

Федеральное государственное автономное учреждение высшего
профессионального образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

Галиуллина Лейсан Фаритовна

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ КОМПОНЕНТОВ
АТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОЙ БЛЯШКИ МЕТОДАМИ МАГНИТНОГО
РЕЗОНАНСА**

Специальность 01.04.07 — физика конденсированного состояния

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Казань 2013

Работа выполнена на кафедре общей физики и на кафедре квантовой электроники и радиоспектроскопии Института физики ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научные руководители: доктор физико-математических наук,
профессор **Силкин Николай Иванович**
доктор химических наук
профессор **Аганов Альберт Варганович**

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
доцент, профессор кафедры физики
молекулярных систем института физики
ФГАОУ ВПО КФУ **Филиппов Андрей
Васильевич**

доктор физико-математических наук,
профессор, заведующий лабораторией
биофизики транспортных процессов
Казанского института биохимии и
биофизики КазНЦ РАН **Анисимов
Александр Васильевич**

Ведущая организация: Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, г. Москва

Защита состоится «26» декабря 2013 года в «14» часов «40» минут на заседании диссертационного совета Д212.081.15 при Казанском Федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПУ «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте Казанского (Приволжского) федерального университета <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «__»_____2013 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук,
профессор



Еремин М.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. На протяжении десятилетий многие аспекты развития и совершенствования экспериментальной базы и методов ЯМР спектроскопии связывались с проблемами исследования структуры и свойств различных химических веществ. Разработка новых методик проведения экспериментов и обработки данных постоянно расширяла круг решаемых с применением ЯМР задач и позволяла исследовать все более сложные объекты. Это способствовало успешному применению ЯМР для исследования структуры биомолекул и их функций в организме на уровне клеток и органов. В настоящее время современные методы спектроскопии ядерного магнитного резонанса достигли столь высокого уровня, что позволили вплотную приблизиться к детальному изучению биофизических процессов в медицине и биологии. Следствием этого явилось появление крупных международных журналов, специализирующихся на тематиках, посвященных приложениям ЯМР в биологии и медицине - Journal of Biomolecular NMR, Magnetic Resonance in Medicine, NMR in Biomedicine и др. для более широкой и профессиональной ориентации в указанных областях.

Особенность метода ЯМР высокого разрешения (ВР), прежде всего, состоит в том, что по положению и мультиплетности резонансных линий в спектрах можно судить о взаимном расположении отдельных атомов или групп атомов в молекулах, причем с применением специальных методик это удастся обнаружить даже для магнитно эквивалентных атомов. Этим ЯМР метод по своей информативности выгодно отличается от других аналитических методов, конкурирующих с ним.

В последнее время особую актуальность приобрели приложения ЯМР в медицинских исследованиях, в частности, для изучения молекулярных механизмов, имеющих место при сердечно-сосудистых заболеваниях (ССЗ). ССЗ являются наиболее частой причиной инвалидизации и смертности взрослого населения в большинстве экономически развитых стран, включая РФ. Известно, что данное заболевание часто остается нераспознанным (плохо диагностируется) на ранних стадиях и, как правило, выявляется на заключительных стадиях так называемого сердечно-сосудистого континуума, когда речь идет уже о таких осложнениях, как острый коронарный синдром, инфаркт миокарда, мозговой инсульт [1]. Согласно доминирующей версии причиной приведенных осложнений ССЗ является атеросклероз, при котором холестерин и другие липиды, а также клеточные элементы и фибрин накапливаются в стенках артерий, формируя бляшки и, тем самым, ограничивая кровоток. В связи с этим в последнее время значительно возрос интерес к

изучению развития, стабилизации и распада атеросклеротических бляшек с целью выявления механизмов, ответственных за их формирование и развитие.

Несмотря на большое количество исследований в этой области, проблема установления причин возникновения и развития атеросклероза до сих пор остается нерешенной. В большинстве случаев практически невозможно выделить какой-то ограниченный набор факторов, оказывающих влияние на развитие этого заболевания. Кроме того, возможно, что так называемые «факторы риска» оказывают влияние только на определенные формы атеросклероза [2]. Известно, что к ним относят не просто общее высокое общее содержание холестерина, а содержание «плохого» холестерина - липопротеинов низкой плотности. В то же время «хороший» холестерин - липопротеины высокой плотности, обладает антиатерогенными свойствами (так называемый «необходимый холестерин»). [3] Другой неразрешенной проблемой является стадия кальцификации бляшек. В процессе развития атеросклероза в организме происходит отложение кальциевого фосфата гидроксиапатита (кальцификация) в атеросклеротических образованиях, что приводит к увеличению прочности бляшки [4]. Однако неизвестно, влияет ли этот фактор на ее склонность к разрыву. Кроме того, в состав атеросклеротических бляшек входит коллаген – фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани организма и обеспечивающий ее прочность и эластичность. Содержание коллагена, возможно, является фактором, оказывающим влияние на склонность бляшек к разрыву [5]. Известно, что взаимодействие коллагена и гидроксиапатита в атеросклеротической бляшке имеет сходство с аналогичными процессами, имеющими место в костной ткани, механизмы же этого взаимодействия все еще однозначно не установлены. В связи с этим актуальным является исследование факторов, оказывающих влияние на кальцификацию бляшек и их склонность к разрыву.

ЯМР исследования атеросклеротических образований в кровеносных сосудах человека появились еще в начале 1970-х годов, однако были ограничены, в основном, идентификацией и определением количества липидов в различных жидких фазах. Развитие методов ЯМР высокого разрешения в твердых телах с вращением под магическим углом ^1H и ^{31}P HR-MAS и ^{13}C CP-MAS (для наблюдения ЯМР с низким содержанием магнитных ядер), а также градиентных двумерных методов существенно расширили возможности ЯМР в изучении сложных молекулярных систем. Одно из ограничений в исследовании структуры и межмолекулярных взаимодействий компонентов атеросклеротических образований заключается в том, что время протонной релаксации для них в большинстве случаев мало в шкале ЯМР, что затрудняет такие исследования с помощью наиболее эффективной для подобных целей методики, основанной на использовании ядерного эффекта Оверхаузера.

Другим ограничением является плохая растворимость большинства компонентов атеросклеротических бляшек в органических растворителях и в воде. В связи с этим актуальными являются и разработки новых подходов ЯМР исследований компонентов атеросклеротических бляшек, и подбор модельных систем, адекватных целям и задачам исследования.

Целью диссертационной работы является установление структуры различных компонентов атеросклеротических образований методами ЯМР высокого разрешения в жидкости и ЯМР твердого тела с вращением под магическим углом. Для достижения поставленной цели были решены **следующие задачи:**

1. изучение структуры комплекса холестерин+модель биологической мембраны (додецилсульфат натрия);
2. исследование мицеллообразования додецилсульфата натрия в растворе DMSO+H₂O;
3. исследование структурных свойств кальциевого фосфата гидроксиапатита в зависимости от степени карбонизации;
4. изучение взаимодействия коллагена и гидроксиапатита в образцах порошков и в суспензиях;
5. определение ЯМР спектральных характеристик атеросклеротических бляшек.

Методы исследования. При решении поставленных задач кроме различных методов ЯМР высокого разрешения в жидкости и ЯМР с вращением под магическим углом (¹H, ³¹P, ¹³C MAS, ¹H HR-MAS, и ¹³C CP-MAS) использовались ЭПР, а также квантово-химические расчеты оптимальной геометрии молекул и химических сдвигов. В частности применялись методы одномерной ЯМР спектроскопии на ядрах ¹H, ³¹P и ¹³C, двумерные гомо- и гетероядерные ЯМР импульсные последовательности [HetCOR, COSY, HSQC, HMBC и NOESY модификации], селективные 1D NOESY эксперименты и диффузионная DOSY спектроскопия. Часть этих методов применялась в сочетании с методиками подавления сигнала протонов растворителя. Эксперименты проводились с использованием ЯМР спектрометра «AVANCE-500-II» фирмы «Bruker» (рабочая частота 500,13 МГц на ядрах ¹H, 125,758 МГц на ядрах ¹³C и 202,456 на ядрах ³¹P). ЭПР эксперименты проведены на спектрометре W-диапазона (93,5 ГГц) Elexsys 680 фирмы «Bruker» с применением стационарного и импульсного режимов.

