. 480-489.
- [436] Duan R.G. Electrically conducting dendrimers / R. G. Duan, L. L. Miller, D. A. Tomalia // *J. Am. Chem. Soc.* - 1995. - V. 117 - P. 10783-10784.
- [437] Photophysical and photochemical properties of a water-soluble perylene diimide derivative / S. Icli, S. Demic, B. Dindar [et al.] // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* - 2000. - V. 136. - P. 15-24.

- [438] İcli S. High-rates of fluorescence quenching between perylene dodecyldiimide and certain pi-electron donors / S. İcli, H. İcil, I. I. Gurol // Tr. J. Chem. – 1997. – V. 21. – P. 363-368.
- [439] The study of the solubility of naphthalene diimides with various bulky flanking substituents in different solvents by UV/VIS spectroscopy / S. Erten, Y. Posokhov, S. Alp, S. İcli // Dyes & Pigments. – 2005. – V. 64. – P. 171-178.
- [440] UV/VIS spectral properties of naphthalene diimides with bulky substituents / S. Erten, Y. Posokhov, S. Alp, S. İcli // XVII Turkish National Chemical Congress, 8-11 September 2003: Book of abstracts. – Istanbul, Turkey, 2003. – P. 569.
- [441] Asahina Y. Chemistry of Lichen Substances / Y. Asahina, S. Shibata. – Amsterdam: Vaals Asher Ltd, 1971. – 172. p.
- [442] Culberson C. F. Chemical and botanical guide to lichen products / C. F. Culberson. – Chapel Hill: The University of North Carolina Press, 1969. – 628 p.
- [443] Culberson C. F. Lichen substances: methods in plant biochemistry / C. F. Culberson, J. A. Elix. – London: Academic Press, 1989. – Vol 1 – P. 509–535.
- [444] Elix J. A. Venables D.A. 4-O-methylividic acid, a new lichen depsidone / J. A. Elix, D. A. Venables // Mycotaxon. – 1993. – V. 47. – P. 275-281.
- [445] Elix J. A. New dibenzofurans and depsides from the lichen *Bunodophoron patagonicum*/ J. A. Elix, D. A. Venables, M. Wedin // Austral. J. Chem. – 1994. – V. 47. – P. 1335–1344.
- [446] Huneck S. Identification of lichen substances / S. Huneck, I. Yoshimura. – Berlin: Springer, 1996. – 216 p.
- [447] Huneck S. The significance of lichens and their metabolites / S. Huneck // Naturwissenschaften. – 1999. – V. 86. – P. 559–570.

- [448] Boustie J. Lichens - a promising source of bioactive secondary metabolites / J. Boustie, M. Grube // *Plant Genet. Resour.* – 2005. – V. 3. – P. 273-287.
- [449] Antibiotic activity of lichens / P. R. Burkholder, A. W. Evans, I. McVeigh, H. K. Thornton // *Proc Nat Acad Sci USA.* – 1944. – V. 30. – P. 250-255.
- [450] Uncialamycin, a new enediyne antibiotic / J. Davies, H. Wang, T. Taylor [et al.] // *Org. Lett.* – 2005. – V. 7. – P. 5233-5236.
- [451] Yamamoto Y. Screening of biological activities and isolation of biological-active compounds from lichens / Y. Yamamoto // *Chemical regulation of plants.* – 2000. – V. 35. – P. 169-179.
- [452] Ranković B. Antimicrobial activity of extracts of the lichens *Cladonia furcata*, *Parmelia caperata*, *Parmelia pertusa*, *Hypogymnia physodes* and *Umbilicaria polyphylla* / B. Ranković, M. Misić, S. Sukdolak // *Br. J. Biomed. Sci.* – 2007. – V. 64. – P. 143-148.
- [453] Ranković B. Evaluation of antimicrobial activity of the lichens *Lasallia pustulata*, *Parmelia sulcata*, *Umbilicaria crustulosa*, and *Umbilicaria cylindrical* / B. Ranković, M. Misić, S. Sukdolak // *Mikrobiologija* (Engl. trans.). – 2007. – V. 76. – P. 723-727.
- [454] Rawlings B. J. Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides) / B. J. Rawlings // *Nat. Prod. Rep.* – 1999. – V. 16. – P. 425-484.
- [455] Reddy V. M. Antimycobacterial activities of riminophenazines / V. M. Reddy, J. F. O'Sullivan, P. R. Gangadharam // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1999. – V. 43. – P. 615-623.
- [456] Metabolites of *Pseudevernia furfuracea* (L.) Zopf. and their inhibition potential of proteolytic enzymes / B. Proksa, J. Adamcova, M. Sturdikova, J. Fуска // *Pharmazie.* – 1994. – V. 49. – P. 282-283.
- [457] Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina* / N. T. Manojlovic, S. Solujic, S. Sukdolak, M. Milosev // *Fitoterapia.* – 2005. – V. 76. – P. 244-246.

