

## Взаимодействие полиэлектролитов с мембранными структурами: ЭПР-исследование

А. А. Дементьев, А. А. Рахнянская, Г. Б. Хомутов

*АНДРЕЙ АНАТОЛЬЕВИЧ ДЕМЕНТЬЕВ — аспирант кафедры биофизики Физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биофизика взаимодействия полиэлектролитов с липидными мембранами.*

*АННА АЛЕКСАНДРОВНА РАХНЯНСКАЯ — кандидат химических наук, научный сотрудник кафедры высокомолекулярных соединений Химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: химия высокомолекулярных соединений.*

*ГЕННАДИЙ БОРИСОВИЧ ХОМУТОВ — кандидат физико-математических наук, доцент кафедры биофизики Физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: биофизика и нанобиотехнология.*

119899 Москва, Ленинские горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, Физический факультет, E-mail gbk@phys.msu.ru

### Введение

Выяснение физико-химических механизмов взаимодействия полиэлектролитов с биологическими мембранами является предметом интенсивных исследований на протяжении ряда лет. Изучение данного вопроса необходимо для понимания фундаментальных принципов регуляции структурно-функциональных взаимосвязей в сложных мембранных структурах и актуально ввиду постоянно растущего числа практических приложений результатов работ в этой области к медицине, биотехнологии, индустрии косметических и фармакологических средств [1–4]. В настоящее время актуально создание гибридных систем, включающих полиэлектролиты (синтетические макромолекулы) и биологические компоненты, в частности, иммобилизованных ферментов, клеточных органелл и целых клеток [5–7]. Такие системы необходимы для разработки эффективных биокаталитических, аналитических и сенсорных устройств.

Поверхности клеточных мембран обычно имеют отрицательный электростатический заряд при физиологических значениях pH, а многие сложные биологические соединения, такие как полипептиды, нуклеиновые кислоты, хитозан, являются полиэлектролитами, ионогенные группы которых несут отрицательный или положительный заряд. Поэтому системы, включающие липосомы, липидные везикулы и поликатионы, служат удобными и эффективными моделями для изучения механизмов взаимодействия биологических соединений с поверхностью клеточных мембран [8, 9].

Известно, что адсорбция поликатиона на отрицательно заряженную поверхность липидной мембраны может приводить к изменению температуры фазового перехода мембраны [10, 11], латеральному разделению фаз в мембране [10–12], миграции молекул липида между слоями липидного бислоя мембраны [13, 14], увеличению проницаемости мембраны для неорганических ионов [15–17], разрушению мембраны [18–21].

В данной статье представлены результаты работы по изучению влияния адсорбции поликатионов с различной линейной плотностью ионогенных групп на

структурные характеристики мембран отрицательно заряженных липосом. Приведены также результаты исследования влияния поликатионов на структуру внутриклеточных мембран, в частности мембран тилакоидов хлоропластов.

### Экспериментальная часть

#### С п и с о к

и с п о л ь з у е м ы х с о к р а щ е н и й

CL — дифосфатидилглицерин (кардиолипин)

EL — фосфатидилхолин (яичный лецитин)

РААН — полиаллиламингидрохлорид

PVP-30 и PVP-91 — сополимеры N-этил-4-винилпиридинийбромиды и 4-винилпиридина с 30 и 91% заряженных групп, соответственно

SA — стеариновая кислота

5-SASL и 16-SASL — 5-доксилстеарат и 16-доксилстеарат, соответственно

16-MeSASL — метил-16-доксилстеарат

Методом спиновых меток изучали влияние поликатионов на структурное состояние липидного бислоя мембран вблизи его поверхности и во внутренней гидрофобной области бислоя. Исследования проводили на мембранах липосом, состоящих из нейтрального липида — яичного лецитина, и из отрицательно заряженных липидных молекул (кардиолипина или стеариновой кислоты), а также на тилакоидных мембранах хлоропластов класса Б.

По спектрам ЭПР спиновых меток, включенных в систему мембрана—поликатион, определяли параметр порядка и время корреляции вращения парамагнитного фрагмента зонда. На основании этих параметров можно сделать заключение о влиянии полиэлектролитов на подвижность и организацию липидных молекул в мембранах.

### Материалы и реагенты

Катионные полимеры синтезировали с использованием поли-4-винилпиридина со степенью полиме-

ризации 1100, который кватернизовали различными алкилбромидами [22]. Были получены следующие поликатионы: сополимеры N-этил-4-винилпиридинийбромид и 4-винилпиридина с 91 и 30% алкилированных пиридиновых групп — 91/9 сополимер (PVP-91) и 30/70 сополимер (PVP-30), соответственно. Степень алкилирования поликатионов определяли методом инфракрасной спектроскопии (спектрометр UR-20, Karl Zeiss) [23].

В работе использовали также поликатион полиаллиламингидрохлорид (реагент фирмы Sigma, США).

Для приготовления суспензии липосомальных мембран использовали фосфатидилхолин (яичный лецитин, EL), дифосфатидилглицерол (кардиолипин, CL), стеариновую кислоту (SA); в качестве спиновых меток применяли нитроксильные радикалы на основе стеариновой кислоты: 5-доксилстеарат (5-SASL), 16-доксилстеарат (16-SASL) и метил-16-доксилстеарат (16-MeSASL) — все реагенты также фирмы «Sigma». Химические формулы использованных в работе реагентов приведены на рис. 1.

