

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
НАУКИ КАЗАНСКИЙ ФИЗИКО-ТЕХНИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ им. Е.К.  
ЗАВОЙСКОГО КАЗАНСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК

*На правах рукописи*

Конов Константин Борисович

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

01.04.11 – физика магнитных явлений

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
доктор физико-математических наук,  
профессор С.А. Дзюба

Казань – 2016

# Содержание

<b>Введение</b>	5
<b>Глава 1. Литературный обзор</b>	12
1.1 Роль воды в поддержании структуры биологических систем	12
1.2 Различные факторы повреждения биологических клеток при замораживании	17
1.3 Механизмы действия криопротекторов	20
1.4 Структура биомембран	24
1.5 Фазовые состояния липидных мембран	28
1.6 Особенности подвижности молекул в неупорядоченных средах	30
1.7 Исследование подвижности липидных мембран	32
<b>Глава 2. Методы стационарного и импульсного ЭПР</b>	37
2.1 Метод спиновых зондов, метод спиновых меток и их применение к исследованию структуры и динамики биомембран	37
2.2 Влияние быстрого молекулярного движения на форму линии стационарного спектра ЭПР	40
2.3 Влияние быстрого молекулярного движения на форму линии эходетектированного спектра ЭПР	48
2.4 Метод модуляции огибающей амплитуды электронного спинового эха	51
<b>Глава 3. Исследование профиля проникновения глицерина внутрь модельной липидной мембраны</b>	57
3.1 Исследуемые образцы	59
3.2 Экспериментальные результаты	63
3.2.1 Спектры частот модуляций огибающей ЭСЭ	63
3.2.2 Градуировка методики	65
3.2.3 Локализация спиновых меток	66
3.3 Обсуждение результатов	69

3.4 Выводы по главе 3	72
<b>Глава 4. Взаимодействие молекул сахарозы и трегалозы с модельной липидной мембраной</b>	<b>73</b>
4.1 Исследуемые образцы	77
4.2 Экспериментальные результаты	78
4.2.1 Градуировка методики	78
4.2.2 Определение локальной концентрации дисахаридов около поверхности липидной мембраны	82
4.2.3 Профиль проникновения сахарозы и трегалозы	86
4.2.4 Локализация спиновых меток	90
4.3 Обсуждение результатов	92
4.3.1 Локальная концентрация сахарозы и трегалозы около поверхности липидной мембраны	92
4.3.2 Профили проникновения сахарозы и трегалозы внутрь клеточной мембраны	93
4.4 Выводы по главе 4	94
<b>Глава 5. Исследование влияния глицерина на подвижность модельной липидной мембраны</b>	<b>95</b>
5.1 Исследуемые образцы	96
5.2 Используемые экспериментальные методики	97
5.2.1 Анализ стационарных спектров ЭПР	97
5.2.2 Вклад анизотропной релаксации в спад сигнала спинового эха	98
5.3 Экспериментальные результаты	100
5.3.1 Стационарные ЭПР спектры	100
5.3.2 Скорость анизотропной релаксации в образцах с глицерином	102
5.4 Обсуждение результатов	103
5.5 Выводы по главе 5	105
<b>Глава 6. Исследование влияния трегалозы, сахарозы и сорбита на подвижность модельной липидной мембраны</b>	<b>106</b>

6.1 Исследуемые образцы	107
6.2 Экспериментальные результаты	109
6.2.1 Анализ стационарных спектров ЭПР	109
6.2.2 Анализ спадов сигнала ЭСЭ	110
6.3 Обсуждение результатов	113
6.4 Выводы по главе 6	116
<b>Заключение</b>	117
<b>Благодарности</b>	119
<b>Список цитируемой литературы</b>	120
<b>Список авторских публикаций по теме диссертации</b>	136

## Введение

### Актуальность работы

Существует множество живых организмов, способных пережить воздействие низких температур и дегидратации. При восстановлении благоприятных условий жизнедеятельность таких организмов полностью восстанавливается. Причиной такой живучести является способность некоторых растений и животных накапливать в своем организме специальные вещества, которые принято называть криопротекторами.

Некоторые беспозвоночные (например, насекомые и морские моллюски) и позвоночные (например, земноводные и рептилии) выживают даже при частичной кристаллизации воды в их телах. Среди них наиболее известны земноводные *Rana sylvatica*, *Hyla versicolor*, *Pseudacris crucifer*, *Salamander keyserlingi*, *Lacerta vivipara* и т.д. Некоторые животные выживают при замерзании до 70% всей воды в их теле [Layne, 1992], даже если при этом замерзает внутриклеточная жидкость. Таким свойством, например, обладают виды *Panagrolaimus davidi* [Wharton, 1995], *Crassostrea gigas* [Salinas-Flores, 2008]. Известны некоторые виды насекомых, которые способны пережить охлаждение до  $-80^{\circ}\text{C}$  [Brown, 2004, Miller, 1982], некоторые деревья до  $-50^{\circ}\text{C}$  [Breton, 2000] и  $-192^{\circ}\text{C}$  [Sakai, 1960], некоторые беспозвоночные и семена некоторых растений способны выживать при температурах вплоть до  $-269^{\circ}\text{C}$ .

Наиболее хорошо изученным представителем животного мира, способным выживать при температурах ниже  $0^{\circ}\text{C}$  в течении нескольких месяцев, является древесная лягушка (*Rana sylvatica*). При этом процессы ее жизнедеятельности полностью останавливаются, а сама лягушка покрывается слоем льда. В качестве криопротекторов организм древесной лягушки синтезирует глюкозу и специальные белки, которые препятствуют образованию льда. Известно еще несколько позвоночных видов, которые могут выживать при температурах незначительно ниже точки замерзания воды. Как правило, такие животные могут находиться при низких температурах от нескольких часов до нескольких недель.

Продолжительное время, проведенное при температурах значительно ниже нуля, приводят к гибели животного. Некоторые беспозвоночные способны выживать при очень низких температурах. Например, вид *Cuscuta clavipes* способен выживать при температурах до  $-150^{\circ}\text{C}$  благодаря способности накапливать в своем организме глицерин и белки-антифризы.

Гибель организма при переохлаждении, как правило, происходит из-за денатурации белков и/или разрушении структуры мембраны клетки. Существует несколько факторов, влияющих на разрушение клеточной мембраны. Известно, что структурная организация и функционирование биологических мембран возможны только в присутствии воды в непосредственной близости от поверхности мембраны. Дегидратация (высушивание) или замораживание часто приводит к изменению свойств и разрушению клеточной мембраны и денатурации белков, что гарантированно приводит к гибели клетки. Образование кристаллов льда в межклеточной или внутриклеточной жидкости также является одним из основных факторов гибели клетки.

Для адаптации к низким температурам в природе используются две основных стратегии — блокирование замерзания воды и блокирование роста больших кристаллов льда внутри организма [Brown, 2004]. Эти две стратегии реализуются за счет накопления в организмах белков-антифризов, различных веществ, выступающих в роли центров кристаллизации воды, многоатомных спиртов, сахаридов.

Один из механизмов защиты — блокирование замерзания воды — заключается в понижении температуры кристаллизации воды на несколько градусов. Для этого в организме накапливаются специальные белки-антифризы, которые блокируют рост кристаллов льда. Организмы, которые пользуются этим методом защиты, не выживают, если замерзание воды внутри организма все-таки происходит. Примером таких организмов могут служить полярные морские рыбы.

Другая стратегия — блокирование роста больших кристаллов льда — основана либо на принудительной кристаллизации воды при температурах близких к 0 °С, либо на процессе стеклования внутриклеточных и межклеточных жидкостей. Принудительная кристаллизация достигается с помощью специальных инициирующих кристаллизацию агентов, которые запускают процесс образования множества кристаллов льда. При этом не допускается рост больших кристаллов льда и, таким образом, тканям наносится минимальный ущерб. В идеальном случае кристаллизации воды не происходит вообще, а межклеточная и внутриклеточная жидкости переходят в стеклообразное состояние.

Помимо вышеописанных механизмов существуют гипотезы, объясняющие криозащитную активность некоторых веществ специфическим взаимодействием с клеточными структурами. Криопротекторы по механизму их взаимодействия с клеточной мембраной можно условно разделить на два класса: проникающие и непроникающие криопротекторы. К проникающим относятся пропиленгликоль, этиленгликоль, диметилсульфоксид, глицерин, сорбит. К непроникающим относятся сахароза, трегалоза и белки-антифризы.

Считается, что механизм действия проникающих криопротекторов заключается в образовании водородных связей с молекулами воды, что блокирует ее кристаллизацию. Стеклование межклеточной и внутриклеточной жидкостей является основным способом действия проникающих криопротекторов. Для проникающих криопротекторов важным моментом является вопрос о способе проникновения молекулы криопротектора внутрь клетки.

Механизм действия непроникающих криопротекторов до конца не изучен, однако, существует несколько гипотез. Наибольшее распространение получила гипотеза замещения воды, согласно которой непроникающие криопротекторы вытесняют воду из непосредственной близости липидного бислоя. Образуя водородные связи с полярными липидными головками и, предположительно,

встраиваясь между молекулами липидов, молекулы криопротектора способны сохранять структурную организацию липидного бислоя. Это препятствует разрушению клетки при низких температурах и обезвоживании.

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

### **Цель и задачи работы**

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

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

## **Научная новизна**

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

## **Научная и практическая значимость работы**

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

## **Положения, выносимые на защиту**

На защиту выносятся следующие положения:

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

## **Достоверность полученных результатов**

Достоверность результатов работы обеспечена использованием современного научного оборудования и новых экспериментальных методик,

воспроизводимостью данных, сопоставлением результатов с существующими теоретическими моделями.

### **Личный вклад автора**

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

### **Апробация работы**

Результаты работы были представлены на следующих научных конференциях:

1. XVI международная молодежная научная школа “Actual problems of magnetic resonance and its application” (Казань, 2013)
2. III школа для молодых ученых "Магнитный резонанс и магнитные явления в химической и биологической физике" (Новосибирск, 2014)
3. Международная конференция “Modern development of magnetic resonance” (Казань, 2014)
4. XVII международная молодежная научная школа “Actual problems of magnetic resonance and its application” (Казань, 2014)
5. Российская конференция “Структура и динамика молекулярных систем” (Яльчик, Республика Марий-Эл, 2014).
6. Международная конференция “Spin physics, spin chemistry and spin technology” (Санкт-Петербург, 2015)
7. Международная конференция “Modern development of magnetic resonance” (Казань, 2015)

### **Публикации**

Основные результаты диссертационной работы изложены в 4-х научных статьях [A1-A4], опубликованных в рецензируемых журналах, рекомендованных

ВАК и в 7-ми тезисах докладов международных и российских конференций [А5-А11].

### **Структура и объем диссертации**

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

## Глава 1. Литературный обзор

### 1.1 Роль воды в поддержании структуры биологических систем

Часть воды в тканях живых организмов находится в связанном с клеточными структурами состоянии. Молекулы воды могут находиться как на поверхности биологических объектов, связываясь с гидрофильной частью клеточных структур, так и внутри на некоторой глубине внутри гидрофобной области. При этом молекулы воды поддерживают структуру биологических объектов и, таким образом, обеспечивают возможность их функционирования.

Взаимодействие молекул воды с поверхностью белков и биомембран изучали методами молекулярной динамики [Pandit, 2003, Senapati, 2003]. Было установлено, что вода способна проникать внутрь липидной мембраны до остатка глицерина молекулы липида. Важным параметром, описывающим взаимодействие молекул воды с биологическими структурами, является параметр упорядочения

$$S = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle, \quad (1.1)$$

где  $\theta$  — угол между водородной связью и нормалью к поверхности мембраны. В свободной воде параметр  $S$  усредняется до 0 из-за равномерного распределения всех возможных ориентаций, а области где параметр отличен от нуля содержат связанную с поверхностью белков воду, структурированную определенным образом и образующую сольватную оболочку вокруг молекулы липида. Известно, что слой воды вблизи мембраны сильно поляризован, а молекулы воды выстраиваются так, что атомы водорода ориентированы внутрь мембраны [Jedlovszky, 2001]. Созданный в результате ориентации молекул воды дипольный потенциал во многом влияет на процесс пассивного прохождения ионов сквозь мембрану [Hladky, 1973].

Согласно данным исследования, в котором применялся метод титрования, на одну молекулу фосфолипида ДМФХ (димиристоилфосфатидилхолин),

который часто используют для создания модельных клеточных мембран, приходится 14 связанных молекул воды [Luzardo, 2000]. Согласно другому исследованию, на одну молекулу фосфолипида дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) при нахождении мембраны в жидкокристаллической фазе приходится 25 молекул воды [Ruocco, 1982]. Из анализа уширения линии спектра  $^2\text{H}$  ЯМР было определено, что связанная с мембраной вода не замерзает при температурах ниже  $0^\circ\text{C}$ , для некоторых фосфолипидов вплоть до  $-70^\circ\text{C}$  [Hsieh, 1995]. Кроме того, коэффициент диффузии для связанных с мембраной молекул воды на порядок меньше, чем для молекул из свободного объема воды [Volke, 1994].

Методом ЯМР и молекулярной динамики была проанализирована динамика молекул воды вблизи поверхности мембраны, были обнаружены быстрые пикосекундные случайные пространственные реориентации и медленные реориентации, которые были отнесены к обмену связанных и свободных молекул воды и их латеральной диффузии вдоль мембраны [Aman, 2003].

Также методом молекулярной динамики были исследованы динамические свойства сольватной оболочки белков [Bizzarri, 2002]. Известно, что конформация белка во многом определяется количеством водородных связей, которые образуются с молекулами воды, и для поддержания структуры белков необходимо около 0.4 грамм воды на каждый грамм белка.

Значительное замедление подвижности молекул воды у поверхности обратных мицелл (структура сферической формы, формирующаяся в неполярной жидкости и состоящая из фосфолипидов, организованных в монослой углеродными цепочками наружу) было обнаружено методами флуоресцентной спектроскопии [Zhang, 1991] и спектроскопии ядерного магнитного резонанса [Fukuzaki, 1995].

Белки и липиды содержат несколько типов полярных групп, с которыми возможно образование водородных связей. В случае карбонильной (-CO), карбоксильной (-COOH) и гидроксильной (-OH) группы образование водородной связи происходит путем отдачи протона молекулой воды. Водородная связь также может образовываться с аминной (-NH<sub>2</sub>) и амидными (-CONH<sub>2</sub>) группами путем отдачи протона молекуле воды. Также известна способность молекулы воды взаимодействовать сразу с двумя белками и таким образом обеспечивать косвенное взаимодействие между ними, образуя «водный мостик». Методом молекулярной динамики был подсчитан вклад водородной связи в энергию сольватации для -NH, -NH<sub>2</sub>, -OH, заряженных -NH<sub>2</sub>, -NH<sub>3</sub> групп, карбонильных групп и заряженных карбоксильных групп [Petukhov, 2004].

Значительное количество работ, посвященных взаимодействию воды и поверхности белков и липидных структур, было выполнено с использованием ИК спектроскопии. Образование водородной связи уменьшает частоту осцилляций связи C=O, что может быть обнаружено ИК спектроскопией. Для определения глубины проникновения воды в мембрану добавляют кетоны, которые предположительно встраиваются в липидную мембрану и не образуют в ней отдельной фазы. Степень гидратации на различной глубине мембраны можно определить по смещению линии ИК спектра, соответствующей C=O группе кетона [Casal, 1989].

Изменение свойств воды в окрестности поверхности белка или липидной мембраны вызваны упорядочением молекул воды, которое происходит из-за электростатического взаимодействия с полярными группами фосфолипидов [Cheng, 1998] и пространственных ограничений [Kumar, 2005]. Известно, что вблизи поверхности белков и биомембран подвижность молекул воды и диэлектрическая постоянная воды значительно уменьшаются [Falconi, 2003, Henschman, 2002, Pal, 2014, Russo, 2004], при этом происходит увеличение вязкости воды [Vogel, 2006]. Время корреляции вращательного движения

молекул воды, связанных с поверхностью белка, на 2 порядка меньше времени корреляции свободной воды [Balasubramanian, 2002]. Такое замедление динамики было обнаружено в белках [Balasubramanian, 2002, Jordanides, 1999], мицеллах, липидных везикулах [Nandi, 2000], плоских липидных мембранах [Rog, 2002]. Замедление динамики происходит около шероховатых гидрофобных поверхностей, ускорение — около гладких гидрофобных [Scheidler, 2002]. В случае гидрофильной поверхности происходит значительное замедление вращательных движений молекул воды, что было обнаружено экспериментально. Динамическое поведение молекул воды при этом схоже с динамикой в переохлажденной жидкости. Температура стеклования может быть значительно сдвинута к более высоким или более низким температурам в зависимости от силы взаимодействия поверхности с раствором [Starr, 2002]. Было также выяснено, что плотность воды около гидрофильных поверхностей заметно выше, чем в свободном объеме [Cicero, 2005].

В работе [Zewail, 2005] исследовалась эволюция структуры воды на модели амфифильной поверхности используя сверхбыструю электронную кристаллографию и было обнаружено отличие примерно на порядок между характеристическими временами жизни водородных связей в связанной с поверхностью водой и в воде свободного объема. В то же время измерение вращательной подвижности молекул воды методом дисперсии магнитной релаксации изотопа  $^{17}\text{O}$  дало характеристические времена в связанной воде примерно в два раза меньшие, чем в свободном объеме [Halle, 2004]. Компьютерное моделирование показывает, что изменение в динамике воды возле поверхности зависит от морфологии: подвижность молекул воды возле неровных поверхностей меньше, чем около гладких [Kumar, 2005]. Прямое экспериментальное доказательство аномального поведения динамических характеристик воды было получено в исследовании с помощью терагерцовой оптической спектроскопии (временное разрешение порядка долей пикосекунд) [Heyden, 2006, Micksan, 2002] и воды на поверхности белка с фемтосекундным

разрешением [Balasubramanian, 2002]. Такое временное разрешение необходимо, поскольку среднее время жизни водородной связи в свободном объеме воды составляет порядка нескольких фемтосекунд. Этим методом было установлено, что сольватная оболочка молекулы лактозы имеет толщину 5 ангстрем и состоит из около 120 молекул воды. Было установлено, что несколько слоев молекул воды упорядочены из-за взаимодействия с полярными фрагментами липидов биологической мембраны [Milhaud, 2004]: симуляции с ДПФХ показали четыре отдельных различимых области связанной воды [Pandit, 2003]. Считается, что эти слои связанной воды способны эффективно влиять на проницаемость мембраны, препятствуя прохождению молекул внутрь мембраны [Higgins, 2006]. Исследование подвижности молекул воды в мицеллах показало, что подвижность не изменяется внутри мембраны, при этом подвижность существенно уменьшается в слое Штерна (двойной электрический слой, который образуется при ориентировании полярных молекул на границе фаз при адсорбции полярных молекул растворителя), который содержит полярные группы амфифильных молекул. Таким образом, толщина слоя связанной воды в случае мицелл была определена в 5-6 ангстрем от поверхности. Молекулы этого слоя демонстрируют пониженную подвижность по сравнению с молекулами в свободном объеме воды [Dokter, 2007]. Предположительно замедление динамики воды является причиной стабилизации белков и биомембран в дегидратированном или замороженном состоянии в присутствии моно- и дисахаридов.

Уменьшение подвижности воды около твердой поверхности качественно похоже на поведение переохлажденной воды. Иногда в качестве параметра используют эквивалентный температурный сдвиг, к примеру, величина этого параметра была определена для воды между двумя гладкими гидрофобными поверхностями методом молекулярной динамики как 40 К [Kumar, 2005]. В то же время есть данные, что для такой системы температурный сдвиг составляет 20 К, что было отнесено к разной длительности жизни водородных связей в

рассматриваемых системах [Bellissen-Funelt, 2003]. При уменьшении температуры наблюдается изменение состояния связанной с молекулами ДНК и лизоцима воды в том же температурном диапазоне — 222 К для молекул ДНК и 220 К для молекул лизоцима. Было установлено, что вплоть до этих температур вода вблизи молекул ДНК и лизоцима ведет себя как переохлажденная жидкость [Chen, 2006].

Несмотря на отсутствие полной ясности относительно роли структурного упорядочения и динамического поведения молекул воды около биологических систем очевидно, что вода играет значительную роль в функционировании биомембран и белков. Вытеснение молекул воды с поверхности биомембран и белков в результате дегидратации или замораживания приводит к нарушению функций клеток. Действие криопротекторов многие исследователи объясняют способностью удерживать сольватную оболочку белков и биомембран и изменять ее динамические свойства. Также считается, что криопротекторы способны частично замещать молекулы воды и брать на себя их функции.

## **1.2 Различные факторы повреждения биологических клеток при замораживании**

При отрицательных температурах клетки животных и растений могут получить повреждения, которые сделают невозможной выполнение клеткой ее физиологических функций при возвращении к нормальным температурам. Многие виды членистоногих, растения, обитающие в местности с низкими температурами, полярные виды морских рыб и некоторые другие позвоночные в процессе эволюции приобрели способность вырабатывать в своих организмах криозащитные вещества. Повреждение животных и растительных тканей при низких температурах связывают сразу с несколькими факторами.

Поведение изолированной клетки в водном растворе зависит от скорости охлаждения и может быть описано последовательностью процессов [Bald, 1982,

Karlsson, 2000, Rubinsky, 2003, Wolfe, 1999]. Прежде всего, при понижении температуры происходит образование зародышей кристаллов льда в межклеточной жидкости, которое приводит к возрастанию осмотического давления воды внутри клетки. Скорость нуклеации изначально тем больше, чем более переохлаждена жидкость, достигая максимального значения, а затем уменьшаясь из-за уменьшения подвижности молекул воды [Franks, 2003]. Возрастание осмотического давления приводит к дегидратации клетки, в результате чего происходят негативные изменения в структуре мембраны, что может привести к разрыву плазматической мембраны, потере клеткой органелл и утрате способности клетки выполнять свои функций [Lovelock, 1953]. Молекулы воды покидают клетку за счет экзосмоса диффундируя сквозь липидную мембрану и через поры в мембране [Curry, 1994]. Этот процесс также приводит к росту концентрации растворенных веществ в водном растворе внутри клетки.

Дальнейшее уменьшение температуры приводит к росту кристаллов льда в межклеточной жидкости. В процессе роста кристаллов льда концентрация внеклеточного раствора увеличивается до тех пор, пока температура эвтектики не будет достигнута и оставшийся раствор не закристаллизуется [Pegg, 1966].

Кроме этого, кристаллизация межклеточной и внутриклеточной воды, как правило, приводит к механическому повреждению как клеточной мембраны, так и внутренних структур клетки. Если удастся понизить температуру животных тканей без образования кристаллов льда, т.е. если внутриклеточная и межклеточная жидкость перейдет стеклообразное состояние, то внутренние части клетки и клеточная мембрана сохраняют свою структуру. Такое состояние наиболее благоприятно для длительного сохранения животных тканей при низких температурах [Leibo, 1978].

Известно, что липидный бислой может находиться в жидкокристаллическом и гелеобразном состояниях (подробнее в разделе 1.5). Причем выполнение биологических функций возможно только в

жидкокристаллическом состоянии. При понижении температуры происходит дегидратация поверхностного слоя липидной мембраны, в результате чего клеточная мембрана переходит в гелевое состояние. Переход в гелевую фазу приводит к уменьшению ее площади и, следовательно, к разрушению мембраны и к потере клеткой внутриклеточной жидкости и части органелл [Karlsson, 1996].

Степень повреждения клеток, вызванная низкими температурами, зависит от скорости заморозки, минимальной достигнутой температуры, времени нахождения при низких температурах, скорости оттаивания, а также от окружения клетки, например, результаты будут различные для изолированной клетки и для клеток, образующих плотную ткань. Необходимо отметить, что вода в некоторых тканях и клетках не кристаллизуется даже без использования криопротекторов, т.е. такие ткани и клетки способны переносить низкие температуры даже без добавления каких-либо веществ [Zhmakin, 2009].

В живой природе растениям и животным, как правило, необходимо время для адаптации к низким температурам. Сначала специальные сенсоры улавливают понижение средней температуры окружающей среды. Затем активируются соответствующие гены, которые инициируют изменение биологических процессов. Переносимость холода осуществляется за счет взаимосвязанных процессов, включая управление жесткостью мембраны, синтез низкомолекулярных и высокомолекулярных криопротекторов и т.д. [Beck, 2004].

### **1.3 Механизмы действия криопротекторов**

В природе было обнаружено два способа адаптации организмов к низким температурам [Brown, 2004, Lee, 1998, Planta, 2005]. Первый способ заключается в блокировании роста больших кристаллов льда в организме, а в идеальном случае — витрификации жидкости в организме. При этом начинается либо накопление веществ, предотвращающих образование и рост кристаллов льда, как правило, олигосахаридов [Cavender-Bares, 2005, Smallwood, 2002, Storey, 2004],

других водорастворимых углеводов [Bryant, 2001], глицерина [Layne, 2001], свободных аминокислот (пролин, глицин, бетаин) [Lillford, 2002, Pearce, 1999], которые, связываясь с водой, предотвращают зародышеобразование кристаллов льда (процесс нуклеации)[Margesin, 2007] а также стабилизируют структуру белков и биомембран, либо накопление веществ, инициирующих образование множества мелких кристаллов льда при температурах, близких к 0 °С. Специальные белки (агенты кристаллизации льда) инициируют рост кристаллов льда в тех частях, где его присутствие не критично (межклеточная среда), как правило при более высоких температурах, чем они бы возникали в отсутствии агентов (как правило выше -10 °С) [Lundheim, 2002, Tronsmo, 1998]. Ледяные кристаллы при замерзании могут быть слишком небольшими для того, чтобы нанести серьезные повреждения клетке, но при оттаивании может происходить процесс рекристаллизации, который приводит к увеличению размеров кристаллов льда [Withers, 1978]. Животные, в организме которых используется данный способ криозащиты, выживают при образовании льда во всех межклеточных жидкостях различных органов. Жизнедеятельность таких животных полностью останавливается при замерзании и восстанавливается в полном объеме при оттаивании [Costanzo, 2006]. На практике криозащитные растворы, как правило, содержат несколько различных криопротекторов. Накапливаемые в клетках растворы также называют совместимыми растворами [Smallwood, 2002]. Многокомпонентность раствора обеспечивает низкую концентрацию каждого компонента в отдельности, что уменьшает общую токсичность раствора [Bale, 2002].

Второй способ адаптации к низким температурам заключается в блокировании замерзания воды внутри организма. Блокирование замерзания осуществляется путем синтеза белков-антифризов, которые понижают неравновесную точку замерзания воды [Franks, 2003], оставляя при этом неизменной точку плавления (такие белки еще называют белками температурного гистерезиса) [Denlinger, 1998]. Амплитуда гистерезиса зависит

от концентрации белка-антифриза. Белки-антифризы были обнаружены в большом количестве организмов, таких как растения, насекомые, бактерии и северные морские рыбы [Duman, 1975]. Белки-антифризы способны обеспечивать разность между неравновесной точкой замерзания воды и температурой плавления в пределах от 1.5°C для полярных рыб до 3-6°C для насекомых [Holt, 2003]. Считается, что такие белки могут адсорбироваться на поверхности кристаллов льда, препятствуя их дальнейшему росту при замерзании [Devries, 1977], а также мешать рекристаллизации льда при оттаивании тканей (рекристаллизация приводит к появлению больших, а, значит, и приводящих к значительным повреждениям, ледяных кристаллов) [Knight, 1986]. При криозащите методом стеклования (способ, описанный в предыдущем обзоре) основная роль белков-антифризов в криозащитных растворах сводится только к блокированию рекристаллизации воды при оттаивании [Neil, 1998].

Считается, что кристаллизация более 10% внутриклеточной воды приводит к гибели клетки [Wolkers, 2007]. Вероятность спонтанной нуклеации зависит от объема клетки, степени переохлаждения, концентрации растворенных солей и вязкости жидкости. Согласно термодинамической модели скорость нуклеации выражается следующей формулой:

$$J = J_0 \exp(-W / kT), \quad (1.2)$$

где фактор  $J_0$  зависит от молекулярной подвижности, избыточная свободная энергия  $W$  кристалла льда вычисляется в приближении его сферической формы [Toner, 1990]. Чем меньше подвижность, тем медленнее происходит нуклеация, на этом основан один из способов криозащиты. К примеру, был описан случай успешного криосохранения бактерии *Lactobacillus delibruueckii* в водно-глицериновом растворе [Morris, 2006]. Из-за высокой вязкости водно-глицериновых растворов рост кристаллов льда становится ограничен медленной диффузией и, таким образом, количество и размеры образовавшихся кристаллов льда можно заметно снизить, используя быстрое охлаждение клеток.

В идеальном для криосохранения случае межклеточная жидкость при понижении температуры переходит в стеклообразное состояние. Процесс стеклования необходим для криосохранения живых тканей, поскольку в отличие от кристаллизации, при стекловании не происходит разрушения структур клетки. Для процесса стеклования водных растворов необходима большая концентрация криопротектора (для большинства из используемых криопротекторов массовая доля в водном растворе должна быть не менее 50%) и быстрое охлаждение (порядка  $10^2$  °C/мин). Такие высокие концентрации представляют опасность для клеток за счет высокой токсичности и создания значительного осмотического давления. Тем не менее, стеклование широко используется для сохранения эмбрионов животных и клеток растений и животных [Sakai, 1990]. Часто для этих целей используют растворы сахаридов из-за их относительно малой токсичности. Дисахариды трегалоза и сахароза даже при небольших концентрациях способны уменьшать размеры кристаллов льда [Uchida, 2004]. В ряде случаев этого достаточно для того, чтобы избежать повреждения клеток, и полное стеклование не требуется. Недостатком использования дисахаридов является их низкая способность проникать внутрь клетки. Как следствие, растворы трегалозы служат для защиты от замораживания только плазматической мембраны. Некоторые исследования были посвящены усилению криозащитного эффекта действия трегалозы за счет создания специальных пор, через которые молекулы трегалозы проникают внутрь клетки [Eroglu, 2003].

Криопротекторы также условно могут быть разделены на две группы по их способности проникать внутрь клеточной мембраны. К проникающим относятся пропиленгликоль, этиленгликоль, глицерин, диметилсульфоксид [Eroglu, 2000]. Механизм действия проникающих криопротекторов объясняют в основном блокированием кристаллизации воды. К непроникающим криопротекторам относятся сахароза, трегалоза, лактоза, маннит [Chen, 2001]. Механизм действия непроникающих криопротекторов объясняют несколькими факторами, среди

которых называют специфическое взаимодействие с белками и липидными структурами.

В практике криоконсервации глицерин обычно используется для клеток млекопитающих, этиленгликоль для клеток птиц, глицерин, ДМСО, метанол для клеток рыб. Для эмбрионов и ооцитов используют этиленгликоль из-за своего низкого молекулярного веса, высокой проникающей способности и низкой токсичности [Niemstra, 2005]. Наиболее часто в качестве криопротекторов используют спирты, дисахариды, диолы и амиды. Среди них наиболее высокой эффективностью обладают сахароза, трегалоза, 1,2-пропандиол, этандиол, диметилсульфоксид. Многие другие растворы малых органических молекул, таких как аминокислоты (например, аланин, глицин, пролин), моносахариды (глюкоза, лактоза, рибоза) и амиды (ацетамид, формамид) демонстрируют некоторую невысокую криозащитную активность.

В живой природе в основном в качестве криопротекторов используются глицерин, моносахариды (глюкоза) и дисахариды (трегалоза и сахароза). Глюкоза единственный криопротектор у вида *Rana Sylvatica*, для ее выработки используется реакция синтеза глюкозы из гликогена. *Chrysoscelis Hyla* и *Salamandrella keyserlingii* используют глицерин в качестве криопротектора [Storey, 2004]. Некоторые насекомые, способные переносить холод, содержат до 25% глицерина, к примеру, *Bracon cephi* и *Eurytoma gigantea* [Vogel, 2006].

Известно, что в некоторых случаях большие молекулы полимеров могут демонстрировать криозащитные свойства. Проводились исследования, в которых эритроциты замораживались в присутствии поливинилпирролидона, гидроксоэтила и декстрана. Высокая эффективность подобных полимеров объясняется блокированием роста кристаллов льда из-за образования значительного количества водородных связей между молекулами воды и гидрофильной частью молекулы полимера, а также ростом вязкости раствора полимера с понижением температуры [Korber, 1982]. Для эффективности использования полимеров в качестве криозащитных агентов требуется быстрое

охлаждение замораживаемых тканей, разные авторы указывают скорость охлаждения 200-500 °С/мин. Эффективное использование полимеров возможно только совместно с другими криопротекторами.

Механизм действия растворов криопротекторов состоит из многих факторов. Помимо вышесказанного, значительную роль играют предполагаемые межмолекулярные взаимодействия между молекулами криопротектора и биологически значимыми молекулами. Таким образом, например, пытаются объяснить высокую криозащитную эффективность трегалозы, оказываемую на белки и клеточные мембраны. Например, описаны механизмы, при которых криопротектор напрямую взаимодействует с белками, а также изменяет физико-химические свойства раствора. Оба процесса имеют значение для криоконсервации [Arakawa, 1985].

#### **1.4 Структура биомембран**

В 1925 году Гorter и Грендел предположили, что клеточная мембрана состоит из молекул липидов, упакованных в бислой [Gorter, 1925]. Позже это было подтверждено методом дифракции рентгеновских лучей и электронной микроскопией, и концепция липидного бислоя стала основной при изучении биологических мембран. Позже было установлено, что в липидную мембрану встраиваются белки, выполняющие различные функции. Клеточная мембрана является границей между внутриклеточными и межклеточными компартментами и управляет транспортом молекул внутрь клетки и из клетки. Мембрана также обеспечивает сопряжение между клеткой и ее окружением — соседними клетками и межклеточным матриксом. В нормальных условиях клеточная мембрана является лиотропным жидким кристаллом [Сонин, 1987]. Для описания процессов, происходящих в липидных мембранах, были созданы теоретические модели, простейшая из которых представляет липидную мембрану в виде жидкой мозаики, состоящей из одного типа молекул

фосфолипида [Singer, 1972]. Рассмотрение модели мембраны, состоящей из двух типов молекул фосфолипидов [Bryant, 1989] дает возможность корректно описать деформационные процессы в мембране [Ni, 2006] и разделение фаз в мембране [Kumar, 1999].

Существует большое количество мембранных липидов, однако наиболее распространенными являются глицерофосфолипиды. Остовом глицерофосфолипидов является молекула глицерина, одна из гидроксильных групп которой замещена фосфатом, а две другие — остатками стеариновых кислот. Особенностью липидов является их амфифильность — сочетание в себе гидрофобных и гидрофильных свойств. Благодаря этому в полярных жидкостях (например, в воде) липиды самоорганизуются в липидные структуры. Самоорганизация липидов происходит за счет гидрофильных сил (Ван-дер-Ваальсовские силы и водородные связи) и гидрофобных сил, имеющих энтропийную природу.

Мембрана клетки может содержать множество различных липидов, организующих разнообразные процессы, протекающие в мембране. Например, некоторые липиды способны стабилизировать бислой в местах, где он подвергается сильному искривлению. Существуют липиды, которые участвуют в реакциях биосинтеза, поддерживают активность ферментов, регулируют рост клеток, являются рецепторами и т.д.

Из всего класса глицерофосфолипидов дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) — наиболее распространённый фосфолипид в животных клетках, на его долю приходится до 50% всех фосфолипидов. Основная функция ДПФХ — создание и поддержание структуры липидной мембраны, кроме этого ДПФХ не выполняет никакой специфической функции в липидной мембране. По этой причине ДПФХ часто выбирают в качестве липида для создания модельных мембран для исследований.

В зависимости от температуры и степени гидратации липидный бислои может находиться либо в жидкокристаллической, либо в гелевой фазе. В жидкокристаллической фазе ацильные цепи липидов вытянуты перпендикулярно плоскости бислоя, центр бислоя при этом по своим характеристикам больше напоминает жидкость. Полярные головки ориентированы параллельно плоскости бислоя, аминогруппа образует водородную связь с атомами кислорода фосфатной группы. Глицериновый остов при этом ориентирован перпендикулярно мембране. Как правило, ацильные цепи находятся в транс-конфигурации и начинают углубляться внутрь бислоя только после второго атома углерода ацильной цепи [Геннис, 1997].

Жидкокристаллическая фаза является естественной для протекания физиологических процессов в клетке. При достаточной степени гидратации мембрана находится в жидкокристаллической смектической фазе: молекула липида сохраняет свое положение перпендикулярно бислою, но свободно вращается вокруг своей оси и диффундирует в плоскости бислоя.

Переход из жидкокристаллической в гелевую фазу происходит при понижении температуры или при уменьшении концентрации молекул воды у поверхности мембраны. В гелевой фазе текучесть липидов уменьшается, площадь поверхности липидного бислоя минимизируется, а ацильные цепи выпрямляются и вытягиваются на максимальную длину, при этом они могут упаковываться под углом к поверхности. Температура перехода из жидкокристаллической фазы в гелевую сильно зависит от липидного состава мембраны.

Самоорганизация липидов в бислои происходит только при их растворении в сильно полярной жидкости, например, в воде. Известно, что при гидратации происходит образование водородных связей между полярными участками молекул липидов и молекулами воды. С помощью метода ЯМР установлено, что в условиях полной гидратации с каждой молекулой

фосфолипида связывается 11-16 молекул воды, которые быстро обмениваются с молекулами воды из свободного объема [Vorle, 1983].

Существенным является вопрос о конфигурации и упаковке ацильных цепей липидов в бислое. В насыщенных фосфолипидах (таких как ДПФХ) возможно свободное вращение вокруг одиночных углеродных связей С-С. Ацильные цепи в жидкокристаллическом состоянии могут находиться как в транс-, так и в гош-конфигурациях. Считается, что в транс-конфигурации ацильная цепь полностью выпрямлена, в то время как в гош-конфигурации возникающие изгибы приводят к смещению участка углеродной цепи [Dufourc, 1984].