На защиту выносятся положения, сформулированные в выводах.

Научная новизна диссертации:

1. Впервые проведено прямое наблюдение образования комплекса холестерин + додецилсульфат натрия (модель биологической мембраны) и описана его пространственная структура.

2. Впервые определена зависимость структурных свойств кальциевого фосфата гидроксиапатита от степени его карбонизации.

3. Методами 1D и 2D ЯМР высокого разрешения в жидкости и в твердом теле исследован комплекс коллаген+гидроксиапатит. Впервые показано, что коллаген и гидроксиапатит образуют органо-минеральный комплекс за счет формирования Ван-дер-Ваальсовых связей между атомами кальция гидроксиапатита и аминокислотным остатком пролина в коллагене.

4. С помощью квантово-химических расчетов впервые исследован механизм взаимодействия кальция с фрагментами аминокислотной последовательности коллагена, и установлено, что ионы кальция образуют комплексы с аминокислотной последовательностью глицин-пролин-аланин.

5. На основании анализа ЯМР и ЭПР спектров атеросклеротической бляшки установлено образование в ней органо-минеральных комплексов с участием молекул гидроксиапатита.

Обоснованность и достоверность полученных результатов подтверждается их принципиальным согласием с данными аналогичных исследований, проводимыми с помощью других физических методов (ИК-спектроскопия, ЭПР и рентгеноструктурный анализ), отсутствием противоречия с основными механизмами взаимодействия, имеющими место в биологических системах (взаимодействие холестерина с фосфолипидными бислоями мембранами), а также согласованностью экспериментальных данных с результатами моделирования на основе квантово-механических расчетов.

Научная и практическая значимость работы:

1. Было показано, что холестерин образует комплекс с додецилсульфатом натрия, аналогичный комплексу холестерина в фосфолипидной мембране, следовательно, данный комплекс в дальнейшем может быть использован в качестве модели взаимодействия холестерина и фосфолипидной мембраны.
2. Выявленная зависимость между структурными свойствами гидроксиапатита и его степенью карбонизации может быть использована для установления корреляций между степенью карбонизации гидроксиапатита в различных биологических тканях (кости, зубы, атеросклеротические образования, имплантаты и др.) и их биологическими свойствами.
3. Результаты исследования взаимодействия коллагена и гидроксиапатита могут быть использованы для установления механизмов кальцификации атеросклеротических образований и аналогичных процессов, имеющих место в костных тканях.

Личный вклад автора:

1. Участие в определении целей и задач исследования.
2. Проведение ЯМР экспериментов по изучению компонентов атеросклеротических образований.
3. Проведение квантово-химических расчетов и обработка их результатов.
4. Обработка, анализ и интерпретация полученных ЯМР и ЭПР экспериментальных результатов.
5. Полное написание статей [A1,A3,A4], а также участие в создании статей [A2,A5,A6].

Апробация работы. Результаты работы докладывались и обсуждались на следующих семинарах и конференциях: Международная молодежная научная школа «Актуальные проблемы магнитного резонанса и его приложений» (Казань, 2009), Международный симпозиум «Современное развитие магнитного резонанса» (Казань, 2010), Международный симпозиум и летняя школа «Ядерный Магнитный Резонанс в конденсированных средах» (Санкт-Петербург, 2010), Всероссийская конференция «Структура и динамика молекулярных систем» (Йошкар-Ола, 2009), Всероссийская конференция «Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях» (Казань, 2011), Международная молодежная научная школа «Актуальные проблемы магнитного резонанса и его приложений» (Казань, 2012).

Диссертационная работа выполнена в лаборатории ЯМР спектроскопии биологических систем при кафедре общей физики и при кафедре квантовой электроники и радиоспектроскопии Института физики в рамках междисциплинарного ОНН КФУ «Биомедицинская радиоспектроскопия и оптика».

Публикация результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 6 статей в рецензируемых изданиях, 2 в сборниках статей, 5 – тезисы докладов.

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, четырех глав, выводов, списка литературы и авторского списка литературы. Работа изложена на 131 страницах, содержит 60 рисунков и 12 таблиц. Список цитированной литературы содержит 131 наименование.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследуемой проблемы, сформулированы цель и задачи диссертационной работы, основные результаты, их практическая и научная ценность, представлены положения, выносимые на защиту, и описана структура диссертации.

В первой главе изложены общие принципы методов ЯМР высокого разрешения в жидкости и в твердых телах, использованных в этой работе. Описаны основы одномерной ЯМР спектроскопии: 1D ^1H , ^{31}P , ^{13}C в жидкости и ^1H , ^{31}P , ^{13}C MAS (Magic Angle Spinning), ^{13}C CP MAS (cross polarization MAS) и ^1H HR-MAS (High Resolution MAS) в твердом теле с вращением под магическим углом, приведены общие положения двумерной корреляционной спектроскопии: ^1H - ^1H COSY (Correlated Spectroscopy), ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), ^1H - ^{13}C HMBC (Heteronuclear Multi-Bond Correlation), ^1H - ^{13}C и ^1H - ^{31}P HetCor (Heteronuclear Correlation) приведены также описание и возможности инверсных и градиентных ЯМР методов. Более детально рассмотрена спектроскопия ядерного эффекта Оверхаузера NOE (Nuclear Overhauser Effect) и, в частности, эксперименты 2D NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) и 1D селективный NOESY.

Ядерный эффект Оверхаузера (ЯЭО) основан на изменении поляризации, наблюдаемой в спиновой системе при условии изменения населенности одной или нескольких подсистем. В спектре ЯМР это проявляется как изменение интенсивности одного сигнала за счет насыщения соответствующих резонансных переходов, формирующих другие сигналы. Так как диполь-дипольное взаимодействие, определяющее изменение заселенностей, зависит от расстояния между взаимодействующими спинами, то величина ЯЭО также зависит от расстояния между ними [14,15].

Вероятности переходов для продольной релаксации в случае двухспиновой системы будут пропорциональны коэффициенту q^{AB} , который пропорционален интенсивности диполь-дипольного взаимодействия:

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

где μ_0 – магнитная проницаемость вакуума, r_{AB} – расстояние между спинами A и B, $\hbar$ – постоянная Планка, γ_A , γ_B – гиромагнитные отношения ядер A и B.

Соответствующая функция спектральной плотности имеет вид:

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

где τ_{rot} – вращательное время корреляции, зависящее от размеров молекул или надмолекулярной структуры.

Селективный метод NOESY представляет собой метод наблюдения ЯЭО с использованием градиентных импульсов магнитного поля, не требующий получения разностного спектра, и позволяющий, таким образом, получить спектр без артефактов вычитания. Как результат, становится возможным наблюдение с высокой степенью достоверности очень малых ЯЭО.

В базисном эксперименте селективного 1D NOESY используется следующая импульсная последовательность:

$$90^\circ(x, sel) - G_1 - 90^\circ(x) - \tau_m - G_m - 90^\circ(x) - \tau_2 - 180^\circ(x) - G_2 - acq$$

В конце главы приводится описание методов ЯМР высокого разрешения в твердых телах: ^1H , ^{31}P , ^{13}C MAS, ^{13}C CP MAS и ^1H HR-MAS.

Вторая глава посвящена описанию объектов исследования, техники и методики проведения экспериментов и условия записи спектров ЯМР.

Характерным видом атеросклеротических отложений в сосуде является фиброзная бляшка (рис. 1), состоящая из покрышки, включающей гладкомышечные клетки и фиброзную ткань, представленную, главным образом, коллагеном, и ядра, содержащего желтоватые жиры, а также холестерин (рис. 2).