- [458] Moxham T. H. Lichens in the perfume industry / T. H. Moxham // *Dragoco Rep.* – 1981. – V. 2. – P. 31-39.
- [459] Moxham T. H. The Commercial Exploitation of Lichens for Perfume Industry / T. H. Moxham // *Progress in Essential Oil Research* [ed. Gruyter W. D.]. – Berlin, 1986. – P. 491-503.
- [460] Speta F. Flechten als Nutzpflanzen / F. Speta F. // *Flechten bedrohte Wunder der Natur* [ed. Seipel W.]. – Linz: Landesverlag, 1986. – V. 5. – P. 27-42.
- [461] Muller K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens / K. Muller // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – V. 56. – P. 9-16.
- [462] Bergter E. B. Chemical structure immunology and application of polysaccharides of fungi and lichens / E. B. Bergter // *Studies in Natural Products Chemistry, Structure Elucidation Part B* [ed. Rahman A.]. – London: Elsevier, 1987. – V. 5. – P. 275-340.
- [463] Lipid compositions of some lichens / V. M. Dembitsky, T. Rezanka, I. A. Bychek, M. V. Shustov // *Phytochemistry*. – 1992. – Vol. 31. – P. 1617-1620.
- [464] Fatty acid compositions of *Parmelia* lichens / V. M. Dembitsky, T. Rezanka, I. A. Bychek, M. V. Shustov // *Phytochemistry*. – 1992. – Vol. 31. – P. 841-843.
- [465] Isolation and culture of lichen photobionts and mycobionts/ I. Yoshimura, Y. Yamamoto, T. Nakano, J. Finnie // *Protocols in Lichenology. Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring* [eds. Kranner I., Beckett R. P., Varma A. K.]. – Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2002. – P. 3-33.
- [466] Sarker S. D. Natural products isolation / S. D. Sarker, Z. Latif, A. I. Gray – New Jersey, Totowa: Humana Press, 2006. – 515 p.
- [467] Spectroscopic and structural characterization of copper(II) and palladium(II) complexes of a lichen substance usnic acid and its derivatives: possible forms of environmental metals retained in lichens / M. Takani, T. Yajima,

- H. Masuda, O. Yamauchi // *Journal of Inorganic Biochemistry*. – 2002. – V. 91. – P. 139–150.
- [468] Isolation and structure elucidation of novel natural products from turkish lichens / S. Kırmızıgül, O. Koz, H. Anıl [et al.] // *Turk. J. Chem.* – 2003. – V. 27. – P. 493-500.
- [469] UV/VIS spectral properties of novel natural products from turkish lichens / Y. Posokhov, S. Erten, O. Koz [et al.] // *International Journal of Photoenergy*. – 2005. – V. 7, No. 1. – P. 27-35.
- [470] *UV/VIS Atlas of Organic Compounds* / [ed. Ebel H.] – Weinheim: VCH, 1992. – 804 p.
- [471] *UV-VIS atlas of organic compounds* / [ed. Perkampus H. H.]. – 2nd ed. – Weinheim, N.Y.: VCH., 1992. – 1525 p.
- [472] Novel sulfonate derivatives: potent antimitotic agents / S. L. Gwaltney, H. M. Imade, Q. Li [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2001. – V. 11, No. 13. – P. 1671-1673.
- [473] Synthesis and analgesic effect of 2-aryliminomethylquinolines / V. Hagen, B. Dove, E. Morgenstern [et al.] // *Pharmazie*. – 1983. – V. 38, No. 7. – P. 437-439.
- [474] Spectral properties and complex formation with Cu^{2+} ions of 2- and 4-(N-arylimino)-quinolines / Y. Posokhov, M. Kuş, H. Biner [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2004. – V. 161. – P. 247-254.
- [475] Differently substituted 2- and 4-(N-arylimino)-quinolines: spectral-fluorescent properties and complex formation with Cu^{2+} ions / M. Kus, K. Ocakoglu, Y. Posokhov [et al.] // *XVII Turkish National Chemical Congress, 8-11 September 2003: Book of abstracts*. – Istanbul, Turkey, 2003. – P. 84.
- [476] Spectrophotometric determination of Cu^{2+} with quinolinyl derivative in organic and aqueous solutions / N. Avcibasi, Y. Posokhov, K. Ocakoglu [et al.] // *Asian Journal of Chemistry*. – 2007. – V. 19. – P. 1930-1942.