У молекулы дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ) площадь, приходящаяся на одну полярную головку, составляет  $50 \text{ \AA}^2$ , а площадь поперечного сечения ацильной цепи около  $19 \text{ \AA}^2$ . Чтобы компенсировать разницу в площадях молекулы ДПФХ при переходе мембраны в гелевую фазу упаковываются под углом  $30^\circ$  к нормали к поверхности мембраны. Это позволяет увеличить плотность упаковки липидов с сохранением энергетически выгодной транс-конфигурации ацильных цепей липидов. В жидкокристаллическом состоянии углеродные цепочки фосфолипида ДПФХ содержат гош-конформеры, за счет чего общая толщина мембраны оказывается равной  $35 \text{ \AA}$ , а не  $45 \text{ \AA}$ , как было бы в случае полного выпрямления ацильных цепей. При этом методы спектроскопии комбинационного рассеяния и ИК спектроскопии указывают на то, что в фазе геля ацильные цепи липидов находятся преимущественно в транс-конфигурации [Hauser, 1981, Seelig, 1980].

Спектроскопия ЯМР с замещением атомов водорода на атомы дейтерия использовалась для изучения центральной гидрофобной области мембраны. С помощью ЯМР была исследована степень упорядоченности ацильных цепей липидов в жидкокристаллической фазе. Было установлено, что углеродные цепочки значительно упорядочены от атома С2 до атома С10. Причем этот факт

слабо зависел от липидного состава мембраны. При этом ЯМР показал наличие 4-5 гош-конформеров на липид [Davis, 1983, Seelig, 1977].

Широко применяемый метод дифракции нейтронов позволяет определять взаимное расположение атомов углерода внутри углеродной цепи молекулы фосфолипида. Так, например, была подтверждена гипотеза о полном выпрямлении углеродных цепей в фазе геля для фосфолипида ДПФХ [Buldt, 1978].

### 1.5 Фазовые состояния липидных мембран

Исследование фазового состояния липидного бислоя представляет интерес поскольку изменение геометрии клеточной мембраны влечет за собой изменение ее свойств. Исследованиями методами дифференциальной сканирующей калориметрии, рентгеноструктурного анализа, ИК спектроскопии было установлено, что липидный бислой, составленный из молекул ДПФХ, может находиться в различных фазовых состояниях, в зависимости от температуры и давления.

Ламелярная жидкокристаллическая фаза ( $L_\alpha$ ) характеризуется упорядоченным расположением полярных участков молекул липидов при неупорядоченным расположением ацильных цепей. Считается, что в клетках живых существ при физиологических температурах мембрана находится именно в жидкокристаллической фазе.

Гелевая рифленая фаза ( $P_\beta$ ) характеризуется значительными изгибами поверхности мембраны. Ацильные цепи могут быть как упорядочены, так и в значительной степени разупорядочены в разных частях мембраны.

Гелевая фаза ( $L_\beta$ ) характеризуется более плотной упаковкой молекул липидов по сравнению с жидкокристаллической фазой. Ацильные цепи находятся в полностью вытянутом состоянии и преимущественно в транс-

конфигурациях. Толщина бислоя в гелевой фазе больше, чем в жидкокристаллической. Ацильные цепи могут упаковываться под углом к поверхности мембраны — такую фазу обозначают  $L_{\beta'}$ .

Суб-гелевая фаза ( $L_c$ ) представляет собой ламеллярную кристаллическую фазу. Существование суб-гелевой фазы было обнаружено в 1980 году методом дифференциальной сканирующей калориметрии [Chen, 1980]. В суб-гелевой фазе ацильные цепи расположены перпендикулярно поверхности мембраны и находятся в транс-конформации.

Для фосфолипида ДПФХ главный фазовый переход  $P_{\beta'} \rightarrow L_{\alpha}$  происходит при температуре  $41.3 \pm 1.8$  °C с энтальпией  $8.2 \pm 1.4$  ккал/моль. Переход  $L_{\beta'} \rightarrow P_{\beta'}$  происходит при температуре  $34.4 \pm 2.5$  °C с энтальпией  $1.3 \pm 1.0$  ккал/моль. Переход из гелевой в ламеллярную кристаллическую фазу  $L_{\beta'} \rightarrow L_c$  был обнаружен при выдерживании бислоя при температурах 0-7 °C в течении нескольких суток (данные относительно температуры и длительности фазового перехода разнятся). Обратный переход из суб-гелевой фазы  $L_c \rightarrow L_{\beta'}$  происходит при температуре  $18.8 \pm 3.0$  °C с энтальпией  $3.4 \pm 1.1$  ккал/моль [Коупова, 1998]. Температура фазового перехода зависит от количества воды в системе и повышается при уменьшении количества воды.

Различные фазы мембраны значительно отличаются значением среднего объема, приходящимся на одну молекулу липида. Данные, полученные методом дифракции рентгеновских лучей, свидетельствуют о том, что в жидкокристаллической фазе на молекулу липида приходится наибольший объем. Это объясняется разупорядоченным состоянием ацильных цепей молекул. Для ДПФХ средний объем, приходящийся на одну молекулу, в жидкокристаллическом состоянии превышает  $1220 \text{ \AA}^3$ . При переходе в рифленую, гелевую, а затем и в суб-гелевую фазу средний объем, занимаемый одной молекулой, скачкообразно уменьшается. В суб-гелевой фазе средний объем, занимаемый одной молекулой, становится меньше  $1115 \text{ \AA}^3$ , что делает

суб-гелевую фазу самой плотной из всех возможных для ДПФХ [Tristram-Nagle, 1994].

Переход в гелевую фазу сопровождается изменением размера элементов структуры, появлением дефектов между мембранными протеинами и липидным бислоем, повышением мембранной проницаемости ионов и утечкой внутриклеточной жидкости [Bischof, 2006, Rheinstadter, 2005]. Дегидратация клетки приводит к увеличению температуры фазового перехода мембраны, что представляет одну из проблем при криосохранении клеток, поскольку фазовый переход приводит к повреждению клетки.

## **1.6 Особенности подвижности молекул в неупорядоченных средах**

Подвижность молекул в неупорядоченных и слабо упорядоченных системах, а именно характер, частота и амплитуда движения, представляют большой интерес для фундаментальной науки. Известно, что в стеклах отсутствует дальний порядок, т.е. за пределами первой координационной сферы не наблюдается упорядоченной структуры. При стеклообразовании жидкость не испытывает фазового перехода как при кристаллизации, вместо этого происходит повышение вязкости на несколько порядков. Поскольку четкая граница стеклования не определена, вместо определенного значения температуры для описания процесса стеклования используют интервал температур [Аппен, 1974].

Для исследования стекол широко применяется диэлектрическая спектроскопия. Метод заключается в приложении внешнего переменного электрического поля к диэлектрику и измерении потерь в образце. Когда период изменения напряженности внешнего электрического поля становится по порядку величины близок времени установления равновесной ориентации электрических диполей (время диэлектрической релаксации) наблюдается поглощение энергии

внешнего электрического поля. Эта энергия затрачивается на переориентацию молекулярных электрических диполей [Гусев, 2008].

При исследовании стекол методом диэлектрической спектроскопии было обнаружено два пика в спектре частот — низкочастотный ( $\alpha$ -релаксация) и высокочастотный ( $\beta$ -релаксация). Причем  $\alpha$ - и  $\beta$ -релаксации наблюдались во всех стеклах вне зависимости от типа молекул, которые их образовывали [Johari, 1970]. Природа  $\alpha$ -релаксации была объяснена кооперативными движениями молекул, в то время как  $\beta$ -релаксация обусловлена молекулярными движениями, которые не зависят от структуры молекулы и определяются общими закономерностями строения неупорядоченных веществ [Дзюба, 1991].

В работе [Doster, 1989] методом нейтронного рассеивания изучались колебания атомов в белке миоглобин в диапазоне температур 4-350 К. Было установлено, что при температурах ниже 180 К колебания имели гармонический характер. При температурах выше 180 К наблюдалась ангармоническая подвижность, которая была объяснена пространственными скачками атомов между состояниями с разными энергиями. При гармонических движениях среднеквадратичное отклонение атома от положения равновесия зависит от температуры линейно. Появление ангармонических скачков сопровождалось заметным отклонением от линейной зависимости. Переход от гармонических колебаний к ангармоническим скачкам между равновесными положениями был назван динамическим переходом. Было сделано предположение, что такое поведение характерно для всех стекол в диапазоне температур 180-230 К.

Динамический переход также был обнаружен методом Мессбауэровской спектроскопии, чувствительной к молекулярным колебаниям, с характеристическими временами  $10^{-7}$  с [Bauminger, 1983, Parak, 1980]. Также динамический переход наблюдался в липидных мембранах методом спектроскопии комбинационного рассеивания [Surovtsev, 2014, 2012, 2008]. В статье [Paschenko, 1999] методом стационарного ЭПР был обнаружен динамический переход в стеклах органических растворителей.

Среднеквадратичное угловое отклонение находилось из анализа формы стационарного спектра ЭПР спиновых меток — нитроксильных радикалов и соли Фреми. Было установлено, что температура динамического перехода варьировалась для разных стекол и не зависела от типа используемой спиновой метки.

Корреляцию между температурой динамического перехода и температурой биологически важных изменений обнаруживали в молекулах Т-РНК [Caliskan, 2006], рибонуклеазы А [Rasmussen, 1992], белках [Ringe, 2003, Teeter, 2001]. В статье [Vorovykh, 2007] при помощи импульсного и стационарного ЭПР был обнаружен динамический переход в фотосинтетическом реакционном центре.

## 1.7 Исследование подвижности липидных мембран

Как известно, молекулы липидов в мембране испытывают колебательные, вращательные движения и способны свободно диффундировать по мембране. Подвижность липидов исследовали методами ЭПР, ЯМР, методом флуоресцентной спектроскопии. Каждый из этих методов чувствителен к определенному диапазону времен корреляции.

Спектр ЯМР чувствителен к изменениям ориентации связи C-D относительно направления внешнего магнитного поля. ЯМР способен обнаруживать молекулярные движения с характеристическими временами меньше  $10^{-5}$  с. Молекулярные движения методом ЯМР обнаруживают по изменению ширины линии спектра за счет усреднения локальных магнитных полей, которое происходит при достаточно быстром движении. По степени сужения линий можно делать выводы о характеристических временах движения дейтерированного участка молекулы [Davis, 1983]. Метод ЯМР вносит меньшее возмущение в исследуемую систему, поскольку использует дейтерное замещение, слабо влияющее на физические и химические свойства замещенных

молекул. ЭПР и флуоресцентная спектроскопия используют зонды и метки, которые могут локально изменять структуру мембраны.

Метод флуоресцентной спектроскопии основан на наблюдении изменения поляризации флуоресцентного излучения, которое зависит от ориентации дипольного момента части молекулы. Испускаемый свет регистрируют в течение нескольких наносекунд после облучения образца поляризованным светом. Соответственно, данный метод чувствителен к движениям с временами корреляции меньше  $10^{-8}$  с. Если в течение этого промежутка времени молекулы остаются неподвижными, то поляризация излучаемого света будет совпадать с поляризацией возбуждающего света [Ameloot, 1984]. Если же молекула совершает быстрое вращение, то распределение вектора поляризации испускаемого света будет определяться характером этого движения.

Существует несколько экспериментальных методик ЭПР, чувствительных к молекулярному движению. Применение стационарного метода ЭПР основано на аппроксимации экспериментально полученного спектра теоретически рассчитанным в рамках выбранной модели движения. Стационарный метод ЭПР чувствителен к анизотропным вращениям молекул с временем корреляции порядка  $10^{-10}$ - $10^{-7}$  с [Devaux, 1983]. Стационарный метод также может быть применен для изучения анизотропных молекулярных либраций с определенными параметрами времени корреляции  $\tau_c$  и среднеквадратичной угловой амплитуды  $\langle \alpha^2 \rangle$ . Форма линии спектра зависит не только от времени корреляции, но и от характера движения. В случае изотропного вращения спинового зонда время корреляции может быть легко определено аппроксимацией формы спектра. При исследовании липидных мембран методом ЭПР спиновые метки прикрепляются к различным участкам молекул липидов. При этом движение спиновой метки обуславливается движением молекулы липида, к которой она прикреплена.

Спектроскопия импульсного ЭПР также применялась к исследованию подвижности липидного бислоя. В статье [Dzuba, 1992] с помощью теории Редфилда рассчитано влияние быстрых малоамплитудных молекулярных движений спинового зонда на форму спектра импульсного ЭПР. Теория применима при временах корреляции  $10^{-8} < \tau_c < 10^{-6}$  с. В работе проводилась аппроксимация экспериментального спектра теоретически рассчитанным путем варьирования параметра  $\tau_c \langle \alpha^2 \rangle$ . Делается вывод о том, что среднеквадратичная угловая амплитуда колебаний лежит в интервале  $5 \cdot 10^{-6} < \langle \alpha^2 \rangle < 5 \cdot 10^{-4}$  рад<sup>2</sup>.

В статье [Dzuba, 1996] исследовалась динамика спинового зонда, растворенного в стеклах сахарозы и трегалозы. Стационарный ЭПР использовался для получения температурной зависимости среднеквадратичной угловой амплитуды  $\langle \alpha^2 \rangle$ , а импульсный — для определения параметра  $\tau_c \langle \alpha^2 \rangle$ . Оба эти метода в совокупности позволили оценить время корреляции спинового зонда в исследуемом узком температурном интервале как  $\tau_c \sim 10^{-9}$  с.

В статье [Paschenko, 1999] исследовалось влияние малоамплитудных либраций нитроксильных радикалов в замороженных стеклах на форму спектра ЭПР. В качестве спиновых зондов использовались стабильные радикалы различных размеров, в качестве растворителей — дибутилфталат, сквалан, глицерин и водно-глицериновый раствор. Было показано, что колебания молекул до определенной температуры носят гармонический характер. При этом эффективное значение z-компоненты тензора СТВ изменяется линейно с температурой. Отклонение значений  $A_{zz}$  от линейного закона наблюдалось при высоких температурах, когда либрации становились ангармоническими.

В статье [Kirilina, 2001] исследовалась подвижность нитроксильных радикалов ТЕМПОН, 3-карбокситроксилоксил, соль Фреми в глицерине в температурном диапазоне 80-240 К. Согласно теории, изменение величины среднеквадратичной угловой амплитуды либраций должно изменять

эффективное значение  $z$ -компоненты тензора СТВ. Среднее значение  $A_{zz}$  определялось из формы спектра ЭПР как расстояние между крайними линиями спектра. Наблюдаемое увеличение среднеквадратичной угловой амплитуды с возрастанием температуры было объяснено быстрыми ориентационными либрациями молекулы спинового зонда в матрице растворителя.

Импульсный ЭПР в зависимости от выбранной методики способен давать информацию о молекулярных движениях с временами корреляции  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  с и  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  с. Метод первичного спинового эха чувствителен к подвижности молекул в диапазоне времен корреляции  $10^{-8}$ - $10^{-6}$  с, в то время как метод стимулированного спинового эха — в диапазоне  $10^{-6}$ - $10^{-4}$  с. Для получения информации о подвижности молекул экспериментальный спектр ЭПР, полученный с помощью первичного или стимулированного эха, аппроксимируют теоретически рассчитанным, используя в качестве параметра аппроксимации параметр  $\tau_c \langle \alpha^2 \rangle$ .

В статье [Erilov, 2004] исследовалось влияние холестерина на подвижность липидного бислоя. Из анализа спектров, полученных при помощи двухимпульсного и трехимпульсного спинового эха, было установлено, что присутствие холестерина замедляет быстрые либрации в центре липидного бислоя и в то же время не оказывает влияния на медленные микросекундные движения липидов.

В статье [Dzuba, 2006] исследовался переход от гармонических к ангармоническим движения молекул спинового зонда (динамический переход) в матрице глицерина и ортотерфенила. С помощью импульсного и стационарного ЭПР были установлены температуры динамического перехода для стекол ортотерфенила и глицерина. Указывается, что полученные результаты находятся в согласии с данными нейтронного рассеивания.

В статье [Isaev, 2008] предложен метод получения вклада от анизотропной релаксации в амплитуду спинового эха. Чтобы получить вклад в релаксацию

только от либраций спад сигнала спинового эха записывался в двух участках спектра — наиболее анизотропном и наиболее изотропном. При помощи деления одного сигнала на другой можно избавиться от всех изотропных релаксационных вкладов. Оставшийся анизотропный вклад определяется стохастическими либрациями. При помощи этого метода были получены данные о подвижности различных частей спин-меченой стеариновой кислоты, встроенной в липидную мембрану. Достоинством импульсного ЭПР можно считать лучшую чувствительность по сравнению со стационарным ЭПР. Из полученных в ходе исследований данных следует, что центр липидного бислоя обладает большей подвижностью по сравнению с его поверхностью.

## **Глава 2. Методы стационарного и импульсного ЭПР**

### **2.1 Метод спиновых зондов, метод спиновых меток и их применение к исследованию структуры и динамики биомембран**

Для того, чтобы применять метод ЭПР к исследованию структуры и динамики биологических молекул, необходимо прикрепить к исследуемой молекуле спиновую метку. Чаще всего в качестве спиновой метки используют стабильные радикалы. В результате появляется возможность исследовать структурные особенности и характер движения отдельных участков молекул или биологических систем. В настоящее время спиновые метки могут быть присоединены к множеству биологических молекул (белки, липиды, жирные кислоты). Метод спиновых меток на протяжении последних десятилетий применяется для исследования динамики и структуры биологических систем.

Для исследования динамики и особенностей структурной организации растворов, молекулярных стекол, полимеров в исследуемое вещество могут быть добавлены стабильные радикалы в качестве спиновых зондов. В отличие от спиновых меток, спиновый зонд не образует химических связей с исследуемыми молекулами. Молекулы стабильного радикала повторяют движения молекул своего окружения, таким образом, давая информацию о подвижности молекул растворителя.

Метод спиновых меток широко используется для изучения структурных и динамических характеристик мембраны. Методом ЭПР были исследованы структура, профиль полярности, фазовое состояние и фазовое расслоение мембран [Swamy, 2006], взаимодействия липидов с белками [Costa-Filho, 2003], а также прохождение полярных и неполярных молекул через мембрану [Altenbach, 1994, Dzikovski, 2003, Livshits, 2001]. Помимо липидов спиновые метки прикрепляли к белкам и пептидам с целью выяснения их пространственного положения в мембране [Cieslak, 2010].

Центральной проблемой корректности применения метода спиновых меток является вопрос о конформации спин-меченых липидов внутри липидного бислоя. Согласно некоторым исследованиям ацильные цепи спин-меченых липидов находятся в полностью выпрямленном состоянии [Chattopadhyay, 1987]. Исследования методом ЯМР показали, что распределение спиновых меток по бислою хотя и сильно неоднородно, но тем не менее коррелирует с положением спиновой метки вдоль ацильной цепи [Vogel, 2003]. В пользу наличия множества конформаций говорят данные исследований, проведенных на мономолекулярных пленках и системах мицелл [Cadenhead, 1975].

Если мембрана находится в жидкокристаллической фазе спиновые метки, вероятно, оказываются чуть ближе к поверхности мембраны [Ellena, 1988]. В статье [Кугученко, 2013] методом молекулярной динамики и ЯМР получен профиль глубины нахождения спиновых меток внутри мембраны. Установлено, что, хотя спиновые метки расположены с большим разбросом, их средняя глубина внутри бислоя коррелирует с положением вдоль ацильной цепи, к которому они прикреплены.

В статье [Dzikovski, 2012] методом высокочастотной стационарной ЭПР спектроскопии установлено, что значительное количество спиновых меток вытесняется из объема липидной мембраны на ее поверхность. Было подтверждено, что в жидкокристаллическом состоянии углеродные цепочки липидов могут изгибаться и вытесняться из мембраны. Из анализа спектра ЭПР на частоте 240 ГГц определялось образует ли спиновая метка водородные связи с молекулами воды, и на основе этих данных делался вывод о близости спиновой метки к поверхности мембраны. При быстрой заморозке спиновые метки оказываются преимущественно вытесненными из центра мембраны. При медленной заморозке появлялся сигнал от спиновых меток, не связанных водородными связями с молекулами воды, что означает нахождение значительного количества меток внутри бислоя. При этом линия от вытесненных на поверхность спиновых меток присутствует, но сильно уширяется, что было

объяснено образованием отдельной фазы, в которую вытеснялись спин-меченые липиды. Сильное взаимодействие между спиновыми метками в этой фазе приводит к быстрой парамагнитной релаксации и, следовательно, уширению линии. Столь быстрая релаксация делает невозможным наблюдение сигнала спинового эха от меток, вытесненных на поверхность мембраны. Сигнал спинового эха наблюдается только от меток, находящихся внутри мембраны. Этот факт делает протокол медленной заморозки наиболее подходящим для проведения экспериментов с использованием электронного спинового эха.

Информацию о структурной организации липидной мембраны и проникновению внутрь мембраны различных веществ получают либо фиксируя изменения магнитных параметров спиновой метки, либо детектируя различными способами магнитные взаимодействия спиновой метки с ядрами окружающих атомов. Например, по изменению параметров магнитной анизотропии получают информацию о полярности окружающей среды. На этом эффекте основан метод определения глубины проникновения малых полярных молекул внутрь мембраны [Kurad, 2003, Subczynski, 1994]. Поскольку параметры анизотропии нитроксильного радикала определяются из стационарного спектра ЭПР, наиболее информативен оказывается высокочастотный ЭПР [Earle, 1994]. Магнитные взаимодействия спиновой метки с ядрами различных атомов, ионами, другими спиновыми метками могут быть обнаружены по изменению времен релаксации, переносом поляризации и некоторыми импульсными методами ЭПР.

## **2.2 Влияние быстрого молекулярного движения на форму линии стационарного спектра ЭПР**

Расчет формы линии спектра ЭПР в X-диапазоне проводится путем нахождения частот переходов между уровнями энергии, задающимися Гамильтонианом:

$$H = \beta_e \mathbf{B}_0 \mathbf{g}_e \mathbf{S} + g_N \beta_N \mathbf{B}_0 \mathbf{I} + \mathbf{S} \mathbf{A} \mathbf{I}, \quad (2.1)$$

где  $\beta_e$  — магнетон Бора,  $\mathbf{g}_e$  — g-тензор электрона,  $\beta_N$  — ядерный магнетон,  $\mathbf{B}_0$  — вектор напряженности стационарного магнитного поля (направлено вдоль оси z),  $\mathbf{S}$  — оператор электронного спина,  $\mathbf{A}$  — тензор сверхтонкого взаимодействия со спином ядра азота  $\mathbf{I}$ . В гамильтониане (2.1) пренебрегается ядерным квадрупольным взаимодействием, что является хорошим приближением для ядер азота в нитроксильных спиновых метках.

Для нитроксильного радикала главные оси тензора СТВ и g-тензора близки к молекулярным осям, показанным на рисунке 2.1. Поэтому матрицы g-тензора и тензор СТВ в молекулярной системе координат имеют диагональный вид.

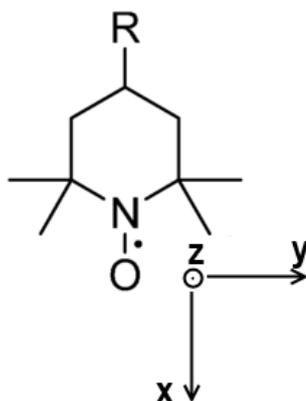


Рисунок 2.1 — Направление осей в молекулярной системе координат нитроксильного радикала

Поскольку величина магнитного поля, наведенного ядерным спином в точке нахождения электронного спина значительно меньше величины полей, используемых в ЭПР, можно считать, что электронный спин квантуется только вдоль направления внешнего магнитного поля (ось z). В то же время ядерный спин квантуется вдоль направления эффективного магнитного поля, которое является векторной суммой внешнего магнитного поля и магнитного поля, созданного магнитным моментом электрона в точке нахождения ядра.

Тензор СТВ и g-тензор записываются в молекулярной системе координат. Для приведения тензора СТВ и g-тензора к лабораторной системе координат используются матрицы поворота вокруг осей молекулярной системы координат на углы Эйлера. Поскольку Гамильтониан инвариантен относительно третьего поворота вокруг оси z, то матрица поворота из молекулярной в лабораторную систему координат выглядит следующим образом [Libertini, 1970]:

$$L_0 = \begin{pmatrix} \cos \varphi \cos \theta & \sin \varphi \cos \theta & -\sin \theta \\ -\sin \varphi & \cos \varphi & 0 \\ \cos \varphi \sin \theta & \sin \varphi \sin \theta & \cos \theta \end{pmatrix}, \quad (2.2)$$

где  $\theta$  и  $\varphi$  - полярный и азимутальный углы, определяющие в сферической системе координат направление магнитного поля.

Тогда в лабораторной системе координат гамильтониан будет выглядеть следующим образом:

$$H = \beta_e \mathbf{B}_0 \mathbf{L}_0 \mathbf{g}_e \mathbf{L}_0^T \mathbf{S} + \beta_N g_N \mathbf{B}_0 \mathbf{I} + \mathbf{S} \mathbf{L}_0 \mathbf{A} \mathbf{L}_0^T \mathbf{I} \quad (2.3)$$

Или

$$H = \omega_S S_Z + \omega_I I_Z + S_Z A I_Z + S_Z B_X I_X + S_Z B_Y I_Y, \quad (2.4)$$

где

$$\omega_S = \beta_e B_0 (g_{xx} \cos^2 \varphi \sin^2 \theta + g_{yy} \sin^2 \varphi \sin^2 \theta + g_{zz} \cos^2 \theta) \quad (2.5)$$

$$A = A_{xx} \cos^2 \varphi \sin^2 \theta + A_{yy} \sin^2 \varphi \sin^2 \theta + A_{zz} \cos^2 \theta \quad (2.6)$$

$$B_X = (A_{xx} \cos^2 \varphi + A_{yy} \sin^2 \varphi - A_{zz}) \sin \theta \cos \theta \quad (2.7)$$

$$B_Y = (A_{yy} - A_{xx}) \sin \varphi \cos \varphi \sin \theta, \quad (2.8)$$

где  $A_{xx}$ ,  $A_{yy}$ ,  $A_{zz}$  — главные значения тензора СТВ в молекулярной системе координат,  $g_{xx}$ ,  $g_{yy}$ ,  $g_{zz}$  — главные значения g-тензора в молекулярной системе координат,  $A$ ,  $B_X$ ,  $B_Y$  — главные значения тензора СТВ в лабораторной системе координат.

Таким образом, ядерный спин в зависимости от проекции электронного спина квантуется вдоль направления одной из двух осей  $\vec{a}_+$  и  $\vec{a}_-$  [Libertini, 1970]

$$\vec{a}_+ = (B_x, B_y, 2\omega_I + A) \quad (2.9)$$

$$\vec{a}_- = (-B_x, -B_y, 2\omega_I - A) \quad (2.10)$$

Тогда гамильтониан для  $S = \frac{1}{2}$  можно записать следующим образом (в единицах частоты):

$$H = \omega_s S_z + \frac{a_{\pm}}{2} \mathbf{I} \quad (2.11)$$

Для электронного спина  $S = \frac{1}{2}$  и ядерного спина  $I = 1$  матрица спин-Гамильтониана будет выглядеть следующим образом [Libertini, 1970]:

$$\begin{pmatrix} \frac{\omega_s}{2} + \left(\omega_I + \frac{A}{2}\right) & \frac{\sqrt{2}}{4}(B_x - iB_y) & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \frac{\sqrt{2}}{4}(B_x + iB_y) & \frac{\omega_s}{2} & \frac{\sqrt{2}}{4}(B_x - iB_y) & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\sqrt{2}}{4}(B_x + iB_y) & \frac{\omega_s}{2} - \left(\omega_I + \frac{A}{2}\right) & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -\frac{\omega_s}{2} + \left(\omega_I - \frac{A}{2}\right) & -\frac{\sqrt{2}}{4}(B_x - iB_y) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -\frac{\sqrt{2}}{4}(B_x + iB_y) & -\frac{\omega_s}{2} & -\frac{\sqrt{2}}{4}(B_x - iB_y) \\ 0 & 0 & 0 & 0 & -\frac{\sqrt{2}}{4}(B_x + iB_y) & -\frac{\omega_s}{2} + \left(-\omega_I + \frac{A}{2}\right) \end{pmatrix} \quad (2.12)$$

Матрица гамильтониан нитроксильного радикала может быть диагонализирована аналитически. При этом диагональные элементы полученной матрицы и будут уровнями энергии системы  $E_n$ . Для гамильтониана нитроксильного радикала возможно точное аналитическое решение методом диагонализации:

$$E_1 = \frac{\omega_s}{2} + \frac{|\vec{a}_+|}{2} \quad (2.13)$$

$$E_2 = \frac{\omega_s}{2} \quad (2.14)$$

$$E_3 = \frac{\omega_s}{2} - \frac{|\bar{a}_+|}{2} \quad (2.15)$$

$$E_4 = -\frac{\omega_s}{2} + \frac{|\bar{a}_-|}{2} \quad (2.16)$$

$$E_5 = -\frac{\omega_s}{2} \quad (2.17)$$

$$E_6 = -\frac{\omega_s}{2} - \frac{|\bar{a}_-|}{2} \quad (2.18)$$

Между шестью уровнями энергии (рисунок 2.2) возможны девять ЭПР переходов с соответствующими резонансными частотами, три из которых являются разрешенными и шесть — запрещенными.

$$3 \leftrightarrow 4: \omega_{-1,-1} = \omega_s - \frac{|\bar{a}_+| + |\bar{a}_-|}{2} \quad (2.19)$$

$$2 \leftrightarrow 5: \omega_{0,0} = \omega_s \quad (2.20)$$

$$1 \leftrightarrow 6: \omega_{+1,+1} = \omega_s + \frac{|\bar{a}_+| + |\bar{a}_-|}{2} \quad (2.21)$$

$$1 \leftrightarrow 5: \omega_{+1,0} = \omega_s + \frac{|\bar{a}_+|}{2} \quad (2.22)$$

$$2 \leftrightarrow 4: \omega_{0,-1} = \omega_s - \frac{|\bar{a}_-|}{2} \quad (2.23)$$

$$3 \leftrightarrow 6: \omega_{-1,+1} = \omega_s + \frac{|\bar{a}_-| - |\bar{a}_+|}{2} \quad (2.24)$$

$$1 \leftrightarrow 4: \omega_{+1,-1} = \omega_s + \frac{|\bar{a}_+| - |\bar{a}_-|}{2} \quad (2.25)$$

$$2 \leftrightarrow 6: \omega_{0,+1} = \omega_s + \frac{|\bar{a}_-|}{2} \quad (2.26)$$

$$3 \leftrightarrow 5: \omega_{+1,0} = \omega_s - \frac{|\bar{a}_+|}{2} \quad (2.27)$$

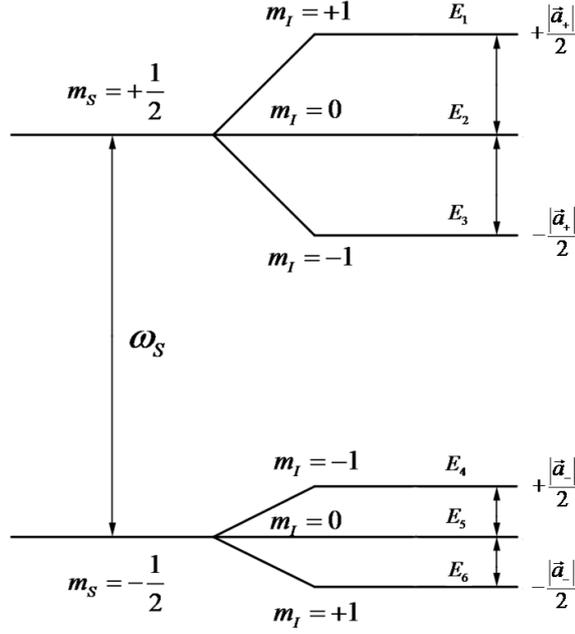


Рисунок 2.2 — Уровни энергии нитроксильного радикала

Для расчета вероятностей переходов между уровнями  $P_{ij} = \left| \langle \psi_i | S_x | \psi_j \rangle \right|^2$  необходимо найти волновые функции, соответствующие каждому из шести уровней [Libertini, 1970].

$$|\varphi_1\rangle = \frac{1}{|\bar{a}_+|} \left[ \left( \left( \frac{|\bar{a}_+|}{2} + \frac{A}{2} + \omega_l \right) \left| +\frac{1}{2}, +1 \right\rangle + \frac{\sqrt{2}}{2} (B_x + iB_y) \left| +\frac{1}{2}, 0 \right\rangle + \frac{B_x^2 + 2iB_x B_y - B_y^2}{B_x^2 + B_y^2} \left( \frac{|\bar{a}_+|}{2} - \frac{A}{2} - \omega_l \right) \left| +\frac{1}{2}, -1 \right\rangle \right] \quad (2.28)$$

$$|\varphi_2\rangle = \frac{1}{|\bar{a}_+|} \left[ \left( -\frac{\sqrt{2}}{2} (B_x - iB_y) \right) \left| +\frac{1}{2}, +1 \right\rangle + (A + 2\omega_l) \left| +\frac{1}{2}, 0 \right\rangle + \frac{\sqrt{2}}{2} (B_x + iB_y) \left| +\frac{1}{2}, -1 \right\rangle \right] \quad (2.29)$$

$$|\varphi_3\rangle = \frac{1}{|\bar{a}_+|} \left[ \frac{B_x^2 + 2iB_x B_y - B_y^2}{B_x^2 + B_y^2} \left( \frac{|\bar{a}_+|}{2} - \frac{A}{2} - \omega_l \right) \left| +\frac{1}{2}, +1 \right\rangle - \frac{\sqrt{2}}{2} (B_x - iB_y) \left| +\frac{1}{2}, 0 \right\rangle + \left( \frac{|\bar{a}_+|}{2} + \frac{A}{2} + \omega_l \right) \left| +\frac{1}{2}, -1 \right\rangle \right] \quad (2.30)$$

$$|\varphi_4\rangle = \frac{1}{|\bar{a}_-|} \left[ \frac{B_x^2 + 2iB_x B_y - B_y^2}{B_x^2 + B_y^2} \left( \frac{|\bar{a}_-|}{2} - \frac{A}{2} + \omega_l \right) \left| -\frac{1}{2}, +1 \right\rangle - \frac{\sqrt{2}}{2} (B_x - iB_y) \left| -\frac{1}{2}, 0 \right\rangle + \left( \frac{|\bar{a}_-|}{2} + \frac{A}{2} - \omega_l \right) \left| -\frac{1}{2}, -1 \right\rangle \right] \quad (2.31)$$

$$|\varphi_5\rangle = \frac{1}{|\bar{a}_-|} \left[ \left( -\frac{\sqrt{2}}{2} (B_x - iB_y) \right) \left| -\frac{1}{2}, +1 \right\rangle + (A - 2\omega_l) \left| -\frac{1}{2}, 0 \right\rangle + \frac{\sqrt{2}}{2} (B_x + iB_y) \left| -\frac{1}{2}, -1 \right\rangle \right] \quad (2.32)$$

$$|\varphi_6\rangle = \frac{1}{|\bar{a}_-|} \left[ \left( \frac{|\bar{a}_-|}{2} + \frac{A}{2} - \omega_l \right) \left| -\frac{1}{2}, +1 \right\rangle + \frac{\sqrt{2}}{2} (B_x + iB_y) \left| -\frac{1}{2}, 0 \right\rangle + \frac{B_x^2 + 2iB_x B_y - B_y^2}{B_x^2 + B_y^2} \left( \frac{|\bar{a}_-|}{2} - \frac{A}{2} + \omega_l \right) \left| -\frac{1}{2}, -1 \right\rangle \right] \quad (2.33)$$

Тогда вероятности разрешенных и запрещенных переходов записываются следующим образом:

$$P_{6\leftrightarrow 1,4\leftrightarrow 3} = \frac{1}{4|\bar{a}_-|^2|\bar{a}_+|^2} \left[ \frac{|\bar{a}_+||\bar{a}_-|}{4} + \frac{A^2}{4} - \omega_I^2 + \frac{B_x^2 + B_y^2}{4} \right]^2 \quad (2.34)$$

$$P_{5\leftrightarrow 2} = \frac{1}{4|\bar{a}_-|^2|\bar{a}_+|^2} \left[ \frac{A^2}{2} - 2\omega_I^2 + \frac{B_x^2 + B_y^2}{2} \right]^2 \quad (2.35)$$

$$P_{6\leftrightarrow 2,5\leftrightarrow 1,4\leftrightarrow 2,5\leftrightarrow 3} = \frac{1}{|\bar{a}_-|^2|\bar{a}_+|^2} \frac{1}{2} (B_x + B_y) \omega_I^2 \quad (2.36)$$

$$P_{6\leftrightarrow 3,4\leftrightarrow 1} = \frac{1}{4|\bar{a}_-|^2|\bar{a}_+|^2} \left[ \frac{|\bar{a}_+||\bar{a}_-|}{4} - \frac{A^2}{4} + \omega_I^2 - \frac{B_x^2 + B_y^2}{4} \right]^2 \quad (2.37)$$

Соответствующее значение резонансного магнитного поля  $B_{рез}$  находится методом половинного деления для каждого перехода с учетом того, что  $\omega_S = \beta_e g_{ZZ}(\varphi, \theta) B_{рез}$ , где  $g_{ZZ}(\varphi, \theta) = g_{XX} \cos^2 \varphi \sin^2 \theta + g_{YY} \sin^2 \varphi \sin^2 \theta + g_{ZZ} \cos^2 \theta$ .

Линии спектра оказываются неоднородно уширены за счет взаимодействия с окружающими спинами протонов вещества. Неоднородное уширение может быть учтено при помощи гауссовой функции с некоторой шириной линии, определяемой экспериментально.