Готовили суспензии моноламеллярных липосом, содержащие 10% молекул кардиолипина (заряд 2-) или 20% молекул стеариновой кислоты (заряд 1-), pH = 9,2, по методике [13], суть которой заключается

в обработке ультразвуком водной дисперсии липидов. Все измерения спектров ЭПР проводили в течение 10—12 ч с момента приготовления везикул.

В работе использовали моноламеллярные липосомы CL/EL и SA/EL со средним диаметром ~70 нм. Тилакоидные мембраны выделяли из листьев бобов (*Vicia faba*) [24].

#### Приготовление спин-меченых образцов

Для приготовления суспензии спин-меченых липосом, содержащих 5-SASL или 16-SASL, к водной суспензии липосом добавляли концентрированный спиртовой раствор спиновой метки в таком количестве, чтобы стехиометрическое соотношение метка/липид в образце составило не более 1/70. При таком соотношении метка/липид форма спектра ЭПР спиновой метки не зависит от ее концентрации в образце, а амплитуда сигнала прямо пропорциональна ее концентрации. Конечная концентрация этанола в суспензии не превышала 1—2% (об.).

Образцы спин-меченых тилакоидов получали аналогичным способом, за исключением того, что вместо метки 16-SASL использовали 16-MeSASL. Во избежание светоиндуцированного восстановления спиновой метки все манипуляции со спин-мечеными образцами

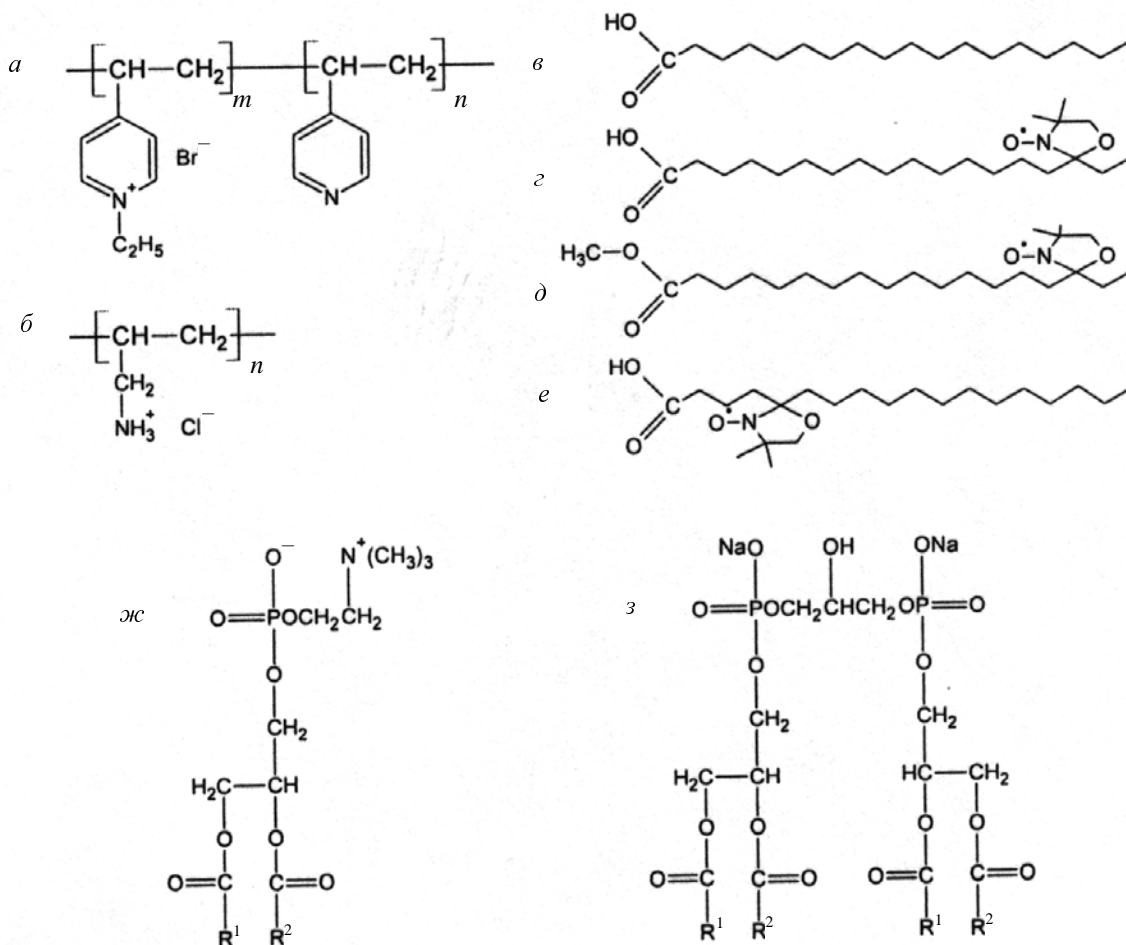


Рис. 1. Реагенты, использованные для приготовления меченой системы липосомальная мембрана—поликатион:

а — PVP-91 ( $m/(m+n) = 0,91$ ), PVP-30 ( $m/(m+n) = 0,30$ ); б — ПААМ; в — стеариновая кислота; г — 16-SASL; д — 16-MeSASL; е — 5-SASL; ж — фосфатидилхолин; з — дифосфатидилглицерол

проводили в затемненной комнате. В водную фазу, содержащую спин-меченые липосомы или тилакоиды, вводили поликатионы.