- [477] Connors K. A. Binding constants. The measurement of molecular complex stability / K. A. Connors. – N.Y.: John Wiley & Sons, 1987. – 320 p.
- [478] Grogan G. Emergent mechanistic diversity of enzyme-catalysed β -diketone cleavage / G. Grogan // Biochem. J. – 2005. – V. 388. – P. 721–730.
- [479] Antiviral activity of some β -diketones. 4. Benzyl diketones. In vitro activity against both RNA and DNA viruses / G. D. Diana, P. M. Carabateas, R. E. Johnson [et al.] // J. Med. Chem. – 1978. – V. 21. – P. 889–894.
- [480] Pokorny D. β -Ketolases – forgotten hydrolytic enzymes? / D. Pokor, W. Steiner, D. W. Ribbons // Trends Biotechnol. – 1997. – V. 15. – P. 291–296.
- [481] Grogan G. β -Diketone hydrolases / G. Grogan // J. Mol. Catal. B Enzym. – 2002. – V. 19. – P. 73–82.
- [482] Protective activities of some phenolic 1,3-diketones against lipid peroxidation: possible involvement of the 1,3-diketone moiety / B. S. Patro, S. Rele, G. J. Chintalwar [et al.] // ChemBioChem. – 2002. – V. 3. – P. 364–370.
- [483] Cox M. Metal complexes of thio- β -diketones / M. Cox, J. Darken // Coord. Chem. Rev. – 1971. – V. 7. – P. 29–58.
- [484] Livingstone S. Monothio- β -diketones and their metal complexes / S. Livingstone // Coord. Chem. Rev. – 1971. – V. 7. – P. 59–80.
- [485] Duus F. .beta.-Thioxo ketones. Part 12. The enol-enethiol tautomerism of simple nonaromatic .beta.-thioxo ketones. An approach to quantitative description based upon proton NMR and UV spectral parameters and the adaptation of these into a simplified model of the tautomeric equilibrium / F. Duus // J. Am. Chem. Soc. – 1986. – V. 108. – P. 630–638.
- [486] Carlsen L. Conjugative effects on the enol-enethiol tautomerism of .beta.-thioxoketones / L. Carlsen, F. Duus // J. Am. Chem. Soc. – 1978. – V. 100. – P. 281–282.

- [487] Carlsen L. β -Thioxoketones. Part 6. Electronic absorption spectra of aromatic β -Thioxoketones. A study of enol-enethiol tautomerism / L. Carlsen, F. Duus // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. – 1980. – P. 1768-1773.
- [488] Gebicki J. Structural aspects and low-temperature photochemistry of the monothioacetylacetone system / J. Gebicki, A. Krantz // J. Am. Chem. Soc. – 1981. – V. 103. – P. 4521-4526.
- [489] Gebicki J. Structure and photochemistry of matrix-isolated monothioacetylacetone / J. Gebicki, A. Krantz // J. Chem. Soc., Chem. Commun. – 1981. – P. 486-488.
- [490] Ultrafast photoinduced dissipative hydrogen switching dynamics in thioacetylacetone / N. Doslic, K. Sundermann, L. Gonzalez [et al.] // Phys. Chem. Chem. Phys. – 1999. – V. 1. – P. 1249-1257.
- [491] Gonzalez L. Substituent effects on the strenght of the intramolecular hydrogen bond of thiomalonaldehyde / L. Gonzalez, O. Mo, M. Yanez // J. Org. Chem. – 1999. – V. 64. – P. 2314-2321.
- [492] Carlsen L. β -Thioxo-ketones. Part 5. Photo-induced enol–enethiol interconversion of β -thioxo-ketones / L. Carlsen, F. Duus // J. Chem. Soc., Perkin Trans. II. – 1979. – No. 11. – P. 1532-1534.
- [493] Noe E. Dynamic nuclear magnetic resonance spectroscopy. Carbon-sulfur p- π -bonding and conformational equilibria in thioacetic acid / E. Noe // J. Am. Chem. Soc. – 1977. – V. 99. – P. 7400.
- [494] Thioacetylacetone: structural and vibrational assignments / Y. Posokhov, A. Gorsky, J. Spanget-Larsen [et al.] // Chem. Phys. Chem. – 2004. – V. 5. – P. 495-502.
- [495] Photoorientation of β -thiooxoketones in rare gas matrices / A. Gorsky, Y. Posokhov, J. Spanget-Larsen [et al.] // XIX IUPAC Symposium on Photochemistry, 14-19 July 2002: Book of Abstracts. – Budapest, Hungary, 2002. – P. 232.