Для получения формы спектра ЭПР в полиориентированных образцах необходимо провести усреднение для всех возможных ориентаций нитроксильного радикала и учесть эффект неоднородного уширения линий спектра (рисунок 2.3).

$$I(B_0) = \sum_{n,m} \frac{\int_0^\pi \int_0^{2\pi} P_{n,m} G(B_{рез}(\varphi, \theta, n, m) - B_0) \sin \theta d\varphi d\theta}{\int_0^\pi \int_0^{2\pi} \sin \theta d\varphi d\theta}, \quad (2.38)$$

где  $G(\Delta B)$  — нормированная функция Гаусса с полушириной на полувисоте  $\delta$ :

$$G(\Delta B) = \sqrt{\frac{\ln 2}{\pi}} \frac{1}{\delta} \exp \left( -\frac{\ln 2 (B_{рез} - B_0)^2}{\delta^2} \right), \quad (2.39)$$

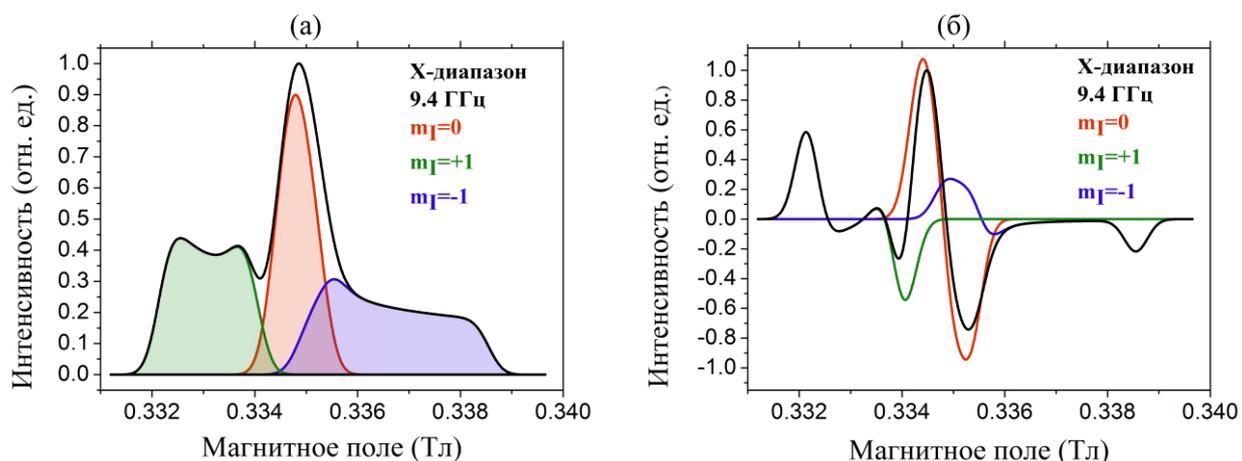


Рисунок 2.3 — Теоретически рассчитанные формы линий спектра ЭПР нитроксильного радикала для X диапазона СВЧ (9.4 ГГц). Спектр поглощения СВЧ излучения (а) и спектр первой производной (б). Красным, синим и зеленым цветом показаны три компоненты спектра, соответствующие проекциям  $m_I$  ядерного спина. Черным цветом показана линия суммарного наблюдаемого в эксперименте спектра. При расчете использовались главные значения тензора СТВ и g-тензора:  $A_{xx}=0.7$  мТ,  $A_{yy}=0.5$  мТ,  $A_{zz}=3.2$  мТ,  $g_{xx}=2.0089$ ,  $g_{yy}=2.0061$ ,  $g_{zz}=2.0027$ , параметр неоднородного уширения  $\delta = 1.5$  Гс.

В простейшем случае быстрого изотропного молекулярного движения все компоненты тензора СТВ и g-тензора усредняются. При этом спектр нитроксильного радикала представляет собой три хорошо различимые линии, соответствующие трем значениям проекции ядерного спина азота на направление эффективного магнитного поля.

В случае быстрых колебательных движений молекулы спиновой метки вокруг одной из молекулярных осей происходит частичное усреднение параметров анизотропии СТВ и g-тензора. При достаточно быстром движении характер таких движений становится не важен. Рассмотрим колебания нитроксильной спиновой метки вокруг оси x молекулярной системы координат. Преобразование g-тензора и тензора СТВ в этом случае производится при помощи матрицы поворота вокруг оси x [Van, 1974]:

$$L_x = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \alpha & \sin \alpha \\ 0 & -\sin \alpha & \cos \alpha \end{pmatrix} \quad (2.40)$$

Матрица СТВ приобретает следующий вид в молекулярной системе координат:

$$A' = L_x^T A L_x = \begin{pmatrix} A_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & A_{yy} \cos^2 \alpha + A_{zz} \sin^2 \alpha & (A_{yy} - A_{zz}) \sin \alpha \cos \alpha \\ 0 & (A_{yy} - A_{zz}) \sin \alpha \cos \alpha & A_{zz} \cos^2 \alpha + A_{yy} \sin^2 \alpha \end{pmatrix} \quad (2.41)$$

Допустим, что все возможные направления, которые принимает ось  $x$  молекулярной системы координат во время колебательного движения, симметрично распределены относительно некоего среднего направления, тогда усредненное значение тензора СТВ будет следующим:

$$\langle A' \rangle = \begin{pmatrix} A_{xx} & 0 & 0 \\ 0 & A_{yy} + (A_{zz} - A_{yy}) \langle \sin^2 \alpha \rangle & 0 \\ 0 & 0 & A_{zz} + (A_{yy} - A_{zz}) \langle \sin^2 \alpha \rangle \end{pmatrix} \quad (2.42)$$

В лабораторной системе координат усредненные компоненты тензора СТВ принимают следующий вид:

$$A = (A_{xx} \cos^2 \varphi \sin^2 \theta + A_{yy} \sin^2 \varphi \sin^2 \theta + A_{zz} \cos^2 \theta) + (A_{zz} - A_{yy})(\sin^2 \theta \sin^2 \varphi - \cos^2 \theta) \langle \sin^2 \alpha \rangle \quad (2.43)$$

$$B_X = (A_{xx} \cos^2 \varphi + A_{yy} \sin^2 \varphi - A_{zz}) \cos \theta \sin \theta + (1 + \sin^2 \varphi)(A_{zz} - A_{yy}) \cos \theta \sin \theta \langle \sin^2 \alpha \rangle \quad (2.44)$$

$$B_Y = (A_{yy} - A_{xx}) \sin \varphi \cos \varphi \sin \theta + (A_{zz} - A_{yy}) \sin \varphi \cos \varphi \sin \theta \langle \sin^2 \alpha \rangle \quad (2.45)$$

Для малоамплитудных молекулярных движений  $\langle \sin^2 \alpha \rangle$  можно заменить на  $\langle \alpha^2 \rangle$ . Аналогичные операции усреднения проводятся для  $g$ -тензора.

Как видно из рисунка 2.4 наибольшее влияние на форму спектра ЭПР оказывают быстрые либрации вокруг осей  $x$  и  $y$ . Вращение вокруг оси  $z$  слабо изменяет форму спектра ЭПР, поскольку форма спектра в  $X$ -диапазоне в

основном определяется значениями тензора СТВ, который в случае нитроксильного радикала близок к аксиальной симметрии.

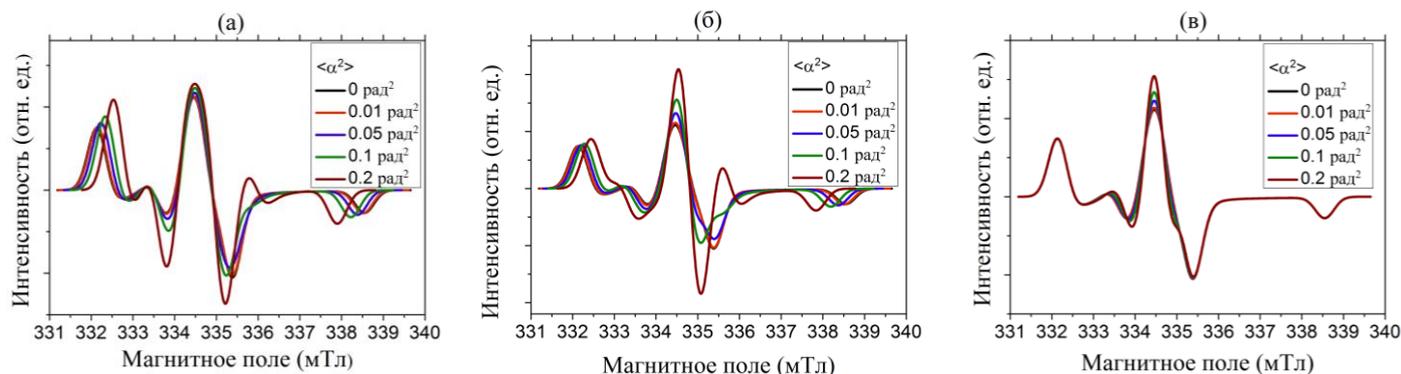


Рисунок 2.4 — Стационарные спектры ЭПР X-диапазона нитроксильного радикала, рассчитанные в рамках модели быстрых ограниченных либраций для различных значений среднеквадратичного отклонения  $\langle \alpha^2 \rangle$ . На трех рисунках показаны либрации вокруг трех главных молекулярных осей — (а) вокруг оси  $x$ , (б) вокруг оси  $y$ , (в) вокруг оси  $z$ . При расчете использовались главные значения тензора СТВ и  $g$ -тензора:  $A_{xx}=0.7$  мТ,  $A_{yy}=0.5$  мТ,  $A_{zz}=3.2$  мТ,  $g_{xx}=2.0089$ ,  $g_{yy}=2.0061$ ,  $g_{zz}=2.0027$ , параметр неоднородного уширения  $\delta = 1.5$  Гс.

### 2.3 Влияние быстрого молекулярного движения на форму линии эхo-детектированного спектра ЭПР

Молекулы нитроксильной спиновой метки способны совершать малоамплитудные колебательные движения, которые принято называть либрациями. Либрации являются дополнительным вкладом в релаксацию сигнала электронного спинового эха. В зависимости от величины характеристического времени и амплитуды либрации по-разному проявляют себя в спектре импульсного ЭПР [Dzuba, 1992].

Если рассматривать быстрые либрации, т.е. такие, время корреляции  $\tau_c$  и амплитуда  $\Delta\omega$  которых удовлетворяет условию  $\langle \Delta\omega^2(t) \rangle_i \tau_c^2 < 1$ , то амплитуда первичного спинового эха тогда будет определяться формулой [Klauder, 1962]:

$$v(2\tau) = \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right) \exp\left(-2\tau\tau_c \langle \Delta\omega^2(t) \rangle_t\right), \quad (2.46)$$

где  $\Delta\omega(t) = \omega(t) - \langle \omega(t) \rangle$ .

В формуле 2.46 множителем  $\exp\left(-\frac{2\tau}{T_2}\right)$  учтен вклад в поперечную релаксацию спинового эха за счет других процессов.

Сдвиг резонансной частоты  $\Delta\omega(t)$  в результате движения спиновой метки будет определяться разностью резонансных частот, соответствующих случайному и среднему значению угла  $\alpha$ .

$$\Delta\omega(t) = \frac{\langle n | \mathbf{H} - \bar{\mathbf{H}} | n \rangle - \langle m | \mathbf{H} - \bar{\mathbf{H}} | m \rangle}{\hbar} \quad (2.47)$$

Здесь  $m$  и  $n$  – уровни энергии, между которыми наблюдается переход. Считается, что вероятность релаксации ядерных спинов во время действия импульсной последовательности мала, так что она не сказывается на изменении ларморовской частоты прецессии электронных спинов (адиабатическое приближение).

Амплитуда спинового эха тогда будет зависеть от временного интервала между импульсами  $\tau$  и адиабатическим вкладом в поперечную релаксацию спинового эха  $R^a$  [Kirilina, 2001]:

$$R_a = \omega_s \frac{g(\theta, \varphi) - \langle g(\theta, \varphi) \rangle}{2} + m_l \frac{(\bar{a} - \langle a \rangle) \langle a \rangle}{|\langle a \rangle|} \quad (2.48)$$

$$R_a = \left( \beta_e B_0 (g_{YY} - g_{ZZ}) + \frac{m_l (A_{YY}^2 - A_{ZZ}^2)}{\sqrt{A_{XX}^2 \sin^2 \theta \cos^2 \varphi + A_{YY}^2 \sin^2 \theta \sin^2 \varphi + A_{ZZ}^2 \cos^2 \theta}} \right) \cdot \sin \theta \cos \theta \sin \varphi \quad (2.49)$$

При расчете значения  $R_a$  для X-диапазона можно пренебречь вкладом от ядерного Зеемановского взаимодействия в гамильтониан. Оставляя только слагаемые, пропорциональные  $\langle \alpha \rangle$ , и отбрасывая более высокие степени получим полное выражение для  $R_a$  в случае быстрых ограниченных либраций

вокруг оси  $x$  молекулярной системы координат. Тогда изменение ларморовской частоты будет пропорционально угловой амплитуде либрационного движения молекулы  $\Delta\omega(t) \approx \Delta\alpha(t)R_a$ .

Как видно из формулы 2.49 релаксация сигнала эха существенно зависит от ориентации нитроксильной спиновой метки в магнитном поле, так что различные участки спектра в разной степени подвержены анизотропной релаксации.

Амплитуда первичного спинового эха тогда будет зависеть от временного интервала между импульсами, среднеквадратичного значения угловой амплитуды и времени корреляции [Erilov, 2004]:

$$v(2\tau) = \exp\left(-2\tau\tau_c R_a^2 \langle \Delta\alpha^2(t) \rangle\right) = \exp(-2\tau W_{\text{аниз.}}) \quad (2.50)$$

Здесь введен параметр анизотропной релаксации  $W_{\text{аниз.}}$ . На рисунке 2.5 приведен расчетный спектр нитроксильного радикала, полученный в рамках модели быстрого либрационного движения вокруг оси  $x$  молекулярной системы.

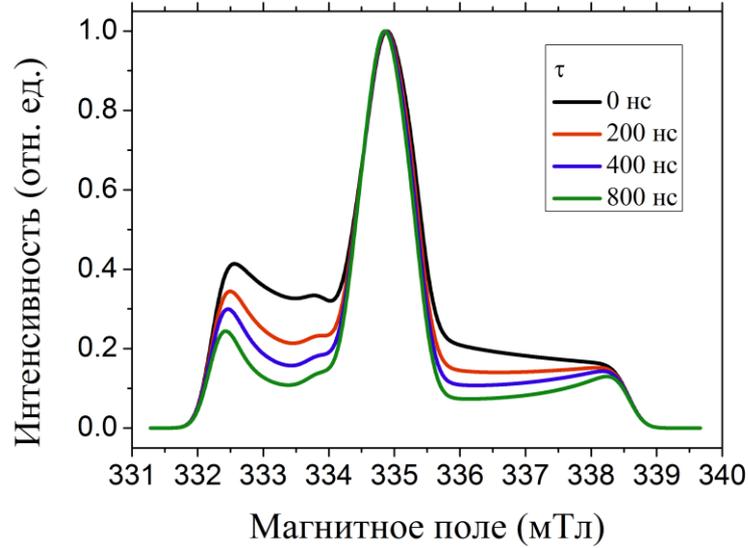


Рисунок 2.5 — Результаты расчета формы спектра ЭПР в X-диапазоне в рамках модели быстрых стохастических либраций вокруг оси  $x$  молекулярной системы координат нитроксильной спиновой метки для различных значений временного интервала между импульсами  $\tau$ . Значение параметра  $\langle \alpha^2 \rangle \tau_c = 10^{-11} \text{ рад}^2 \text{ с}$ . Линии спектров нормированы на интенсивность центральной компоненты спектра. При расчете использовались главные значения тензора СТВ и  $g$ -тензора:  $A_{xx}=0.41 \text{ мТ}$ ,  $A_{yy}=0.39 \text{ мТ}$ ,  $A_{zz}=3.17 \text{ мТ}$ ,  $g_{xx}=2.0089$ ,  $g_{yy}=2.0059$ ,  $g_{zz}=2.0024$ .

## 2.4 Метод модуляции огибающей амплитуды электронного спинового эха

Рассмотрим гамильтониан для модельной системы с электронным спином

$S = \frac{1}{2}$  и ядерным спином  $I = \frac{1}{2}$  [Schweiger, 2006]:

$$H_0 = \omega_S S_z + \omega_I I_z + A S_z I_z + B S_z I_x \quad (2.51)$$

Матрица гамильтониана в лабораторной системе координат выглядит следующим образом:

$$H_0 = \begin{pmatrix} \frac{\omega_s}{2} + \frac{2\omega_l + A}{4} & \frac{B}{4} & 0 & 0 \\ \frac{B}{4} & \frac{\omega_s}{2} - \frac{2\omega_l + A}{4} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -\frac{\omega_s}{2} + \frac{2\omega_l - A}{4} & -\frac{B}{4} \\ 0 & 0 & -\frac{B}{4} & -\frac{\omega_s}{2} + \frac{-2\omega_l + A}{4} \end{pmatrix} \quad (2.52)$$

Диагонализацию матрицы гамильтониана можно осуществить при помощи преобразования  $H_0^{diag} = U_1 H_0 U_1^+$ , где матрицы поворота определяются следующим образом:

$$U_1 = \begin{pmatrix} \cos\left(\frac{\eta_\alpha}{2}\right) & -\sin\left(\frac{\eta_\alpha}{2}\right) & 0 & 0 \\ \sin\left(\frac{\eta_\alpha}{2}\right) & \cos\left(\frac{\eta_\alpha}{2}\right) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \cos\left(\frac{\eta_\beta}{2}\right) & -\sin\left(\frac{\eta_\beta}{2}\right) \\ 0 & 0 & \sin\left(\frac{\eta_\beta}{2}\right) & \cos\left(\frac{\eta_\beta}{2}\right) \end{pmatrix} \quad (2.53)$$

$$\eta_\alpha = \text{arctg}\left(\frac{-B}{A + 2\omega_l}\right) \quad (2.54)$$

$$\eta_\beta = \text{arctg}\left(\frac{-B}{A - 2\omega_l}\right) \quad (2.55)$$

$$\eta = \frac{|\eta_\alpha| + |\eta_\beta|}{2} \quad (2.56)$$

Тогда уровни энергии спиновой системы выражаются следующим образом:

$$E_1 = \frac{\omega_s}{2} + \frac{|\vec{a}_+|}{4} \quad (2.57)$$

$$E_2 = \frac{\omega_s}{2} - \frac{|\vec{a}_+|}{4} \quad (2.58)$$

$$E_3 = -\frac{\omega_s}{2} + \frac{|\vec{a}_-|}{4} \quad (2.59)$$

$$E_4 = -\frac{\omega_s}{2} - \frac{|\bar{a}_-|}{4} \quad (2.60)$$

$$\bar{a}_+ = (B, 2\omega_l + A) \quad (2.61)$$

$$\bar{a}_- = (-B, 2\omega_l - A) \quad (2.62)$$

После диагонализации гамильтониан будет выглядеть следующим образом:

$$H^d = \omega_s S_z + |\bar{a}_+| S^\alpha I_z + |\bar{a}_-| S^\beta I_z = \omega_s S_z + \frac{\omega_+}{2} I_z + \frac{\omega_-}{2} 2S_z I_z, \quad (2.63)$$

$$\text{где } \omega_\alpha = |\bar{a}_\alpha| = \sqrt{\left(\omega_l + \frac{A}{2}\right)^2 + \frac{B^2}{4}}, \quad \omega_\beta = |\bar{a}_\beta| = \sqrt{\left(\omega_l - \frac{A}{2}\right)^2 + \frac{B^2}{4}}, \quad \omega_+ = |\bar{a}_+| + |\bar{a}_-|, \quad \omega_- = |\bar{a}_+| - |\bar{a}_-|.$$

Изначально система находится в тепловом равновесии, это означает, что заселенности уровней распределены согласно распределению Больцмана. Энергия электронного зеемановского взаимодействия значительно больше энергии ядерного зеемановского взаимодействия. Поэтому равновесную матрицу плотности можно записать в следующем виде:

$$\sigma_{\text{равн.}} = \frac{1}{4} \hat{1} - \varepsilon 2S_z = \frac{1}{4} \begin{pmatrix} 1-\varepsilon & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1-\varepsilon & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1+\varepsilon & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1+\varepsilon \end{pmatrix} \quad (2.64)$$

Здесь принимается, что разница населенности между ядерными уровнями энергии незначительна.

$$\exp(iA) = 1 + iA - \frac{A^2}{2!} + i\frac{A^3}{3!} - \frac{A^4}{4!} + \dots \quad (2.65)$$

Поскольку для спиновых операторов в декартовой системе координат выполняется равенство  $S_{x,y}^2 = \frac{1}{4}$ , то операторы поворота будут выглядеть следующим образом:

$$\hat{R}_x(\varphi) = \exp(-i\varphi \hat{S}_x) = \cos(\varphi/2) \hat{1} - 2i \sin(\varphi/2) \hat{S}_x \quad (2.66)$$

$$S_x = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (2.67)$$

$$S_y = \frac{i}{2} \begin{pmatrix} 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (2.68)$$

$$S_z = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} \quad (2.69)$$

Эволюция спиновой системы в промежутках между импульсами происходит под действием не зависящего от времени гамильтониана. В системе собственных функций гамильтониана матрица поворота будет выглядеть следующим образом:

$$\exp(-iH_0 t) = \begin{pmatrix} \exp(-iE_1 t) & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \exp(-iE_2 t) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \exp(-iE_3 t) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \exp(-iE_4 t) \end{pmatrix} \quad (2.70)$$

Через время  $t$  после подачи 90-градусного импульса матрица плотности будет определяться выражением:

$$\sigma(t) = U^+ \exp(-iH_0 t) U R_x \left( \frac{\pi}{2} \right) \sigma_{равн.} R_x^+ \left( \frac{\pi}{2} \right) U^+ \exp(iH_0 t) U \quad (2.71)$$

Амплитуда детектируемого сигнала вдоль различных осей лабораторной системы координат тогда будет выражаться следующими формулами:

$$\langle S_x \rangle = Tr(\sigma(t) S_x) = -\sin(\omega_s t) \left( \cos^2(\eta) \cos\left(\frac{\omega_-}{2} t\right) + \sin^2(\eta) \cos\left(\frac{\omega_+}{2} t\right) \right) \quad (2.72)$$

$$\langle S_y \rangle = Tr(\sigma(t) S_y) = \cos(\omega_s t) \left( \cos^2(\eta) \cos\left(\frac{\omega_-}{2} t\right) + \sin^2(\eta) \cos\left(\frac{\omega_+}{2} t\right) \right) \quad (2.73)$$

$$\langle S_z \rangle = Tr(\sigma(t) S_z) = 0 \quad (2.74)$$

Для двухимпульсной последовательности

$$\begin{aligned} \sigma(t) = & U^+ \exp(-iH_0\tau)UR_x(\pi)U^+ \exp(-iH_0\tau)UR_x\left(\frac{\pi}{2}\right) \times \sigma_{\text{равн.}} \times \\ & \times R_x^+\left(\frac{\pi}{2}\right)U^+ \exp(iH_0\tau)UR_x^+(\pi)U^+ \exp(iH_0\tau)U \end{aligned} \quad (2.75)$$

$$\langle S_x \rangle = Tr(\sigma(t)S_x) = 0 \quad (2.76)$$

$$\begin{aligned} \langle S_y \rangle = & Tr(\sigma(t)S_y) = \\ = & \frac{\varepsilon}{2} \left( -1 + \frac{1}{4} \sin^2(2\eta) \left( 2 - 2\cos(\omega_\alpha\tau) - 2\cos(\omega_\beta\tau) + \cos(\omega_+\tau) + \cos(\omega_-\tau) \right) \right) \end{aligned} \quad (2.77)$$

$$\langle S_z \rangle = Tr(\sigma(t)S_z) = 0 \quad (2.78)$$

Здесь  $\tau$  — временной интервал между двумя СВЧ импульсами.

Соответственно для последовательности стимулированного эха, состоящего из трех СВЧ импульсов:

$$\begin{aligned} \sigma(t) = & U^+ \exp(-iH_0\tau)UR_x\left(\frac{\pi}{2}\right)U^+ \exp(-iH_0\tau)UR_x\left(\frac{\pi}{2}\right)U^+ \exp(-iH_0\tau)UR_x\left(\frac{\pi}{2}\right) \times \\ & \times \sigma_{\text{равн.}} R_x^+\left(\frac{\pi}{2}\right)U^+ \exp(iH_0\tau)UR_x^+\left(\frac{\pi}{2}\right)U^+ \exp(iH_0\tau)UR_x^+\left(\frac{\pi}{2}\right)U^+ \exp(iH_0\tau)U \end{aligned} \quad (2.79)$$

$$\begin{aligned} \langle S_x \rangle = & \frac{\varepsilon}{2} \sin^2(2\eta) \sin(\Omega_s\tau) \cos(\Omega_s\tau) \cdot \\ & \cdot \left( \sin^2\left(\frac{\omega_\beta}{2}\tau\right) \cos(\omega_\alpha(T+\tau)) + \sin^2\left(\frac{\omega_\alpha}{2}\tau\right) \cos(\omega_\beta(T+\tau)) \right) \end{aligned} \quad (2.80)$$

$$\begin{aligned} \langle S_y \rangle = & \frac{\varepsilon}{2} \sin^2(2\eta) \sin^2(\Omega_s\tau) \cdot \\ & \cdot \left( \sin^2\left(\frac{\omega_\beta}{2}\tau\right) \cos(\omega_\alpha(T+\tau)) + \sin^2\left(\frac{\omega_\alpha}{2}\tau\right) \cos(\omega_\beta(T+\tau)) \right) \end{aligned} \quad (2.81)$$

$$\langle S_z \rangle = 0 \quad (2.82)$$

Здесь  $\tau$  — временной интервал между первым и вторым СВЧ импульсами,  $T$  — временной интервал между вторым и третьим импульсами.

Амплитуда модуляций тогда будет выражаться следующим образом:

$$\begin{aligned} V(\tau, T) = & 1 - \frac{\sin^2(2\eta)}{4} \cdot \\ & \cdot \left( \left( (1 - \cos(\omega_\beta\tau))(1 - \cos(\omega_\alpha(\tau+T))) \right) + \left( (1 - \cos(\omega_\alpha\tau))(1 - \cos(\omega_\beta(\tau+T))) \right) \right) \end{aligned} \quad (2.83)$$

Множитель  $\frac{\sin^2(2\eta)}{4}$  определяет глубину модуляции электронного спинового эха.

Этот множитель зависит от величины ядерного Зеемановского взаимодействия и величины СТВ:

$$k = \sin(2\eta) = \frac{B\omega_I}{\omega_\alpha\omega_\beta} \quad (2.84)$$

В случае когда величина электрон-ядерного взаимодействия достаточно мала по сравнению с величиной ядерного Зеемановского взаимодействия формула 2.83 упрощается:

$$\sin(2\eta) \approx \frac{B}{\omega_I} \quad (2.85)$$

Модуляции амплитуды спинового эха исчезают при очень слабом СТВ, при ориентации внешнего постоянного магнитного поля вдоль одной из главных осей молекулярной системы координат.

Модуляции исчезают также при определенных значениях промежутка между первым и вторым импульсами.

$$\tau = \frac{2\pi n}{\omega_{\alpha,\beta}} \quad (2.86)$$

Амплитуда модуляций максимальна при промежутках

$$\tau = \frac{2\pi}{\omega_{\alpha,\beta}} \left( \frac{1}{2} + n \right) \quad (2.87)$$

Ядерная зеемановская частота протонов в полях, используемых в X-диапазоне  $\nu_{1H} = 14.5$  МГц. Для ядер дейтерия эта частота будет равна  $\nu_{2H} = 2.2$  МГц. Таким образом, протонные модуляции ЭСЭ должны проявлять себя минимальным образом при  $\tau \approx 69, 138, 207, 276, 344 \dots$  нс. Для атома фосфора модуляции будут максимально проявляться при  $\tau \approx 83, 250, 417 \dots$  нс.

### **Глава 3. Исследование профиля проникновения глицерина внутрь модельной липидной мембраны**

Одним из наиболее часто встречающихся в живой природе криопротекторов является глицерин. Благодаря малой токсичности водно-глицериновые растворы также используются в сельском хозяйстве для криосохранения клеток и эмбрионов животных [Виганаампуау, 2011]. На данный момент известно, что глицерин способен проникать внутрь клетки и его эффективность как криопротектора связывают с действием глицерина не только в межклеточной среде, но и во внутриклеточной жидкости [Ramlov, 2000, Storey, 1986, Westh, 2003].

Хотя факт проникновения глицерина сквозь клеточную мембрану уже был установлен экспериментально, вопрос о механизме прохождения глицерина сквозь мембрану остается открытым. Пассивное прохождение сквозь мембрану в результате диффузии считается наиболее вероятным способом прохождения для таких малых полярных молекул [Walter, 1986]. Однако, в клетках также были обнаружены специальные каналы, по которым глицерин может проходить сквозь мембрану [Abrami, 1995, Paula, 1996, Wang, 2005].

На сегодняшний день известно, что криозащитное действие глицерина сводится к следующим факторам. Во-первых, глицерин мешает кристаллизации межклеточной и внутриклеточной жидкости. Известно, что основным повреждающим клетку действием при замораживании является кристаллизация окружающей мембрану жидкости. Водно-глицериновые растворы при определенной концентрации не кристаллизуются, а стеклуются, что значительно уменьшает повреждающее действие низких температур [Banerjee, 2009, Li, 2008]. Также благодаря стеклованию молекулы воды остаются связанными с клеточной мембраной, что позволяет сохранить ее структуру. Во-вторых, глицерин способен препятствовать повышению температуры главного фазового перехода. Известно, что мембрана способна выполнять свои физиологические

функции только находясь в жидкокристаллической фазе [Геннис, 1997]. Считается, что глицерин способен встраиваться между полярными группами молекул липидов, таким образом блокируя переход в гелевую фазу [Williams, 1991].

Задача получения профиля проникновения различных веществ внутрь липидной мембраны исследовалась с помощью методов рентгеноструктурного анализа [Lee, 2004], молекулярной динамики [Henin, 2008], ЯМР спектроскопии [Brown, 1982]. Существует метод исследования профиля проникновения некоторых полярных молекул внутрь мембраны с помощью ЭПР, основанный на определении полярности среды в окрестности спиновой метки [Kurad, 2003]. Как известно, компоненты тензора СТВ  $A_{zz}$  и g-тензора  $g_{xx}$  спиновой метки чувствительны к полярности среды [Marsh, 2010]. Полярные молекулы образуют водородные связи с N-O группой спиновой метки и, таким образом, изменяют параметры магнитной анизотропии радикала, что приводит к изменению формы линии спектра ЭПР. Величины этих изменений определялись аппроксимацией формы линии стационарного спектра ЭПР. Метод определения полярности, основанный на изменении компоненты g-тензора  $g_{xx}$ , дает более точные результаты при использовании высокочастотного ЭПР, поскольку в этом случае достигается лучшее разрешение линий спектра [Dzikovski, 2012].

Спектроскопия электронного спинового эха обладает большими возможностями по сравнению со стационарными методами применительно к решению задачи получения профиля проникновения молекул. Метод огибающей модуляции электронного спинового эха (раздел 2.4) может быть применен к решению этой задачи. Применение этого метода к исследованию проникновения молекул внутрь липидного бислоя основано на детектировании магнитного взаимодействия между электронным спином нитроксильной метки и ядерными спинами атомов дейтерия исследуемой молекулы. По глубине модуляции электронного спинового эха можно определить локальную концентрацию атомов дейтерия вблизи нитроксильной спиновой метки, и, следовательно,

концентрацию любой дейтерированной молекулы. Энергия электрон-ядерного взаимодействия быстро уменьшается с расстоянием, поэтому эффективный радиус данного метода ограничен 0.5 нм [Carmieli, 2006, Milov, 2008]. Ранее метод модуляции огибающей электронного спинового эха позволил получить информацию о профиле проникновения дейтерированной воды внутрь клеточной мембраны [Egilov, 2004, Syryamina, 2012].

Для исследования профиля проникновения какой-либо молекулы внутрь мембраны методом спинового эха необходимо приготовить серию образцов, содержащих фосфолипиды, к которым спиновая метка прикреплена в различных положениях по всей длине ацильной цепи. Тогда амплитуда модуляции будет соответствовать локальной концентрации дейтерированной молекулы около определенного положения спиновой метки.

В X-диапазоне (частота СВЧ излучения 9,4 ГГц) ларморовская частота прецессии ядерных спинов атомов дейтерия равна 2.2 МГц, в то время как частота прецессии протонов в этом же диапазоне около 14.5 МГц. Поэтому замещение протонов на атомы дейтерия позволяет отличать сигнал молекул исследуемого вещества от сигнала протонов окружения.

В этой главе описано применение метода модуляции огибающей электронного спинового эха к исследованию процесса проникновения глицерина внутрь модельной клеточной мембраны. Для сравнения также были проведены исследования с использованием дейтерированной воды.

### 3.1 Исследуемые образцы

Для проведения исследований создавалась модельная мембрана из молекул фосфолипида 1,2-дипальмитоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) и молекул спин-меченого фосфолипида 1-пальмитоил-2-(n-ДОКСИЛ)-стероил-sn-глицеро-3-фосфохолин (n-ПСФХ, n = 5, 7, 10, 12, 14, 16), где n — номер атома углерода вдоль ацильной цепи, к которому прикреплялась спиновая метка

ДОКСИЛ (рисунок 3.1). Также были проведены исследования с использованием липида 2-олеоил-1-пальмитоил-sn-глицеро-3-фосфо(ТЕМПО)холин (ОПФХ), в котором спиновая метка прикреплена к полярной части липида.

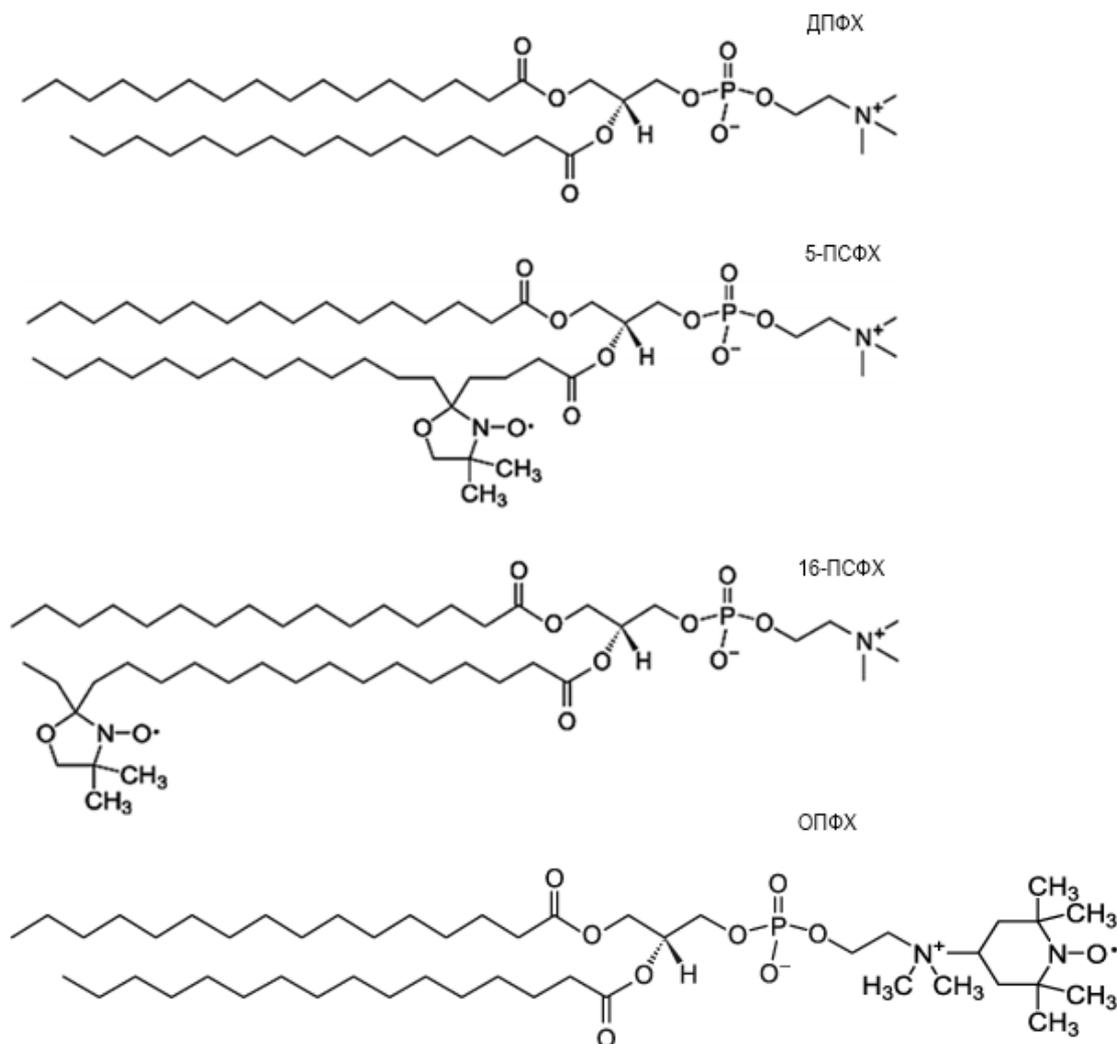


Рисунок 3.1 — Структура молекул фосфолипидов ДПФХ, 5- ПСФХ, 16- ПСФХ, ОПФХ.

Липиды n-ПСФХ и ДПФХ смешивались в молярном отношении 1:100 и растворялись в хлороформе. Растворитель выпаривался потоком газообразного азота, затем удалялся выдерживанием под вакуумом  $10^{-3}$  бар в течение 12 часов. Полученные образцы в течение 4 часов гидратировались либо дейтерированной водой, либо раствором воды и дейтерированного глицерина 1 к 1 по объему, что соответствует концентрации глицерина 6.85 моль/л. Далее образцы

выдерживались в течение 24 часов при температуре 5 °С для лучшей локализации спиновых меток (раздел 2.1). Непосредственно перед проведением измерений образцы замораживались путем помещения в жидкий азот.

Для проведения измерений использовался спектрометр Bruker Elexsys E580 с резонатором ER 4118 X-MS3 и криостатом CF935. Добротность резонатора была уменьшена с целью уменьшить «звон» резонатора. Длительность СВЧ-импульсов составляла 16 нс, амплитуда — около 6 Гс. Использовалась трехимпульсная последовательность стимулированного спинового эха  $\pi/2-\tau-\pi/2-T-\pi/2-\tau-\text{эхо}$  с 4-шаговым фазовым циклом (раздел 2.4). Временной интервал  $T$  сканировался от 248 нс до 12 мкс с шагом 12 нс, интервал  $\tau$  не изменялся и устанавливался равным 200 нс. Для наблюдения модуляций огибающей амплитуды электронного спинового эха от атомов фосфора временной интервал  $\tau$  устанавливался равным 250 нс. Измерения проводились в магнитном поле, соответствующем центральной компоненте спектра ЭПР (рисунок 3.2).