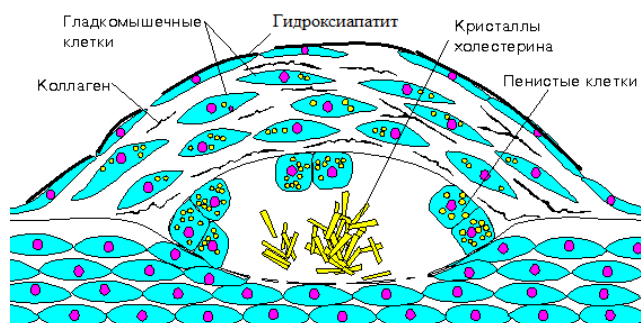


Рис. 1. Атеросклеротическая бляшка.

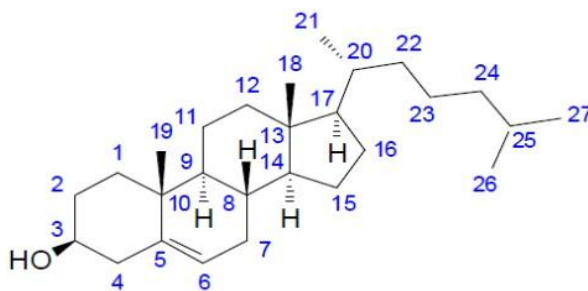


Рис. 2. Химическая структура молекулы холестерина.

Количество холестерина в разных его фракциях рассматривается как фактор риска в развитии атеросклероза (холестериновая теория атеросклероза) и, в целом, ССЗ [6].

Несмотря на то, что ЯМР спектроскопия достаточно часто используется для определения содержания липидных компонентов в биологических мембранах, возможности современных методик ЯМР спектроскопии для исследования структуры и межмолекулярных взаимодействий внутри фосфолипидных мембран все еще сильно ограничены. Причин тому несколько.

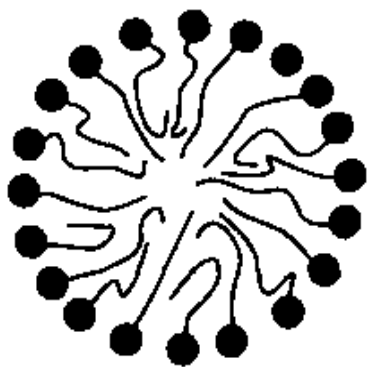


Рис. 3. Схематическое изображение мицелл додецилсульфата натрия в растворе ДМСО+Н₂О

Время протонной релаксации для фосфолипидных агрегатов мало в шкале ЯМР ($<10^{-6}$ с) [7], что затрудняет такие исследования с помощью наиболее эффективной для подобных целей методики, основанной на использовании ядерного эффекта Оверхаузера. Кроме того, холестерин плохо растворим в воде, а большинство фосфолипидов не растворяются в органических растворителях. В связи с этим актуальной является задача поиска адекватных модельных систем, пригодных для

изучения методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения. В качестве модели биологической мембраны нами был выбран додецилсульфат натрия (ДСН) (рис. 4). В отличие от фосфолипидов, которые формируют бислои и мультислои в водных растворах, молекулы додецилсульфата натрия в растворах способны формировать мицеллы – относительно небольшие агрегаты сферической формы (рис. 3), что делает ДСН подходящей модельной системой для изучения взаимодействия различных составляющих клеточных мембран, в том числе холестерина, с фосфолипидными мембранами [8-10].

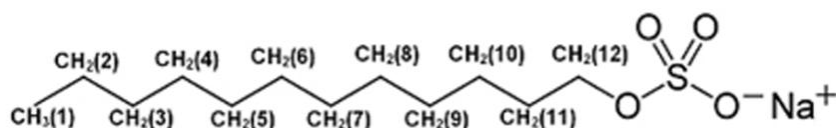


Рис. 4. Химическая структура молекулы додецилсульфата натрия.

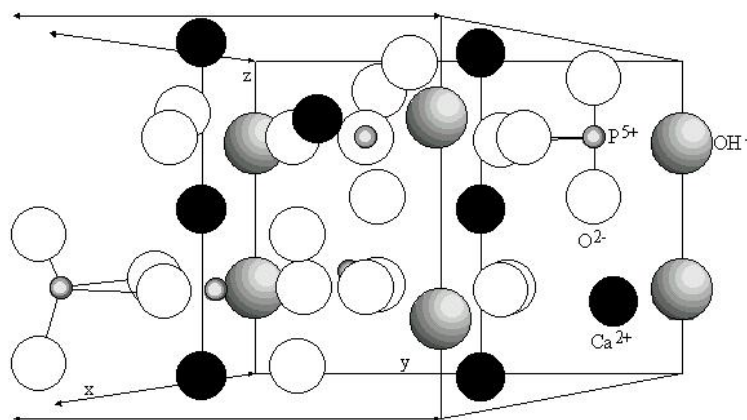


Рис. 5. Трехмерная модель гидроксиапатита

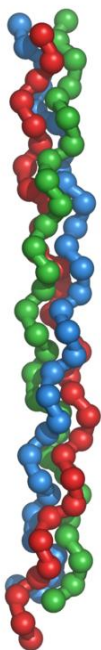


Рис. 6. Трех-
мерная модель
коллагена

Кальциевый фосфат гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (рис. 5) является твердой компонентой развитых атеросклеротических отложений. Кальцификация атеросклеротических бляшек – это активный процесс, возможно, имеющий место на ранних стадиях формирования атеросклеротических образований [11-13], но ее механизмы пока неизвестны. В данной работе в качестве модельной системы был исследован синтетический кальциевый фосфат гидроксиапатита с различными степенями карбонизации.

Коллаген (рис. 6) – важный компонент прочности фиброзного покрова бляшки. Молекула коллагена представляет собой правозакрученную спираль из трех полипептидных α -цепей (рис. 6), которые образованы строгой последовательностью аминокислот. Последовательность состоит из повторяющихся фрагментов типа $[\text{Gly-X-Y}]_n$, т.е. каждая третья аминокислота – это глицин (Gly) (рис. 7). Коллаген обычно содержит около 33% глицина, 13% пролина и 11% аланина и гидроксипролина (рис. 7), остальные аминокислоты представлены в меньшем количестве [14].

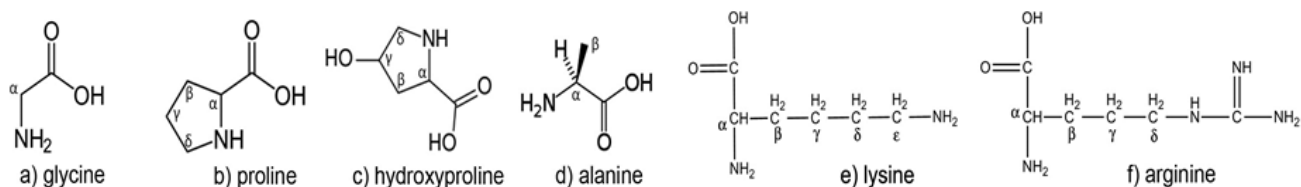


Рис. 7. Основные аминокислоты, представленные в коллагене.

Нами были проведены ЯМР исследования с вращением под магическим углом образцов порошка коллагена и гидроксиапатита, а также ЯМР исследования суспензии коллагена и гидроксиапатита в воде.