- [496] Photochromism of β -thioxoketones: Linear dichroism in rare gas matrices, first step in understanding the mechanism of photoreaction / A. Gorski, Y. Posokhov, J. Spanget-Larsen [et al.] // Photoinduced Charge (Electron and Proton) Migration, Workshop, 30 May – 6 June 2004: Book of abstracts. – Wdzydze, Poland, 2004. – P.72.
- [497] Photochromism in p-methylbenzoylthioacetone and related β -thioxoketones / A. Gorski, Y. Posokhov, B. K. V. Hansen [et al.] // Chemical Physics. – 2007. – V. 338. – P. 11-22.
- [498] Photochromism and polarization spectroscopy of p-methyl(thiobenzoyl)acetone / A. Gorski, Y. Posokhov, B. K. V. Hansen [et al.] // Chemical Physics. – 2006. – V. 328. – P. 205-215.
- [499] The structure of the phototransformation product of monothiodibenzoylmethane / Y. Posokhov, A. Gorski, J. Spanget-Larsen [et al.] // Chem. Phys. Lett. – 2001. – V. 350. – P. 502-508.
- [500] Monothiodibenzoylmethane: structural and vibrational assignments / B. K. V. Hansen, A. Gorski, Y. Posokhov [et al.] // Vibrational Spectroscopy. – 2007. – V. 43. – P. 53–63.
- [501] Photochromism, photoorientation and linear dichroism of β -thioxoketones in rare gas matrices / A. Gorski, Y. Posokhov, J. Spanget-Larsen [et al.] // XXVII European Congress on Molecular Spectroscopy, 5-10 September 2004: Book of abstracts – Krakow, Poland, 2004. – P. 173.
- [502] Photoorientation and depolarization: two complementary ways of studying molecular structure and dynamics / A. Gorski, Y. Posokhov, F. Duus [et al.] // Novel Experimental Techniques and Instrumentation: workshop, 5-11 June 2005: Book of abstracts. – Lesko, Poland, 2005. – P. 5.
- [503] Radziszewski J. G. Fourier-transform infrared linear dichroism. Stretched polyethylene as a solvent in IR spectroscopy / J. G. Radziszewski, J. Michl // J. Am. Chem. Soc. – 1986. – V. 108. – P. 3289-3297.

- [504] Michl J. Ultraviolet and infrared linear dichroism: polarized light as a probe of molecular and electronic structure / J. Michl, E. W. Thulstrup // *Acc. Chem. Res.* – 1987. – V. 20. – P. 192-199.
- [505] Radziszewski J.G., Burkhalter F.A., Michl J. Nondestructive photoorientation by generalized pseudorotation: a quantitative treatment // *J. Am. Chem. Soc.* – 1987. – V. 109. – P. 61-65.
- [506] Radziszewski J.G., Waluk J., Michl J. Site-population conserving and site-population altering photo-orientation of matrix-isolated free-base porphine by double proton transfer: IR dichroism and vibrational symmetry assignments // *J. Am. Chem. Soc.* – 1989. – V. 136. – P. 165-180.
- [507] Michl J. Spectroscopy with polarized light, in: solute alignment by photoselection, in liquid crystals, polymers, and membranes / J. Michl, E. W. Thulstrup. – N.Y.: VCH Publishers, 1986. – 573 p.
- [508] Thulstrup E. W. Elementary Polarization Spectroscopy / E. W. Thulstrup, J. Michl – N.Y.: VCH Publishers, 1989. – 176 p.
- [509] Samori B. Polarized Spectroscopy of Ordered Systems / B. Samori, E. W. Thulstrup – Dordrecht: Kluwer, 1988. – 578 p.
- [510] Ultraviolet-visible and infrared linear dichroism spectroscopy of 1,8-dihydroxy-9,10-anthraquinone aligned in stretched polyethylene / F. Madsen, I. Terpager, K. Olskar, J. Spanget-Larsen // *Chem. Phys.* – 1992. – V. 165. – P. 351-360
- [511] Photoisomerization of the enol form of 1,3-dicarbonyl compounds / D. Vairov, T. Bercovici, E. Fisher [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1977. – V. 99. – P. 2723-2729.