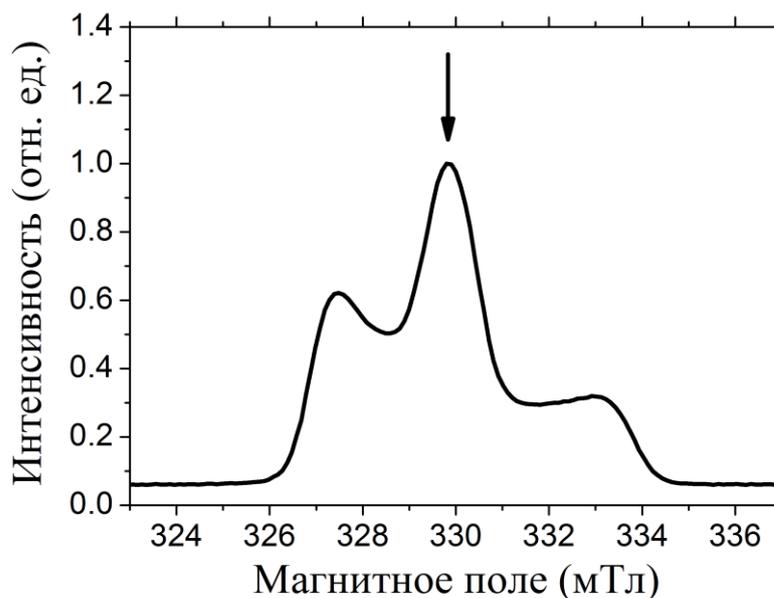


Рисунок 3.2 — Спектр нитроксильного радикала ДОКСИЛ полученный с помощью электронного спинового эха при температуре 80 К. Стрелкой показана компонента спектра, соответствующая магнитному полю, при котором проводился эксперимент.

Эксперименты проводились при температуре 80 К. Охлаждение осуществлялось потоком жидкого азота. Температура поддерживалась с точностью  $\pm 0.5$  К температурным контроллером Bruker VT4131.

На рисунке 3.3 показаны этапы математической обработки экспериментальных данных, которая заключалась в следующем:

1. Спад сигнала эха аппроксимировался биэкспоненциальной функцией

$$\langle V(T) \rangle = A_0 + A_1 \exp\left(-\frac{T}{T_1}\right) + A_2 \exp\left(-\frac{T}{T_2}\right) \quad (3.1)$$

Здесь  $T$  — сканируемое время,  $T_1$ ,  $T_2$  — параметры аппроксимации, характеристические времена спада сигнала ЭСЭ (рисунок 3.3а).

2. Кинетики спада делились на функцию аппроксимации (рисунок 3.3б). Из результата деления вычиталась единица:

$$V_N(T) = \frac{V(T)}{\langle V(T) \rangle} - 1 \quad (3.2)$$

3. К результату применялось амплитудное Фурье-преобразование (рисунок 3.3в)

$$F(f) = \left| \int_{t_1}^{t_2} V_N(T) \exp(-2\pi if(T + \tau)) dT \right| \quad (3.3)$$

4. Для каждого из образцов вычислялась амплитуда линии в Фурье-спектре.

Амплитуда линии дейтерной модуляции полученных Фурье-спектров соответствует величине локальной концентрации дейтерированного глицерина в окрестности спиновой метки.

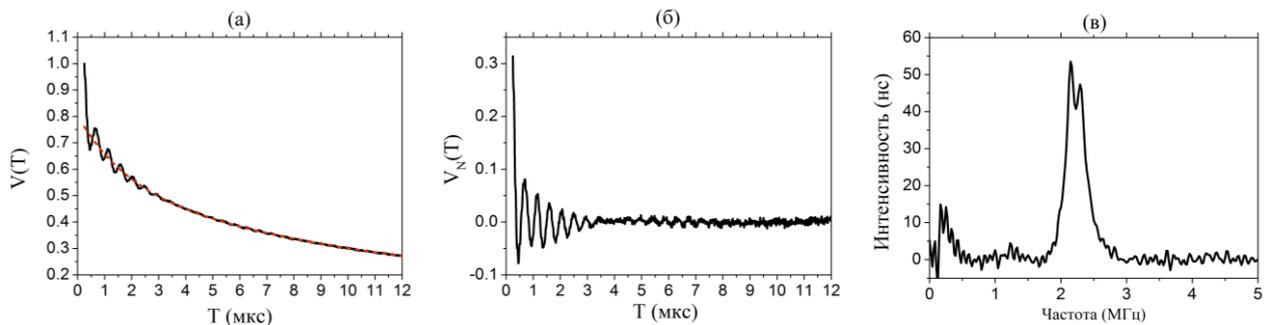


Рисунок 3.3 — (а) Сигнал модуляции огибающей амплитуды электронного спинового эха и линия аппроксимации биэкспоненциальной функцией. (б) Сигнал модуляции огибающей амплитуды электронного спинового эха после математической обработки. Модуляции соответствуют ларморовской частоте прецессии ядерных спинов дейтерия. (в) Амплитудный Фурье-спектр частот модуляции электронного спинового эха.

## 3.2 Экспериментальные результаты

### 3.2.1 Спектры частот модуляций огибающей ЭСЭ

Модуляции огибающей линии сигнала электронного спинового эха при сканировании временного интервала  $T$  для липидов, спин-меченых в различных положениях изображены на рисунке 3.4. На рисунке 3.5 показаны Фурье-спектры, получаемые после математической обработки и Фурье-преобразования сигнала модуляции огибающей амплитуды ЭСЭ.

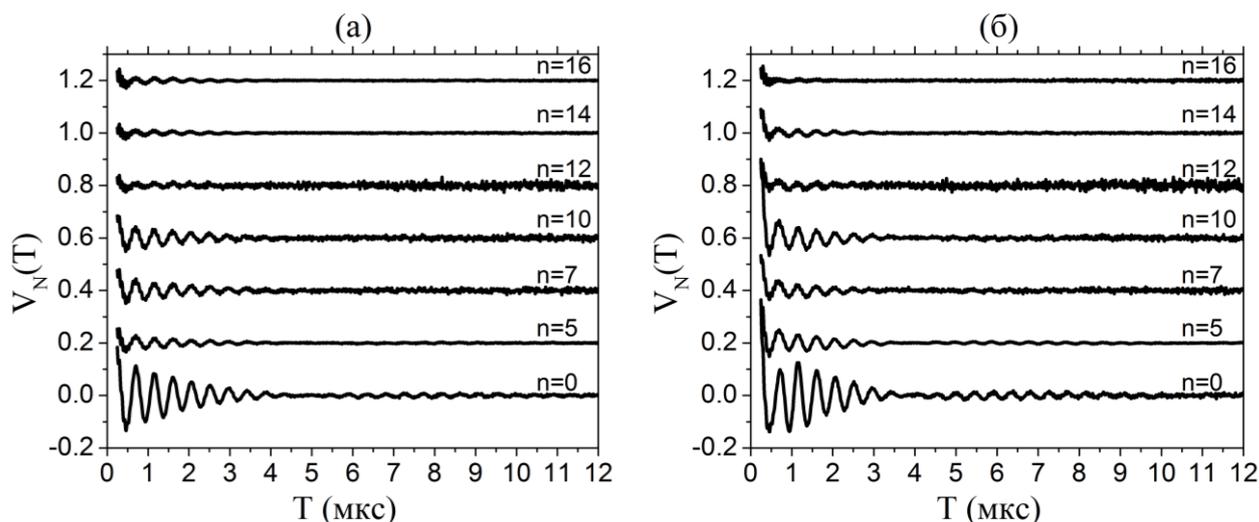


Рисунок 3.4 — Модуляции огибающей сигнала электронного спинового эха для образцов, гидратированных водой (а) и водно-глицериновым раствором (б). Положения спиновой метки в фосфолипиде *n*-ПСФХ соответствует значениям  $n=5, 7, 10, 12, 14, 16$ . Образцы с использованием спин-меченного фосфолипида ОПФХ отмечены как  $n=0$ .

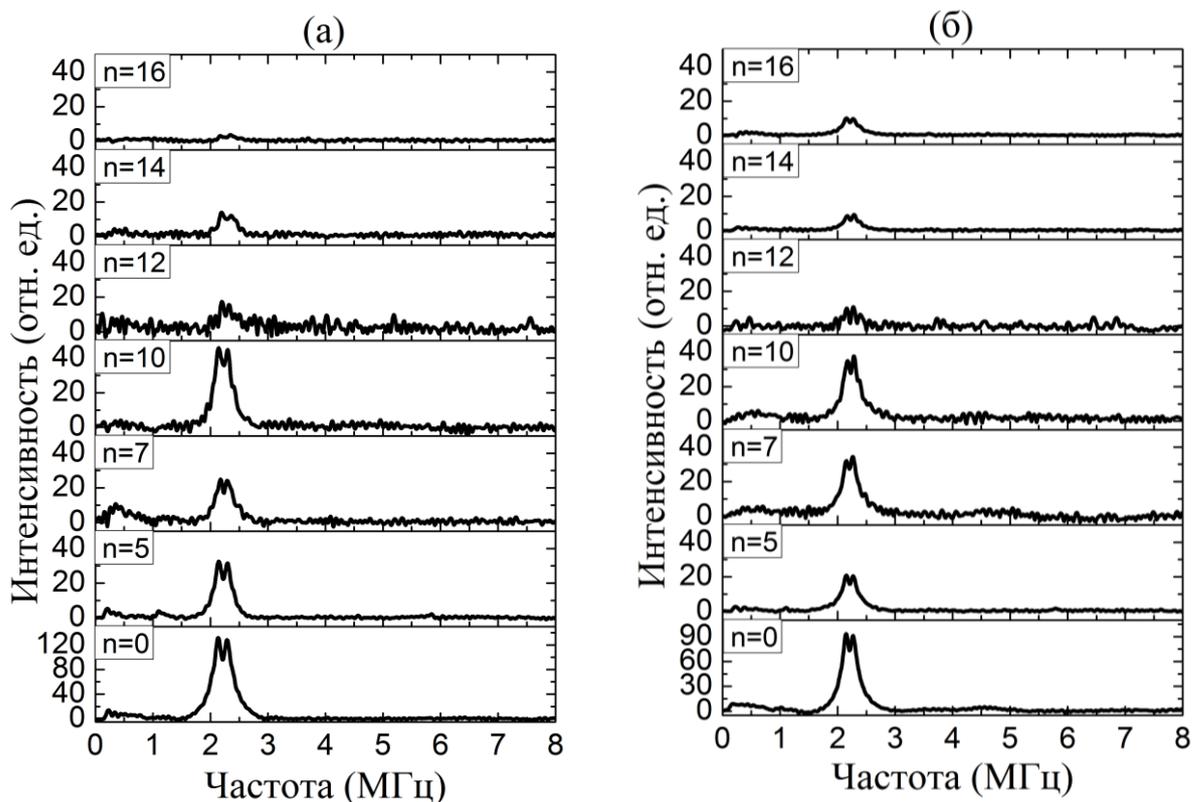


Рисунок 3.5 — Амплитудные Фурье-спектры огибающей сигнала электронного спинового эха для образцов, гидратированных дейтерированной водой (а) и водным раствором глицерина (б). Положения спиновой метки в фосфолипиде *n*-ПСФХ соответствует значениям  $n=5, 7, 10, 12, 14, 16$ . Образцы с использованием спин-меченного фосфолипида ОПФХ отмечены как  $n=0$ .

### 3.2.2 Градуировка методики

Для градуировки экспериментальной методики были проведены эксперименты с использованием спинового зонда ТЕМПОЛ (рисунок 3.6) в водно-глицериновых растворах различной концентрации. Были записаны кинетики модуляции амплитуды огибающей ЭСЭ при различных концентрациях дейтерированного глицерина (рисунок 3.7). При исследованных концентрациях водно-глицериновые растворы при замораживании образовывали прозрачное стекло. Из анализа амплитуды модуляции можно найти, что коэффициент пропорциональности между концентрацией и амплитудой спектра сигнала ЭСЭ равен  $k = 0.031 \pm 0.002 \frac{\text{моль}}{\text{л}}$ .

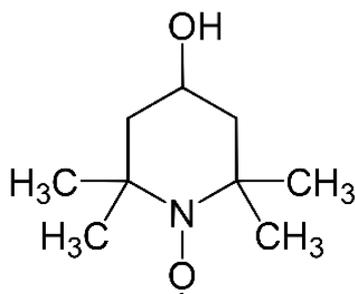


Рисунок 3.6 — Структура радикала ТЕМПОЛ

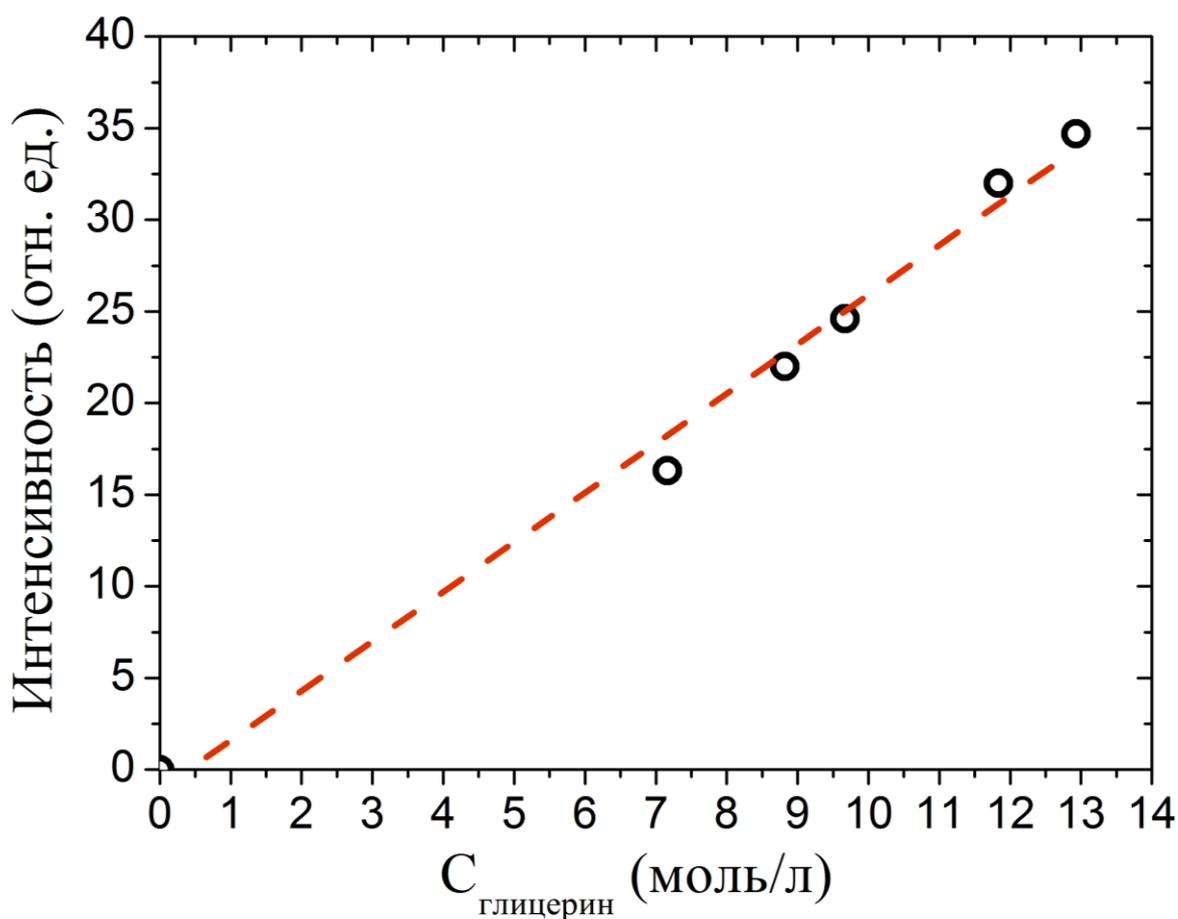


Рисунок 3.7 — Амплитуда линии Фурье-спектра модуляции огибающей сигнала ЭСЭ в зависимости от концентрации дейтерированного глицерина в водно-глицериновом растворе.

Пунктирная линия – результат аппроксимации прямой линией.

### 3.2.3 Локализация спиновых меток

При использовании молекулярных зондов для исследования структуры, полярности и текучести липидных мембран необходимо учитывать, что молекулярные зонды локально вносят возмущение в структуру мембраны. Кроме того, не всегда ясно в каком участке мембраны на самом деле находится зонд. Сомнения относительно корректности результатов, получаемых с помощью спин-меченных липидов появились с самого начала использования этого метода [Cadenhead, 1975]. Отчасти эти сомнения могут быть развеяны, если удастся определить положение спиновой метки относительно некоторой точки, положение которой достаточно жестко связано с мембраной. Такой точкой

может быть выбран атом фосфора, входящий в состав молекул фосфолипидов. Методами компьютерного моделирования показано, что атомы фосфора имеют достаточно узкую пространственную функцию распределения. Таким образом, поверхность, образованную атомами фосфора, можно условно считать поверхностью мембраны [Skibinski, 2005]. Расстояние между спиновой меткой и поверхностью мембраны можно оценить, используя метод модуляции огибающей электронного спинового эха. Естественное содержание изотопа атома фосфора со спином  $1/2$  составляет 100%, что обеспечивает хороший уровень сигнала. На рисунке 3.8 показан Фурье-спектр образца, содержащего спин-меченный фосфолипид ОПФХ, полученный из времяразрешенного сигнала электронного спинового эха. На рисунке хорошо видны линии, соответствующие взаимодействию спиновой метки с ядрами атомов азота (1 МГц), ядрами атомов фосфора (6 МГц) и ядрами атомов водорода (14 МГц).

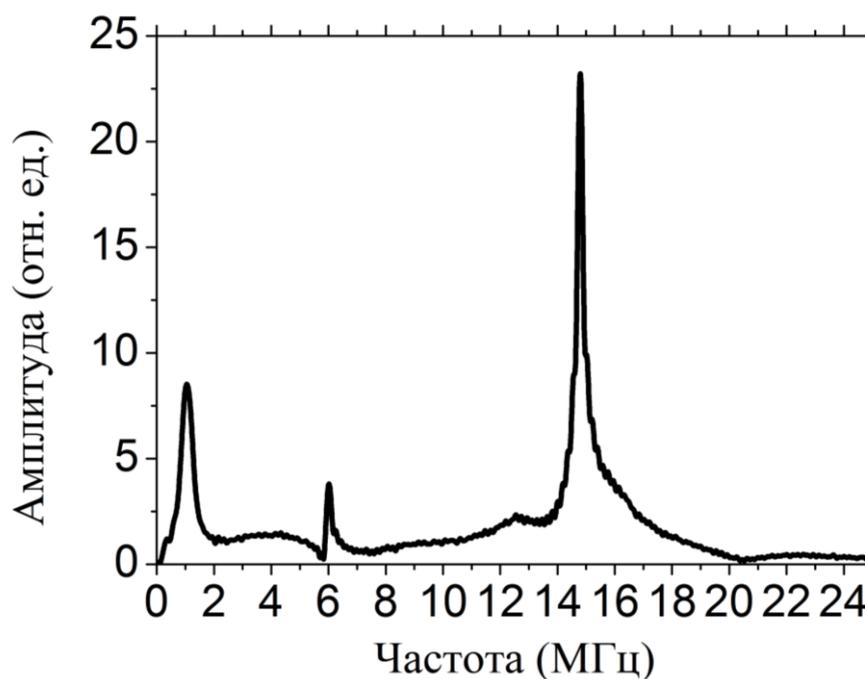


Рисунок 3.8 — Фурье спектр модуляции огибающей амплитуды электронного спинового эха образца, содержащего спин-меченный фосфолипид ОПФХ.

Серия образцов исследовалась дважды — в первом случае образцы путем продолжительного нагрева выше температуры главного фазового перехода

(42 °C) переводились в жидкокристаллическую фазу (см. параграф 1.5), а затем охлаждались путем помещения в жидкий азот. Во втором случае те же самые образцы переводились в суб-гелевую фазу путем выдерживания при температуре 5 °C в течении 12 часов, затем также охлаждались жидким азотом.

На рисунке 3.9 представлена зависимость амплитуды фосфорной линии Фурье-спектра от положения спиновой метки. Видны существенные отличия для образцов со спиновыми метками в 12, 14 и 16 положениях при разных протоколах заморозки. При заморозке образцов, находящихся в жидкокристаллической фазе, амплитуда фосфорной линии Фурье-спектра остается значительной. Это означает, что в среднем спиновые метки расположены достаточно близко к атомам фосфора и к поверхности мембраны. При заморозке образцов, находящихся в суб-гелевой фазе, амплитуда фосфорной линии Фурье-спектра падает до нуля. Это означает, что спиновые метки локализируются в глубине мембраны за пределами эффективного радиуса используемого метода. Таким образом, перевод липидной мембраны в суб-гелевую фазу способствует лучшей локализации спиновых меток.

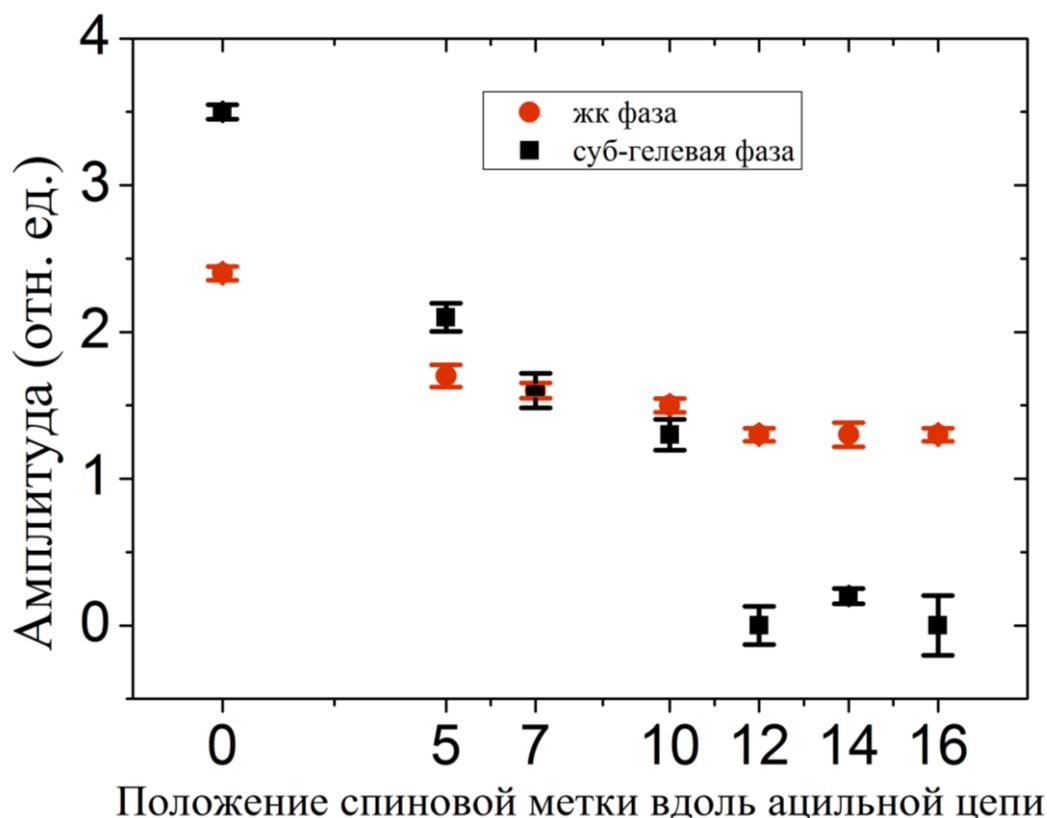
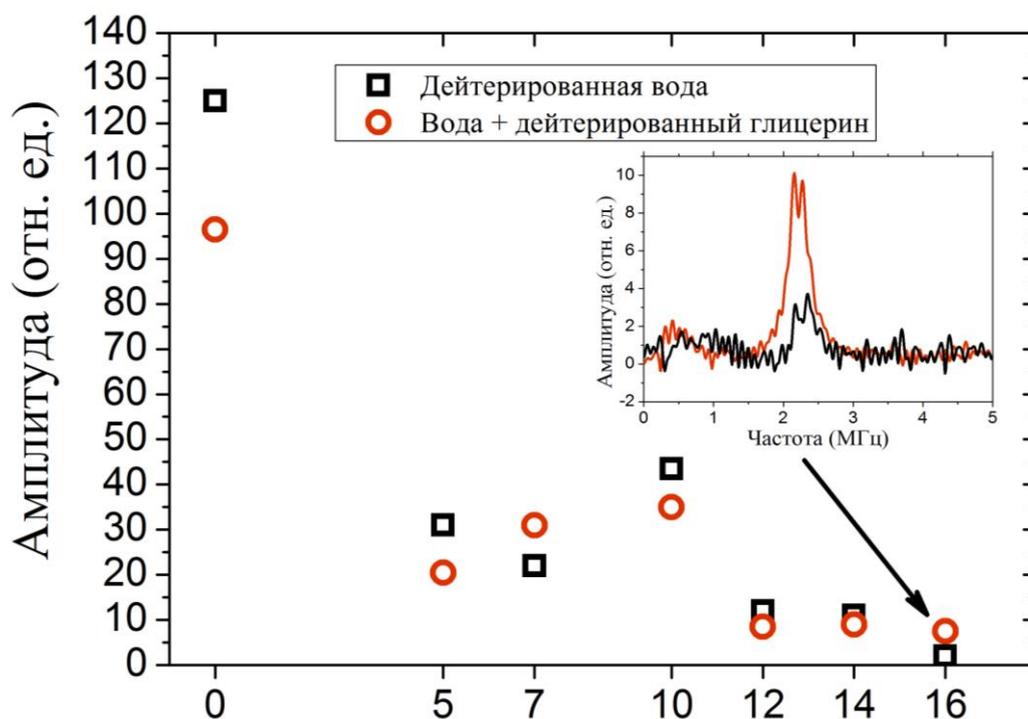


Рисунок 3.9 — Амплитуда фосфорной линии Фурье спектра для образцов с различным положением спиновой метки. Образцы перед заморозкой находились либо в жидкокристаллической фазе (●), либо в суб-гелевой фазе (■).

### 3.3 Обсуждение результатов

На рисунке 3.5 можно заметить выраженный пик на частоте 2.2 МГц, который соответствует резонансной частоте ядер дейтерия при величине магнитного поля около 340 мТл. Пик расщеплен на дублет за счет квадрупольного взаимодействия с ядерным спином дейтерия [Milov, 2008]. Поскольку амплитуда дейтерной линии Фурье-спектра пропорциональна локальной концентрации дейтерно-замещенных молекул около спиновой метки, зависимость амплитуды модуляции от глубины положения спиновой метки (рисунок 3.10) отражает профиль проникновения молекул внутрь клеточной мембраны.



Положение спиновой метки вдоль ацильной цепи

Рисунок 3.10 — Профиль проникновения воды (□) и глицерина (○) внутрь модельной клеточной мембраны. Положения спиновой метки в фосфолипиде n-ПСФХ соответствует значениям n=5, 7, 10, 12, 14, 16. Спин-меченный фосфолипид ОПФХ соответствует n=0. По оси ординат отложена амплитуда дейтерной линии в наносекундах. Вставка: Фурье-спектры модуляции огибающей амплитуды ЭСЭ для образца 16-ПСФХ, гидратированного в воде и водно-глицериновом растворе.

Из рисунка 3.10 видно, что для образцов, спин-меченых в 16 положении и гидратированных водой, амплитуда дейтерной линии сравнима с уровнем шумов. Это свидетельствует о том, что молекулы воды не проникают в центр мембраны. В то же время для таких же образцов, но гидратированных в растворе дейтерно-замещенного глицерина амплитуда значительно выше уровня шумов. Этот результат показывает, что в центре мембраны находится значительная концентрация глицерина, что не противоречит гипотезе диффузионного прохождения глицерина сквозь мембрану.

Используя коэффициент  $k = 0.031 \pm 0.002 \frac{\text{моль}}{\text{л} \cdot \text{нс}}$ , полученный из градуировочных данных (рисунок 3.7), можно получить локальную концентрацию молекул глицерина и воды на различной глубине внутри мембраны (рисунок 3.11).

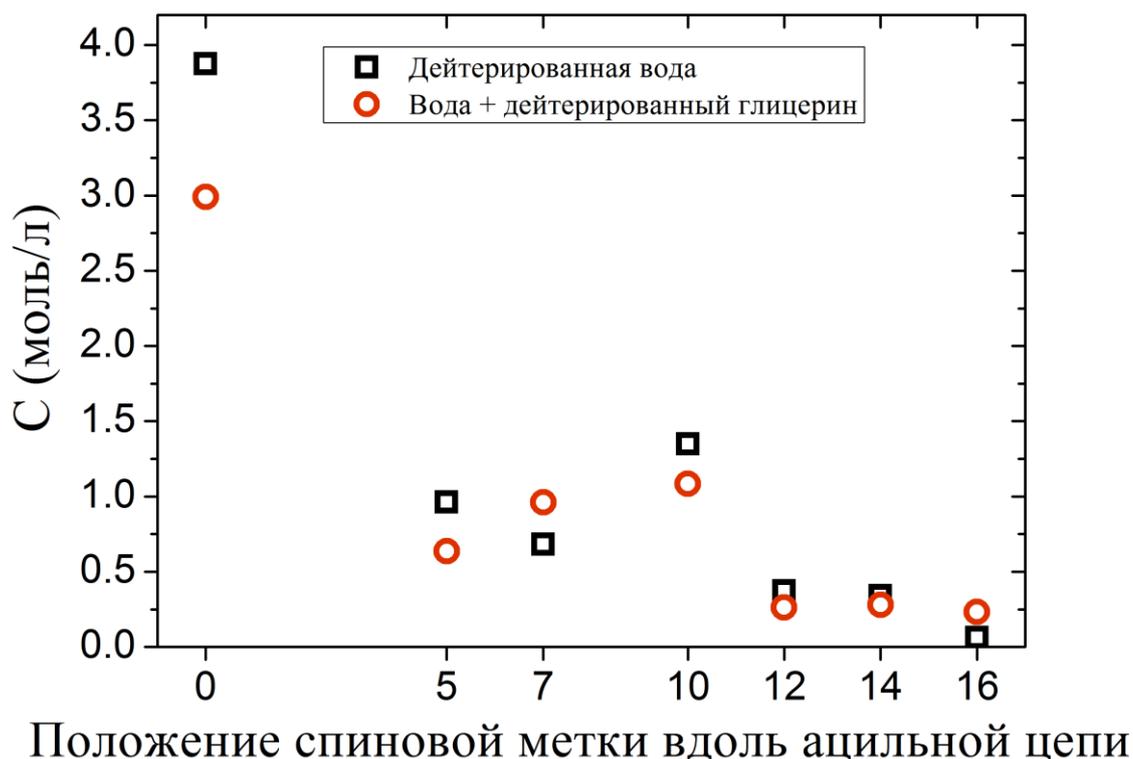


Рисунок 3.11 — Профиль проникновения воды (□) и глицерина (○) внутрь модельной клеточной мембраны. Положения спиновой метки в фосфолипиде п-ПСФХ соответствует значениям  $n=5, 7, 10, 12, 14, 16$ . Спин-меченный фосфолипид ОПФХ соответствует  $n=0$ . По оси ординат отложена концентрация воды и глицерина соответственно.

Можно заметить, что амплитуда модуляции для дейтерированной воды и для дейтерированного глицерина имеет максимум в 10-м положении спиновой метки. Данные ЯМР и молекулярной динамики свидетельствуют о том, что после 10-го атома углерода липидные цепи оказываются спутанными, что может служить дополнительным барьером для прохождения молекул. В то же время

около 10 атома углерода липидный бислой имеет наибольшую пространственную свободу, что приводит к накоплению там большого количества молекул глицерина и воды [Petrache, 2000].

### **3.4 Выводы по главе 3**

Основным результатом проделанной работы является получение профиля проникновения глицерина внутрь модельной липидной мембраны. Амплитуда модуляций спинового эха для образцов, гидратированных водно-глицериновой смесью, слабо отличается от амплитуды для образцов, гидратированных водой, для всех положений спиновой метки, кроме 16 положения, для которого амплитуда в случае гидратации водой близка к нулю, а в случае гидратации водно-глицериновой смесью существенно выше нуля. Полученные данные согласуются с гипотезой диффузионного прохождения глицерина сквозь липидную мембрану.

## **Глава 4. Взаимодействие молекул сахарозы и трегалозы с модельной липидной мембраной**

Сахариды известны как широко распространенные природные криопротекторы. Среди них выделяют дисахариды сахарозу и трегалозу, поскольку они наиболее сильно проявляют криозащитную активность [Fuller, 2004].

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

Как известно, вода, находящаяся на поверхности мембраны, играет главную роль в стабилизации структуры бислоя (см. раздел 1.1). В последние десятилетия в ходе проведения экспериментальных работ и обсуждения их результатов было выдвинуто две гипотезы [Andersen, 2011]. Первая объясняет криозащитное действие дисахаридов прямым взаимодействием молекул дисахаридов и клеточной мембраны посредством образования множества водородных связей. При этом вода вытесняется с поверхности мембраны и заменяется дисахаридами, и поэтому эта гипотеза была названа гипотезой вытеснения воды [Clegg, 1982, Crowe, 1988]. Существует множество исследований, подтверждающих вытеснение воды с поверхности мембраны моно- и дисахаридами [Andersen, 2011, Crowe, 1987, 1986, Golovina, 2010]. Гипотеза вытеснения воды опирается на тот факт, что некоторые полярные молекулы, например, диметилсульфоксид и дисахариды, могут

электростатически взаимодействовать с молекулами липидов. Предполагается, что при этом происходит вытеснение воды с поверхности липидной мембраны, а молекулы криопротекторов образуют водородные связи с полярными фрагментами фосфолипидов. С помощью ИК-спектроскопии было показано, что 3 молекулы трегалозы способны вытеснить 11-14 молекул воды на липид, при этом 4 молекулы воды может быть вытеснено из-за изменения свойств межклеточной жидкости и еще 7-10 за счет прямого взаимодействия дисахарида с мембраной. Предполагается, что трегалоза связывается преимущественно с карбонильной группой фосфолипида. В то же время сахароза вытесняет только три молекулы воды, и не установлено преимущественное связывание сахарозы с определенными частями липида [Luzardo, 2000].

Вторая гипотеза предполагает взаимодействие молекул дисахаридов с молекулами воды сольватной оболочки клеточной мембраны и белков. При этом изменяются физико-химические свойства сольватной оболочки, такие как вязкость и подвижность молекул воды [Belton, 1994, Cottone, 2002, Lins, 2004, Xie, 1997]. Эту гипотезу еще называют гипотезой вытеснения дисахаридов (см. раздел 1.2).

Криозащитное действие дисахаридов проявляется несколькими способами. Результаты некоторых исследований свидетельствуют о том, что молекулы трегалозы способны встраиваться между липидами, увеличивая таким образом площадь поверхности мембраны [Viera, 1993]. Считается, что благодаря этому понижается температура главного фазового перехода липидной мембраны, что важно для сохранения целостности клетки [Ricker, 2003, Tsvetkov, 1989]. Было показано, что липидная мембрана за счет прямого взаимодействия с молекулами дисахаридов способна сохранять свою структуру даже при полном удалении воды с поверхности мембраны в результате высушивания или замораживания [Donnamaria, 1994, Ortiz, 2011]. В работе [Aranda, 2007] методами дифференциальной сканирующей калориметрии и ИК-спектроскопии было исследовано изменение температуры фазового перехода для фосфолипидов

ДПФХ, ДМФХ и дистероилфосфатидилхолина (ДСФХ) в присутствии трегалозы. Было показано, что температура фазового перехода из жидкокристаллического в гелевое состояние может уменьшаться на 5-10 °С при увеличении количества молекул трегалозы до 0,3 на молекулу липида. В работе [Crowe, 1988] исследовалось изменение температуры фазового перехода для моноламелярных везикул, составленных из молекул ДПФХ и пальмитоил-2-олеоил-глицерофосфохолин (ПОФХ), высушенных в присутствии трегалозы. Методами дифференциальной сканирующей калориметрии было установлено, что температура фазового перехода для ДПФХ изменяется с 80 °С до 42 °С при повышении концентрации трегалозы до 1,5 молекулы на молекулу липида. Для ПОФХ температура фазового перехода уменьшается с 57 °С до -23 °С при концентрации трегалозы 2,15 молекулы на молекулу липида. В работе [Lenné, 2007] исследовалась зависимость температуры главного фазового перехода фосфолипида ДПФХ в зависимости от степени гидратации и соотношения количества молекул сахарозы или глюкозы к количеству молекул фосфолипида. Было установлено, что при дегидратации модельной мембраны присутствие сахаридов уменьшает температуру главного фазового перехода с 70 °С до 44 °С (температура фазового перехода полностью гидратированной мембраны ДПФХ 42 °С). Таким образом сахароза при концентрации 0.6 молекул сахарозы на молекулу липида способна практически полностью компенсировать негативный эффект дегидратации. Известно, что переход из жидкокристаллической фазы в гелевую может приводить к повреждению клетки [Crowe, 1989, Drobnis, 1993, Lin, 2014]. Таким образом, значительное уменьшение температуры фазового перехода служит одним из механизмов криозащитного действия сахаридов.

В работах [Lenne, 2006, 2009] было подтверждено уменьшение температуры фазового перехода мембраны ДПФХ в присутствии дисахаридов, однако этот эффект был объяснен без отсылок к гипотезе вытеснения воды. Методом рассеяния рентгеновских лучей было установлено, что площадь, приходящаяся на одну молекулу фосфолипида, не изменяется с увеличением

концентрации сахарозы в модельной системе. Предполагается, что переход из жидкокристаллической в гелевую фазу происходит из-за возрастающего давления на мембрану, вызванного взаимодействием различных мембран. Молекулы сахаридов за счет изменения осмотических свойств препятствуют взаимодействию мембран друг с другом и, таким образом, избавляют мембрану от избыточного давления, которое и приводит к уменьшению среднего расстояния между липидами [Bryant, 2004, Rand, 1989].