### Регистрация и обработка спектров ЭПР

Запись спектров ЭПР производилась на спектрометре Varian E-4, сопряженном с IBM-совместимым персональным компьютером. Управление экспериментом и обработку результатов осуществляли с применением оригинального программного обеспечения [25].

Температуру образцов варьировали с помощью потока азота, подаваемого в резонатор спектрометра компрессором (на пути потока азота находился нагревательный элемент).

Последовательность операций при получении температурных зависимостей спектров ЭПР спиновых меток была следующей. Сначала записывали спектр ЭПР спиновой метки при комнатной температуре. Затем образец нагревали и через определенный интервал в несколько градусов производилась запись спектра ЭПР. Повторяя эту операцию, продолжали нагревание и через такой же температурный интервал записывали спектр ЭПР. Последний спектр записывали снова при комнатной температуре. Этот спектр сравнивался с первым для выяснения обратимости термоиндуцированных изменений окружения спиновой метки и исключения из рассмотрения изменений в спектрах, обусловленных деструктивными термоиндуцированными изменениями образца.

Структурные характеристики липидных систем определяли по спектрам ЭПР спиновых зондов, из которых находили параметр порядка  $S$  и время корреляции вращения метки  $\tau_c$  [26, 27]. Отметим, что под временем корреляции вращения  $\tau_c$  нитроксильного радикала понимается среднее время, необходимое для изменения его ориентации в пространстве на угол  $\pi/2$  [30]. В принципе эти структурные параметры связаны с макроскопическими характеристиками мембран, такими как текучесть, вязкость, однако в случае метода мембранных зондов тот или иной параметр может нести информацию как о динамике, так и о молекулярной упорядоченности системы [26]. С помощью какого-то одного параметра ( $S$  или  $\tau_c$ ) нельзя достаточно полно охарактеризовать физическое состояние мембраны, но об изменении этого состояния можно судить по изменению одного параметра.

Исходя из конкретных предположений о характере движения нитроксильного радикала метки в исследуемой системе, параметр порядка можно связать с усредненными значениями углов между главными осями радикала и осью симметрии среды. Для бислойной липидной мембраны параметр порядка в общем случае определяется следующим образом [26, 28]:

$$S_i = 1/2(3\langle \cos^2\theta_i \rangle - 1)$$

где  $\theta_i$  — угол между осями  $X$ ,  $Y$  и  $Z$  системы координат, связанной с парамагнитным фрагментом метки и соответствующими осями системы координат, связанной с липидным бислоем.

Таким образом, параметр порядка характеризует среднюю по времени ориентацию парамагнитного фрагмента относительно системы координат, связанной с бислоем. В качестве такой системы координат обычно принимают систему, у которой ось  $Z$  перпендикулярна плоскости бислоя. У системы координат,

связанной с парамагнитным фрагментом, ось  $X$  направлена вдоль  $N-O$ -связи, а ось  $Z$  — вдоль  $2p_z$ -орбитали неспаренного электрона. Спиновые метки на основе стеариновой кислоты обладают осью вращения, направленной вдоль углеводородной цепи кислоты и приблизительно совпадающей с осью  $Z$  парамагнитного фрагмента. Таким образом, для описания параметра порядка всей молекулы метки 5-SASL используется формула [26, 29]:

$$S \approx S_z = 1/2(3\langle \cos^2\theta \rangle - 1)$$

где  $\theta$  — угол между нормалью к бислою и осью вращения молекулы спиновой метки. В случае плотной упаковки молекул в бислое и их одинаковой ориентации величина  $\theta$  близка к нулю, а параметр  $S$  близок к 1. По мере уменьшения плотности упаковки молекул в бислое и при их разупорядочении диапазон значений угла  $\theta$  увеличивается, а параметр порядка  $S$  уменьшается вплоть до нуля, что соответствует изотропному движению метки в бислое ( $\theta$  принимает значения от 0 до  $\pi$ ). Необходимо отметить, что параметр порядка  $S$  служит мерой пространственной упорядоченности в случае  $\tau_c > 10^{-8}$  с (условия медленного вращения нитроксильного радикала).

Параметр порядка  $S$  и время корреляции вращения  $\tau_c$  использовались для характеристики подвижности спиновых меток, встроенных в мембраны липосом. Параметр порядка  $S$  рассчитывали по формуле [31]:

$$S = \frac{1}{7}(T_{\parallel}' + 2T_{\perp}') - \sqrt{\left[\frac{1}{7}(T_{\parallel}' + 2T_{\perp}')\right]^2 - 0,46(T_{\parallel}' + 2T_{\perp}') + 0,6} \quad (1)$$

где  $T_{\parallel}'$  и  $T_{\perp}'$  — внешний и внутренний параметры расщепления, определяемые экспериментально из спектра ЭПР спиновой метки (см. рис. 2А).