Приложение А

Копии актов внедрения

ДУ” ІНСТИТУТ НЕВРОЛОГІЇ, ПСИХІАТРІЇ ТА
НАРКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ”

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор ДУ “Інститут
неврології, психіатрії
та наркології
НАМН України”
Д.М.Н. проф. Волошин П.В.



Акт про використання

Об'єкта права інтелектуальної власності

14 травня 2013р.

1. Назва й номер охоронного документа:

Патент 66256 Україна, МПК G01N 1/28 (2006.01), G01N 33/52 (2006.01).

2. Назва об'єкта права інтелектуальної власності (винаходу, корисної моделі, промислового зразка, раціоналізаторської пропозиції): Спосіб визначення мембранотропної активності летких органічних сполук: Пат. 66256 Україна. МПК G01N 1/28 (2006.01), G01N 33/52 (2006.01) / Посохов Є.О. (Україна); заявник і власник патенту Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. – №U201107786; Заявл. 20.06.2011; Опубл. 26.12.2011, Бюл. №24.

3. Дата початку використання:

1 лютого 2012 р.

4. Де використано винахід (назва закладу, відділу, НДР): Лабораторія нейрофізіології імунології та біохімії ДУ “Інститут неврології, психіатрії та наркології НАМН України”

5. Форма впровадження: метод дослідження

6. Результати впровадження: з'ясування механізму дії летких органічних сполук на біологічні клітини

7. Зауваження, пропозиції: не має

Особа, відповідальна за

Впровадження

д.б.н., проф. Воробйова Т.М.

Воробйова
(підпис)

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Завідуючий кафедрою фізіології
 людини і тварин
 Харківського національного
 університету імені В.Н. Каразіна
 Бондаренко В.А.
 « 25 » квітня 2013 р.



А К Т ПРО ВИКОРИСТАННЯ ВИНАХОДУ

СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕМБРАНОТРОПНОЇ АКТИВНОСТІ КРІОПРОТЕКТОРА

АВТОРИ: Посохов Є. О., Корнієнко Є.М.

Ми, які нижче підписали, комісія у складі: професор. д.б.н. Бондаренко В.А., доц. к.б.н., Наглов О.В., доц. к.б.н. Мартиненко В.В.

склали, цей акт про те, що на базі кафедри фізіології людини і тварин Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна

з „ 1 ” вересня 2012 і по нині використовується винахід „Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротектора”

з затвердженою формулою винаходу:

Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротекторів, що включає введення у досліджувані мембрани флуоресцентних зондів, реєстрацію спектрів їх флуоресценції та математичну обробку одержаних спектральних даних. У мембрани, які піддавали дії кріопротектора, вводять набір флуоресцентних зондів, складених із зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран, а математична обробка спектральних даних полягає в тому, що за даними спектрів визначають інтенсивності флуоресценції зондів.

СПОЖИВЧІ ВЛАСТИВОСТІ

Винахід використовується для наукових досліджень з визначення впливу кріопротекторів на стан ліпідного бішару штучних або природних (клітинних) мембран при вирішенні біологічних, кріобіологічних і медичних завдань.

Використання набору флуоресцентних зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран для визначення змін фізико-хімічних властивостей мембран під дією кріопротекторів дозволяє: здійснювати моніторинг змін у всіх

областях ліпідного бішару мембран, точніше встановити локалізацію змін у ліпідному бішарі мембран, підвищити достовірність визначення змін в мембранах за рахунок зіставлення даних для зондів із різною локалізацією у ліпідному бішарі мембран.

Даний спосіб було вперше використано в НДІ хімії Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна.

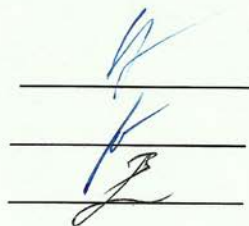
Дійсний акт не є основою для фінансових претензій з боку розробників способу.

ЧЛЕНИ КОМІСІЇ:

професор. д.б.н. Бондаренко ВА.