Также было сделано предположение, что дисахариды способны проникать внутрь мембраны, таким образом стабилизируя ее структуру. Эта гипотеза, тем не менее, до настоящего момента не находила своего подтверждения. Методы компьютерного моделирования (молекулярная динамика) не показывали проникновения дисахаридов вглубь мембраны.

Гипотеза вытеснения воды появилась первой и к настоящему моменту существует значительное количество работ, подтверждающих ее действие. В то же время численную оценку среднего количества взаимодействующих с бислоем молекул дисахаридов на количество молекул фосфолипидов дают в основном теоретические методы молекулярной динамики [Kapla, 2013, Kent, 2015, Skibinski, 2005]. Среди экспериментальных методов, дающих такую оценку, можно выделить стехиометрию [Crowe, 1987] и ИК-спектроскопию [Crowe, 1988]. Таким образом, несмотря на то, что гипотеза вытеснения воды является наиболее вероятной, в настоящее время существует нехватка прямых экспериментальных доказательств этой гипотезы.

В этой главе описаны результаты исследований локальной концентрации дисахаридов сахарозы и трегалозы около поверхности и в глубине липидной мембраны, проведенных с помощью спектроскопии электронного спинового эха. Эти результаты важны, т.к. зная локальную концентрацию дисахаридов возле мембраны можно судить о достоверности одной из описанных в литературе гипотез.

Также в этой главе методом модуляции огибающей амплитуды ЭСЭ с использованием спин-меченых фосфолипидов был получен профиль проникновения сахарозы и трегалозы внутрь модельной клеточной мембраны. Полученные результаты свидетельствуют о наличии значительной концентрации сахарозы и трегалозы как на поверхности, так и внутри липидного бислоя.

#### 4.1 Исследуемые образцы

Процесс приготовления образцов аналогичен описанному в главе 3, единственное отличие состояло в том, что образцы гидратировались водными растворами дейтерированной сахарозы и трегалозы различной концентрации (дейтерирование проводилось сотрудником ИХКГ СО РАН Федотовым К. Ю. по методу, описанному в работе [Koch, 1978]).

Эксперименты с трегалозой проводились автором диссертации, эксперименты с сахарозой проводились магистрантом НГУ Леоновым Д. В. В экспериментах, направленных на определение профиля проникновения, концентрация дисахаридов в водном растворе оставалась фиксированной и была равна 0.8 моль/л. Далее образцы выдерживались в течение 24 часов при температуре 5 °С для получения суб-гелевой фазы. Непосредственно перед проведением измерений образцы замораживались, путем помещения в жидкий азот.

Для градуировки методики спиновый зонд ТЕМПОЛ (рисунок 3.6) растворялся либо в водных растворах сахарозы или трегалозы (концентрация ТЕМПОЛа поддерживалась постоянной 0.5 ммоль/л), либо в водно-глицериновых растворах (объемное соотношение глицерина и воды 3 к 2) с добавлением сахарозы и трегалозы (рисунок 4.1). Водно-глицериновые растворы дисахаридов использовались для надежного стеклования растворов, поскольку

при низкой концентрации водные растворы дисахаридов не образовывали стекла при замораживании.

Оборудование и импульсная последовательность, использовавшаяся в эксперименте, описаны в главе 3. Измерения проводились в магнитном поле, соответствующем центральной компоненте спектра ЭПР спиновой метки (рисунок 3.2). Обработка экспериментальных данных производилась согласно методике, описанной в разделе 3.1.

## 4.2 Экспериментальные результаты

### 4.2.1 Градуировка методики

Для того, чтобы установить однозначное соответствие между амплитудой модуляции спинового эха и локальной концентрацией молекул дисахаридов были проведены измерения в водно-глицериновых растворах сахарозы и трегалозы с добавлением спинового зонда ТЕМПОЛ (рисунок 3.6). Исследуя концентрационную зависимость амплитуды сигнала ESEEM можно установить коэффициент  $k$  пропорциональности между единицами амплитуды модуляции сигнала спинового эха и концентрацией дисахаридов (рисунок 4.3) Из линейной аппроксимации экспериментальных данных были получены значения для сахарозы  $k = 0.070 \text{ моль} / \text{л} \cdot \text{нс}$ , для трегалозы —  $k = 0.038 \text{ моль} / \text{л} \cdot \text{нс}$ . Различие в коэффициентах пропорциональности объясняется разной степенью дейтерирования молекул сахарозы и трегалозы. Согласно данным ЯМР одна молекула сахарозы содержит в среднем  $2.5 \pm 0.5$ , а молекула трегалозы —  $6 \pm 1$  ядер дейтерия (ЯМР измерения проводили сотрудник ИХКГ СО РАН Поляков Н. Э. и сотрудник КФТИ КазНЦ РАН Волков М. Ю.). Необходимо отметить, что эти коэффициенты были получены для стеклообразного замороженного раствора, в котором молекулы дисахаридов распределены равномерно. Поэтому применение градуировки амплитуды модуляции спинового эха будет корректно

тоже только для равномерного распределения дейтерированных молекул вокруг спиновой метки.

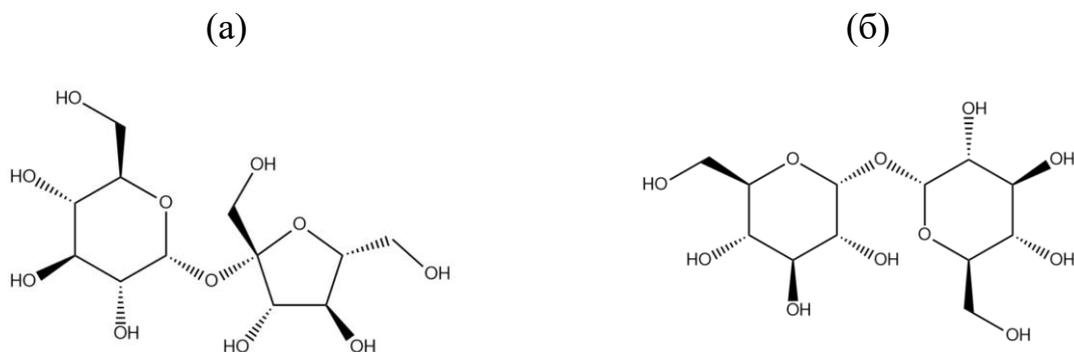


Рисунок 4.1 — Структура молекул сахарозы (а) и трегалозы (б)

На рисунке 4.2 показаны стационарные спектры ЭПР радикала ТЕМПОЛ в водных растворах сахарозы и трегалозы. Видно, что форма спектров не изменяется с изменением концентрации раствора. При этом растворы сахарозы кристаллизуются при концентрации менее 1.8 моль/л и стеклуются при концентрации более 1.8 моль/л. Если бы радикал в замороженных растворах вытеснялся бы в отдельную фазу, то спектры стационарного ЭПР существенно бы искажались из-за спин-спинового взаимодействия между радикалами. Отсутствие уширения линий спектра свидетельствует о том, что радикал не вытесняется в отдельную фазу при замораживании.

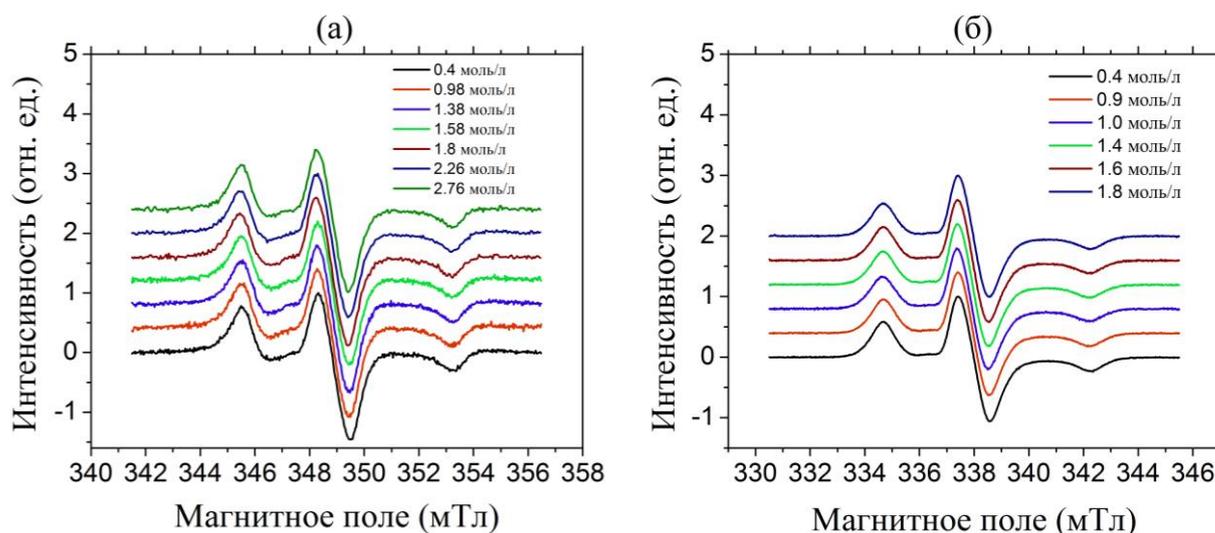


Рисунок 4.2 — Стационарные спектры ЭПР спинового зонда ТЕМПОЛ в водных растворах сахарозы (а) и трегалозы (б)

На рисунке 4.3 показана зависимость амплитуды сигнала модуляции ЭСЭ радикала ТЕМПОЛ в водных и водно-глицериновых растворах дисахаридов от концентрации. Для водно-глицеринового раствора концентрационная зависимость линейна, что объясняется хорошим стеклованием водно-глицериновых растворов. Данные, полученные для водных растворов дисахаридов условно можно разделить на три участка, которые соответствуют кристаллизации (при концентрации меньше 1.8 моль/л) и стеклованию (при концентрации больше 1.8 моль/л) раствора. Известно, что диаметр кристаллов льда сильно зависит от концентрации дисахаридов, что наблюдали с помощью оптической и электронной просвечивающей микроскопии [Uchida, 2004]. При кристаллизации дисахариды и спиновая метка вытесняются в отдельную фазу. При концентрациях сахарозы меньше 1.4 моль/л глубина модуляции ЭСЭ не изменяется с изменением концентрации дисахаридов. Аналогичный эффект наблюдается для растворов трегалозы при концентрации менее 1.2 моль/л. Это можно объяснить тем, что размеры отдельных фаз, в которые вытесняются дисахариды и спиновая метка становится больше, чем эффективный радиус используемого метода, т.е. больше 0.5 нм.

Концентрация, при которой происходит стеклование растворов сильно зависит от скорости охлаждения. Для дисахаридов стеклование водных растворов может быть получено при концентрациях выше 1.8 моль/л. Разница между кристаллизованными и стеклованными образцами видна визуально: кристаллизованные образцы непрозрачны, в то время как стеклованные образцы прозрачны. Видно, что при концентрациях выше 1.8 моль/л точки хорошо ложатся на линии линейной аппроксимации сигнала ТЕМПОЛ для водно-глицериновых растворов. Это доказывает, что при концентрациях выше 1.8 моль/л водные растворы дисахаридов стеклуются и реализуется равномерное распределение молекул дисахаридов вокруг спиновой метки.

Выполненная таким образом градуировка необходима для получения локальной концентрации из значений амплитуды модуляции ЭСЭ.

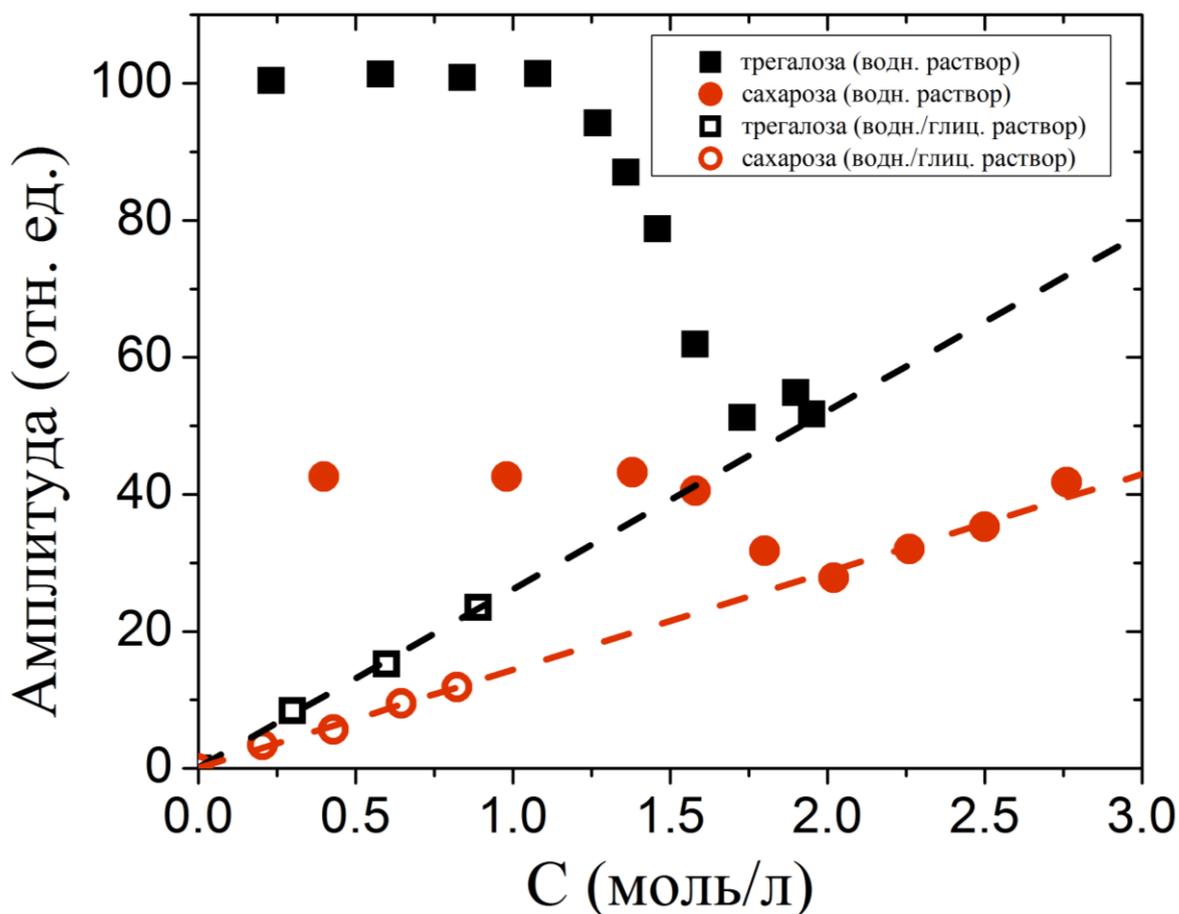


Рисунок 4.3 — Зависимость амплитуды дейтерной линии фурье-спектров сигнала спинового зонда ТЕМПОЛ от концентрации сахарозы и трегалозы в водном и водно-глицериновом растворах (концентрация глицерина 8.2 моль/л).

#### 4.2.2 Определение локальной концентрации дисахаридов около поверхности липидной мембраны

Если на практике реализуется гипотеза вытеснения воды, то должна наблюдаться высокая концентрация дисахаридов на поверхности мембраны. Локальная концентрация молекул дисахаридов может быть найдена с использованием метода модуляции огибающей амплитуды электронного спинового эха. Для проведения экспериментов использовался спин-меченый фосфолипид ОПФХ, в котором спиновая метка была прикреплена к полярной части фосфолипида (рис 3.1). В качестве молекул дисахаридов использовались

сахароза и трегалоза (рисунок 4.1), в которых атомы водорода, входящие в состав СН групп, были частично заменены на атомы дейтерия.

Модуляции амплитуды огибающей ЭСЭ спин-меченого фосфолипида ОПФХ, гидратированного в водных растворах дейтерированной сахарозы и трегалозы различных концентраций, представлены на рисунке 4.4. Амплитудные Фурье-спектры этих модуляций показаны на рисунке 4.5. Хорошо видно пик на 2.2 МГц, соответствующий ядерной частоте атомов дейтерия. Пик на 1 МГц соответствует ядерной частоте атома азота, входящего в состав молекулы фосфолипида.

С использованием полученных ранее градуировочных коэффициентов из амплитуды дейтерной линии была получена локальная концентрация молекул дисахаридов в окрестности спиновой метки. На рисунке 4.6 приведена зависимость локальной концентрации молекул дисахаридов около спиновой метки  $C_{\text{лок.}}$  от концентрации молекул дисахаридов в объеме воды  $C_{\text{объемн.}}$ .

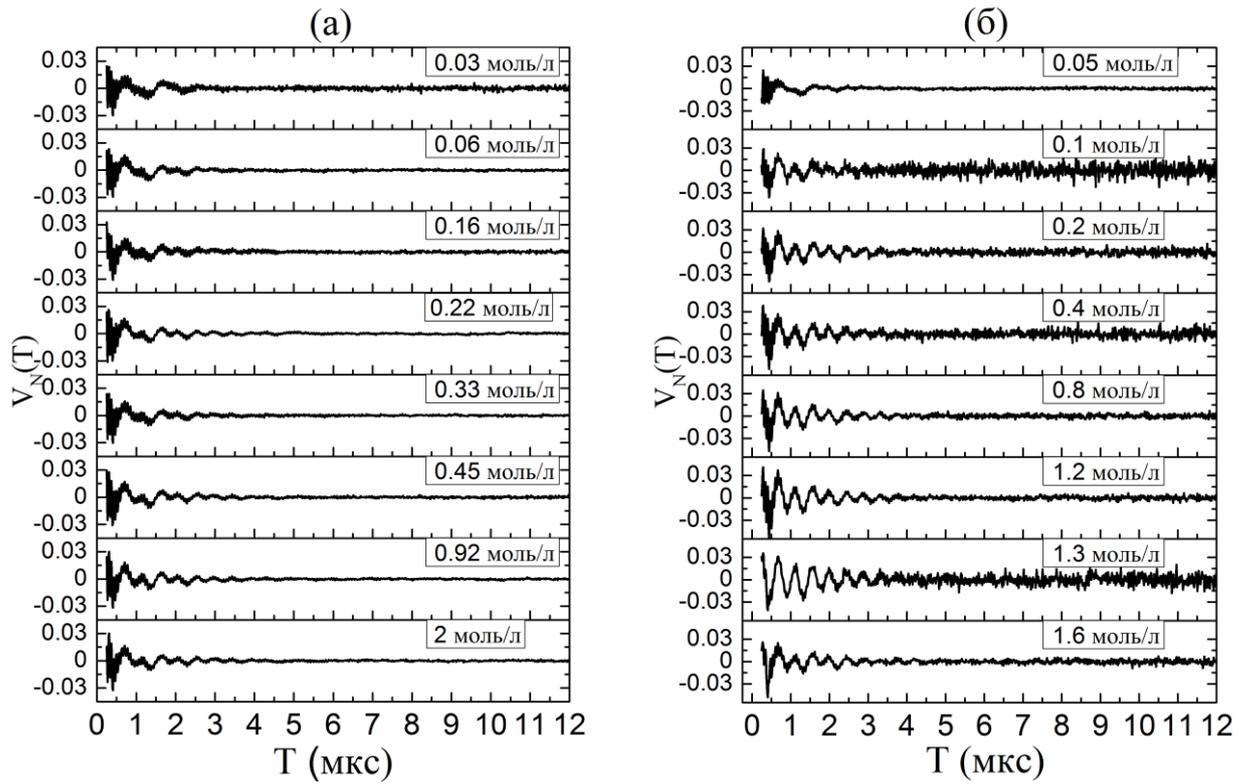


Рисунок 4.4 — Модуляции амплитуды ЭСЭ спин-меченого фосфолипида ОПФХ гидратированного в водных растворах сахарозы (а) (концентрация 0.03, 0.06, 0.16, 0.22, 0.33, 0.45, 0.92, 2 моль/л) и в водных растворах трегалозы (б) (концентрация 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.3, 1.6 моль/л)

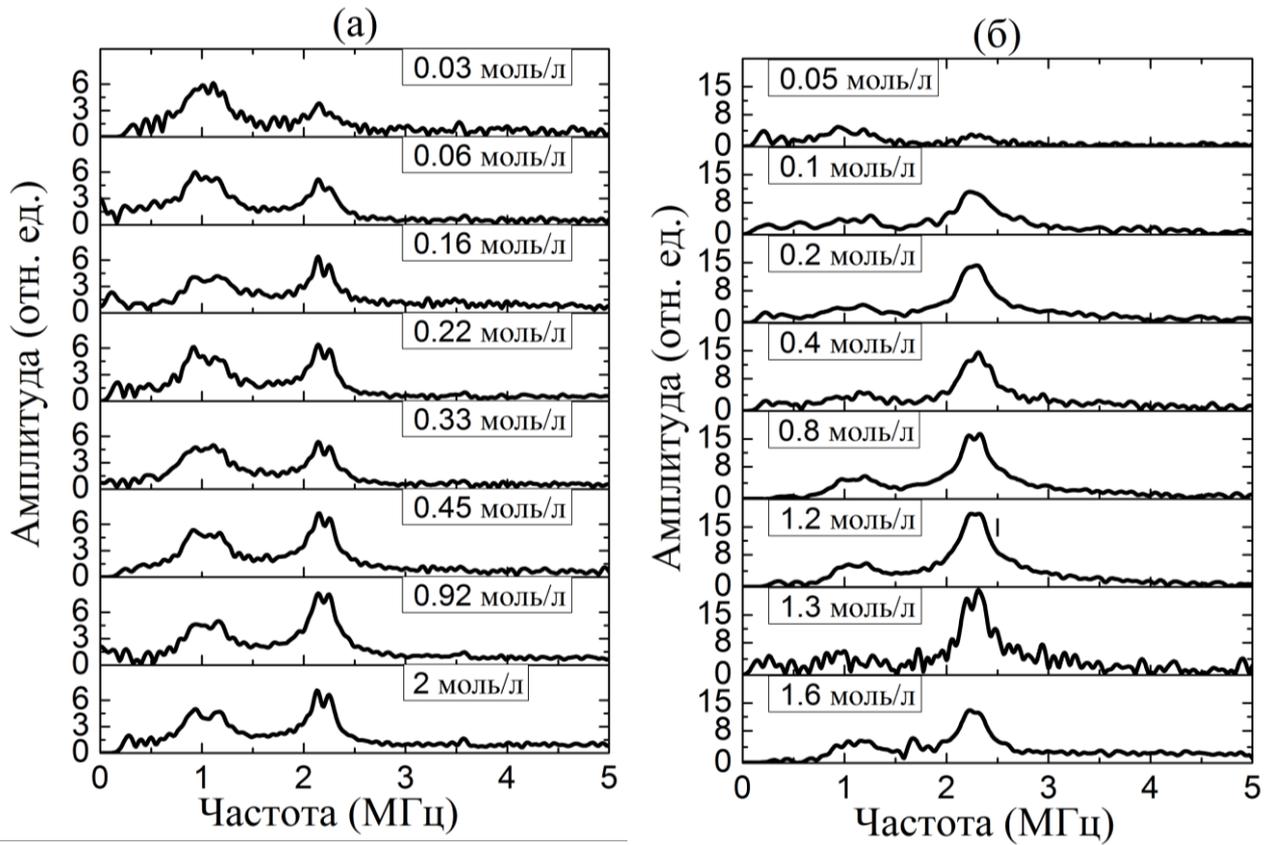


Рисунок 4.5 — Амплитудные фурье-спектры образцов, содержащих спин-меченый фосфолипид ОПФХ, гидратированного в водных растворах сахарозы (а) (концентрация 0.03, 0.06, 0.16, 0.22, 0.33, 0.45, 0.92, 2 моль/л) и в водных растворах трегалозы (б) (концентрация 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.3, 1.6 моль/л)

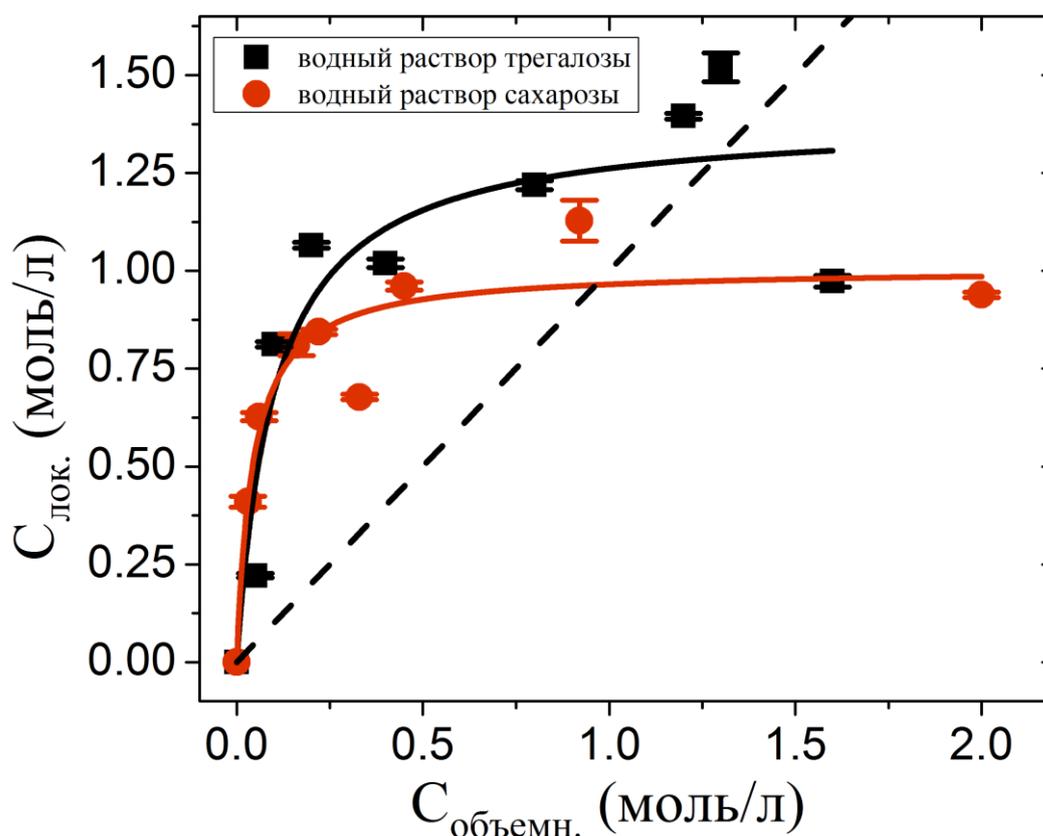


Рисунок 4.6 — Зависимость локальной концентрации молекул сахарозы (●) и трегалозы (■)

$C_{\text{лок.}}$  около поверхности липидной мембраны от концентрации сахарозы и трегалозы в водном растворе  $C_{\text{объемн.}}$ . Линии соответствуют аппроксимации в рамках модели адсорбции Ленгмюра. Пунктиром показана линия, соответствующая равенству значений  $C_{\text{лок.}}$  и  $C_{\text{объемн.}}$ .

#### 4.2.3 Профиль проникновения сахарозы и трегалозы

Для исследования профиля проникновения дисахаридов внутрь липидной мембраны использовались спин-меченные фосфолипиды n-ПСФХ, где  $n=5,7,10,12,14,16$ . Модуляции амплитуды огибающей ЭСЭ для образцов, содержащих спин-меченные липиды и гидратированных в водных растворах сахарозы и трегалозы, показаны на рисунке 4.7. На рисунке 4.8 показаны амплитудные Фурье-спектры. На частоте 2.2 МГц хорошо заметна линия, соответствующая ядерному спину атомов дейтерия. Как для сахарозы, так и для трегалозы хорошо видно, что амплитуда линии максимальна для образцов со

спин-меченым липидом 10-ПСФХ. Профиль проникновения сахарозы и трегалозы представлен на рисунке 4.9. Используя ранее полученные градуировочные прямые можно получить значения локальной концентрации дисахаридов на различной глубине мембраны (рисунок 4.10).

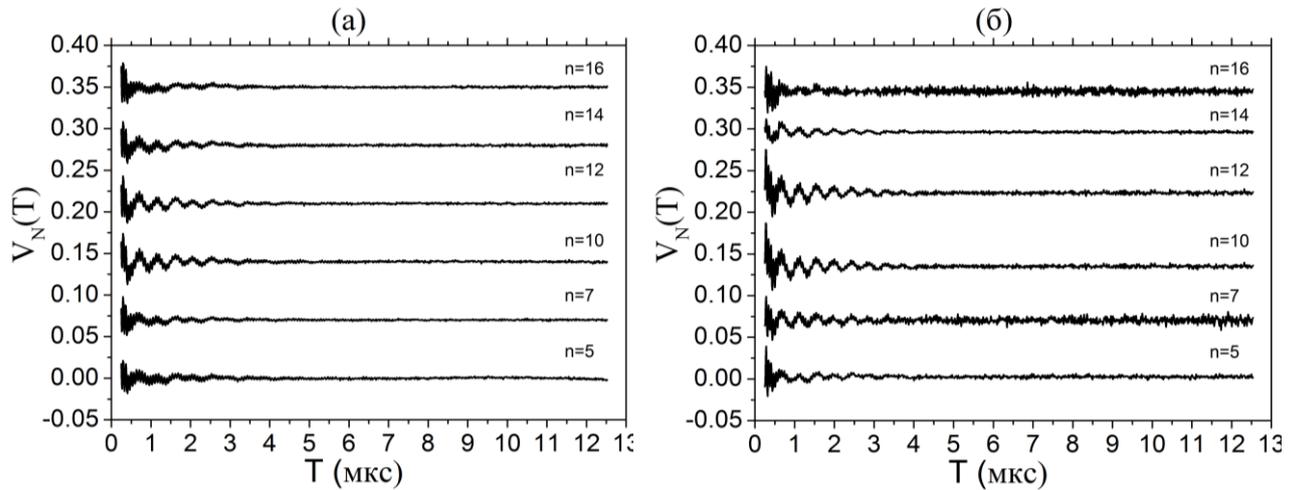


Рисунок 4.7 — Модуляции амплитуды огибающей сигнала ЭСЭ для образцов, гидратированных водным раствором дейтерированной сахарозы (а) и водным раствором дейтерированной трегалозы (б). Положения спиновой метки в фосфолипиде n-ПСФХ соответствует значениям  $n=5, 7, 10, 12, 14, 16$ . Спин-меченный фосфолипид ОПФХ отмечен как  $n=0$ .

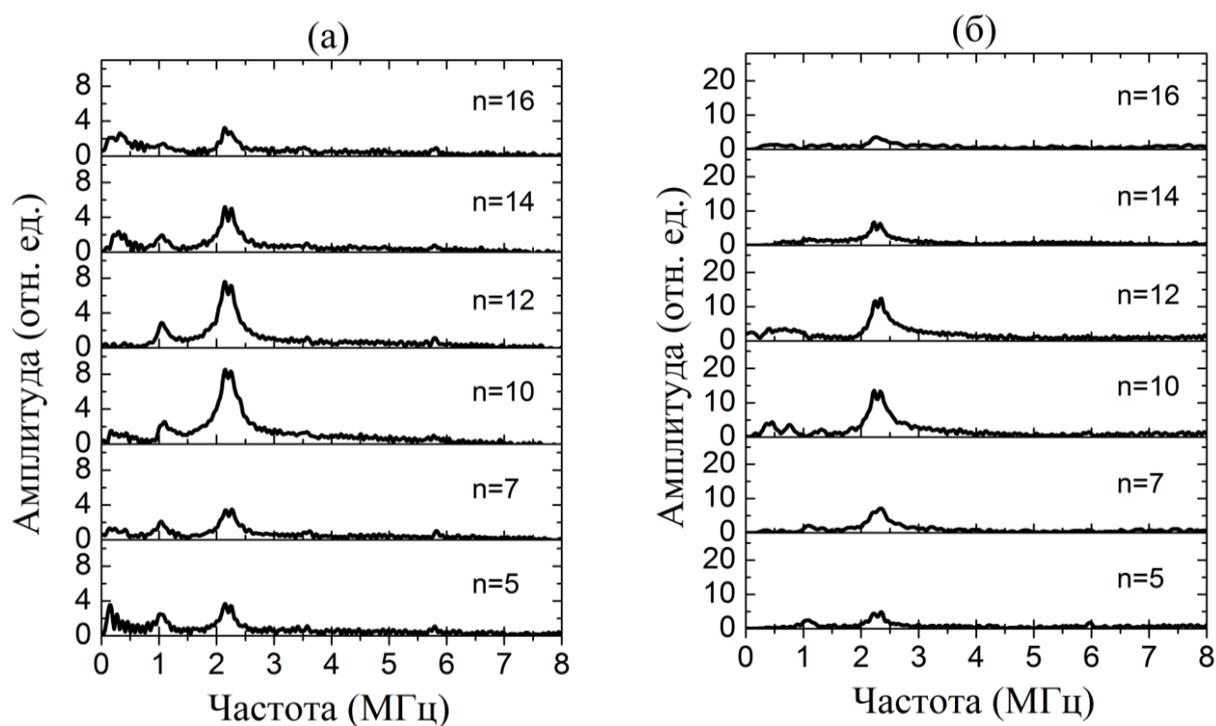
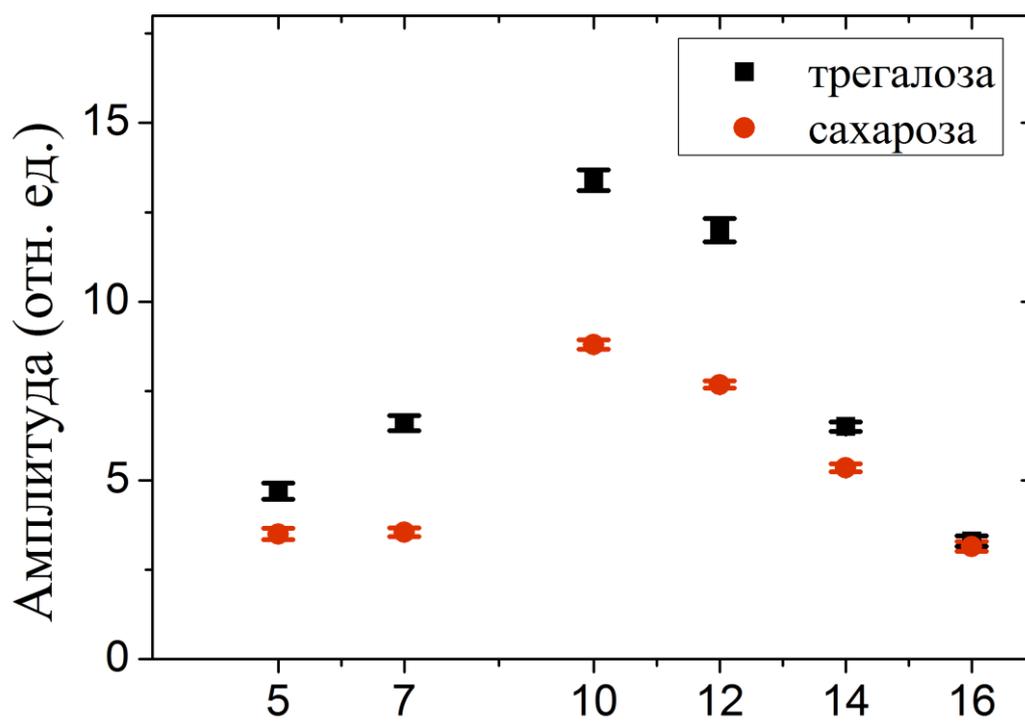
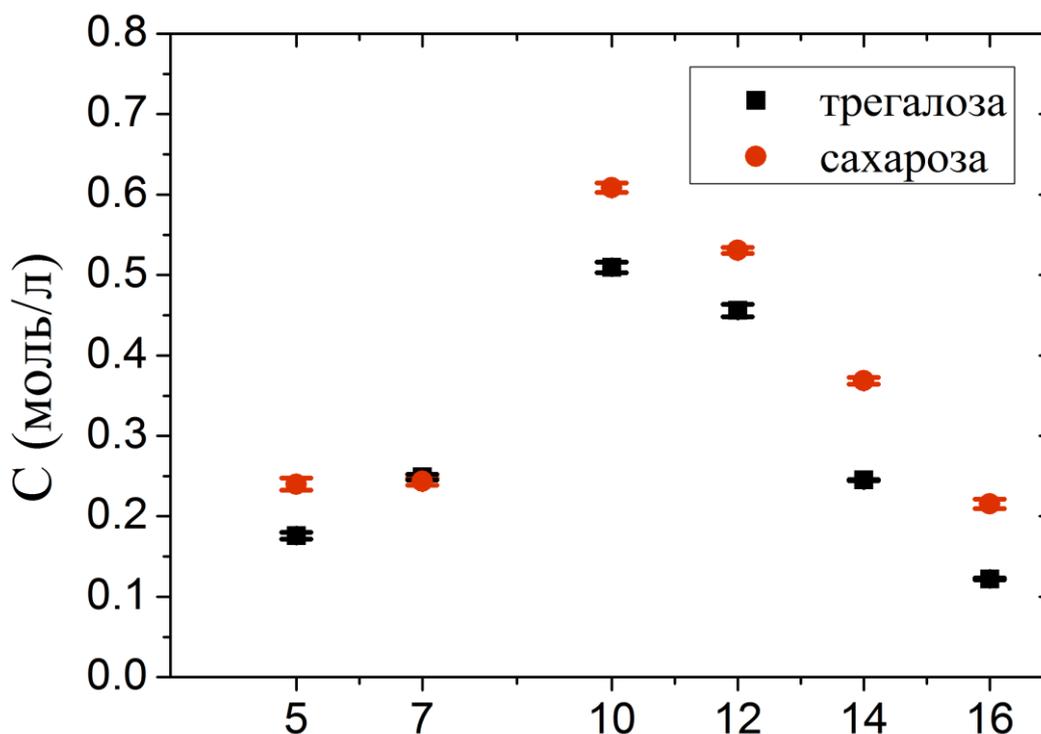


Рисунок 4.8 — Амплитудные Фурье-спектры модуляции электронного спинового эха для образцов, гидратированных в водном растворе сахарозы (а) и в водном растворе трегалозы (б). Положения спиновой метки в фосфолипиде n-ПСФХ соответствует значениям  $n=5, 7, 10, 12, 14, 16$ . Спин-меченный фосфолипид ОПФХ отмечен как  $n=0$ .