Время вращательной корреляции  $\tau_c$  определяли в соответствие с [30]:

$$\tau_c = K_{0,-1}\Delta H_0 \left[ \sqrt{\left(\frac{I_0}{I_{-1}}\right) - 1} \right] \quad (2)$$

где  $K_{0,-1} = 6,73 \cdot 10^{-10}$  (с/Гц),  $I_0$  и  $I_{-1}$  — амплитуды центральной и высокопольной компонент спектра ЭПР метки;  $\Delta H_0$  — ширина центральной линии (параметры  $I_{-1}$ ,  $I_0$ ,  $\Delta H_0$  обозначены на рис. 2Б).

Область применимости формулы (2):

$$5 \cdot 10^{-17} \text{ с}^2 \gg \tau_c^2 \gg 4 \cdot 10^{-22} \text{ с}^2.$$

Определение параметров подвижности молекул спиновых меток на основе анализа их спектров ЭПР сложной формы может проводиться различными методами [26]. Так, некоторые экстремумы спектров могут быть плохо разрешены, т.е. невозможно измерить какие-то из параметров, указанных на рис. 3, и это приводит к неверным их значениям, рассчитанным с помощью формул (1) и (2). Кроме того, формулы (1) и (2) имеют определенные области применимости, обусловленные ограничениями принимаемой при их выводе модели движения нитроксильного радикала. В наружной области мембраны имеет место медленное и анизотропное вращение липидных молекул, поэтому корректно применять формулу (1). Внутренняя об-

ласть бислоя более рыхлая и в ней происходит относительно быстрое и изотропное вращение углеводородных цепей, поэтому для описания внутренних областей бислоя корректно применять формулу (2).

Оценку погрешностей рассчитываемых из спектров ЭПР величин  $S$  и  $\tau_c$  производили, исходя из точности измеряемых спектральных параметров по правилам оценки погрешностей для косвенных измерений.

### Обсуждение экспериментальных результатов

#### Влияние поликатионов на параметры движения спиновых зондов в мембранах липосом, содержащих стеариновую кислоту

Для изучения эффектов поликатионов на подвижность липидных молекул вблизи поверхности мембраны липосом нами использовалась спиновая метка 5-SASL. Парамагнитный фрагмент этой метки локализован в области гидрофильных полярных групп молекул липидов [32] (на расстоянии  $\sim 8 \text{ \AA}$  от поверхности мембраны). На рис. 2А приведен характерный спектр ЭПР спинового зонда 5-SASL в суспензии липосом, который дает информацию об анизотропном характере вращения молекул зонда в мембранах липосом. Как известно из данных работ [13, 14], поликатионы PVP-30 и PVP-91 активно связываются с отрицательно заряженными липосомами с образованием комплексов.

Исследованные нами липосомы диаметром 70 нм состоят приблизительно из 27000 молекул липида.

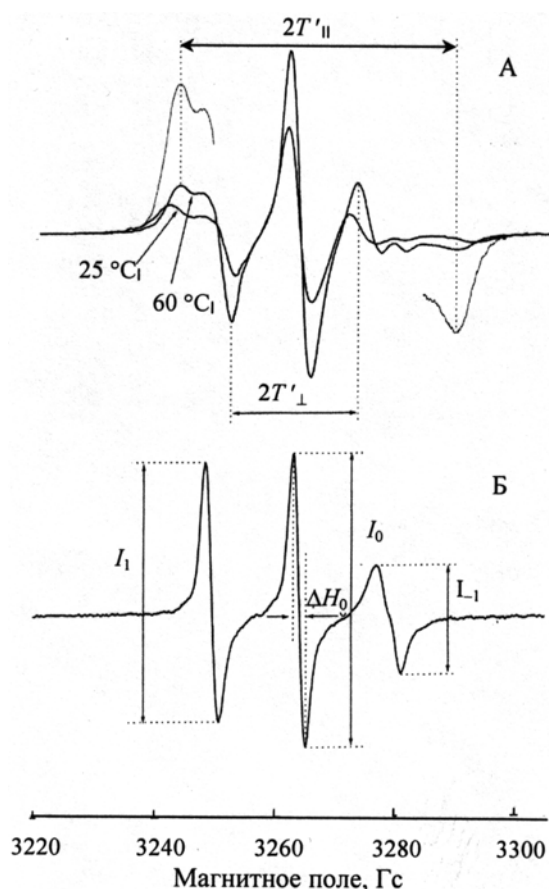


Рис. 2. Спектры ЭПР спиновых меток в суспензии липосом: А — метка 5-SASL; Б — метка 16-SASL (при 25 °С)

Учитывая бислоюю структуру липосом и их размеры, находим, что при стехиометрическом соотношении катионных групп адсорбированных поликатионов и анионных групп липосом, равном 1:1, на одну липосому приходится  $\sim 10$  молекул PVP-30 и  $\sim 3$  молекулы PVP-91. Таким образом, исследуемая система является сильно неоднородной.