Спектры ЯМР были записаны на импульсном ЯМР спектрометре с Фурье-преобразованием Bruker Avance 500 - II с частотой ^1H 500,13 МГц, ^{13}C 125,758 МГц, ^{31}P 202,456 МГц. Спектры с вращением образца под магическим углом были записаны при частоте вращения образца 12 кГц. Спектры ЯМР жидких образцов были записаны с использованием широкополосного 5 мм инверсного датчика в ампулах диаметром 5 мм. Объем каждого из жидких образцов – 500 мкл. Полное отнесение ^1H и ^{13}C ЯМР спектров произведено с использованием 2D COSY, HSQC и HMBSC экспериментов. Точность в измерении химических сдвигов ^1H и ^{13}C составляла $\pm 0,01$ м.д. и $\pm 0,1$ м.д.,

соответственно. Для определения эффектов Оверхаузера проводились селективные 1D NOESY эксперименты, при этом для радиочастотного облучения образца использовали импульсы гауссовой формы. Временная задержка между повторениями последовательности NOESY принималось не менее, чем в три раза дольше времени продольной релаксации T_1 . Использовались времена смешивания 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,4, 0,6 и 0,8 с.

Третья глава посвящена исследованиям молекулярной системы холестерин+модель биологической мембраны.

Для исследования образования различных молекулярных комплексов эффективным является использование метода NOESY. Известно, что наблюдаемый эффект Оверхаузера зависит от параметра, называемого временем корреляции, которое, в свою очередь, зависит от молекулярной массы (размера молекул) [15,16].

Нами были проведены ЯМР селективные 1D NOESY эксперименты для растворов ДСН в ДМСО с концентрациями 2 г/л и 80 г/л. При низкой концентрации ДСН (2 г/л) все наблюдаемые эффекты Оверхаузера оказались положительными и, следовательно, соответствуют значениям NOE для малых молекул. Из этого следует, что ДСН при данной концентрации находится в мономерной форме. При высокой концентрации ДСН в растворе ДМСО (80 г/л) наблюдаются отрицательные эффекты Оверхаузера. Из этого был сделан вывод, что в растворе при данной концентрации ДСН присутствует в мицеллярной форме.

Дальнейшие эксперименты с растворами ДСН и холестерина проводились при условиях, когда молекулы ДСН в растворе образовывали мицеллы.

Для установления формирования молекулярного комплекса между холестерином и мицеллами, образованными молекулами ДСН, также были проведены 1D NOESY эксперименты (рис. 8).

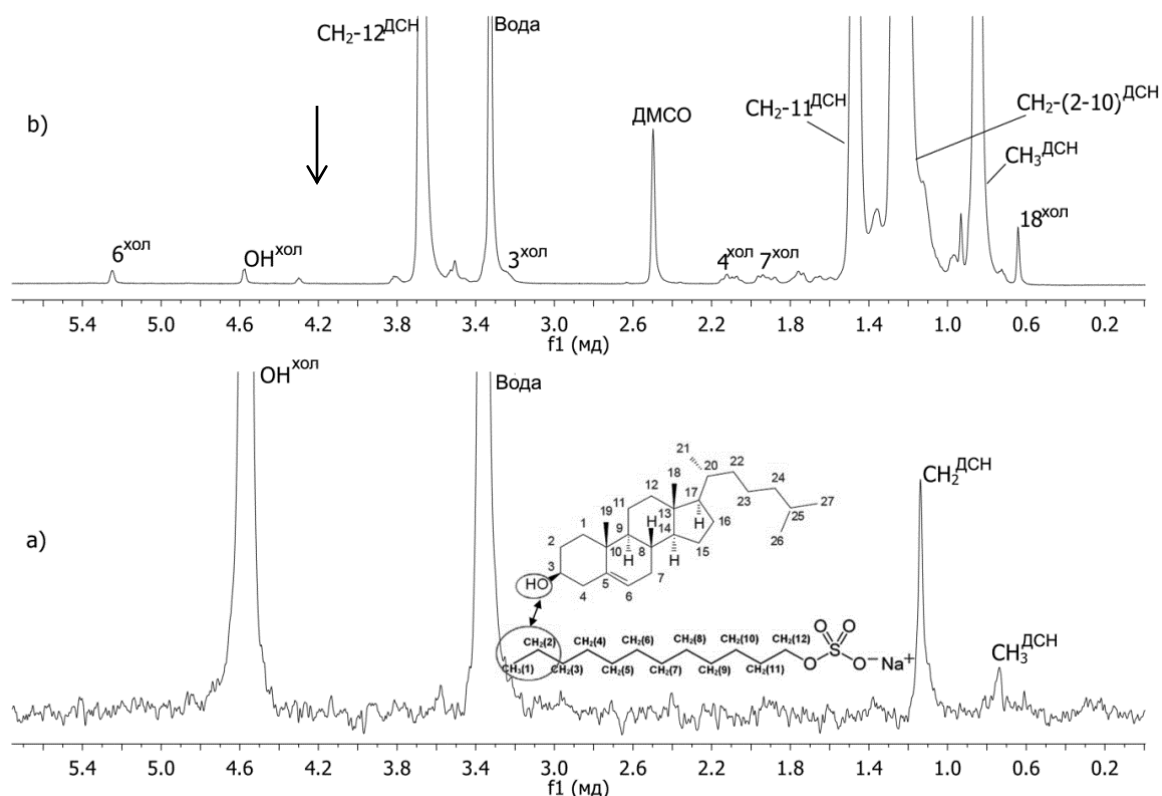


Рис. 8. Селективный 1D NOESY спектр (а) и ^1H ЯМР (500,13 МГц) спектр (b) смеси холестерина+ДСН в растворе ДМСО+ H_2O при $T=298\text{ K}$. Время смешивания $\tau_m = 50\text{ мс}$. Стрелкой обозначен сигнал, на частоте которого проводилось РЧ облучение образца.

При радиочастотном (РЧ) облучении образца на частоте сигнала ОН-группы холестерина в селективном 1D NOESY спектре наблюдался сигнал молекул воды, сигнал от CH_3 -1 группы ДСН и сигнал от ближайших CH_2 -групп алифатической цепи молекулы ДСН. Это означает, что наблюдается прямое диполь - дипольное взаимодействие ОН - группы холестерина с протонами концевых групп гидрофобной части ДСН (рис. 8), что соответствует их близкому пространственному расположению, т.е. комплексообразованию между холестерином и мицеллами ДСН. Соответственно холестерин в комплексе находится внутри мицеллы. Схематическое изображение комплекса приведено на рис. 9.

Данное заключение согласуется с литературными данными о том, что в фосфолипидных мембранах в результате взаимодействия холестерин проникает в пространство между гидрофобными «хвостами» фосфолипидных бислоев и, таким образом, близость ОН – группы холестерина и концевых алифатических групп ДСН оказывается в некоторой степени аналогичной расположению тех же групп холестерина и атомов алифатических цепочек фосфолипидных молекул [17,18].

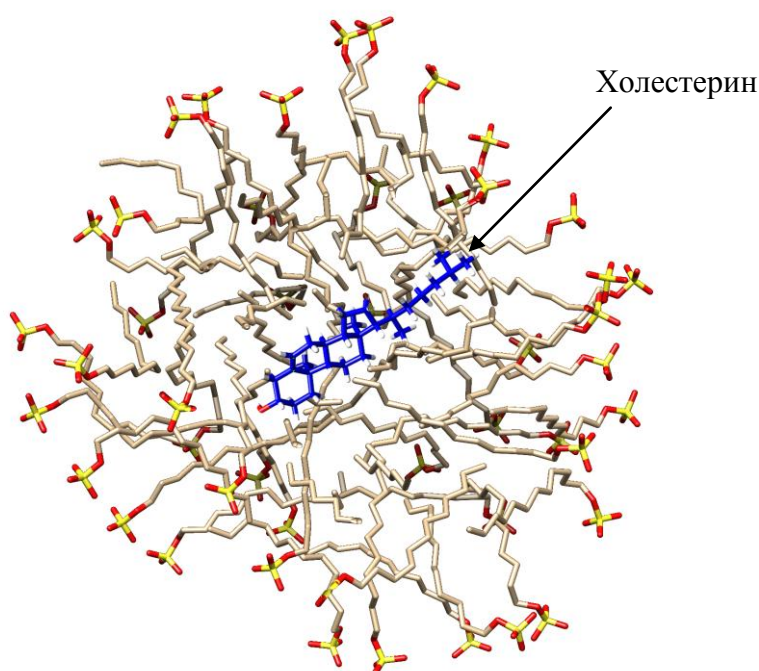


Рис. 9. Схематическое изображение комплекса между холестерином и мицеллами додецилсульфата натрия.