доц. к.б.н., Наглов О.В.

доц. к.б.н. Мартиненко В.В.



«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Завідуючий кафедрою біохімії
Харківського національного
університету імені В.Н. Каразіна

Перський Є.Е.

« 25 » квітня 2013 р.



А К Т ПРО ВИКОРИСТАННЯ ВИНАХОДУ

СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕМБРАНОТРОПНОЇ АКТИВНОСТІ КРІОПРОТЕКТОРА

АВТОРИ: Посохов Є. О., Корнієнко Є.М.

Ми, які нижче підписали, комісія у складі професор. д.б.н., Перський Є.Е., доц., к.б.н., Буланкіна Н.І., доц., Яковенко М.Г., ст. наук. співробітник, к.б.н., Кот. Ю.Г.

склали цей акт про те, що на базі кафедри біохімії Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна

з „_1_” вересня 2012 і по нині використовується винахід „Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротектора”

з затвердженою формулою винаходу:

Спосіб визначення мембранотропної активності кріопротекторів, що включає введення у досліджувані мембрани флуоресцентних зондів, реєстрацію спектрів їх флуоресценції та математичну обробку одержаних спектральних даних. У мембрани, які піддавали дії кріопротектора, вводять набір флуоресцентних зондів, складених із зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран, а математична обробка спектральних даних полягає в тому, що за даними спектрів визначають інтенсивності флуоресценції зондів.

СПОЖИВЧІ ВЛАСТИВОСТІ

Винахід використовується для наукових досліджень з визначення впливу кріопротекторів на стан ліпідного бішару штучних або природних (клітинних) мембран при вирішенні біологічних, кріобіологічних і медичних завдань.

Використання набору флуоресцентних зондів з різною локалізацією в ліпідному бішарі мембран для визначення змін фізико-хімічних властивостей мембран під дією кріопротекторів дозволяє: здійснювати моніторинг змін у всіх

областях ліпідного бішару мембран, точніше встановити локалізацію змін у ліпідному бішарі мембран, підвищити достовірність визначення змін в мембранах за рахунок зіставлення даних для зондів із різною локалізацією у ліпідному бішарі мембран.

Даний спосіб було вперше використано в НДІ хімії Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна.

Дійсний акт не є основою для фінансових претензій з боку розробників способу.

ЧЛЕНИ КОМІСІЇ:

д.б.н., професор. Перський Є.Е.

к.б.н., доц. Буланкіна Н.І.

к.б.н., доц. Яковенко М.Г.

ст. наук. співробітник, к.б.н. Кот. Ю.Г.

Four handwritten signatures are written on four horizontal lines. The signatures are in blue ink and appear to be cursive or stylized. The first signature is at the top, followed by three more below it.

АКТ впровадження результатів науково-дослідної роботи

Даним актом підтверджується, що винахід «Спосіб визначення впливу магнітного або електромагнітного поля на біологічні мембрани» автори: Посохов Є.О., Пасюга В.М., Шкорбатов Ю.Г., Колчигін М.М., на який отримано патент України (корисна модель), №76399 от 10.01.2013, патент опубліковано: «Промислова власність» (офіційний бюлетень) 2013, №1.

впроваджено у Харківському національному університеті імені В.Н. Каразіна, у відділі генетики НДІ біології, при виконанні держбюджетної теми «Дослідження особливостей адаптивної відповіді на електромагнітні поля та інші стресові навантаження на рівні клітини» № держреєстрації 0112U008335, науковим керівником теми є Шкорбатов Юрій Георгійович
(назва організації де здійснюється впровадження)

Термін впровадження 06 лютий – травень 2013 року
(рік, місяць)

Форма впроваджених результатів: застосування показнику стану мембран клітин букального епітелію та еритроцитів людини для визначення впливу електромагнітних полів на клітини людини

Характеристика масштабу впровадження партія

(унікальне, одиночне, партія, масове, серійне)

Новизна впроваджених результатів нове

(нове, модифікація, модернізація, модернізація старих розробок)

Ефективність впровадження:

З соціальним, економічним і науково-технічним ефектом - з соціальним і науково-технічним ефектом



В.О. першого проректора з наукової роботи
Харківського національного університету
імені В.Н. Каразіна
доктор фіз.-мат. наук, професор

Катрич В.О.

(підпис)

Керівник НДР
доктор біол. наук
Шкорбатов Ю.Г.

(підпис)