Поликатион, взаимодействуя с липидной везикулой, инициирует образование кластеров из отрицательно заряженных липидов в месте контакта (рис. 3) [33]. Следовательно, наблюдаемые спектры ЭПР являются суперпозицией спектров меток, находящихся в различном окружении (метка в месте контакта мембраны с поликатионом и метка, в состоянии липидного окружения которой ничего не изменилось). В случае различного сродства поликатиона к отрицательно заряженному липиду и стеариновой кислоте (на основе которой построены молекулы спиновых меток) распределение метки по мембране в присутствии поликатиона может быть весьма сложным. Чтобы обеспечить большую однородность системы, нами были проведены эксперименты, где в качестве носителя отрицательного заряда на липосомах использовалась стеариновая кислота. В этом случае носитель заряда на липосоме и используемые спиновые метки имеют одинаковую анионную группу.

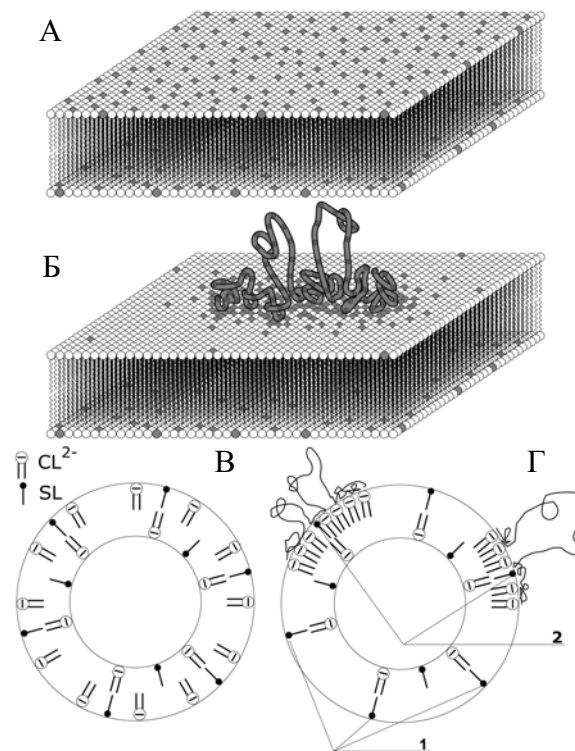


Рис. 3. Схематическое изображение исследуемой модельной мембранной структуры:

А — фрагмент бислоюй липидной мембраны, состоящей из нейтральных (белые) и отрицательно заряженных (серые) молекул липида; Б — кластер из отрицательно заряженных молекул липидов мембраны, образуемый при связывании мембраны с поликатионом; В — распределение метки в липосоме в отсутствие поликатиона; Г — то же в присутствии поликатиона; 1 — метка, в окружении которой ничего не изменилось, 2 — метка в области кластера из отрицательно заряженного липида

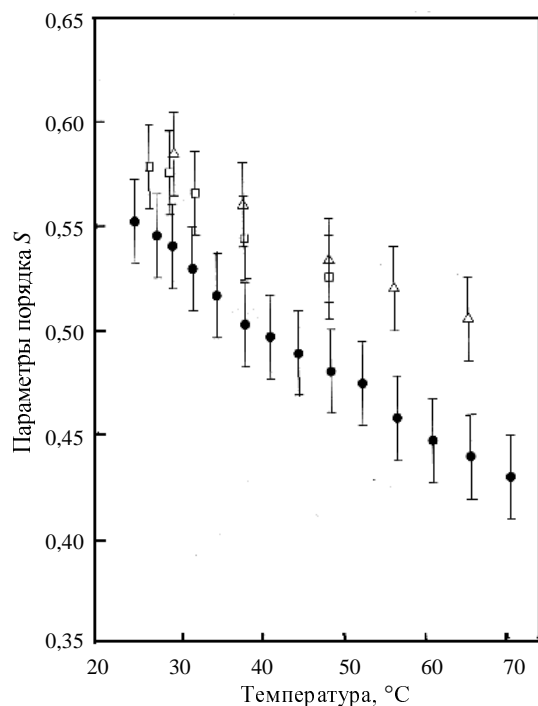


Рис. 4. Зависимость параметра порядка от температуры для липосом, содержащих стеариновую кислоту:

- — контрольный образец, не содержащий поликатионов;
- Δ — образец, содержащий PVP-30 ( $[\text{поликатион}^+]/[\text{SA}^-] = 2$ );
- — образец, содержащий PVP-91

Как известно [34], при повышении температуры степень упорядоченности молекул в бислоиных липидных мембранах уменьшается, о чем свидетельствует снижение степени анизотропии вращения нитроксильного радикала спиновой зонды в мембране (и, как следствие, уменьшение значения параметра порядка  $S$ ).

На рис. 4 представлена температурная зависимость параметра порядка спиновой метки 5-SASL в липосомах состава EL/SA без добавок и в присутствии поликатионов PVP-30 и PVP-91. Как видно из рис. 4, при образовании комплекса везикула-поликатион параметр  $S$  увеличивается, причем влияние PVP-30 и PVP-91 на значение параметра порядка различное. Добавка PVP-30 приводит к увеличению параметра порядка примерно на 0,05—0,06, а поликатион PVP-91 увеличивает параметр порядка на 0,03—0,04.