В четвертой главе приведены результаты исследования образцов механически измельченной атеросклеротической бляшки, карбонизированного гидроксиапатита, а также органо-минерального комплекса коллаген+гидроксиапатит.

Для исследования структуры гидроксиапатита были записаны ^1H , ^{13}C и ^{31}P MAS ЯМР спектры порошков гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_2(\text{CO}_3)_x$ (рис. 4) с различными степенями карбонизации ($x = 0.25; 0.5; 0.75; 1.0; 1.5$ и 2.0) (рис. 10).

Карбонатные ионы могут замещать в гидроксиапатите OH -группы (замещение А-типа) или PO_4 группы (замещение В-типа). Тип замещения влияет на кристаллическую структуру и свойства получаемых образцов.

Показано, что с увеличением степени карбонизации x в ^1H ЯМР спектрах гидроксиапатита уменьшается интенсивность линии OH гидроксиапатита по отношению к интегральной интенсивности линии воды, содержание которой в гидроксиапатите можно считать приблизительно постоянным, что свидетельствует об образовании гидроксиапатитов А-типа.

С помощью встроенной в программное обеспечение спектрометра утилиты Line Shape Fitting. был проведен анализ формы линии ^{31}P MAS ЯМР спектров синтетического гидроксиапатита с различными степенями карбонизации. Установлено, что резонансные линии ^{31}P обусловлены суперпозицией сигналов от гидроксиапатита с «жесткой» кристаллической

решеткой (линия гауссовой формы) и разупорядоченного (аморфного) гидроксиапатита (линия лоренцевой формы), причем отношение интегральных интенсивностей этих линий изменяется с уменьшением степени карбонизации (таблица 1).

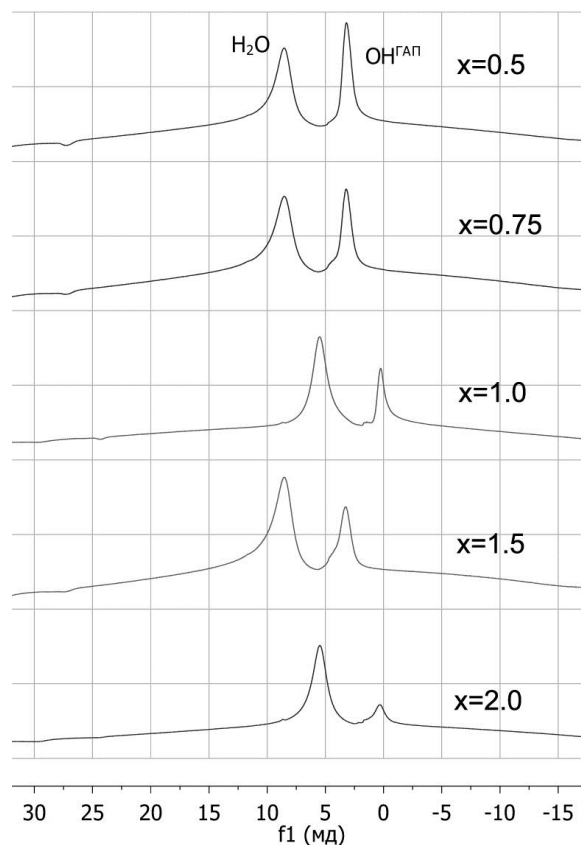


Рис. 10. ^1H MAS ЯМР спектры гидроксиапатита, полученные при частоте вращения образца 12 кГц.

С уменьшением степени карбонизации уменьшается и вклад гауссовой линии в полученный резонансный сигнал. Рост вклада лоренцевой составляющей в форму линии ^{31}P ЯМР спектров с уменьшением величины x связан с доминированием в структуре замещений А-типа, приводящих к более разупорядоченной структуре с вакансиями, допускающими трансляционные и вращательные движения CO_3^{2-} в каналах, которые, вероятно, могут усиливать либрацию PO_4 -тетраэдров [A5].

Таблица 1. Вклад (в процентах от интегральной интенсивности) линий лоренцевой и гауссовой форм в резонансный сигнал ^{31}P ЯМР PO_4 группы гидроксиапатита

Степень карбонизации x	$x = 2.0$	$x = 1.5$	$x = 1.0$	$x = 0.75$	$x = 0.5$	$x = 0.25$
Вклад лоренцевой линии, %	59%	63%	67%	70%	75%	81%
Вклад гауссовой линии, %	41%	37%	33%	30%	25%	19%

С целью установления механизмов взаимодействия коллагена и гидроксиапатита были проведены исследования порошка смеси коллаген+гидроксиапатит с использованием метода ^{13}C MAS. На основании анализа двумерного ^1H - ^{13}C HetCor MAS ЯМР спектра, а также литературных данных, было проведено соотнесение ^{13}C ЯМР сигналов коллагена (рис. 11).

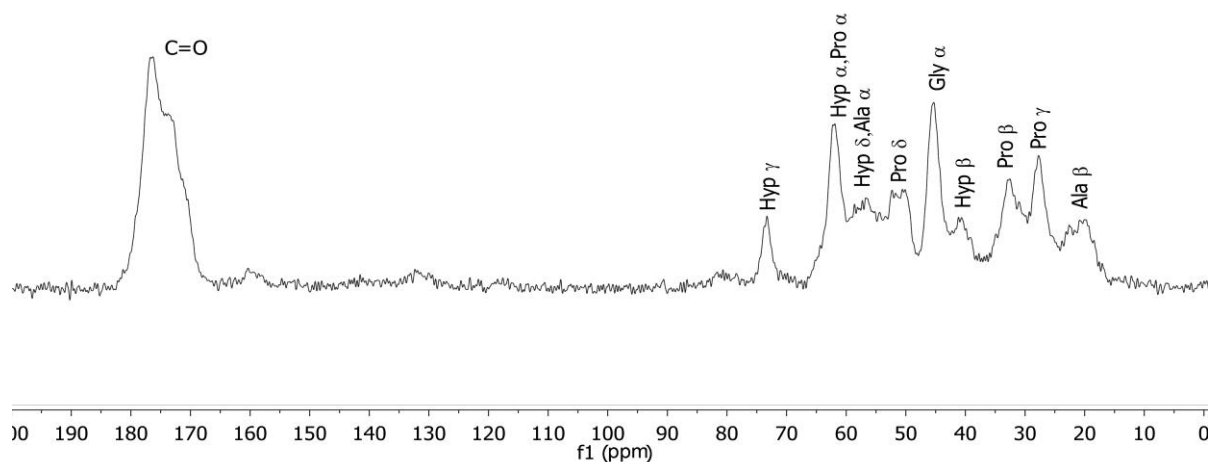


Рис. 11. ^{13}C ЯМР с ВМУ спектр коллагена. Частота вращения $f = 12$ кГц.

Для получения более детальной информации о взаимодействии коллагена и гидроксиапатита записаны ЯМР спектры водных суспензий чистого коллагена, а также смеси коллагена и гидроксиапатита. Отнесение линий в ^1H и ^{13}C ЯМР спектрах коллагена и смеси коллагена и гидроксиапатита было проведено с использованием корреляций, наблюдаемых в ^1H - ^{13}C HSQC, ^1H - ^{13}C NMBC спектрах и литературных данных о процентном содержании различных аминокислот в коллагене.