Положение спиновой метки вдоль ацильной цепи

Рисунок 4.9 — Профиль проникновения сахарозы (●) и трегалозы (■) внутрь липидной мембраны.



### Положение спиновой метки вдоль ацильной цепи

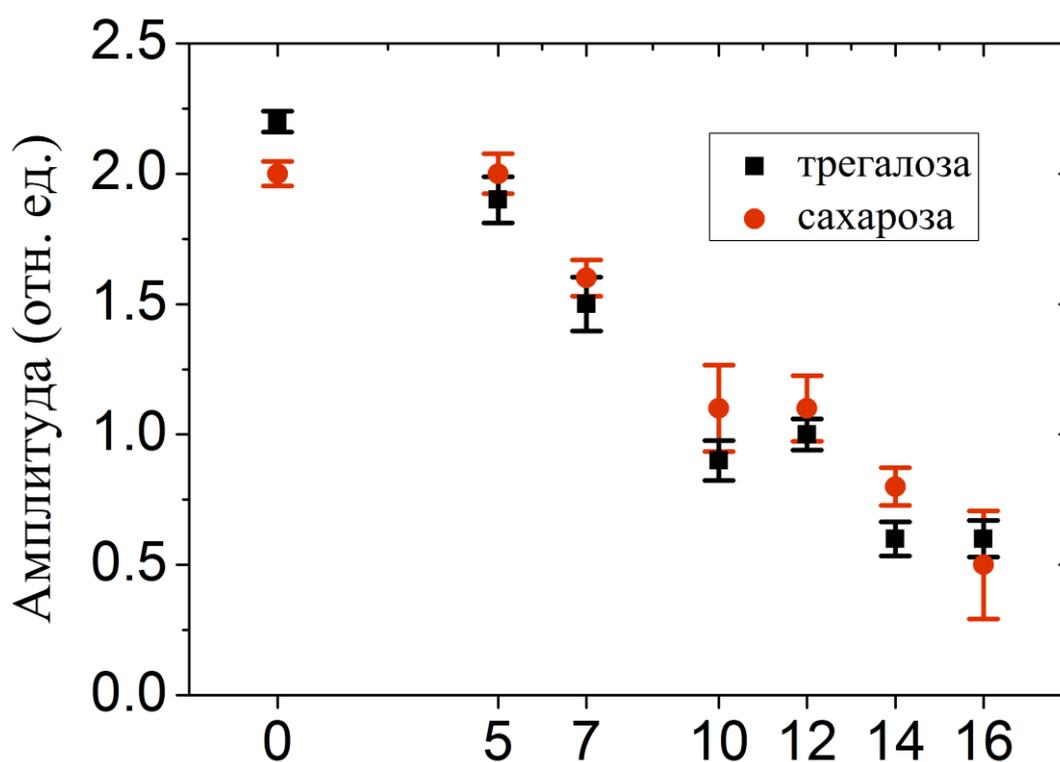
Рисунок 4.10 — Профиль проникновения сахарозы (●) и трегалозы (■) внутрь липидной мембраны. По оси ординат отложена концентрация дисахаридов внутри мембраны.

#### 4.2.4 Локализация спиновых меток

Как уже было сказано в параграфе 3.2.3, в некоторых случаях спиновая метка может выталкиваться из объема липидной мембраны и локализоваться на ее поверхности [Dzikovski, 2012]. Для подтверждения достоверности полученных результатов необходимо убедиться в том, что спиновая метка находится там, где ее местонахождение и предполагается.

На рисунке 4.11 представлены зависимости амплитуд фосфорных линий Фурье-спектров модуляции огибающей амплитуды электронного спинового эха для образцов, гидратированных в водных растворах не дейтерированной трегалозы и сахарозы (0.8 моль/л). Образцы выдерживались в течение 12 часов при температуре 5 °C для перевода липидной мембраны в суб-гелевую фазу,

после чего непосредственно перед измерениями помещались в жидкий азот. Видно, что амплитуда линии фосфора коррелирует с положением спиновой метки. Это означает, что реальная глубина положения спиновой метки внутри мембраны коррелирует с ее положением вдоль ацильной цепи. Если сравнивать эти результаты с результатами, представленными на рисунке 3.8, то становится очевидно, что углеродные цепочки спин-меченных фосфолипидов не находятся в полностью выпрямленном положении. Тем не менее этот результат показывает, что спиновые метки в присутствии дисахаридов не выталкиваются из объема липидной мембраны, а локализация спиновой метки коррелирует с положением спиновой метки вдоль ацильной цепи.



### Положение спиновой метки вдоль ацильной цепи

Рисунок 4.11 — Амплитуда фосфорной линии Фурье-спектров модуляций огибающей амплитуды электронного спинового эха для образцов, гидратированных растворов трегалозы (■) и сахарозы (●). Положения спиновой метки в фосфолипиде n-ПСФХ соответствует значениям n=5, 7, 12, 16. Значение n=0 соответствует образцам, содержащим спин-меченный фосфолипид ОПФХ.

### 4.3 Обсуждение результатов

#### 4.3.1 Локальная концентрация сахарозы и трегалозы около поверхности липидной мембраны

Кривые модуляции огибающей ЭСЭ и их амплитудные Фурье-спектры для модельной мембраны, гидратированной в водных растворах дисахаридов различных концентраций приведены на рисунке 4.4. Для получения результатов в виде зависимости локальной концентрации дисахаридов в окрестности спиновой метки использовались ранее полученные градуировочные коэффициенты. Значения амплитуды модуляции дополнительно умножались на коэффициент равный 2, поскольку ранее проведенные эксперименты показывают, что амплитуда модуляции ЭСЭ для ОПФХ в мембране в 2 раза меньше, чем для спинового зонда в объеме раствора (раздел 3.3). Этот коэффициент можно объяснить тем, что в отличие от спинового зонда спиновая метка, находящаяся на поверхности мембраны, взаимодействует только с половиной объема раствора.

Процесс накопления молекул дисахаридов на поверхности липидной мембраны можно описать в рамках модели адсорбции Ленгмюра. Модель адсорбции Ленгмюра предполагает, что молекулы адсорбата (в данном случае молекулы дисахаридов) образуют монослой на поверхности адсорбента (в данном случае липидной мембраны), взаимодействие между молекулами адсорбата отсутствует, а вероятность адсорбции одинакова для всех участков поверхности [Карнаухов, 1998].

Линии на рисунке 4.6 соответствуют аппроксимации в рамках Ленгмюровской модели адсорбции:

$$C_{\text{лок.}} = C_{\text{лок.}}^{\text{макс.}} \frac{KC_{\text{объемн.}}}{1 + KC_{\text{объемн.}}} \quad (4.1)$$

В формуле 4.1  $C_{\text{лок.}}$  — локальная концентрация дисахаридов вблизи спиновой метки,  $C_{\text{объемн.}}$  — концентрация дисахаридов в объеме воды,  $K$  —

отношение скоростей адсорбции и десорбции,  $C_{лок.}^{макс.}$  — максимальное значение локальной концентрации. Путем аппроксимации экспериментальных данных в рамках Ленгмюровской адсорбции было получено значение коэффициентов для трегалозы  $C_{лок.}^{макс.} = 1.4 \pm 0.1 \text{ моль / л}$ ,  $K = 9.8 \pm 4.6 \text{ моль}^{-1}$  и для сахарозы  $C_{лок.}^{макс.} = 1.0 \pm 0.1 \text{ моль / л}$ ,  $K = 23.2 \pm 8.3 \text{ моль}^{-1}$ .

Приведенные выше данные показывают преимущественное накопление молекул дисахаридов у поверхности мембраны и, таким образом, подтверждают гипотезу вытеснения воды. Также эти данные не противоречат тому, что окружающая мембрану сольватная оболочка находится в стеклообразном состоянии.

#### 4.3.2 Профили проникновения сахарозы и трегалозы внутрь клеточной мембраны

Полученные профили проникновения рисуют похожую картину для трегалозы и сахарозы (рисунок 4.10). Максимум концентрации наблюдается для 10-го положения спиновой метки вдоль ацильной цепи молекулы фосфолипида. Максимальная концентрация сахарозы внутри мембраны 0.6 моль/л, трегалозы — 0.5 моль/л. При этом было доказано, что спиновые метки не вытесняются из мембраны (рисунок 4.11).

Такая высокая концентрация дисахаридов внутри мембраны может служить аргументом в пользу некоторых гипотез криозащитного действия дисахаридов. Возможно, что описанные во введении к этой главе механизмы стабилизации мембраны реализуются именно за счет встраивания молекул дисахаридов между молекулами фосфолипидов.

#### 4.4 Выводы по главе 4

1. Экспериментально была подтверждена гипотеза вытеснения воды. Используемый в данной работе метод предоставил одно из самых прямых доказательств гипотезы вытеснения воды.
2. Было установлено, что адсорбция молекул дисахаридов на модельной мембране хорошо описывается в рамках модели Ленгмюра.
3. Было установлено, что максимальная концентрация адсорбированных молекул трегалозы составляет  $C_{лок.}^{макс.} = 1.4 \pm 0.1 \text{ моль/л}$ , в то время как для молекул сахарозы этот параметр равен  $C_{лок.}^{макс.} = 1.0 \pm 0.1 \text{ моль/л}$ .
4. Были получены профили проникновения сахарозы и трегалозы внутрь модельной клеточной мембраны. Обнаружена высокая концентрация молекул дисахаридов внутри модельной мембраны.

## Глава 5. Исследование влияния глицерина на подвижность модельной липидной мембраны

Известно, что глицерин способен проникать сквозь клеточную мембрану и, вероятно, эта способность во многом определяет его эффективность как криопротектора [Walter, 1986]. Проникнув внутрь клетки глицерин способен предотвращать формирование внутриклеточного льда и уменьшать осмотическое давление при замораживании [Crowe, 1986].

Известна способность глицерина образовывать водородные связи с поверхностью мембраны. Взаимодействие криопротектора с поверхностью мембраны должно оказывать влияние на подвижность молекул фосфолипидов. Влияние глицерина на подвижность биологических молекул ранее исследовалась методами Мессбауэровской спектроскопии, нейтронного рассеяния [Cornicchi, 2005, Tsai, 2000] и молекулярной динамики [Dirama, 2005]. В данной главе методы стационарного и импульсного ЭПР были применены к исследованию влияния глицерина на подвижность липидного бислоя.

Важным параметром динамического поведения молекул в стеклах является температура динамического перехода (раздел 1.6), которая сильно зависит от сольватной оболочки молекулы. Ранее было исследовано влияние водно-глицериновых растворов на температуру динамического перехода молекул белков, ДНК, фосфолипидов [Cornicchi, 2008]. Полученные данные свидетельствуют о сильном влиянии окружающей матрицы на динамические характеристики исследуемых биомолекул.

С помощью спектроскопии электронного спинового эха (ЭСЭ) оказалось возможным наблюдать динамический переход в биомакромолекулах [Guzzi, 2011, 2009, Scarpelli, 2011, Surovtsev, 2012]. Как известно, при динамическом переходе молекула начинает испытывать ангармонические колебания. Ангармонические наносекундные либрации приводят к появлению анизотропии релаксации и, таким образом, могут быть легко обнаружены [Borovykh, 2007].

Кроме этого, методы ЭПР могут дать численное значение среднеквадратичного углового отклонения  $\langle \alpha^2 \rangle$  и характеристического времени корреляции молекулярных движений  $\tau_c$ . Предполагается, что эти молекулярные движения имеют такую же природу, как и ангармонические колебания, обнаруженные методами нейтронного рассеяния и Мессбауэровской спектроскопии [Dzuba, 2006].

Метод электронного спинового эха обладает чувствительностью к малоамплитудным движениям спиновых зондов и меток. В этой главе с помощью спектроскопии электронного спинового эха исследовалось влияние глицерина на динамические характеристики модельной липидной мембраны.

## 5.1 Исследуемые образцы

Фосфолипид 1,2-дипальмитоил-3-глицерофосфохолин (ДПФХ) и спин-меченый фосфолипид 1-пальмитоил-2-стероил-(n-ДОКСИЛ)-глицеро-3-фосфохолин (n-ПСФХ, где n – положение спиновой метки вдоль ацильной цепи липида, использовались образцы 5-ПСФХ и 16-ПСФХ) смешивались в соотношении 100:1 и растворялись в хлороформе (рисунок 3.1). Хлороформ выпаривался потоком газообразного азота, образцы выдерживались при вакууме ( $10^{-3}$  бар) в течение 12 часов. Полученные образцы гидратировались водой или водно-глицериновой смесью (объемное отношение воды к глицерину 1:1) в течение 4 часов при температуре 62 °С. Гидратированные образцы помещались в ампулы диаметром 4.8 мм и выдерживались при температуре 5 °С в течение 24 часов. Помимо этого, были приготовлены образцы с добавлением вместо спин-меченого липида нитроксильного радикала 4-оксо-2,2,6,6-тетраметил-1-пиперидинилокси (ТЕМПОН) в концентрации 1 ммоль/л (рисунок 5.1). Непосредственно перед проведением измерений образцы замораживались путем помещения в жидкий азот.

Для изучения влияния молекул криопротекторов на подвижность липидного бислоя использовался метод электронного спинового эха. Использовалась последовательность  $\frac{\pi}{2}-\tau-\pi-\tau-\text{echo}$  с длительностью импульсно 16 нс и 32 нс соответственно. Время задержки между импульсами  $\tau$  сканировалось от 120 нс до 920 нс с шагом 4 нс.

Для проведения измерений использовался спектрометр Bruker Elexsys E580 с резонатором ER 4118 X-MD5 и криостатом CF935. Криостат охлаждался потоком газообразного азота, температура устанавливалась с точностью  $\pm 0.5$  К. Добротность резонатора была уменьшена с целью сократить приборное «мертвое время» до 100 нс. Амплитуда СВЧ-импульсов составляла около 6 Гс.

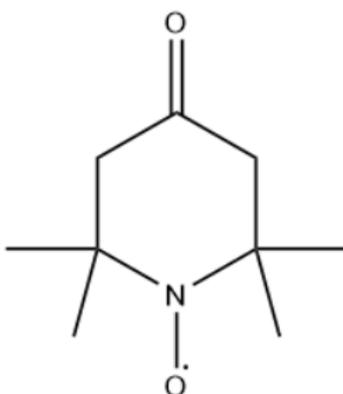


Рисунок 5.1 — Структура спинового зонда ТЕМПОН

## 5.2 Используемые экспериментальные методики

### 5.2.1 Анализ стационарных спектров ЭПР

При быстром (время корреляции  $\tau_c < 10^{-9}$  с) ограниченном ориентационном движении компоненты анизотропного тензора СТВ частично усредняются (раздел 2.2). При этом среднее значение компоненты тензора  $A_{zz}$  можно легко определить из стационарного спектра ЭПР. В случае ориентационных движений

с малой угловой амплитудой  $\alpha$ , усредненная компонента  $A_{zz}$  в лабораторной системе координат пропорциональна  $\langle \alpha^2 \rangle$ :

$$\langle A_{zz} \rangle = A_{zz} + (A_{yy} - A_{zz}) \langle \alpha^2 \rangle \quad (5.1)$$

Таким образом, стационарный ЭПР можно использовать для оценки амплитуды быстрых ограниченных движений молекул спиновой метки (рисунок 5.2). Как известно, характер таких движений определяется в основном свойствами окружающей матрицы и не зависит от типа спиновой метки [Kirilina, 2004].

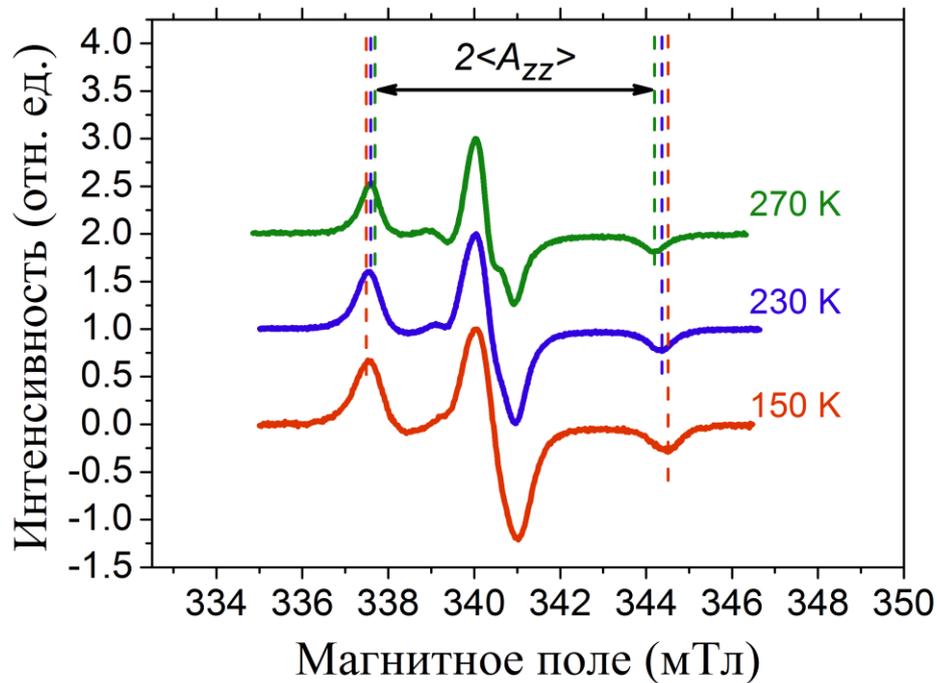


Рисунок 5.2 — Стационарные спектры ЭПР при температуре 150 К, 230 К, 270 К. Расстояние между двумя крайними линиями равно  $2\langle A_{zz} \rangle$ .

### 5.2.2 Вклад анизотропной релаксации в спад сигнала спинового эха

Спад сигнала спинового эха обусловлен главным образом взаимодействием электронного спина с ядерными спинами окружающей

матрицы. Поскольку в стеклах эти взаимодействия усредняются по ориентациям, то их вклад в поперечную релаксацию не зависит от внешнего магнитного поля.

Молекулярные движения также приводят к поперечной релаксации спинового эха (раздел 2.3). В отличие от других этот вклад в релаксацию существенно анизотропен и может быть выделен путем деления спадов сигнала спинового эха, записанного в разных участках спектра ЭПР. В качестве таких точек спектра выбирают наиболее изотропную центральную и наиболее анизотропную высокополевую часть спектра (рисунок 2.3). Спады сигнала спинового эха, записанные в этих двух точках спектра, делились друг на друга для того, чтобы избавиться от изотропных вкладов в релаксацию, которые не зависят от внешнего магнитного поля. Таким образом был выделен вклад в поперечную релаксацию, обусловленный процессами молекулярного движения (рисунок 5.3).

С помощью двухимпульсной последовательности со сканированием времени  $\tau$  были записаны спады модуляции спинового эха при двух значениях магнитного поля. Спад модуляции, записанный в анизотропной части спектра, делился на спад модуляции в центральной части спектра. Таким образом, была получена релаксация сигнала ЭСЭ, которая зависит только от анизотропного вклада  $\exp(-2\tau W_{\text{аниз}})$ , где  $W_{\text{аниз}}$  — скорость анизотропной релаксации.

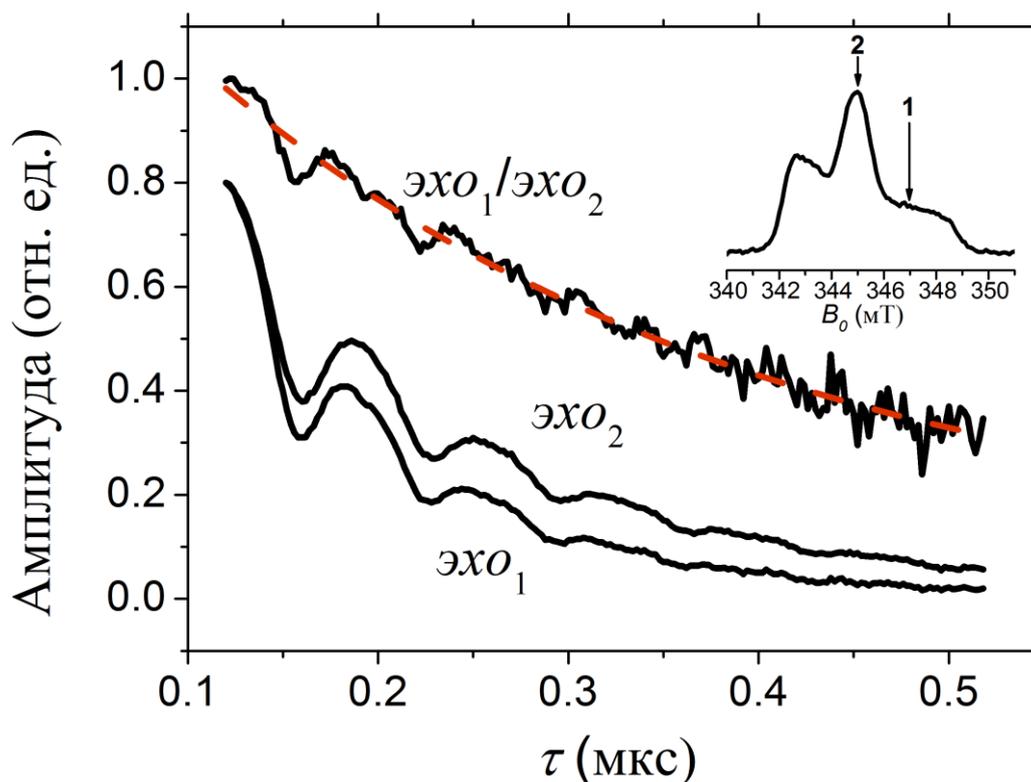


Рисунок 5.3 — Спад сигнала ЭСЭ при различных значениях магнитного поля ( $\text{эхo}_1$ ,  $\text{эхo}_2$ ) и результат их деления друг на друга ( $\text{эхo}_1/\text{эхo}_2$ ). Красной линией показана линия аппроксимации спада экспоненциальной функцией. Вставка: спектр ЭПР нитроксильной спиновой метки, указаны значения магнитного поля, при которых записывались спады сигналов ЭСЭ.

### 5.3 Экспериментальные результаты

#### 5.3.1 Стационарные ЭПР спектры

На рисунке 5.4 видно, что параметр  $2\langle A_{zz} \rangle$  для липидов, спин-меченых в 5 положении, значительно больше, чем для липидов, спин-меченых в 16 положении. Это можно объяснить разной полярностью окружения спиновой метки, локализованной в различных частях бислоя. Вблизи поверхности бислоя присутствует значительное количество молекул воды, которые повышают полярность окружения спиновой метки, что в свою очередь увеличивает значение компоненты тензора СТВ спиновой метки.

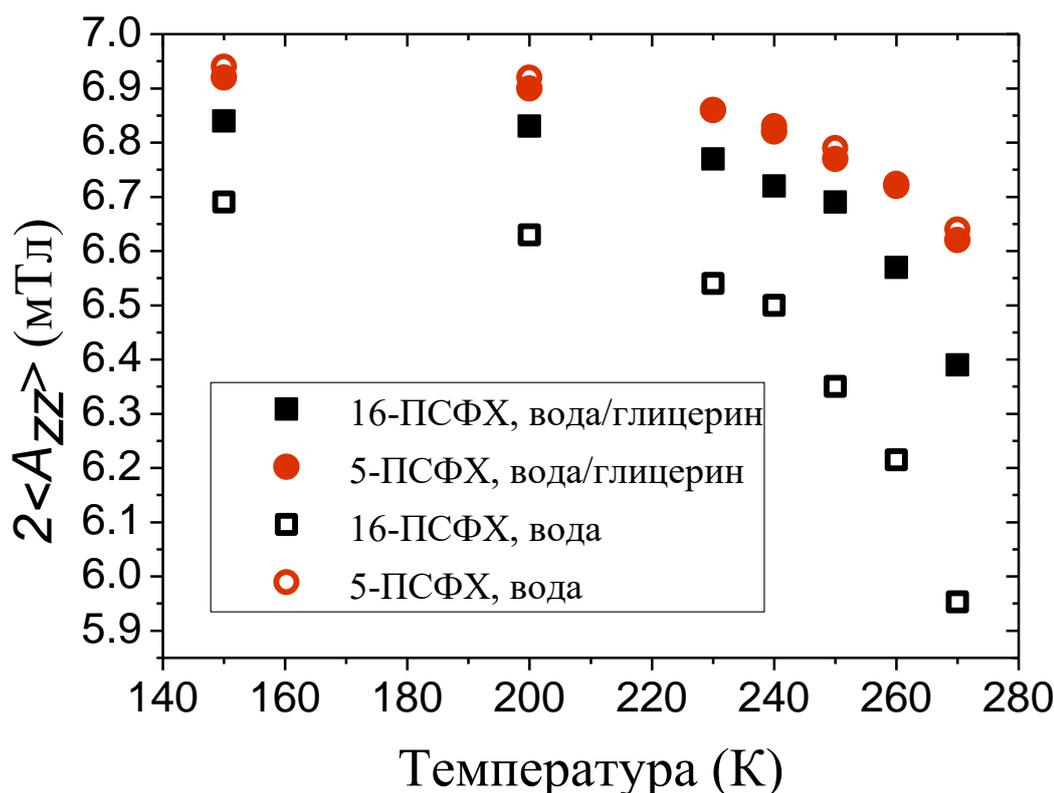


Рисунок 5.4 — Температурная зависимость параметра  $2\langle A_{zz} \rangle$  для образцов со спин-мечеными липидами в 5 положении (5-ПСФХ) и в 16 положении (16-ПСФХ). Гидратация производилась либо водой, либо водно-глицериновым раствором.

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

Данные стационарного ЭПР показывают, что заметное увеличение подвижности происходит при температуре 230-240 К. В то же время данные импульсного ЭПР показывают увеличение подвижности уже при температуре 200 К (рисунок 5.5). Это расхождение можно объяснить тем, что методы чувствительны к разным диапазонам времен корреляции молекулярного движения.

Хотя из температурной зависимости  $\langle \alpha^2 \rangle$  можно определить температуру динамического перехода, стационарный ЭПР в меньшей степени подходит для этой цели. Во-первых, спектр стационарного ЭПР легко насыщается при низких температурах, что приводит к искажению измеряемой величины расщепления линий. Во-вторых, линии спектра стационарного ЭПР неоднородно уширены за счет неразрешенного СТВ с протонами окружающих молекул. Это ограничивает точность измерения  $\langle A_{zz} \rangle$  величиной 0.01-0.02 мТл. В-третьих, полярность окружения спиновой метки вносит заметный вклад в среднюю величину компоненты СТВ. При уменьшении полярности среды среднее значение  $\langle A_{zz} \rangle$  также уменьшается. В отличие от импульсного ЭПР, стационарный ЭПР чувствителен как к ангармоническим, так и к гармоническим либрациям, поэтому динамический переход этим методом обнаружить сложнее.

### 5.3.2 Скорость анизотропной релаксации в образцах с глицерином

На рисунке 5.5 представлена температурная зависимость скорости анизотропной релаксации для образцов, содержащих спин-меченые липиды и для образцов, содержащих спиновый зонд в водно-глицериновом растворе. Видно, что для всех образцов при температурах выше 200 К скорость анизотропной релаксации начинает заметно возрастать, что связано с увеличением среднеквадратичной угловой амплитуды  $\langle \alpha^2 \rangle$ . Увеличение подвижности при температурах 200-220 К наблюдалось во множестве неупорядоченных образцов, этот эффект получил название динамического перехода [Dzuba, 2006, Scarpelli, 2011].

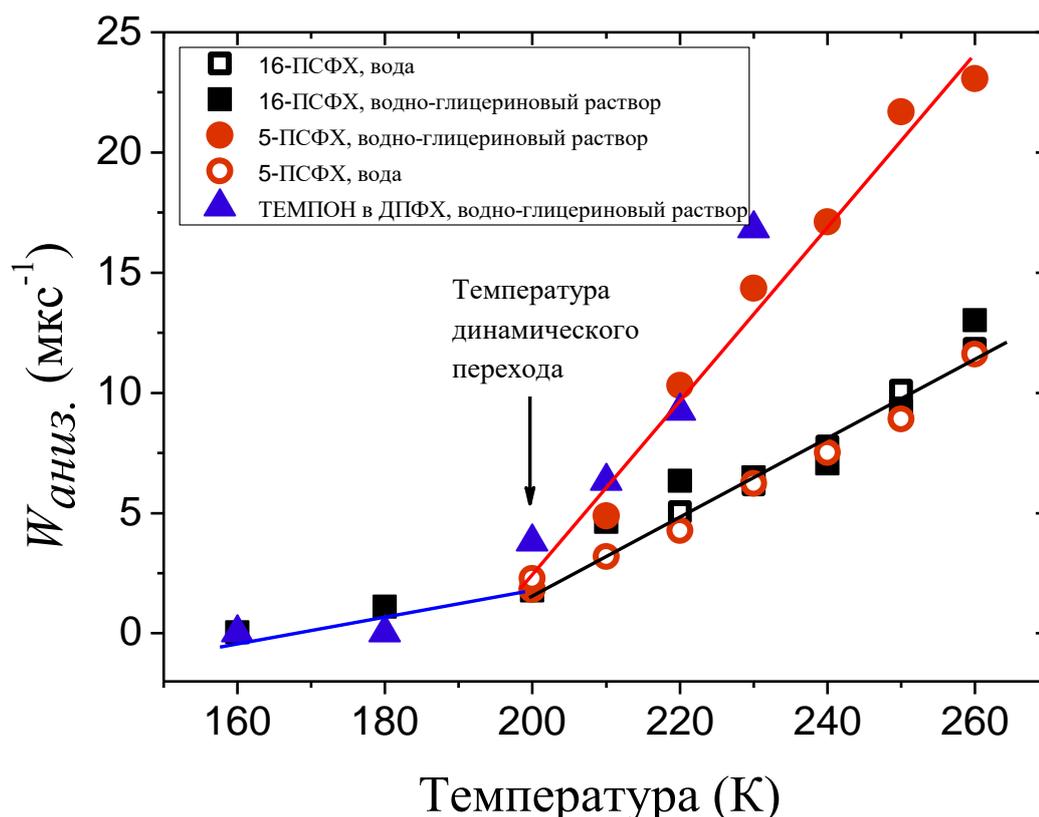


Рисунок 5.5 — Температурная зависимость параметра анизотропной релаксации  $W_{аниз}$  для образцов со спин-мечеными липидами в 5 положении (5-ПСФХ) и в 16 положении (16-ПСФХ). Гидратация производилась либо водой, либо водно-глицериновым раствором. Нитроксильный радикал ТЕМПОН, добавленный к фосфолипидам ДПФХ, гидратированным в водно-глицериновом растворе. Стрелкой указана температура динамического перехода.

#### 5.4 Обсуждение результатов

Метод стационарного ЭПР показывает значительное увеличение подвижности при повышении температуры как поверхностной части (5-ПСФХ), так и внутренней части (16-ПСФХ) липидного бислоя. При этом глицерин уменьшает амплитуду колебаний молекулы фосфолипида во внутренней части липидного бислоя (рисунок 5.4). Также параметр  $\langle A_{zz} \rangle$  сильно зависит от полярности среды, в которой находится спиновая метка. Не зависящий от температуры сдвиг величины  $\langle A_{zz} \rangle$  в случае гидратирования образцов в водно-

глицериновом растворе свидетельствует об изменении степени полярности в центре мембраны за счет проникновения глицерина.

Разная скорость изменения с температурой параметра  $W_{аниз}$  может говорить о разном окружении спинового зонда. Как видно из рисунка 5.5, для образца со спин-меченым липидом 5-ПСФХ скорость анизотропной релаксации значительно выше, чем для образца с липидом 16-ПСФХ. Для сравнения приведена температурная зависимость анизотропной релаксации для нитроксильного радикала ТЕМПОН в водно-глицериновом растворе. Поскольку температурные зависимости для спинового зонда ТЕМПОН и спиновой метки в 5 положении совпадают с хорошей точностью, можно сделать вывод, что динамика поверхностного слоя мембраны определяется в основном подвижностью окружающей мембрану водно-глицериновой матрицы.

В то же время подвижность молекул растворителя не влияет на подвижность глубинных слоев мембраны, поскольку динамика спиновой метки в 16 положении не меняется при гидратации водой или водно-глицериновом раствором (рисунок 5.5). Метод спинового эха чувствителен главным образом к ангармоническим либрациям, в отличие от метода стационарного ЭПР, который чувствителен к гармоническим колебаниям и к ангармоническим либрациям. Вероятно, этот факт может объяснить различие результатов: согласно стационарному ЭПР глицерин уменьшает амплитуду колебаний фосфолипидов в глубинной части мембраны, в то же время импульсные методы ЭПР не фиксируют изменения в подвижности центральной части бислоя вызванного влиянием глицерина.

## 5.5 Выводы по главе 5

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

## **Глава 6. Исследование влияния трегалозы, сахарозы и сорбита на подвижность модельной липидной мембраны**

К числу часто используемых в технологиях криоконсервации криопротекторов относятся сахароза, трегалоза и сорбит [Fuller, 2004]. Механизм их действия до сих пор не выяснен, однако в процессе исследований появилось несколько гипотез. Наиболее распространённой является гипотеза вытеснения воды, согласно которой молекулы дисахаридов замещают собой воду в окрестности липидной мембраны. При этом молекулы дисахаридов образуют водородные связи с полярными участками молекул липидов, что, вероятно, играет роль в стабилизации липидной мембраны [Vogaart, 2007]. Подробному описанию гипотезы вытеснения воды применительно к дисахаридам трегалозе и сахарозе посвящено введение к главе 4.

Для выяснения механизма криопротекторного действия дисахаридов интерес в первую очередь представляет влияние дисахаридов на структуру и динамику мембраны в экстремальных условиях заморозки и высушивания. Воздействие дисахаридов на структуру мембраны проявляется в значительном увеличении площади, приходящейся на одну молекулу липида. Было показано, что трегалоза способна встраиваться между полярными участками молекул фосфолипидов [Viera, 1993].

В противовес гипотезе вытеснения воды существует альтернативная теория, которая утверждает, что дисахариды не концентрируются вблизи липидной мембраны, а вытесняются в объем межклеточной жидкости. При этом их криозащитное действие объясняется изменением физико-химических свойств окружающего водного раствора [Koster, 2003, Wolfe, 1999].

Образование водородных связей с молекулами фосфолипидов должно приводить к изменению их подвижности. Методом  $^{31}\text{P}$  и  $^2\text{H}$  ЯМР спектроскопии было подтверждено, что присутствие сахарозы уменьшает вращательную подвижность молекул фосфолипидов и увеличивает температуру, при которой

эта подвижность начинает проявляться [Tang, 2007, Tsvetkova, 1998]. Также флуоресцентная корреляционная спектроскопия показывает уменьшение латеральной подвижности фосфолипидов в присутствии сахарозы [Bogaart, 2007].

Все вышеприведенные ссылки указывают на то, что присутствие дисахаридов должно существенно изменять динамические свойства липидной мембраны. Импульсный ЭПР обладает высокой информативностью применительно к исследованиям подвижности молекулярных систем. В работе [Ivanisenko, 2013] с помощью метода стимулированного эха исследовалось влияние сахарозы и сорбита на подвижность липидов в температурном диапазоне 200-220 К. Было выяснено, что липиды в данном температурном диапазоне испытывают медленные вращения и стохастические наносекундные либрации. Присутствие сахарозы или сорбита уменьшало подвижность как центральной части, так и поверхностного слоя мембраны.

В данной главе описаны результаты экспериментов, проведенных с целью установить влияние сахарозы, трегалозы и сорбита на подвижность липидной мембраны, используя методы стационарного и импульсного ЭПР.

## 6.1 Исследуемые образцы

Для создания модельной мембраны использовался фосфолипид ДПФХ. Спин-меченая (в 5, либо в 16 положениях по ацильной цепи) стеариновая кислота (рисунок 6.1) растворялась вместе с ДПФХ в молярном отношении 1:100 в хлороформе. Хлороформ выпаривался потоком газообразного азота, образцы высушивались под давлением  $10^{-3}$  бар в течение 24 часов. После высушивания образец гидратировался при температуре 62 °С с добавлением водного раствора сахарозы, трегалозы или сорбита концентрацией либо 0.2 моль/л, либо 1 моль/л.

Для определения подвижности спинового зонда в растворе сахарозы использовался нитроксильный радикал ТЕМПОН (рисунок 5.1). Все

эксперименты были проведены с использованием импульсного спектрометра Bruker Elexsys E580 с использованием резонатора ER4118-X-MD5 и криостата CF935. Охлаждение производилось потоком газообразного азота, температура которого контролировалась с точностью  $\pm 0.5$  К.

Для изучения влияния молекул криопротекторов на подвижность липидного бислоя использовались методы, описанный в разделах 2.2 и 2.3. Использовалась последовательность  $\frac{\pi}{2} - \tau - \pi - \tau - \text{echo}$  с длительностью импульсов 16 нс и 32 нс соответственно. Добротность резонатора была уменьшена с целью сократить приборное «мертвое время» до 100 нс. Амплитуда СВЧ-импульсов составляла около 6 Гс. Время задержки между импульсами  $\tau$  сканировалось от 120 нс до 920 нс с шагом 4 нс.