Увеличение параметра  $S$  может быть связано с тем, что заряженный полимер, связываясь с отрицательно заряженными молекулами липида на поверхности мембраны, ограничивает их подвижность. Различие в изменении параметра порядка между везикулами, связанными с PVP-30 и PVP-91, возможно, обусловлено тем, что в случае PVP-30 помимо электростатического взаимодействия отрицательно заряженных молекул липидов с положительно заряженными группами полимера происходит взаимодействие гидрофобных участков макромолекулы с гидрофобной областью бислоя мембраны [8]. Таким образом, обнаруженное значительное увеличение параметра порядка в случае менее заряженного поликатиона (PVP-30) может отражать степень гидрофобной составляющей этого

взаимодействия. Поликатион PVP-91 в большей степени взаимодействует с анионными группами поверхности мембраны и практически не встраивается в мембрану, а PVP-30, напротив, ввиду меньшей линейной плотности положительных зарядов в молекуле, в большей степени встраивается в гидрофобные области порядка линейных размеров пиридинового фрагмента молекулы), что приводит к изменению структурных характеристик мембраны вблизи поверхности бислоя и, как следствие, к увеличению значения параметра  $S$  в этой области липидного бислоя.

*Влияние поликатионов на параметры движения спиновых зондов в мембранах липосом, содержащих кардиолипин*

Кардиолипин является распространенным компонентом биологических мембран. Измерения, проведенные при постоянной температуре образцов (25 °C), показали, что с ростом концентрации поликатиона PVP-30 в суспензии липосом параметр порядка  $S$  увеличивается примерно от 0,55 до 0,60. Поликатионы PVP-91 также увеличивает параметр порядка от 0,55 до 0,58. Таким образом, изменение параметра порядка, отмеченное в случае везикул, содержащих стеариновую кислоту, имеет место и в везикулах с кардиолипином.

В силу того, что используемые в экспериментах липосомы имели некоторый разброс по диаметру везикул, нами были проведены эксперименты с везикулами разных размеров. Как известно, степень упорядоченности молекул липида в бислое зависит от диаметра везикулы: при малом радиусе кривизны мембраны моноламеллярной везикулы возникает трансмембранная гетерогенность характеристик мембраны, обусловленная особенностями структурной организации и состояния липидных молекул во внешнем и внутреннем слоях бислоя [27, 35]. Кроме того, реальные биологические мембраны, например, мембраны клеток или клеточных органелл, имеют радиус кривизны значительно больший, чем малые моноламеллярные везикулы. Измерение параметра порядка для везикул размерами 45, 90 и 240 нм дало аналогичные результаты. При постоянной температуре образца по мере увеличения концентрации PVP-30 для везикул всех исследованных размеров были получены одинаковые (в пределах погрешности эксперимента) значения параметра порядка: контроль ( $[\text{поликатион}^+]/2[\text{CL}^{2-}] = 0$ , липосомы в отсутствие PVP-30)  $S = 0,55 \pm 0,2$ ; при насыщающей концентрации PVP-30 (соотношение  $[\text{поликатион}^+]/2[\text{CL}^{2-}] = 2$ )  $S = 0,60 \pm 0,2$ . Таким образом, как показал эксперимент, изменение размера везикул не вносит вклад в изменение параметра порядка, определяемого по спектрам ЭПР зонда 5-SASL.

Нами получены температурные зависимости параметра порядка для липосом малого диаметра (рис. 5). Как видно из рис. 5А, параметр порядка, определяемый из спектра ЭПР спиновой зонды 5-SASL в мембранах липосом в отсутствие поликатиона PVP-30 и в его присутствии в насыщающей по заряду концентрации, отличается на  $\sim 0,05$  в исследованном интервале температур.

Парамагнитный фрагмент встроенной в мембрану метки 16-SASL находится в области гидрофобных фрагментов липидов — во внутренних областях бис-

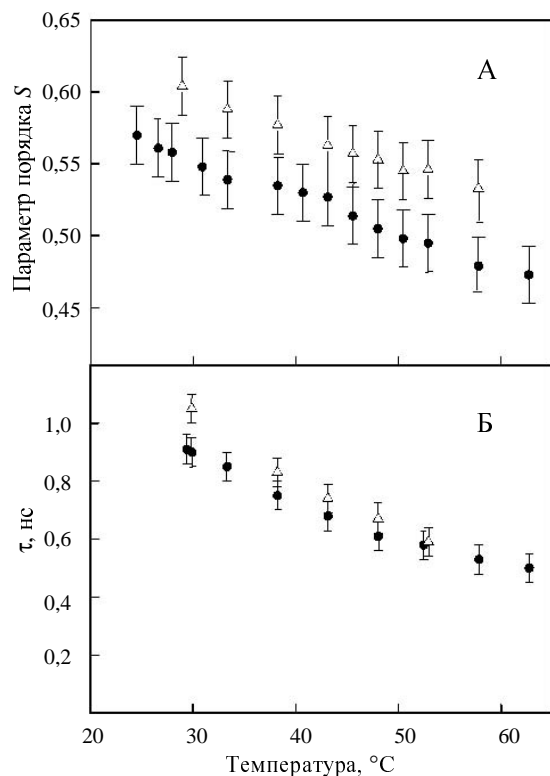


Рис. 5. Зависимость параметра порядка (А) и времени корреляции вращения (Б) для липосом, содержащих кардиолипин:

● — контрольный образец, не содержащий поликатионов;  
 Δ — образец, содержащий насыщающую концентрацию PVP-30 ([поликатион<sup>+</sup>]/[SA<sup>-</sup>] = 2)

ля. На рис. 5Б представлена температурная зависимость времени корреляции вращения, рассчитываемого по спектрам ЭПР метки 16-SASL. Как видно из рис. 5А и 5Б, относительное изменение величины параметра порядка  $S$ , характеризующего подвижность парамагнитного фрагмента вблизи поверхности бислоя, превышает относительное изменение величины  $\tau_c$ , характеризующего подвижность парамагнитного фрагмента в глубине мембраны.

*Структурные характеристики тилакоидных мембран в составе комплексов тилакоид/полиэлектролит*

Как было показано в работе [36], мембраны тилакоидов хлоропластов высших растений адсорбируют поликатион полиаллиламингидрохлорид (РААН), что приводит к образованию комплексов тилакоид/полимер в водной фазе. Изучение влияния адсорбции РААН на параметр порядка и время корреляции вращения, определяемых по спектрам ЭПР спиновых меток на основе стеариновой кислоты (рис. 6), не выявило существенного изменения величин  $S$  и  $\tau_c$  спиновых меток, встроенных в мембраны тилакоидов (в пределах погрешностей эксперимента). Данный результат коррелирует с результатами наших экспериментов по исследованию влияния поликатионов на светоиндуцированный электронный транспорт в мембранах тилакоидов [36]. Следовательно, при взаимодействии поликатиона с биологическими мембраны-

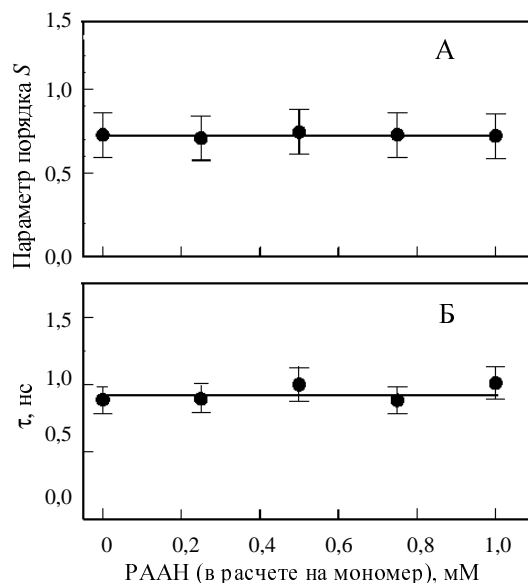


Рис. 6. Зависимость параметра порядка (А) и времени корреляции вращения (Б) от концентрации полиаллиламингидрохлорида в суспензии тилакоидов

ми структурами, такими как тилакоиды, поликатион связывается преимущественно с нелипидными компонентами мембраны, не вызывая заметных изменений в липидном матрикс мембраны.

**Выводы**

Совокупность полученных результатов свидетельствует о влиянии поликатионов на структурное состояние мембран липосом в интервале температур 25—65 °С, при этом поликатион с большей линейной плотностью заряда (PVP-91) в меньшей степени влияет на структурное состояние липидных молекул вблизи поверхности бислоя, чем молекулы PVP-30, характеризующиеся меньшей линейной плотностью заряда. Поликатионы в большей степени влияют на подвижность и организацию липидных молекул вблизи поверхности бислоя и в меньшей степени на состояние липидной матрицы во внутренних гидрофобных областях бислоя мембраны. Степень влияния поликатионов на состояние липидного бислоя везикул практически не меняется при варьировании размеров везикул в диапазоне 45—240 нм.

В случае взаимодействия поликатиона с мембранами биологических объектов, в частности, мембранами тилакоидов, существенных изменений параметра порядка и времени корреляции спиновых зондов на основе стеариновой кислоты не обнаружено, что свидетельствует о том, что поликатион, по-видимому, связывается с нелипидными компонентами биомембраны.

\*\*\*

Авторы выражают признательность профессорам А.Н. Тихонову и А.А. Ярославову за проявленный ими интерес к работе и обсуждение результатов, Н.С. Мелик-Нубарову за работу по приготовлению липосом и обсуждение результатов и В.В. Птушенко за помощь в выделении хлоропластов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 05-03-32756-а).