В спектре ^1H - ^{13}C HSQC смеси коллагена и гидроксиапатита (рис. 12) наблюдаются два набора сигналов, относящихся к пролину. Один набор сигналов имеет те же химические сдвиги, что и сигналы пролина в чистом коллагене и относится к несвязанным с гидроксиапатитом фрагментам коллагена. Второй набор сигналов пролина имеет химические сдвиги, отличающиеся от химических сдвигов сигналов в чистом коллагене. Такие изменения химических сдвигов свидетельствуют о том, что в суспензии коллагена и гидроксиапатита происходит образование молекулярного комплекса между коллагеном и гидроксиапатитом за счет связывания гидроксиапатита с пролином, содержащемся в коллагене [А6]. Анализ интегральной интенсивности соответствующих кросс-пиков позволяет сделать вывод о том, что примерно 27% аминокислотных остатков коллагена остается в свободном состоянии, а соответственно 73% образуют комплекс с гидроксиапатитом.

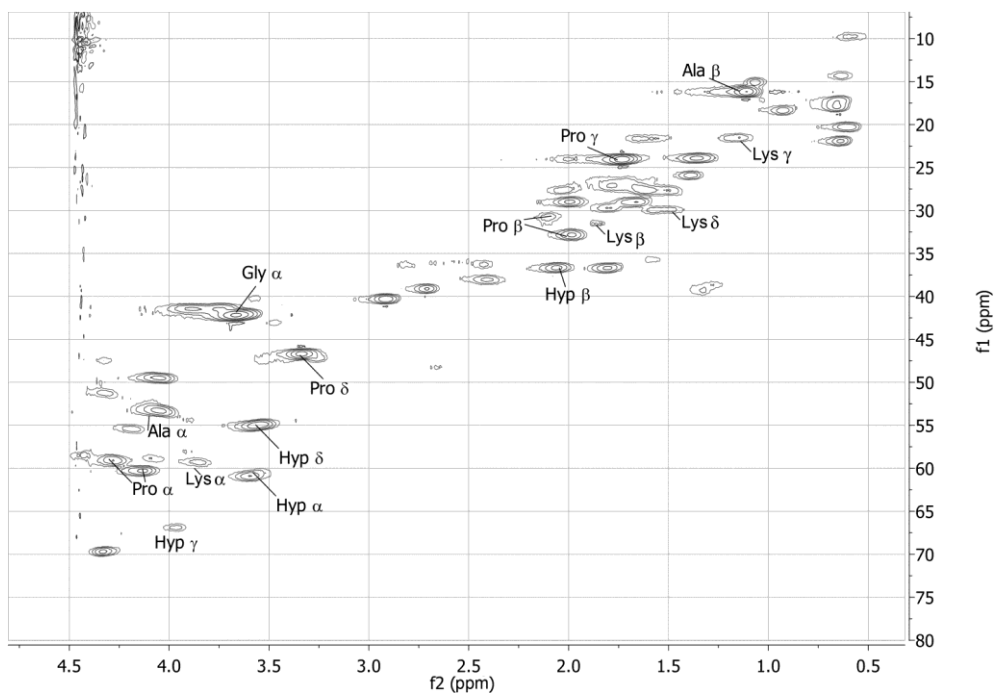


Рис. 12. 2D ^1H - ^{13}C HSQC ЯМР спектр водной суспензии коллагена+гидроксиапатита (концентрация 2%).

Этот вывод дополнительно был подтвержден нашими данными квантово-химических расчетов модельных комплексов [A1].

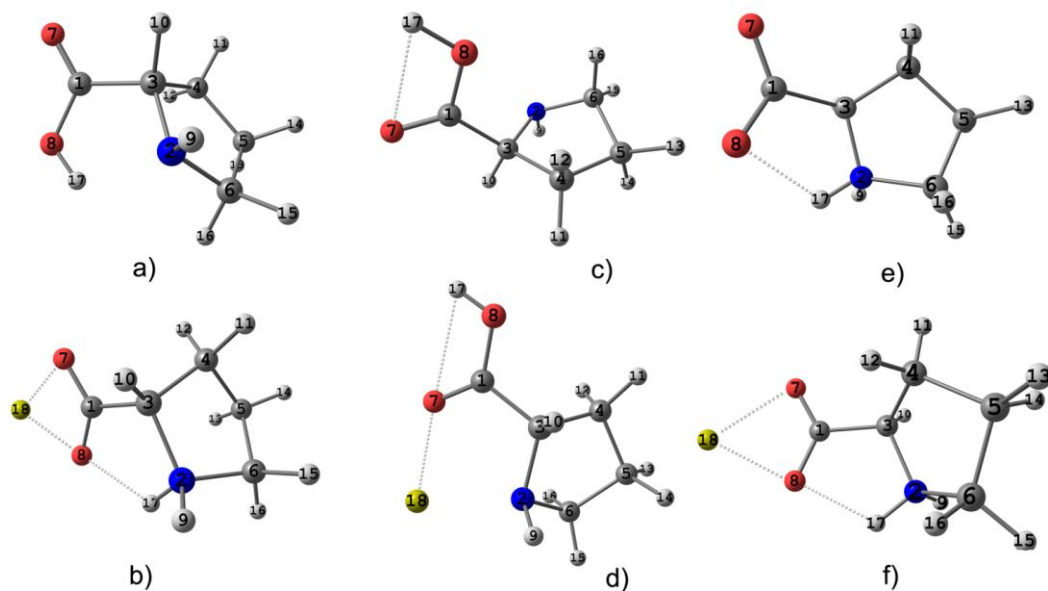


Рис. 13. Пространственные структуры пролина с цис-ориентацией связей $\text{C}=\text{O}$ и $\text{O}-\text{H}$ (a) и его комплекса с Ca^{2+} (b), пролина с транс-ориентацией связей $\text{C}=\text{O}$ и $\text{O}-\text{H}$ (c) и его комплекса с Ca^{2+} (d), пролина в форме цвиттериона (e) и его комплекса с Ca^{2+} (f).

В качестве таковых в первом приближении были выбраны комплексы пролин+Ca²⁺ и лизин+Ca²⁺. Была рассчитана геометрия молекул пролина и лизина, а также комплексов пролин+Ca²⁺ (рис. 13) и лизин+Ca²⁺.

На основании анализа результатов квантово-химических расчетов ЯМР химических сдвигов с оптимизацией геометрии, проведенной в программном комплексе Gaussian 03 методом теории функционала плотности (DFT B3LYP в базисе 6-31G(d,p)) было показано, что комплекс пролин+Ca²⁺ является более прочным по сравнению с комплексом лизин+Ca²⁺. Кроме того, химические сдвиги атомов ¹H и ¹³C пролина, полученные на основании квантово-химических расчетов для комплекса пролин+Ca²⁺, лучше коррелируют с экспериментальными значениями химических сдвигов ЯМР соответствующих атомов пролина, чем рассчитанные значения химических сдвигов для комплекса лизин+Ca²⁺. Это является дополнительным свидетельством тому, что имеет место образование молекулярного комплекса гидроксиапатита с коллагеном путем связывания кальция в гидроксиапатите с пролином в коллагене.

Для получения результатов, адекватных реальным системам, были рассмотрены более сложные молекулярные системы. Так, пролин в коллагене может образовывать комплекс с гидроксиапатитом в следующих вариантах аминокислотных последовательностей: Gly-Pro-Ala, Gly-Pro-Lys, Gly-Pro-Arg, Gly-Pro-Hyp, где Gly – глицин, Pro – пролин, Ala – аланин, Arg – аргинин, Hyp – гидроксипролин. На основании квантово-химических расчетов была получена оптимальная геометрия указанных выше комплексов с ионом кальция.