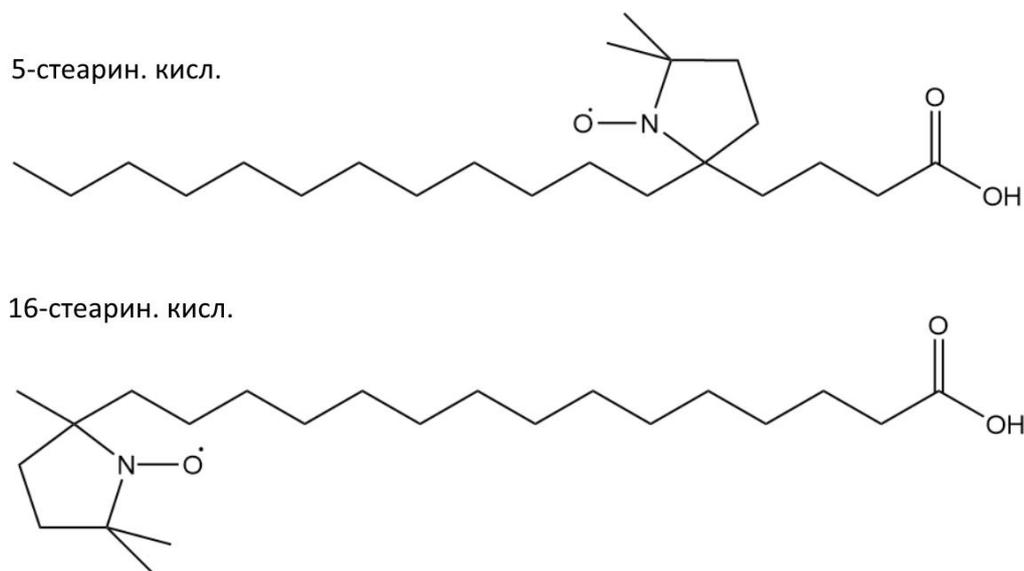


Рисунок 6.1 — Структура спин-меченых стеариновых кислот

## 6.2 Экспериментальные результаты

### 6.2.1 Анализ стационарных спектров ЭПР

Известно, что эффективное значение главного тензора СТВ  $\langle A_{zz} \rangle$  зависит от подвижности спиновой метки. Параметр  $2\langle A_{zz} \rangle$  может быть с хорошей точностью определен из стационарных спектров ЭПР как расстояние между крайними линиями спектра (рисунок 5.2). Параметр  $\langle A_{zz} \rangle$  пропорционален среднеквадратичному угловому отклонению  $\langle \alpha^2 \rangle$  молекулы спиновой метки в рамках модели наносекундных либраций. Таким образом, из стационарных спектров ЭПР можно определить среднеквадратичную угловую амплитуду либраций  $\langle \alpha^2 \rangle$ . При этом нужно помнить, что параметр  $\langle A_{zz} \rangle$  также чувствителен к полярности окружения спиновой метки.

К недостаткам метода можно отнести то, что стационарные спектры могут существенно уширяться за счет насыщения. Это увеличивает погрешность измерения параметра  $\langle A_{zz} \rangle$ . Кроме этого, параметр  $A_{zz}$  зависит от полярности окружения спиновой метки, что также усложняет анализ спектра ЭПР. В результате погрешность определения параметра  $2\langle A_{zz} \rangle$  оказывается не меньше  $\pm 0.02$  мТл. Температурные зависимости значения параметра  $2\langle A_{zz} \rangle$  показаны на рисунке 6.2

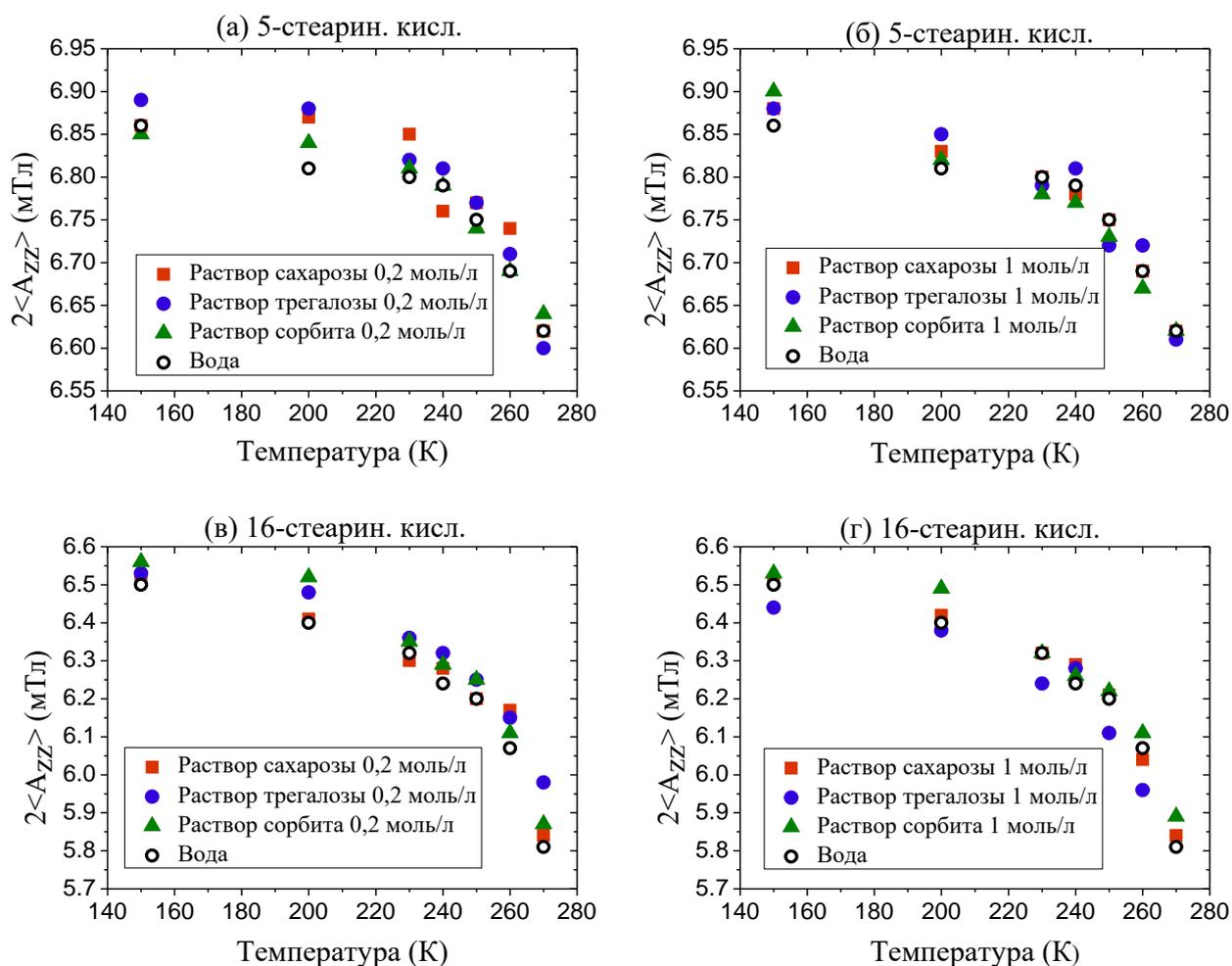


Рисунок 6.2 — Температурная зависимость параметра  $2\langle A_{zz} \rangle$  модельной мембраны со стеариновой кислотой, спин-меченой в 5 (а, б) и 16 (в, г) положениях по ацильной цепи. Гидратация образцов проводилась водой и водными растворами сахарозы, трегалозы и сорбита концентрацией 0,2 моль/л (а, в) и 1 моль/л (б, г).

### 6.2.2 Анализ спадов сигнала ЭСЭ

Параметр анизотропной релаксации  $W_{аниз}$ , который определяется с помощью метода, описанного в параграфе 5.2.2, пропорционален среднеквадратичному угловому отклонению  $\langle \alpha^2 \rangle$  и времени корреляции  $\tau_c$  либрационного движения, совершаемого спиновой меткой. Эксперименты были проведены с образцами, состоящими из спин-меченых в 5 и 16 положениях вдоль ацильной цепи стеариновых кислот в модельной мембране из ДПФХ,

гидратированных в водных растворах сахарозы, трегалозы и сорбита концентрацией 0.2 и 1 моль/л. Результаты представлены на рисунке 6.3.

Небольшой отрицательный вклад при низких температурах объясняется процессом мгновенной диффузии. Этот вклад в релаксацию зависит от концентрации спиновых меток и не зависит от температуры, так что влияние мгновенной диффузии не искажает температурной зависимости анизотропной релаксации.

Из рисунка 6.3 видно, что параметр  $W_{аниз}$  начинает значительно увеличиваться при температурах выше 170-200 К. При температурах выше 200 К присутствие сахаров проявляет себя в уменьшении значения  $W_{аниз}$  по сравнению с образцами, гидратированными в чистой воде. Особенно сильно этот эффект заметен для сорбита.

Параметр  $W_{аниз}$  начинает увеличиваться уже при 120 К для образцов с сахарозой. Для трегалозы эта динамика обнаруживается только для 16 положений спиновой метки, для сорбита подобного эффекта не наблюдается. Выше температуры 200 К  $W_{аниз}$  в присутствии дисахаридов уменьшается по сравнению с гидратацией чистой водой.

При низких температурах параметр  $W_{аниз}$  принимает отрицательные значения из-за эффекта мгновенной спектральной диффузии. Мгновенной спектральной диффузией называют явление изменения локального магнитного поля в точке нахождения определенного спина, в результате чего Зеемановская частота этого спина изменяется, что приводит к изменению формы линии спектра. Изменение локального магнитного поля происходит за счет действия СВЧ импульсов, которые возбуждают окружающие спины. Этот эффект оказывает большее влияние на центральную компоненту спектра, что в процессе математической обработки данных приводит к отрицательным значениям  $W_{аниз}$ . Эффект мгновенной диффузии сильно зависит от концентрации спинов и

Поэтому величина эффекта оказывается разной для разных образцов. Эффект мгновенной диффузии не зависит от температуры [Erilov, 2004].

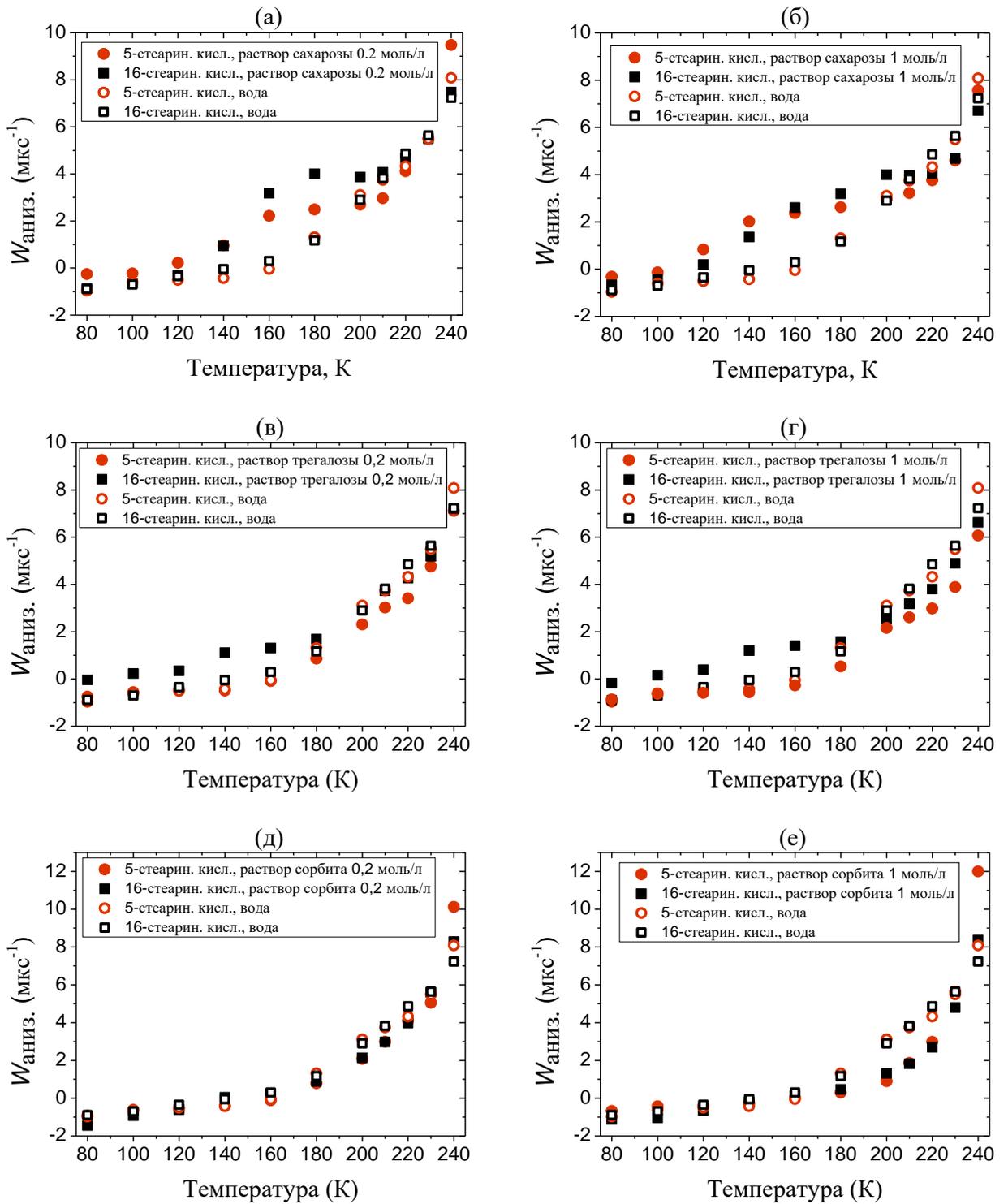


Рисунок 6.3 — Температурные зависимости величины анизотропной релаксации  $W_{\text{аниз.}}$ .

Образцы, гидратировались водными растворами сахарозы (а,б), трегалозы (в,г), сорбита (д,е) с концентрацией 0,2 моль/л и 1 моль/л.

Для сравнения температурная зависимость  $W_{\text{аниз}}$  была исследована также для спинового зонда ТЕМПОН в водном растворе сахарозы (4 моль/л). Из рисунка 6.4 видно, что увеличение  $W_{\text{аниз}}$  в температурном интервале 120-180 К связано именно с воздействием сахарозы на липидную мембрану.

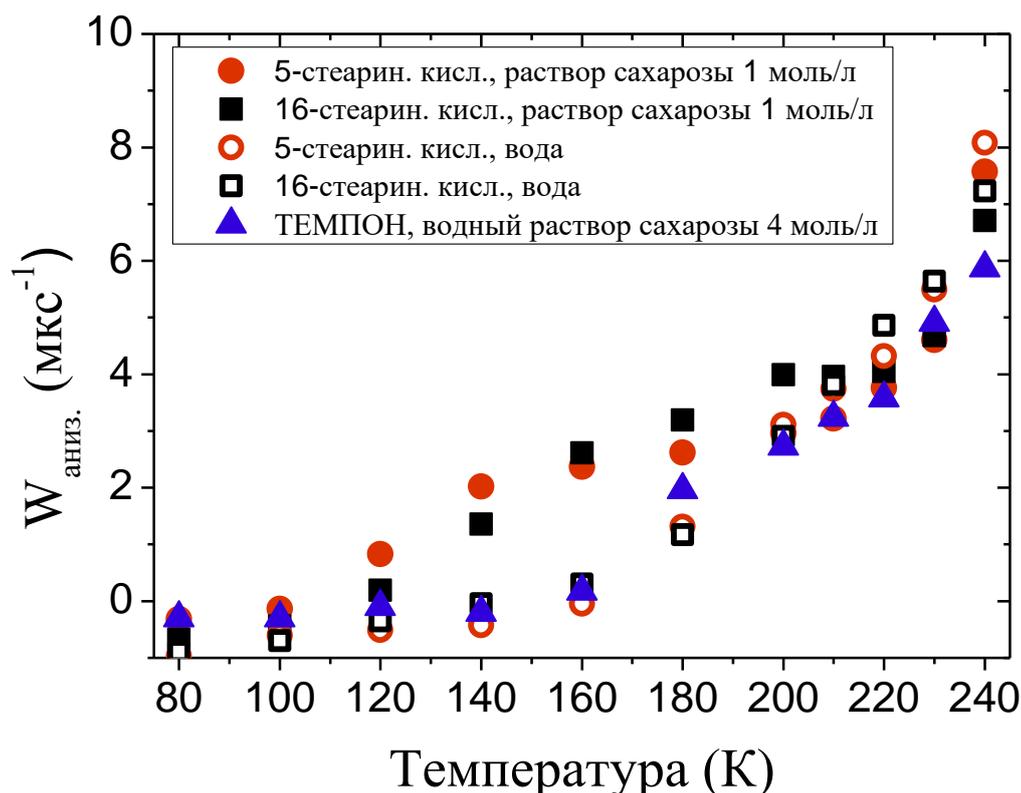


Рисунок 6.4 — Температурная зависимость скорости анизотропной релаксации  $W_{\text{аниз}}$  для образцов со спин-мечеными стеариновыми кислотами, гидратированных в воде и водном растворе сахарозы, и для спинового зонда ТЕМПОН в водном растворе сахарозы 4 моль/л.

### 6.3 Обсуждение результатов

В отличие от импульсного ЭПР, который способен обнаруживать только приводящие к спиновой релаксации стохастические колебания, метод стационарного ЭПР чувствителен как к стохастическим, так и к гармоническим либрациям.

Как видно из рисунка 6.2, параметр  $\langle A_{zz} \rangle$  уменьшается при повышении температуры. Для стеариновой кислоты, спин-меченной в 5 положении вдоль ацильной цепи, параметр  $\langle A_{zz} \rangle$  заметно больше, чем у спин-меченой в 16 положении. Это связано с разной полярностью окружения спиновой метки, которая также влияет на значения тензора СТВ. Спиновая метка, расположенная на поверхности мембраны, находится в окружении значительного количества молекул воды, в то время как в центре мембраны вода почти отсутствует. Как известно, образование молекулами воды водородной связи с N-O фрагментами нитроксильной спиновой метки приводит к увеличению z-компоненты тензора СТВ  $A_{zz}$ .

Ранее уже было показано, что изменения  $W_{аниз}$  могут быть интерпретированы в рамках модели стохастических наносекундных либраций (раздел 2.3). Согласно этой интерпретации,  $W_{аниз} \sim \langle \alpha^2 \rangle \tau_c$ , где  $\langle \alpha^2 \rangle$  — среднеквадратичная угловая амплитуда либраций,  $\tau_c$  — характеристическое время корреляции.

Проблема влияния сахаров на подвижность липидной мембраны ранее исследовалась методами нейтронного рассеяния и Мессбауэровской спектроскопией. Эти методы способны определять среднеквадратичное отклонение атомов  $\langle r^2 \rangle$ . Для мембран, пептидов, протеинов, молекул ДНК и РНК среднеквадратичное отклонение  $\langle r^2 \rangle$  начинает увеличиваться при температуре выше 200 К. Это связывают с динамическим переходом — появлением ангармонической составляющей в либрационном движении молекул. Таким образом, рост параметра  $W_{аниз}$  при температурах выше 200 К можно также объяснить динамическим переходом.

Увеличение параметра  $W_{аниз}$  в несколько раз в диапазоне температур 100-200 К может свидетельствовать о взаимодействии дисахаридов с липидной мембраной. Предполагается, что дисахариды взаимодействуют с поверхностью

липидной мембраны, что приводит к увеличению средней площади поверхности мембраны, приходящейся на один фосфолипид. Большая пространственная свобода приводит к увеличению среднеквадратичного углового отклонения молекулы спиновой метки и времени корреляции движения. При этом, вероятно, значение имеет относительно большой размер молекулы дисахарида и ее способность образовывать водородные связи, поскольку для молекул сорбита подобного увеличения подвижности мембраны не наблюдается.

Из рисунка 6.4 видно, что изменение подвижности связано именно со специфическим взаимодействием дисахаридов с липидной мембраной, а не со свойствами стекла, образованного водными растворами дисахаридов. Динамика спинового зонда ТЕМПОН в водном растворе сахарозы почти не отличается от динамики спиновой метки внутри мембраны. В то же время сахароза сильно влияет на подвижность липидного бислоя как вблизи его поверхности, так и внутри. Следовательно, криозащитное действие сахарозы нельзя объяснить только лишь стеклованием сольватной оболочки биомембраны. Вероятно, образование водородных связей с полярными частями липидов и прохождение дисахаридов внутрь мембраны (глава 4) приводит к увеличению среднего расстояния между молекулами липида и стабилизации структуры липидного бислоя.

Рост величины параметра  $W_{\text{аниз}}$  для образцов со спиновой меткой в водном растворе сахарозы начинается уже при температуре 170 К, в то время как метод нейтронного рассеивания показывает для подобных образцов увеличение  $\langle r^2 \rangle$  при температурах выше 220 К. Такое несоответствие объясняется чувствительностью методов к разным диапазонам времен корреляции: метод нейтронного рассеивания чувствителен к временам корреляции меньше нескольких наносекунд, в то время как импульсный ЭПР — меньшим несколькими сотен наносекунд. Т.е. метод спинового эха чувствителен к более широкому спектру движений, по сравнению с методом нейтронного рассеивания.

## 6.4 Выводы по главе 6

1. Обнаружено изменение подвижности молекул липидов при гидратации водными растворами сахарозы и трегалозы. Увеличение скорости анизотропной релаксации  $W_{аниз}$  свидетельствует об увеличении подвижности молекул липидов. Данный эффект, вероятно, можно объяснить известным свойством дисахаридов увеличивать площадь, приходящуюся на одну молекулу липида. Бóльшая свобода движения должна приводить к увеличению амплитуды и времени корреляции движения.
2. При температурах выше 200 К при гидратации образцов водными растворами дисахаридов и сорбита величина  $W_{аниз}$  оказывается несколько меньше, чем при гидратации чистой водой. Этот факт можно объяснить сдвигом температуры динамического перехода при гидратации водными растворами дисахаридов и сорбита. Наиболее заметно этот эффект выражен для образцов с сорбитом. Предположительно, сорбит может проникать на определенную глубину внутрь липидного бислоя и изменять локальную вязкость, и, таким образом подавлять молекулярную подвижность.
3. Одним из факторов, разрушающих клеточную мембрану, является переход окружающей воды из жидкой фазы в кристаллическую. Наличие молекулярного движения означает отсутствие льда в окрестности мембраны. В присутствии сахарозы и трегалозы подвижность фосфолипидов сохраняется вплоть до температуры 130 К, в то время как при гидратации чистой водой подвижность отсутствует уже при температуре 160 К. Это также может служить доказательством существования прямого взаимодействия между молекулами дисахаридов и липидов. Однако, для образцов, гидратированных водным раствором сорбита, подобного не наблюдается.

## Заключение

Из исследований методом модуляции огибающей амплитуды электронного спинового эха спиновых меток

- получен профиль проникновения глицерина внутрь модельной липидной мембраны, при этом относительно высокая концентрация глицерина в центре мембраны является прямым подтверждением диффузионного прохождения глицерина сквозь липидный бислой;
- установлено, что процесс накопления дисахаридов у поверхности модельной липидной мембраны описывается в рамках модели адсорбции Ленгмюра, что свидетельствует о прямом связывании молекул сахарозы и трегалозы с поверхностью мембраны (подтверждение гипотезы вытеснения воды);
- получен профиль проникновения дисахаридов сахарозы и трегалозы внутрь модельной липидной мембраны, обнаружена их высокая концентрация в глубине мембраны.

Из исследований методом анизотропной релаксации электронного спинового эха спиновых меток

- установлено, что присутствие глицерина в гидратной оболочке липидной мембраны значительно изменяет интенсивность низкотемпературных ограниченных ориентационных движений меток в ее поверхностных слоях, но практически не влияет на такие движения в глубине мембраны, причем движения меток на поверхности мембраны коррелируют с движениями зондов в ее сольватной оболочке;
- обнаружено влияние сахарозы, трегалозы и сорбита в гидратной оболочке липидной мембраны на низкотемпературные ограниченные ориентационные движения меток внутри мембраны. Причем если в отсутствие сахаров эти движения размораживаются при 170-200 К (что соответствует известному в литературе так называемому динамическому

переходу), то в присутствии сахарозы и трегалозы эти движения размораживаются уже при 120 К, что может быть следствием расширения мембраны из-за ее прямого взаимодействия с сахарами (что можно считать еще одним подтверждением гипотезы вытеснения воды).

## **Благодарности**

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю доктору физ.-мат. наук профессору Сергею Андреевичу Дзюбе, без которого данная диссертация не могла бы быть написана. Также автор выражает благодарности сотрудникам лаборатории химии и физики свободных радикалов ИХКГ СО РАН, которые принимали непосредственное участие в обучении автора и проведении экспериментов Исаеву Николаю Павловичу и Леонову Дмитрию Вячеславовичу.

Автор благодарит за помощь сотрудников лаборатории спиновой физики и спиновой химии КФТИ КазНЦ РАН Салихова Кева Минуллиновича, Воронкову Виолету Константиновну, Волкова Михаила Юрьевича, Зарипова Руслана Булатовича, Суханова Андрея Анатольевича, Мингалиеву Людмилу Вячеславовну, Яцыка Ивана Владимировича.

## Список литературы

- Аппен, А.А. Химия стекла / А. А. Аппен. – Ленинград: Химия, 1974.– 352с.
- Геннис, Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функции / Р. Геннис. – Москва: Мир, 1997.– 624с.
- Гусев, Ю.А. Основы диэлектрической спектроскопии / Ю. А. Гусев. – Казань: КФУ, 2008.– 112с.
- Дзюба, С.А. Динамика молекул в неупорядоченных средах / С. А. Дзюба, Ю. Д. Цветков. – Новосибирск: Наука, 1991.– 118с.
- Карнаухов, А.П. Адсорбция. Текстура дисперсных и пористых материалов / А. П. Карнаухов. – Новосибирск: Наука, 1998.– 470с.
- Сонин, А.С. Лиотропные нематики / А. С. Сонин // Успехи физических наук. – 1987. – Т. 153, № 2. – с. 273–310.
- Abrami, L. Evidence for a glycerol pathway through aquaporin 1 (CHIP28) channels / L. Abrami, F. Tacnet, P. Ripoché // Eur. J. Physiol. – 1995. – Vol. 430. – p. 447–458.
- Altenbach, C. A collision gradient method to determine the immersion depth of nitroxides in lipid bilayers: application to spin-labeled mutants of bacteriorhodopsin / C. Altenbach, D. Greenhalgh, H. G. Khorana, W. L. Hubbell // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1994. – Vol. 91. – p. 1667–1671.
- Aman, K. Structure and dynamics of interfacial water in an La phase lipid bilayer from molecular dynamics simulations / K. Aman, E. Lindahl, O. Edholm // Biophys. J. – 2003. – Vol. 84. – p. 102–115.
- Ameloot, M. Effect of orientational order on the decay of the fluorescent anisotropy in membrane suspensions / M. Ameloot, H. Hendrickx, W. Herreman, H. Pottel, F. Cauwelaert, W. Meer // Biophys. J. – 1984. – Vol. 46. – p. 525–539.
- Andersen, H.D. Reconciliation of opposing views on membrane-sugar interactions. / H. D. Andersen, C. Hang, L. Arleth, G. H. Peters, P. Westh // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2011. – Vol. 108, № 5. – p. 1874–1878.
- Arakawa, T. Mechanism of poly(ethylene glycol) interaction with proteins / T. Arakawa, S. N. Timasheff // Biochim. – 1985. – Vol. 24. – p. 6756–6762.
- Aranda, F.J. Domain formation by a Rhodococcus sp. biosurfactant trehalose lipid incorporated into phosphatidylcholine membranes / F. J. Aranda, J. a. Teruel, M. J. Espuny, A. Marqués, Á. Manresa, E. Palacios-Lidón, A. Ortiz // Biochim. Biophys. Acta. – 2007. – Vol. 1768, № 10. – p. 2596–2604.
- Balasubramanian, S. Hydrogen-bond dynamics near a micellar surface: origin of the universal slow relaxation / S. Balasubramanian, S. Pal, B. Bagchi // Phys. Rev. Lett. – 2002. – Vol. 89, № 11. – p. 115505–115509.
- Bald, W.B. Cryogenic surgery / W. B. Bald, J. Fraser // Rep. Prog. Phys. – 1982. – Vol.

45. – p. 1381–1434.

Bale, J.S. Insects and low temperatures: from molecular biology to distributions and abundance / J. S. Bale, J. S. Bale // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 2002. – Vol. 357. – p. 849862.

Banerjee, D. Vitrification, relaxation and free volume in glycerol–water binary liquid mixture: spin probe ESR studies / D. Banerjee, S. V. Bhat // *J. Non. Cryst. Solids.* – 2009. – Vol. 335. – p. 2433–2438.

Bauminger, E.R. Dynamics of heme iron in crystals of metmyoglobin and deoxymyoglobin / E. R. Bauminger, S. G. Cohen, I. Nowik, S. Ofer, J. Yariv // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1983. – Vol. 80, № 3. – p. 736–740.

Beck, E.H. Plant resistance to cold stress: Mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening / E. H. Beck, R. Heim, J. Hansen // *J. Biosci.* – 2004. – Vol. 29, № 4. – p. 449–459.

Bellissen-Funelt, M.C. Status of experiments probing the dynamics of water in confinement / M. C. Bellissen-Funelt // *Eur. Phys. J. E.* – 2003. – Vol. 92. – p. 83–92.

Belton, P.S. IR and Raman spectroscopic studies of the interaction of trehalose with hen egg white lysozyme / P. S. Belton, A. M. Gil // *Biopolymers.* – 1994. – Vol. 34. – p. 957–961.

Bischof, J.C. Micro and nanoscale phenomenon in bioheat transfer / J. C. Bischof // *Heat Mass Transf.* – 2006. – Vol. 42. – p. 955–966.

Bizzarri, A.R. Molecular dynamics of water at the protein-solvent interface / A. R. Bizzarri, S. Cannistraro, U. Infm, S. Ambientali, V. Uni, I.- Viterbo // *J. Phys. Chem. B.* – 2002. – Vol. 106. – p. 6617–6633.

Bogaart, G. On the decrease in lateral mobility of phospholipids by sugars / G. Bogaart, N. Fermans, V. Krasnikov, A. H. Vries, B. Pollman // *Biophys. J.* – 2007. – Vol. 92. – p. 1598–1605.

Borle, F. Hydration of escherichia coli lipids / F. Borle, J. Seelig // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – Vol. 735. – p. 131–136.

Borovykh, I. V. The dynamical transition in proteins of bacterial photosynthetic reaction centers observed by echo-detected EPR of specific spin labels / I. V. Borovykh, P. Gast, S. A. Dzuba // *Appl. Magn. Reson.* – 2007. – Vol. 31. – p. 159–166.

Breton, G. Biotechnological applications of plant freezing associated proteins / G. Breton, J. Danyluk, F. Ouellet, F. Sarhan // *Biotech. Ann. Rev.* – 2000. – Vol. 6. – p. 59–101.

Brown, C.L. Freezing induces a loss of freeze tolerance in an overwintering insect / C. L. Brown, J. S. Bale, K. F. A. Walters, S. Hutton, Y. Yo // *Proc. R. Soc. Lond. B.* – 2004. – Vol. 271. – p. 1507–1511.

- Brown, F. NMR studies of glycerol permeability in lipid vesicles, erythrocytes and the alga *dunaliella* / F. Brown, I. Sussman, M. Avron, H. Degani // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 1982. – Vol. 690. – p. 165–173.
- Bryant, G. Dehydration of solute–lipid systems: hydration forces analysis / G. Bryant, K. L. Koster // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* – 2004. – Vol. 35. – p. 73–79.
- Bryant, G. Membrane behaviour in seeds and other systems at low water content : the various effects of solutes / G. Bryant, K. L. Koster, J. Wolfe // *Seed Sci. Res.* – 2001. – Vol. 11. – p. 17–25.
- Bryant, G. Can hydration forces induce lateral phase separations in lamellar phases? / G. Bryant, J. Wolfe // *Eur. Biophys. J.* – 1989. – Vol. 16. – p. 369–374.
- Buldt, G. Neutron diffraction studies on selectively Deuterated phospholipid bilayers / G. Buldt, H. U. Gally, A. Seelig, J. Seelig // *Nature.* – 1978. – Vol. 271. – p. 182–184.
- Buranaamnuay, K. Influence of cryoprotectants glycerol and amides , combined with antioxidants on quality of frozen-thawed boar sperm / K. Buranaamnuay, R. Grossfeld, C. Struckmann, D. Rath // *Anim. Reprod. Sci.* – 2011. – Vol. 127. – p. 56–61.
- Cadenhead, D.A. A comparison of a spin-label and a fluorescent cell membrane probe using pure and mixed monomolecular films / D. A. Cadenhead, B. M. J. Kellner, F. Muller-Landau // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1975. – Vol. 382. – p. 253–259.
- Caliskan, G. Dynamic transition in tRNA is solvent induced / G. Caliskan, R. M. Briber, D. Thirumalai, V. Garcia-Sakai, S. a. Woodson, A. P. Sokolov // *J. Am. Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 128, № 1. – p. 32–33.
- Carmieli, R. Utilizing ESEEM spectroscopy to locate the position of specific regions of membrane-active peptides within model membranes. / R. Carmieli, N. Papo, H. Zimmermann, A. Potapov, Y. Shai, D. Goldfarb // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 90, № 2. – p. 492–505.
- Casal, H.L. Infrared spectroscopic determination of water penetration in lipid bilayer membranes / H. L. Casal // *J. Phys. Chem.* – 1989. – Vol. 93. – p. 4328–4330.
- Cavender-Bares, J. Impacts of freezing on long distance transport in woody plants / ed.M.N. Holbrook, M.A. Zwieniecki. – Amsterdam, 2005., ch.19.– p.401–424.
- Chattopadhyay, A. Parallax method for direct measurement of membrane penetration depth utilizing fluorescence quenching by spin-labeled phospholipids / A. Chattopadhyay, E. London // *Biochemistry.* – 1987. – Vol. 26. – p. 39–45.
- Chen, S. Experimental evidence of fragile-to-strong dynamic crossover in DNA hydration water Experimental evidence of fragile-to-strong dynamic crossover in DNA hydration water / S. Chen, L. Liu, X. Chu, Y. Zhang, E. Fratini, P. Baglioni, A. Faraone, E. Mamontov, S. Chen, L. Liu, X. Chu, Y. Zhang // *J. Chem. Phys.* – 2006. – Vol. 125. – p. 171103–171107.
- Chen, S.C. Scanning calorimetric evidence for a third phase transition in phosphatidylcholine bilayers / S. C. Chen, J. M. Sturtevant, B. J. Gaffney // *Proc. Natl.*

Acad. Sci. USA. – 1980. – Vol. 77, № 9. – p. 5060–5063.

Chen, T. Beneficial effect of intracellular trehalose on the membrane integrity of dried mammalian cells / T. Chen, J. P. Acker, A. Eroglu, S. Cheley, H. Bayley, A. Fowler, M. Toner // *Cryobiology*. – 2001. – Vol. 43. – p. 168–181.

Cheng, Y. Surface topography dependence of biomolecular hydrophobic hydration / Y. Cheng, P. J. Rossky // *Lett. to Nat.* – 1998. – Vol. 392. – p. 5–8.

Cicero, G. Water at a hydrophilic solid surface probed by ab initio molecular dynamics: inhomogeneous thin layers of dense fluid / G. Cicero, J. C. Grossman, A. Catellani, G. Galli, L. V California, P. Area // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – Vol. 127. – p. 6830–6835.

Cieslak, J.A. Electron spin-echo envelope modulation (ESEEM) reveals water and phosphate interactions with the KcsA potassium channel / J. A. Cieslak, P. J. Focia, A. Gross // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49. – p. 1486–1494.

Clegg, J.S. Cellular responses to extreme water loss: the water-replacement hypothesis / J. S. Clegg, P. Seitz, W. Seitz, C. F. Hazlewoodt // *Cryobiology*. – 1982. – Vol. 19. – p. 306–316.

Cornicchi, E. Thermal fluctuations of DNA enclosed by glycerol–water glassy matrices: an elastic neutron scattering investigation / E. Cornicchi, S. Capponi, M. Marconi, G. Onori, A. Paciaroni // *Eur. Biophys. J.* – 2008. – Vol. 37. – p. 583–590.

Cornicchi, E. Picosecond-time-scale fluctuations of proteins in glassy matrices: the role of viscosity / E. Cornicchi, G. Onori, A. Paciaroni // *Phys. Rev. Lett.* – 2005. – Vol. 95. – p. 158104–58108.

Costa-Filho, A.J. Lipid-gramicidin interactions: dynamic structure of the boundary lipid by 2D-ELDOR / A. J. Costa-Filho, R. H. Crepeau, P. P. Borbat, M. Ge, J. H. Freed // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 84. – p. 3364–3378.

Costanzo, J.P. Physiological responses to freezing in hatchlings of freeze-tolerant and -intolerant turtles / J. P. Costanzo, P. J. Baker, R. E. Lee // *J. Comp. Physiol. B.* – 2006. – Vol. 176. – p. 697–707.

Cottone, G. Protein-trehalose-water structures in trehalose coated carboxy-myoglobin / G. Cottone, G. Ciccotti, L. Cordone // *J. Chem. Phys.* – 2002. – Vol. 117. – p. 9862–9866.

Crowe, J.H. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars / J. H. Crowe, L. M. Crowe, J. F. Carpenter, C. Aurell Wistrom // *Biochem. J.* – 1987. – Vol. 242. – p. 1–10.

Crowe, J.H. Interactions of sugars with membranes / J. H. Crowe, L. M. Crowe, J. F. Carpenter, a S. Rudolph, C. a Wistrom, B. J. Spargo, T. J. Anchordoguy // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1988. – Vol. 947. – p. 367–384.

Crowe, J.H. Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen / J. H. Crowe, F. A. Hoekstra, L. M. Crowe // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* –

1989. – Vol. 86. – p. 520–523.

Crowe, J.H. Preservation of dry liposomes does not require retention of residual water. / J. H. Crowe, B. J. Spargo, L. M. Crowe // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1987. – Vol. 84, № 6. – p. 1537–1540.

Crowe, L.M. Trehalose and dry dipalmitoylphosphatidylcholine revisited / L. M. Crowe, J. H. Crowe // Biochim. Biophys. Acta. – 1988. – Vol. 946. – p. 193–201.

Crowe, L.M. Prevention of fusion and leakage in freeze-dried liposomes by carbohydrates / L. M. Crowe, C. Womersley, J. H. Crowe, D. Reid, L. Appel, A. Rudolph // Biochim. Biophys. Acta. – 1986. – Vol. 861. – p. 131–140.