ЛИТЕРАТУРА

1. Donaruma L.D., Otternbrite R.M., Vogl O. Anionic Polymeric Drugs. N. Y.: Wiley, 1980.
2. Gref R., Minamitake Y., Trubetskoy M.T., Torchilin V.P., Langer R. Science, 1994, v. 263, p. 1600–1603.
3. Hancock R.E. Trends in Microbiology, 1997, v. 5, Issue 1, p. 37–42.
4. Yaroslavov A.A., Sukhishvili S.A., Obolsky O.L., Yaroslavova E.G., Kabanov A.V., Kabanov V.A. FEBS Letters, 1996, v. 384, p. 177–180.
5. Westgate S., Vaidya A.M., Bell G., Halling P.G. Enzyme Microb. Technol., 1998, v. 22, p. 575–577.
6. Bobreshova M.E., Sukhorukov G.B., Saburova E.A., Efimova L.I., Shabarchina L.I., Sukhorukov B.I. Biophysics, 1999, v. 44, № 5, p. 813–820.
7. Pommersheim R., Schrezenmeir J., Vogt W. Macromol. Chem. Phys., 1994, v. 195, p. 1557–1567.
8. Yaroslavov A.A., Yaroslavova E.G., Rakhnyanskaya A.A., Menger F.M., Kabanov V.A. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 1999, v. 16, p. 29–43.
9. Yaroslavov A.A., Koulikov V.Ye., Yaroslavova E.G., Ignatiev M.O., Kabanov V.A. Langmuir, 1998, v. 14, p. 5999–6004.
10. Hartmann W., Galla H.-J. BBA — Biomembranes, 1978, v. 509, Issue 3, p. 474–490.
11. Carrier D., Dufourcq J., Faucon J.-F., Pézolet M. Ibid., 1985, v. 820, Issue 1, p. 131–139.
12. Takahashi H., Matuoka S., Kato S., Ohki K., Hatta I. Ibid., 1992, v. 1110, Issue 1, p. 29–36.
13. Yaroslavov A.A., Koulikov V.E., Polinsky A.S., Baibakov B.A., Kabanov V.A. FEBS Letters, 1994, v. 340, Issues 1–2, p. 121–123.
14. Kabanov V.A., Yaroslavov A.A., Sukhishvili S.A. J. of Controlled Release, 1996, v. 39, Issues 2–3, p. 173–189.
15. Gad A.E., Silver B.L., Eytan G.D. BBA — Biomembranes, 1982, v. 690, Issue 1, p. 124–132.
16. Kato T., Lee S., Ono S., Agawa Y., Aoyagi H., Ohno M., Nishino N. Ibid., 1991, v. 1063, Issue 2, p. 191–196.
17. Lee S., Iwata T., Oyagi H., Aoyagi H., Ohno M., Anzai K., Kirino Y., Sugihara G. Ibid., 1993, v. 1151, Issue 1, p. 76–82.
18. Wang C.Y., Huang L. Biochemistry, 1984, v. 23(19), p. 4409.
19. Gad A.E., Elyashiv G., Rosenberg N. BBA — Biomembranes, 1986, v. 860(2), p. 314–324.
20. Walter A., Steer C.J., Blumenthal R. Ibid., 1986, v. 861, p. 319–330.
21. Oku N., Shibamoto S., Ito F., Gondo H., Nango M. Biochemistry, 1987, v. 26(25), p. 8145–8150.
22. Fuoss R.M., Strauss U.P. J. of Polymer Science, 1948, v. 3(2), p. 246–263.
23. Кириш Ю.Э., Плужнов С.К., Шомина Т.С., Кabanov В.А., Каргин В.А. Высокомолекул. соед., 1970, т. 12А, с. 186–190.
24. Tikhonov A.N., Khomutov G.B., Ruuge E.K., Blumenfeld L.A. Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 637, p. 321–333.
25. Трубицин Б.В., Кокиаров Ю.А., Шаталов Н.А., Рууге Э.К., Тихонов А.Н. Тез. X междунар. конф. «Магнитный резонанс в химии и биологии». Суздаль, 1998, с. 9–10.
26. Гриффит О., Джост П. В кн.: Метод спиновых меток. Теория и применение. Под ред. Л. Берлинера. М.: Мир, 1979.
27. Геннис Р.Б. Биомембраны: Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997, с. 104.
28. Лихтинштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. М.: Наука, 1974, с. 200.
29. Hemminga M.A. Chem. Phys. Liquids, 1983, 32, p. 323–383.
30. Кузнецов А.Н. Метод спинового зонда. М.: Наука, 1976.
31. Marsh D., Schorn K. In: Biological Magnetic Resonance, v. 14: Spin labeling: the next millennium. Ed. L.J. Berliner. N.Y.: Plenum Press, 1998, p. 405–410.
32. Tikhonov A.N., Subczynski W.K. In: Biological Magnetic Resonance, v. 23: Biomedical ESR-Part A. Eds. S.S. Eaton, G.R. Eaton, L.J. Berliner. N.Y.: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2005, p. 147–194.
33. Yaroslavov A.A., Efimova A.A., Lobyshev V.I., Kabanov V.A. BBA — Biomembranes, 2002, v. 1560, p. 14–24.
34. Griffith O.H., Jost P.C. In: Spin Labelling Theory and Applications. Ed. L.J. Berliner. N.Y.: San Francisco, London, Acad. Press, 1976, p. 454–535.
35. Тихонов А.Н. Дисс. ...докт. ф.-м. наук. Москва, 1985.
36. Dementiev A.A., Baikov A.A., Ptushenko V.V., Khomutov G.B., Tikhonov A.N. Biochim. Biophys. Acta, 2005, v. 1712, p. 9–16.