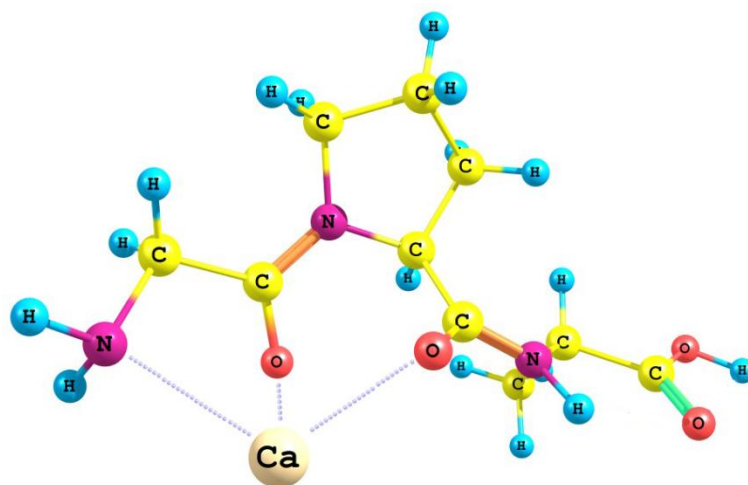


Рис. 14. Пространственная структура молекулярного кластера Gly-Pro-Ala + Ca²⁺.

На основании сравнения расчетных значений с экспериментально наблюдаемыми величинами химических сдвигов ЯМР ¹H и ¹³C пролина, показано, что молекулы коллагена образуют молекулярный комплекс с ионами

кальция посредством ван-дер-ваальсовых взаимодействий между ионами кальция и атомами кислорода пролина, включенного в состав аминокислотного фрагмента Gly-Pro-Ala (рис. 14).

Чтобы проверить, образует ли гидроксиапатит межмолекулярные комплексы с органической частью атеросклеротической бляшки были записаны 2D ^1H - ^{31}P HetCor MAS ЯМР спектры порошкообразного образца атеросклеротической бляшки и гидроксиапатита.

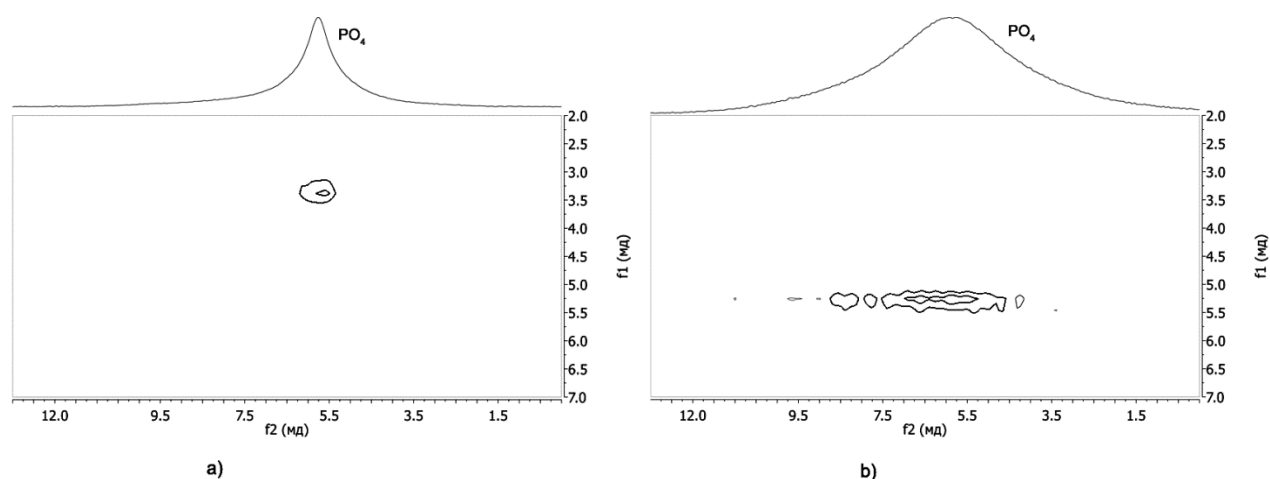


Рис. 15. ^1H - ^{31}P HetCor ЯМР спектры с вращением под магическим углом гидроксиапатита (а) и атеросклеротической бляшки (б). Частота вращения 5 кГц.

Спектр гидроксиапатита (рис. 15,а) содержит единственный кросс-пик на пересечении сигналов с химическими сдвигами $\delta(^1\text{H})=3,4$ м.д./ $\delta(^{31}\text{P})=5,7$ м.д., обусловленный взаимодействием PO_4 и OH групп. Положение сигнала гидроксиапатита атеросклеротической бляшки (рис. 15,б) заметно отличается: координаты кросс-пика - $\delta(^1\text{H})=5,3$ м.д./ $\delta(^{31}\text{P})=6,1$ м.д. Такое различие в спектрах можно объяснить наличием взаимодействия между молекулами гидроксиапатита и органической составляющей атеросклеротической бляшки. Таким образом, можно сделать вывод о том, что гидроксиапатит присутствует в атеросклеротической бляшке не в качестве отдельных включений, а образует в ней органо-минеральные комплексы.

Данный вывод был дополнительно подтвержден результатами ЭПР исследований атеросклеротических бляшек. Так, в ЭПР спектрах атеросклеротических бляшек обнаружены два типа парамагнитных центров. Центр I, быстро релаксирующий и интенсивный, был интерпретирован как неорганический радикал CO_2 в гидроксиапатите. Центр II, медленно релаксирующий, вероятно, связан с радикалами, принадлежащими к органической компоненте атеросклеротической бляшки [A2].

ВЫВОДЫ

На основании экспериментальных исследований (спектроскопия ЯМР ^1H , ^{31}P и ^{13}C , двумерная ЯМР спектроскопия, 1D и 2D NOESY модификации, ЭПР), а также квантово-химических расчетов модельных соединений, была установлена структура различных компонентов атеросклеротических образований, а именно, были получены следующие результаты:

1. Впервые показано, что молекулы холестерина образуют молекулярный комплекс с мицеллами додецилсульфата натрия. Данный комплекс может рассматриваться в качестве модели биологической мембраны с холестерином [A3,A4].
2. Установлена взаимосвязь между степенью карбонизации гидроксиапатита и его спектральными характеристиками, отражающими структурные свойства кристаллов. Показано, что уменьшение степени карбонизации гидроксиапатита приводит к более разупорядоченной структуре образца. Установлено, что с увеличением степени карбонизации происходит замещение ОН-групп гидроксиапатита карбонатными ионами [A5].
3. Установлено, что гидроксиапатит способен образовывать межмолекулярный комплекс с молекулами коллагена путем Ван-дер-Ваальсового взаимодействия кальция с атомами кислорода, относящимися к пролину, включенного в состав аминокислотного фрагмента Gly-Pro-Ala [A1,A6].
4. Установлено, что гидроксиапатит присутствует в атеросклеротической бляшке не в качестве отдельных включений, а способен образовывать в ней органо-минеральные комплексы [A2].

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Go A.S. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. /Go A.S., D. Mozaffarian , V.L. Roger et al. // Circulation. – 2013. – 127(1). – P. e6-e245.
2. Arnett D.K. Relevance of genetics and genomics for prevention and treatment of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, the Stroke Council, and the Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group / D.K. Arnett, A.E. Baird, R.A. Barkley et al. // Circulation. – 2007. – 115. – P. 2878-2901
3. Hietaniemi M. Studies of novel and traditional risk factors of atherosclerosis / M. Hietaniemi. // Oulu University Press. – 2009. – 88 pp