Curry, M.R. Calculated Optimal Cooling Rates for Ram and Human Sperm Cryopreservation Fail to Conform with Empirical Observations / M. R. Curry, J. D. Millar, P. F. Watson // Biol. Reprod. – 1994. – Vol. 51. – p. 1014–1021.

Davis, J.H. The description of membrane lipid conformation, order and dynamics by <sup>2</sup>H-NMR / J. H. Davis // Biochim. Biophys. Acta. – 1983. – Vol. 737. – p. 117–171.

Denlinger, D.L. Physiology of cold sensitivity / D. L. Denlinger, R. E. Lee. / ed.G.J. Hallman, D.L. Denlinger. – Boulder: Westview press, 1998.– 311p.

Devaux, P.F. ESR and NMR Studies of Lipid-Protein Interactions in Membranes / ed.L.J. Berliner, J. Reuben. – New York: Plenum Press, 1983. – Vol.5, ch.5.– p.183–292.

Devries, A.L. Structure of a peptide antifreeze and mechanism of adsorption to ice / A. L. Devries, Y. Lin // Biochim. Biophys. Acta. – 1977. – Vol. 495. – p. 388–392.

Dirama, T.E. Coupling between lysozyme and glycerol dynamics: Microscopic insights from molecular-dynamics simulations / T. E. Dirama, G. A. Carri, A. P. Sokolov // J. Chem. Phys. – 2005. – Vol. 122. – p. 244910–244920.

Dokter, A.M. Ultrafast dynamics of water in cationic micelles / A. M. Dokter, S. Woutersen, H. J. Bakker, A. M. Dokter, S. Woutersen, H. J. Bakker // J. Chem. Phys. – 2007. – Vol. 126. – p. 124507–124517.

Donnamaria, M.C. Interaction of water with  $\alpha,\alpha$ -trehalose in solution: molecular dynamics simulation approach / M. C. Donnamaria, E. Howard, J. R. Grigera // J. Chem. Soc. Faraday Trans. – 1994. – Vol. 90. – p. 2731–2735.

Doster, W. Dynamical transition of myoglobin revealed by inelastic neutron scattering // Nature. – 1989. – T. 337. – № 6209. – 754–756c.

Drobnis, E.Z. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model / E. Z. Drobnis, L. M. Crowe, T. Berger, T. J. Anchordoguy, J. W. Overstreet, J. H. Crowe // J. Exp. Zool. – 1993. – Vol. 265. – p. 432–437.

Dufourc, E.J. Role of cyclopropane moieties in the lipid properties of biological membranes: a <sup>2</sup>H NMR structural and dynamical approach / E. J. Dufourc, I. C. P.

- Smith, H. C. Jarrell // *Biochemistry*. – 1984. – Vol. 23. – p. 2300–2309.
- Duman, J.G. The role of macromolecular antifreezes in cold water fishes / J. G. Duman, A. L. Devries // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1975. – Vol. 52A. – p. 193–199.
- Dzikovski, B. Conformational distributions and hydrogen bonding in gel and frozen lipid bilayers: A high frequency spin-label ESR study / B. Dzikovski, D. Tipikin, J. Freed // *J. Phys. Chem. B*. – 2012. – Vol. 116. – p. 6694–6706.
- Dzikovski, B.G. Oxygen permeation profile in lipid membranes: comparison with transmembrane polarity profile / B. G. Dzikovski, V. a Livshits, D. Marsh // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 85. – p. 1005–1012.
- Dzuba, S.A. Librational motion of guest spin probe molecules in glassy media / S. A. Dzuba // *Phys. Lett. A*. – 1996. – Vol. 213. – p. 77–84.
- Dzuba, S.A. On the possible manifestation of harmonic-anharmonic dynamical transition in glassy media in electron paramagnetic resonance of nitroxide spin probes / S. A. Dzuba, E. P. Kirillina, E. S. Salnikov // *J. Chem. Phys.* – 2006. – Vol. 125. – p. 054502–054507.
- Dzuba, S.A. Echo-induced EPR spectra of nitroxides in organic glasses: model of orientational molecular motions near equilibrium position / S. A. Dzuba, Y. D. Tsvetkov // *Chem. Phys. Lett.* – 1992. – Vol. 188. – p. 217–222.
- Earle, K. a 250-GHz electron spin resonance studies of polarity gradients along the aliphatic chains in phospholipid membranes / K. a Earle, J. K. Moscicki, M. Ge, D. E. Budil, J. H. Freed // *Biophys. J.* – 1994. – Vol. 66. – p. 1213–1221.
- Ellena, J.F. Localizing the nitroxide group of fatty acid and voltage-sensitive spin-labels in phospholipid bilayers / J. F. Ellena, S. J. Archer, R. N. Dominey, B. D. Hill, D. S. Cafiso // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1988. – Vol. 940. – p. 63–70.
- Erilov, D. a Librational motion of spin-labeled lipids in high-cholesterol containing membranes from echo-detected EPR spectra / D. a Erilov, R. Bartucci, R. Guzzi, D. Marsh, S. a Dzuba, L. Sportelli // *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 87, № 6. – p. 3873–3881.
- Erilov, D.A. Echo-detected electron paramagnetic resonance spectra of spin-labeled lipids in membrane model systems / D. A. Erilov, R. Bartucci, R. Guzzi, D. Marsh, S. A. Dzuba, V. Uni // *J. Phys. Chem. B*. – 2004. – Vol. 108. – p. 4501–4507.
- Eroglu, A. Quantitative microinjection of trehalose into mouse oocytes and zygotes, and its effect on development / A. Eroglu, J. A. Lawitts, M. Toner, T. L. Toth // *Cryobiology*. – 2003. – Vol. 46. – p. 121–134.
- Eroglu, A. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells / A. Eroglu, M. J. Russo, R. Bieganski, A. Fowler, S. Cheley, H. Bayley, M. Toner // *Nat. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 18. – p. 163–167.
- Falconi, M. Static and dynamic water molecules in Cu, Zn superoxide dismutase / M. Falconi, M. Brunelli, A. Pesce, M. Ferrario, M. Bolognesi, A. Desideri // *Proteins Struct. Funct. Genet.* – 2003. – Vol. 51. – p. 607–615.

- Franks, F. Nucleation of ice and its management in ecosystems / F. Franks // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* – 2003. – Vol. 361. – p. 557–574.
- Fukuzaki, M. Comparison of water relaxation time in serum albumin solution using nuclear magnetic resonance and time domain reflectometry / M. Fukuzaki, N. Miura, N. Shinyashiki, D. Kurita, S. Shioya, M. Haida, S. Mashimo // *J. Phys. Chem.* – 1995. – Vol. 99. – p. 431–435.
- Fuller, B.J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state / B. J. Fuller // *CryoLetters.* – 2004. – Vol. 25, № 6. – p. 375–388.
- Golovina, E.A. Water replacement hypothesis in atomic details: Effect of trehalose on the structure of single dehydrated POPC bilayers / E. A. Golovina, A. Golovin, F. A. Hoekstra, R. Faller // *Langmuir.* – 2010. – Vol. 26, № 13. – p. 11118–11126.
- Gorter, E. On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood / E. Gorter, F. Grendel // *J. Exp. Med.* – 1925. – Vol. 41. – p. 439–443.
- Guzzi, R. Spin-echo EPR of Na, K-ATPase unfolding by urea / R. Guzzi, M. Babavali, R. Bartucci, L. Sportelli, M. Esmann, D. Marsh // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1808. – p. 1618–1628.
- Guzzi, R. Conformational heterogeneity and spin-labeled -SH groups: pulsed EPR of Na, K-ATPase / R. Guzzi, R. Bartucci, L. Sportelli, M. Esmann, D. Marsh // *Biochemistry.* – 2009. – Vol. 48. – p. 8343–8354.
- Halle, B. Protein hydration dynamics in solution: a critical survey / B. Halle // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* – 2004. – Vol. 359. – p. 1207–1224.
- Hauser, H. Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine / H. Hauser, I. Pascher, R. H. Pearson, S. Sundell // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1981. – Vol. 650. – p. 21–51.
- Henchman, R.H. Structural and dynamic properties of water around acetylcholinesterase / R. H. Henchman, J. A. McCammon // *Protein Sci.* – 2002. – Vol. 11. – p. 2080–2090.
- Henin, J. Diffusion of glycerol through Escherichia coli aquaglyceroporin GlpF / J. Henin, E. Tajkhorshid, K. Schulten, C. Chipot // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 94. – p. 832–839.
- Heyden, M. Solute-induced retardation of water dynamics probed directly by terahertz spectroscopy / M. Heyden, X. Yu, D. M. Leitner, M. Havenith, U. Heugen, G. Schwaab, E. Bru // *PNAS.* – 2006. – Vol. 103, № 33. – p. 12301–12306.
- Hiemstra, S.J. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies – Turin, 2005.– p.25–36.
- Higgins, M.J. Structured water layers adjacent to biological membranes / M. J. Higgins, M. Polcik, T. Fukuma, J. E. Sader, Y. Nakayama, S. P. Jarvis // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 91. – p. 2532–2542.

- Hladky, S.B. Membrane conductance and surface potential / S. B. Hladky, D. A. Haydon // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – Vol. 318. – p. 464–468.
- Holt, C.B. Substances which inhibit ice nucleation: a review / C. B. Holt // *CryoLetters.* – 2003. – Vol. 24. – p. 269–274.
- Hsieh, C. Three distinct types of unfrozen water in fully hydrated phospholipid bilayers: a combined  $^2\text{H}$ - and  $^{31}\text{P}$ -NMR study / C. Hsieh, W. Wu // *Chem. Phys. Lipids.* – 1995. – Vol. 78. – p. 37–45.
- Isaev, N.P. Fast Stochastic Librations and Slow Rotations of Spin Labeled Stearic Acids in a Model Phospholipid Bilayer at Cryogenic Temperatures / N. P. Isaev, S. A. Dzuba // *J. Phys. Chem. B.* – 2008. – Vol. 112. – p. 13285–13291.
- Ivanisenko, N. V. Molecular motion in frozen phospholipid bilayers in the presence of sucrose and sorbitol studied by the spin-echo EPR of spin labels / N. V. Ivanisenko, S. A. Dzuba // *Appl. Magn. Reson.* – 2013. – Vol. 44. – p. 883–891.
- Jedlovsky, P. Orientational order of the water molecules across a fully hydrated DMPC bilayer : A monte carlo simulation study / P. Jedlovsky, M. Mezei // *J. Phys. Chem. B.* – 2001. – Vol. 105. – p. 3614–3623.
- Johari, G.P. Viscous liquids and the glass transition. II. Secondary relaxation in glasses of rigid molecules / G. P. Johari, M. Goldstein // *J. Chem. Phys.* – 1970. – Vol. 53, № 6. – p. 2372–2388.
- Jordanides, X.J. Solvation dynamics in protein environments studied by photon echo spectroscopy / X. J. Jordanides, M. J. Lang, X. Song, G. R. Fleming // *J. Phys. Chem. B.* – 1999. – Vol. 103. – p. 7995–8005.
- Kapla, J. Molecular dynamics simulations of membrane–sugar interactions / J. Kapla, J. Wohler, B. Stevansson, O. Engstrom, G. Widmalm, A. Maliniak // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – Vol. 117, № 22. – p. 6667–6673.
- Karlsson, J.O.M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues / J. O. M. Karlsson, M. Toner // *Biomaterials.* – 1996. – Vol. 17. – p. 243–256.
- Karlsson, J.O.M. Cryopreservation / ed.R. Lanza. – New-York: Academic Press, 2000., ch.24.– p.293–307.
- Kent, B. Localization of trehalose in partially hydrated DOPC bilayers: insights into cryoprotective mechanisms / B. Kent, T. Hunt, T. A. Darwish, T. Haub, C. J. Garvey, G. Bryant // *J. R. Soc. Interface.* – 2015. – Vol. 11. – p. 1–6.
- Kirilina, E.P. Librational dynamics of nitroxide molecules in a molecular glass studied by echo-detected EPR / E. P. Kirilina, S. a. Dzuba, a. G. Maryasov, Y. D. Tsvetkov // *Appl. Magn. Reson.* – 2001. – Vol. 21, № 2. – p. 203–221.
- Kirilina, E.P. Orientational motion of nitroxides in molecular glasses: Dependence on the chemical structure, on the molecular size of the probe, and on the type of the matrix / E. P. Kirilina, I. a. Grigoriev, S. a. Dzuba // *J. Chem. Phys.* – 2004. – Vol. 121, № 24. – p. 12465–12471.

- Klauder, J. Spectral diffusion decay in spin resonance experiments / J. Klauder, P. Anderson // *Phys. Rev.* – 1962. – Vol. 125, № 3. – p. 912–932.
- Knight, C.A. Inhibition of recrystallization of ice by insect thermal hysteresis proteins: a possible cryoprotective role / C. A. Knight, J. G. Duman // *Cryobiology.* – 1986. – Vol. 23. – p. 256–262.
- Koch, H.J. The catalytic C-deuteration of some carbohydrate derivatives / H. J. Koch, R. S. Stuart // *Carbohydr. Res.* – 1978. – Vol. 67. – p. 341–348.
- Korber, C. The influence of hydroxyethyl starch on ice formation in aqueous solutions / C. Korber, M. W. Scheiwe, P. Boutron, G. Rau // *Cryobiology.* – 1982. – Vol. 19. – p. 478–492.
- Koster, K.L. Exclusion of maltodextrins from phosphatidylcholine multilayers during dehydration: effects on membrane phase behaviour / K. L. Koster, K. J. Maddocks, G. Bryant // *Eur. Biophys. J.* – 2003. – Vol. 32, № 2. – p. 96–105.
- Koynova, R. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines / R. Koynova, M. Caffrey // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* – 1998. – Vol. 1376, № 1. – p. 91–145.
- Kumar, P. Thermodynamics, structure, and dynamics of water confined between hydrophobic plates / P. Kumar, S. V Buldyrev, F. W. Starr, N. Giovambattista, H. E. Stanley // *Phys. Rev. E.* – 2005. – Vol. 72. – p. 051503–051515.
- Kumar, P.B.S. Modulated phases in multicomponent fluid membranes / P. B. S. Kumar, G. Gompper, R. Lipowsky // *Phys. Rev. E.* – 1999. – Vol. 60, № 4. – p. 4610–4618.
- Kurad, D. Lipid membrane polarity profiles by high-field EPR / D. Kurad, G. Jeschke, D. Marsh // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 85. – p. 1025–1033.
- Kyrychenko, A. Molecular dynamics simulations of depth distribution of spin-labeled phospholipids within lipid bilayer / A. Kyrychenko, A. S. Ladokhin // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – Vol. 117, № 19. – p. 5875–5885.
- Layne, J.R. Freeze Tolerance in the Gray Treefrog: Cryoprotectant Mobilization and Organ Dehydration / J. R. Layne, A. L. Jones // *J. Exp. Zool.* – 2001. – Vol. 290. – p. 1–5.
- Layne, J.R. Adaptations of frogs to survive freezing / J. R. Layne, R. E. Lee // *Clim. Res.* – 1992. – Vol. 5. – p. 53–59.
- Lee, J.K. Water and glycerol permeation through the glycerol channel GlpF and the aquaporin family / J. K. Lee, S. Khademi, W. Harries, D. Savage, L. Miecke, R. M. Stroud // *J. Synchrotron Rad.* – 2004. – Vol. 11. – p. 86–88.
- Lee, R.E. Biological ice nucleation and ice distribution in cold-hardy ectothermic animals / R. E. Lee, J. P. Costanzo // *Annu. Rev. Physiol.* – 1998. – Vol. 60. – p. 55–72.

- Leibo, S.P. Microscopic Observation of Intracellular as a Function Ice Formation in Unfertilized Mouse Ova as a Function of Cooling Rate / S. P. Leibo, M. J. J., E. G. Cravalho // *Cryobiology*. – 1978. – Vol. 15. – p. 257–271.
- Lenne, T. Location of sugars in multilamellar membranes at low hydration / T. Lenne, G. Bryant, C. J. Garvey, U. Keiderling, K. L. Koster, T. Lenne // *Phys. B*. – 2006. – Vol. 385-386. – p. 862–864.
- Lenné, T. How much solute is needed to inhibit the fluid to gel membrane phase transition at low hydration? / T. Lenné, G. Bryant, R. Holcomb, K. L. Koster // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 2007. – Vol. 1768, № 5. – p. 1019–1022.
- Lenne, T. Effects of sugars on lipid bilayers during dehydration-SAXS/WAXS measurements and quantitative model / T. Lenne, C. J. Garvey, K. L. Koster, G. Bryant // *J. Phys. Chem. B*. – 2009. – Vol. 113. – p. 2486–2491.
- Li, D. Predict the glass transition temperature of glycerol-water binary cryoprotectant by molecular dynamic simulation / D. Li, B. Liu, Y. Liu, C. Chen // *Cryobiology*. – 2008. – Vol. 56. – p. 114–119.
- Libertini, L.J. Orientation dependence of the electron spin resonance spectrum of ditbutyl nitroxide / L. J. Libertini, O. H. Griffith // *J. Chem. Phys.* – 1970. – Vol. 53. – p. 1359.
- Lillford, P.J. In vitro uses of biological cryoprotectants / P. J. Lillford, C. B. Holt // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. – 2002. – Vol. 357. – p. 945–951.
- Lin, C. Membrane lipid phase transition behavior of oocytes from three gorgonian corals in relation to chilling injury / C. Lin, F. Kuo, S. Chavanich, V. Viyakarn // *LPT Coral Oocytes*. – 2014. – Vol. 9. – p. 1–6.
- Lins, R.D. Trehalose-protein interaction in aqueous solution / R. D. Lins, C. S. Pereira, P. H. Hunenberger // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* – 2004. – Vol. 55. – p. 177–186.
- Livshits, V. a Mechanism of relaxation enhancement of spin labels in membranes by paramagnetic ion salts: dependence on 3d and 4f ions and on the anions / V. a Livshits, B. G. Dzikovski, D. Marsh // *J. Magn. Reson.* – 2001. – Vol. 148. – p. 221–237.
- Lovelock, J.E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing / J. E. Lovelock // *Sedimentation Diffus. Albumins*. – 1953. – Vol. 56. – p. 265–270.
- Lundheim, R. Physiological and ecological significance of biological ice nucleators / R. Lundheim // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. – 2002. – Vol. 357. – p. 937–943.
- Luzardo, M.C. Effect of trehalose and sucrose on the hydration and dipole potential of lipid bilayers / M. C. Luzardo, F. Amalfa, a M. Nuñez, S. Díaz, a C. Biondi De Lopez, E. a Disalvo // *Biophys. J.* – 2000. – Vol. 78. – p. 2452–2458.
- Margesin, R. Cold-loving microbes, plants, and animals — fundamental and applied aspects / R. Margesin, G. Neuner, K. B. Storey // *Naturwissenschaften*. – 2007. – Vol.

94. – p. 77–99.

Marsh, D. Spin-label EPR for determining polarity and proticity in biomolecular assemblies: Transmembrane profiles / D. Marsh // *Appl. Magn. Reson.* – 2010. – Vol. 37, № 1. – p. 435–454.

Mickan, S.P. Terahertz spectroscopy of bound water in nano suspensions / S. P. Mickan, J. Dordick, J. Munch, D. Abbott, X. Zhang // *Biomed. Appl. Micro- Nanoeng.* – 2002. – Vol. 4937. – p. 49–61.

Milhaud, J. New insights into water–phospholipid model membrane interactions / J. Milhaud // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1663. – p. 19–51.

Miller, K. Cold-hardiness strategies of some adult and immature insect overwintering in interior Alaska / K. Miller // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1982. – Vol. 73A, № 4. – p. 595–604.

Milov, A.D. ESEEM measurements of local water concentration in D2O-containing spin-labeled systems / A. D. Milov, R. I. Samoiloova, A. A. Shubin, Y. A. Grishin // *Appl. Magn. Reson.* – 2008. – Vol. 35. – p. 73–94.

Morris, G.J. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation / G. J. Morris, M. Goodrich, E. Acton, F. Fonseca // *Cryobiology.* – 2006. – Vol. 52. – p. 323–334.

Nandi, N. Dielectric relaxation and solvation dynamics of water in complex chemical and biological systems / N. Nandi // *Chem. Rev.* – 2000. – Vol. 100. – p. 2013–2045.

Neil, L.O. Vitrification of mature mouse oocytes in a 6 M Me2SO solution supplemented with antifreeze glycoproteins: the effect of temperature / L. O. Neil, S. J. Paynter, B. J. Fuller, R. W. Shaw, A. L. Devries // *Cryobiology.* – 1998. – Vol. 37. – p. 59–66.

Ni, D. Morphology and phase behavior of two-component lipid membranes / D. Ni, H. Shi, Y. Yin, L. Niu // *J. Biol. Phys.* – 2006. – Vol. 32. – p. 369–381.

Ortiz, A. Effects of a bacterial trehalose lipid on phosphatidylglycerol membranes / A. Ortiz, J. a. Teruel, Á. Manresa, M. J. Espuny, A. Marqués, F. J. Aranda // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2011. – Vol. 1808. – p. 2067–2072.

Pal, S. Anomalous dielectric relaxation of water molecules at the surface of an aqueous micelle / S. Pal, S. Balasubramanian, B. Bagchi // *J. Chem. Phys.* – 2014. – Vol. 120, № 4. – p. 1912–1920.

Pandit, S.A. An algorithm to describe molecular scale rugged surfaces and its application to the study of a water/lipid bilayer interface / S. A. Pandit, D. Bostick, M. L. Berkowitz // *J. Chem. Phys.* – 2003. – Vol. 119, № 4. – p. 2199–2205.

Parak, F. Evidence for a correlation between the photoinduced electron transfer and dynamic properties of the chromatophore membranes from *rhodospirillum rubrum* / F. Parak, E. N. Frolov, A. A. Kononenko, R. L. Mossbauer, V. I. Goldanskii, A. B. Rubin // *FEBS Lett.* – 1980. – Vol. 117, № 1. – p. 368–372.

- Paschenko, S. V. Temperature dependence of amplitudes of libration motion of guest spin-probe molecules in organic glasses / S. V. Paschenko, Y. V. Toropov, S. A. Dzuba, Y. D. Tsvetkov, A. K. Vorobiev // *J. Chem. Phys.* – 1999. – Vol. 110, № 16. – p. 8150–8154.
- Paula, S. Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness / S. Paula, A. G. Volkov, A. N. Van Hoek, T. H. Haines, D. W. Deamer // *Biophys. J.* – 1996. – Vol. 70. – p. 339–348.
- Pearce, R.S. Molecular analysis of acclimation to cold / R. S. Pearce // *Plant Growth Regul.* – 1999. – Vol. 29. – p. 47–76.
- Pegg, D.E. Cryobiology / D. E. Pegg // *Phys. Med. Biol.* – 1966. – Vol. 11, № 2. – p. 209–224.
- Petrache, H.I. Area per lipid and acyl length distributions in fluid phosphatidylcholines determined by <sup>2</sup>H NMR spectroscopy / H. I. Petrache, S. W. Dodd, M. F. Brown // *Biophys. J.* – 2000. – Vol. 79, № 6. – p. 3172–3192.
- Petukhov, M. H-bonding in protein hydration revisited / M. Petukhov, G. Rychkov, L. Firsov, L. Serrano // *Protein Sci.* – 2004. – Vol. 13. – p. 2120–2129.
- Planta, I. Antifreeze proteins modify the freezing process in planta / I. Planta, M. Griffith, C. Lumb, S. B. Wiseman, M. Wisniewski, R. W. Johnson, A. G. Marangoni // *Plant Physiol.* – 2005. – Vol. 138. – p. 330–340.
- Ramlov, H. Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals / H. Ramlov // *Hum. Reprod.* – 2000. – Vol. 15, № 5. – p. 26–46.
- Rand, R.P. Hydration forces between phospholipid bilayers / R. P. Rand, V. A. Parsegian // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1989. – Vol. 988. – p. 351–376.
- Rasmussen, B.F. Crystalline ribonuclease A loses function below the dynamical transition at 220 K / B. F. Rasmussen, a M. Stock, D. Ringe, G. a Petsko // *Nature.* – 1992. – Vol. 357. – p. 423–424.
- Rheinstadter, M.C. Molecular motions in lipid bilayers studied by the neutron backscattering technique / M. C. Rheinstadter, T. Seydel, F. Demmel, I. Laue-langevin, J. Horowitz, G. Cedex, T. Salditt // *Phys. Rev. E.* – 2005. – Vol. 71. – p. 061908–061916.
- Ricker, J. V Trehalose maintains phase separation in an air-dried binary lipid mixture / J. V Ricker, N. M. Tsvetkova, W. F. Wolkers, C. Leidy, F. Tablin, M. Longo, J. H. Crowe // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 84. – p. 3045–3051.
- Ringe, D. The “glass transition” in protein dynamics: what it is, why it occurs, and how to exploit it / D. Ringe, G. A. Petsko // *Biophys. Chem.* – 2003. – Vol. 105. – p. 411–420.
- Rog, T. The dynamics of water at the phospholipid bilayer surface: a molecular dynamics simulation study / T. Rog, K. Murzyn, M. Pasenkiewicz-Gierula // *Chem.*

Phys. Lett. – 2002. – Vol. 352. – p. 323–327.

Rubinsky, B. Principles of low temperature cell preservation / B. Rubinsky // Heart Fail. Rev. – 2003. – Vol. 8. – p. 277–284.

Ruocco, M.J. Characterization of the sub-transition of hydrated dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers / M. J. Ruocco, G. G. Shipley // Biochim. Biophys. Acta. – 1982. – Vol. 691. – p. 309–320.

Russo, D. Hydration dynamics near a model protein surface / D. Russo, G. Hura, T. Head-gordon // Biophys. J. – 2004. – Vol. 86. – p. 1852–1862.

Sakai, A. Survival of the twig of woody plants at -196 °C / A. Sakai // Nature. – 1960. – Vol. 185. – p. 393.

Sakai, A. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange / A. Sakai, S. Kobayashi, I. Oiyama // Plant Cell Rep. – 1990. – Vol. 9. – p. 30–33.

Salinas-Flores, L. Survival of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, oocytes in relation to intracellular ice formation / L. Salinas-Flores, S. L. Adams, D. A. Wharton, M. F. Downes, M. H. Lim // Cryobiology. – 2008. – Vol. 56. – p. 28–35.

Scarpelli, F. Solvent effect on librational dynamics of spin-labelled haemoglobin by ED- and CW-EPR / F. Scarpelli, R. Bartucci, L. Sportelli, R. Guzzi // Eur. Biophys. J. – 2011. – Vol. 40. – p. 273–279.

Scheidler, P. Cooperative motion and growing length scales in supercooled confined liquids / P. Scheidler, W. Kob, K. Binder // Europhys. Lett. – 2002. – Vol. 59, № 5. – p. 701–707.

Schweiger, A. Principles of pulse electron paramagnetic resonance / A. Schweiger, G. Jeschke. – New York: Oxford University Press, 2006. – 578p.

Seelig, J. Deuterium magnetic resonance: theory and application to lipid membranes / J. Seelig // Q. Rev. Biophys. – 1977. – Vol. 10, № 3. – p. 353–418.

Seelig, J. Lipid conformation in model membranes and biological membranes / J. Seelig, A. Seelig // Quart. Rev. Biophys. – 1980. – Vol. 13, № 1. – p. 19–61.

Senapati, S. Water structure and dynamics in phosphate fluorosurfactant based reverse micelle: A computer simulation study / S. Senapati, M. L. Berkowitz // J. Chem. Phys. – 2003. – Vol. 118. – p. 1937–1944.

Singer, S.J. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes / S. J. Singer, G. L. Nicolson // Science (80-). – 1972. – Vol. 175. – p. 720–731.

Skibinski, A. A molecular dynamics study of the response of lipid bilayers and monolayers to trehalose / A. Skibinski, R. M. Venable, R. W. Pastor // Biophys. J. – 2005. – Vol. 89, № 6. – p. 4111–4121.

Smallwood, M. Plants in a cold climate / M. Smallwood, D. J. Bowles // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. – 2002. – Vol. 357. – p. 831–847.

- Starr, F.W. Molecular dynamicssimulation of a polymer melt with a nanoscopic particle / F. W. Starr, T. B. Schroder, S. C. Glotzer // *Macromolecules*. – 2002. – Vol. 35. – p. 4481–4492.
- Storey, K.B. Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians / K. B. Storey, J. M. Storey // *Comp. Biochem. Physiol.* – 1986. – Vol. 83A, № 4. – p. 613–617.
- Storey, K.B. Physiology, Biochemistry and Molecular biology of Vertebrate Freeze Tolerance: The Wood Frog / ed.B.J. Fuller, N. Lane, E.E. Benson. – Boca Raton: CRC Press, 2004., ch.7.– p.243–274.
- Subczynski, W.K. Hydrophobic barriers of lipid bilayer membranes formed by reduction of water penetration by alkyl chain unsaturation and cholesterol / W. K. Subczynski, J. A. Wisniewska, J. Yin, J. S. Hyde, A. Kusumi // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33. – p. 7670–7681.
- Surovtsev, N. V. Flexibility of phospholipids with saturated and unsaturated chains studied by Raman scattering: The effect of cholesterol on dynamical and phase transitions / N. V. Surovtsev, S. A. Dzuba // *J. Chem. Phys.* – 2014. – Vol. 140. – p. 235103–235110.
- Surovtsev, N. V. Low-temperature dynamical and structural properties of saturated and monounsaturated phospholipid bilayers revealed by Raman and spin-label EPR spectroscopy / N. V. Surovtsev, N. V. Ivanisenko, K. Y. Kirillov, S. a. Dzuba // *J. Phys. Chem. B*. – 2012. – Vol. 116. – p. 8139–8144.
- Surovtsev, N. V. On the low-temperature onset of molecular flexibility in lipid bilayers seen by Raman scattering / N. V. Surovtsev, E. S. Salnikov, V. K. Malinovsky, L. L. Sveshnikova, S. a. Dzuba // *J. Phys. Chem. B*. – 2008. – Vol. 112. – p. 12361–12365.
- Swamy, M.J. Coexisting domains in the plasma membranes of live cells characterized by spin-label ESR spectroscopy / M. J. Swamy, L. Ciani, M. Ge, A. K. Smith, D. Holowka, B. Baird, J. H. Freed // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 90. – p. 4452–4465.
- Syryamina, V.N. A molecular view on the role of cholesterol upon membrane insertion, aggregation, and water accessibility of the antibiotic lipopeptide trichogin GA IV as revealed by EPR / V. N. Syryamina, M. Zotti, C. Peggion, F. Formaggio, C. Toniolo, J. Raap, S. A. Dzuba // *J. Phys. Chem. B*. – 2012. – Vol. 116. – p. 5653–5660.
- Tang, M. Trehalose-protected lipid membranes for determining membrane protein structure and insertion / M. Tang, A. J. Waring, M. Hong // *J. Magn. Reson.* – 2007. – Vol. 184. – p. 222–227.
- Teeter, M.M. On the nature of a glassy state of matter in a hydrated protein: Relation to protein function / M. M. Teeter, A. Yamano, B. Stec, U. Mohanty // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2001. – Vol. 98, № 20. – p. 11242–11247.
- Toner, M. Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells / M. Toner, E. G. Cravalho, M. Karel // *J. Appl. Phys.* – 1990. – Vol. 67, № 3. – p. 1582–1593.

- Tristram-Nagle, S. Kinetics of subgel formation in DPPC: X-ray diffraction proves nucleation-growth hypothesis / S. Tristram-Nagle, R. M. Suter, W. J. Sun, J. F. Nagle // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1994. – Vol. 1191. – p. 14–20.
- Tronsmo, A.M. Freezing resistance among isolates of a psychrophilic fungus, *typhula ishikariensis*, from norway / A. M. Tronsmo, N. Matsumo, T. Hos, T. Godai, S. Oiic, T. Araki, F. Georges, T. Goda, S. Ohgiya, K. Ishizaki // *Proc NIPR Symp. Polar Biol.* – 1998. – Vol. 11. – p. 112–118.
- Tsai, A.M. Molecular dynamics of solid-state lysozyme as affected by glycerol and water: A neutron scattering study / A. M. Tsai, D. A. Neumann, L. N. Bell // *Biophys. J.* – 2000. – Vol. 79. – p. 2728–2732.
- Tsvetkov, T.D. Effect of trehalose on the phase properties of hydrated and lyophilized dipalmitoylphosphatidylcholine multilayers / T. D. Tsvetkov, L. I. Tsonev, N. M. Tsvetkova, R. D. Koynova, B. G. Tenchov // *Cryobiology.* – 1989. – Vol. 26. – p. 162–169.
- Tsvetkova, N.M. Effect of sugars on headgroup mobility in freeze-dried dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: solid-state  $^{31}\text{P}$  NMR and FTIR Studies / N. M. Tsvetkova, B. L. Phillips, L. M. Crowe, J. H. Crowe, S. H. Risbud // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 75. – p. 2947–2955.
- Uchida, T. Freezing properties of disaccharide solutions: inhibition of hexagonal ice crystal growth and formation of cubic ice / ed.E. Borisenko. – Rijeka: InTech, 2004., ch.9.– p.203–224.
- Van, S.P. Rapid anisotropic motion of spin labels. Models for motion averaging of the ESR parameters / S. P. Van, G. B. Birrell, O. H. Griffith // *J. Magn. Reson.* – 1974. – Vol. 15, № 3. – p. 444–459.
- Viera, L.I. Properties of gel phase lipid-trehalose bilayers upon rehydration / L. I. Viera, S. Alonso-Romanowski, V. Borovyagin, M. R. Feliz, E. a. Disalvo // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 1993. – Vol. 1145, № 1. – p. 157–167.
- Vogel, A. The distribution of lipid attached spin probes in bilayers: application to membrane protein topology. / A. Vogel, H. a Scheidt, D. Huster // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 85, № 3. – p. 1691–1701.
- Vogel, S. Living in a physical world IX. Making and maintaining liquid water / S. Vogel // *J. Biosci.* – 2006. – Vol. 31, № 5. – p. 525–536.
- Volke, F. Dynamic properties of water at phosphatidylcholine lipid- bilayer surfaces as seen by deuterium and pulsed field gradient proton NMR / F. Volke, S. Eisenbl, J. Galle, G. Klose // *Chem. Phys. Lipids.* – 1994. – Vol. 70. – p. 121–131.
- Walter, A. Permeability of small nonelectrolytes through lipid bilayer membranes / A. Walter, J. Gutknecht // *J. Membr. Biol.* – 1986. – Vol. 90. – p. 207–217.
- Wang, Y. What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF / Y. Wang, K. Schulten, E. Tajkhorshid // *Structure.* – 2005. – Vol. 13. – p.

1107–1118.

Westh, P. Unilamellar DMPC vesicles in aqueous glycerol: preferential interactions and thermochemistry / P. Westh // *Biophys. J.* – 2003. – Vol. 84. – p. 341–349.

Wharton, D.A. Survival of intracellular freezing by the antractic nematode *Panagrolaimus davidi* / D. A. Wharton, D. J. Ferns // *J. Exp. Biol.* – 1995. – Vol. 198. – p. 1381–1387.

Williams, W.P. The effects of glycerol on the phase behaviour of hydrated distearoylphosphatidylethanolamine and its possible relation to the mode of action of cryoprotectants / W. P. Williams, P. J. Quinn, L. I. Tsonev, R. D. Koynova // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – Vol. 1062. – p. 123–132.

Withers, L.A. A fine-structural study of the freeze-presevation of plant tissue cultures 1. The frozen state / L. A. Withers, M. R. Davey // *Protoplasma.* – 1978. – Vol. 94. – p. 207–219.

Wolfe, J. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems / J. Wolfe, G. Bryant // *Cryobiology.* – 1999. – Vol. 39. – p. 103–129.

Wolkers, W.F. Effects of freezing on membranes and proteins in LNCaP prostate tumor cells / W. F. Wolkers, S. K. Balasubramanian, E. L. Ongstad, H. C. Zec, J. C. Bischof // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2007. – Vol. 1768. – p. 728–736.

Xie, G. The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose / G. Xie, S. N. Timasheff // *Biophys. Chem.* – 1997. – Vol. 64. – p. 25–43.

Zewail, A.H. Diffraction, crystallography and microscopy beyond three dimensions: structural dynamics in space and time / A. H. Zewail // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* – 2005. – Vol. 364. – p. 315–329.

Zhang, J. Nanosecond reorganization of water within the interior of reversed micelles revealed by frequency-domain fluorescence spectroscopy / J. Zhang, F. V Bright // *J. Phys. Chem.* – 1991. – Vol. 95. – p. 7900–7907.

Zhmakin, A.I. Fundamentals of cryobiology / A. I. Zhmakin. – Berlin: Springer-Verlag, 2009.– 278p.

## Список авторских публикаций по теме диссертации

[A1] **Konov, K.** Glycerol penetration profile in phospholipid bilayers measured by ESEEM of spin-labelled lipids [Text] / **K.B. Konov**, N.P. Isaev and S.A. Dzuba // *Molecular Physics* — 2013. — Vol. 111, Iss.18-19. — pp.2882-2886

[A2] **Konov, K.B.** Low-temperature molecular motions in phospholipid bilayers in presence of glycerol as studied by spin-echo EPR of spin labels [Text] / **K. B. Konov**, N. P. Isaev, S. A. Dzuba // *Appl. Magn. Reson.* — 2014. — Vol. 45, Iss. 10, — pp.1117-1126.

[A3] **Konov, K.B.** Low-temperature molecular motions in lipid bilayers in the presence of sugars: insights into cryoprotective mechanisms [Text] / **K. B. Konov**, N. P. Isaev, S. A. Dzuba // *J. Phys. Chem. B* — 2014. — Vol. 118, Iss. 43, — pp.12478-12485.

[A4] Membrane–sugar interactions probed by pulsed electron paramagnetic resonance of spin labels [Text] / **K. B. Konov**, D. V. Leonov, N. P. Isaev, K. Yu. Fedotov, V. K. Voronkova, S. A. Dzuba // *J. Phys. Chem. B* — 2015. — Vol. 119, Iss. 32, — pp.10261-10266.

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

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

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

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

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

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

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