4. Lee R.T., Grodzinsky A.J., Frank E.H. et al. Structure-dependent dynamic mechanical behavior of fibrous caps from human atherosclerotic plaques / R.T. Lee, A.J. Grodzinsky, E.H. Frank et al. // *Circulation*. – 1991. – Vol. 83. – P. 1764-1770
5. Loree H.M. Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels / H.M. Loree, R.D. Kamm, R.G. Stringfellow, R.T. Lee // *Circulat. Res.* – 1992. – Vol. 71. – P. 850-858
6. Borroni B. Serum cholesterol levels modulate long-term efficacy of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease / B. Borroni, C. Pettenati, T. Bordonali, et al. // *Neuroscience Lett.* – 2003. – 343. – P. 213-215
7. Henry G.D. Methods to study membrane protein structure in solution. / G.D. Henry, B.D. Sykes // *Methods in Enzymology*. – 1994. – V. 239. – P. 515-535.
8. Wang G. Solution structure of the N-terminal amphitropic domain of Escherichia coli glucose-specific enzyme IIA in membrane-mimetic micelles / G. Wang, P. Keifer, A. Peterkofsky // *Protein Science*. – 2003. – 12. – P. 1087–1096
9. Blokhin D.S. Spatial structure of the decapeptide Val-Ile-Lys-Lys-Ser-Thr-Ala-Leu-Leu-Gly in water and in a complex with sodium dodecyl sulfate micelles / D.S. Blokhin, S.V. Efimov, A.V. Klochkov et al. // *Appl. Magn. Reson.* – 2011. - 41(2). - P. 267-282
10. Henry G.D. Methods to study membrane protein structure in solution. / G.D. Henry, B.D. Sykes // *Methods in Enzymology*. – 1994. – 239. – P. 515-535
11. Kramsch D.M. The effect of agents interfering with soft tissue calcification and cell proliferation of calcific fibrous-fatty plaques in rabbits / D.M. Kramsch, C.T. Chan // *Circ. Res.* – 1978. – 42. – P. 562–571.
12. Kramsch D.M. Atherosclerosis: prevention by agents not affecting abnormal levels of blood lipids / D.M. Kramsch, A.J. Aspen, L.J. Rozler // *Science*. – 1981. – 213. – P. 1511–1512
13. Meziani M.J. Protein protected nanoparticles from rapid expansion of supercritical solution into aqueous solution / M.J. Meziani, H.W. Rollins, L.F. Allard, Y.P. Sun // *J. Phys. Chem.* – 2002. – 106. – P. 11178
14. Fratzl P. Collagen: Structure and Mechanics / P. Fratzl // Springer. – 2008. – 510 pp
15. Ernst R.R. Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions / R.R. Ernst, B. Bodenhausen, A. Wokaun // Oxford: Oxford University Press. - 1987. - p. 610
16. Gordon S.R. Fundamentals of Protein NMR spectroscopy / S.R. Gordon, T.K. Hitchens // Dordrecht: Springer. - 2006. - p. 364
17. Robinson A.J. Behavior of cholesterol and its effect on head group and chain conformations in lipid bilayers: a molecular dynamics study / A.J. Robinson,

- W.G. Richards, P.J. Thomas, M.M. Hann // Biophysical Journal. – 1995. – V. 68. – P. 164-170.
18. Tiburu E.K. Solid-state ^2H NMR studies of the effects of cholesterol on the acyl chain dynamics of magnetically aligned phospholipid bilayers / E.K. Tiburu, P.C. Dave, G.A. Lorigan // Magn. Reson. Chem. – 2004. – V. 42. – P. 132–138.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- A1. Aminova R.M., **Galiullina L.F.**, Silkin N.I., Ulmetov A.R., Klochkov V.V., Aganov A.V. Investigation of complex formation between hydroxyapatite and fragments of collagen by NMR spectroscopy and quantum-chemical modeling // J. Mol. Struct. – 2013. – V. 1049. – P. 13-21.
- A2. Абдульянов В.А., **Галиуллина Л.Ф.**, Галявич А.С., Изотов В.Г., Мамин Г.В., Орлинский С.Б., Родионов А.А., Салахов М.Х., Силкин Н.И., Ситдикова Л.М., Хайруллин Р.Н., Челышев Ю.А. Стационарный и импульсный высокочастотный ЭПР кальцифицированной атеросклеротической бляшки. // Письма в ЖЭТФ. – 2008. – Т. 88, вып. 1. – С. 75-79.
- A3. **Галиуллина Л.Ф.**, Блохин Д.С., Аганов А.В., Ключков В.В. Прямое наблюдение образования комплекса: холестерин - модель биологической мембраны методами ЯМР спектроскопии. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. VII, №3. – С. 41-48.
- A4. **Galiullina L.F.**, Blokhin D.S., Aganov A.V., Klochkov V.V. Investigation of cholesterol+model of biological membrane complex by NMR spectroscopy // Magnetic Resonance in Solids. - 2012. - V. 14, No.2. - 12204 (7 pp). - ISSN 2072-5981.
- A5. **Галиуллина Л.Ф.**, Ковалёва Е.С., Шабанов М.П., Путляев В.И., Третьяков Ю.Д., Иванов В.К., Силкин Н.И., Мамин Г.В., Орлинский С.Б., Родионов А.А., Салахов М.Х. Биорезорбитрируемые порошковые материалы на основе $\text{Ca}_{10-x}\text{Na}_x(\text{PO}_4)_6(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$. // Ученые записки КГУ. Серия естественные науки. 2010. Т.152. С. 79
- A6. Северин А.В., Силкин Н.И., **Галиуллина Л.Ф.**, Мазалева О.Н., Рудин В.Н., Салахов М.Х., Хайруллин Р.Н., Челышев Ю.А. Структурные особенности образования наногидроксиапатита в присутствии коллагена. // Ученые записки КГУ. Серия естественные науки, 2012. - Т.254, Кн. 3. С. 127-140.
- A7. **Leisan Galiullina**, Nikolay Silkin, Alexander Severin, Makzum Salahov. NMR investigation of atherosclerotic plaque, collagen and

- hydroxyapatite. Book of abstracts of International Symposium and Summer School "Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter", Saint-Peterburg, June 28- July 2, 2010. - P. 78.
- A8. **Galiullina L.F.**, Blokhin D.S., Aganov A.V., Klochkov V.V. Investigation of cholesterol+model of biological membrane by NMR spectroscopy. Proceedings of the XV International Young Scientists School «Actual problems of Magnetic Resonance and its Applications», Kazan, 2012. - P. 43.
- A9. **Galiullina L.F.**, Blokhin D.S., Aganov A.V., Klochkov V.V. Investigation of cholesterol+model of biological membrane complex by nmr spectroscopy. Book of abstracts of The third international Scientific and Practical Conference "Postgenomic methods of analysis in biology, and laboratory and clinical medicine", Kazan, 2012. - P. 83.
- A10. **Галиуллина Л.Ф.**, Абдульянов В.А., Аганов А.В., Ковалева Е.С., Мамин Г.В., Орлинский С.Б., Путляев В.И., Рудин В.Н., Салахов М.Х., Северин А.В., Силкин Н.И., Третьяков Ю.Д., Филлипов Я.Ю., Хайруллин Р.Н., Челышев Ю.А. ЯМР исследования кальцифицированных тканей. Сборник тезисов V Всероссийская конференция "Новые достижения ЯМР в структурных исследованиях", Казань, 20-22 апреля, 2011. - С. 94.
- A11. **Galiullina L.F.**, N.I. Silkin, S.B. Orlinskii, G.V. Mamin, A.F. Severin, V.I. Putlyayev, Yu.D. Tretyakov, E.S.Kovaleva, I.V. Melekov, R.N. Hairullin, Yu.A. Chelyshev, M.H.Salakhov. Magnetic resonance of calcificated tissues. Book of abstracts of International Symposium «Modern Development of Magnetic Resonance», September 28-October 1, 2010. Kazan. Russia. - P. 47.
- A12. **Leisan Galiullina**, Nikolay Silkin, Alexander Severin, Makzum Salahov. NMR investigation of atherosclerotic plaque, collagen and hydroxyapatite. Book of abstracts of International Symposium and Summer School "Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter", Saint-Peterburg, June 28- July 2, 2010. - P.78.
- A13. **Galiullina L.F.**, A.S. Galyavich, R.N. Khairullin, M.Kh. Salakhov, N.I. Silkin, A.V. Severin. NMR investigation of atherosclerotic plaque. Proceedings of the XII International Young Scientists School «Actual problems of Magnetic Resonance and its Applications», Kazan, 2009. - P. 154.
- A14. **Галиуллина Л.Ф.**, Силкин Н.И. Исследование атеросклеротической бляшки и синтетического гидроксиапатита методами ЯМР. Сборник тезисов XVI Всероссийской конференции "Структура и динамика молекулярных систем", Яльчик, 2009. – С. 10.