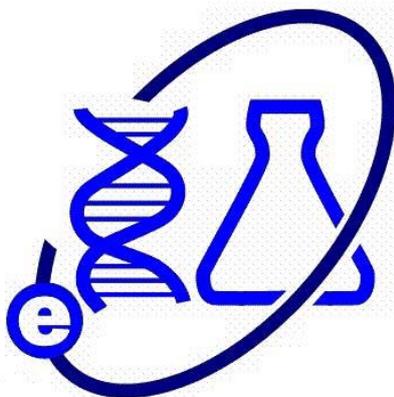


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ им. Н.М. Эмануэля
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА

Труды
XXII Ежегодной молодежной конференции
с международным участием
ИБХФ РАН-ВУЗы

Москва
14–16 ноября 2022 г.

Москва
2023

УДК 577:53(063)
ББК 28.072+28.071+22.3
Б63

Оргкомитет ИБХФ РАН:
кандидат химических наук, начальник отдела по подготовке научных кадров
Л.В. Недоспасова;
кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник *Е.Н. Тимохина;*
кандидат химических наук, старший научный сотрудник *Т.Ю. Астахова*

Составители:
Е.Н. Тимохина, Т.Ю. Астахова

Б63 **Биохимическая физика** : труды XXII Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗЫ. Москва, 14–16 ноября 2022 г. – Москва : РУДН, 2023. – 183 с. : ил.
ISBN 978-5-209-11951-7

Всего в работе XXII Ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗЫ «БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА», приняло участие 204 человека. Было сделано 3 приглашенных и 54 устных доклада и 30 стендовых сообщений.

Труды представлены в авторской редакции.

УДК 577:53(063)
ББК 28.072+28.071+22.3

ISBN 978-5-209-11951-7

© Коллектив авторов, 2023
© Оформление. Российский университет
дружбы народов, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

Абдуллина М.И., Мотякин М.В., Важенкова Е.Е., Каспаров В.В., Бычкова А. В. <i>Влияние окислительной модификации на устойчивость покрытия из сывороточного альбумина на поверхности наночастиц магнетита</i>	7
Аслоповский В.Р., Боченкова А.В. <i>Влияние окружения хромофора белка EGFP на сечение двухфотонного поглощения</i>	9
Багрова О.Е., Лапшина К.К., Белова Е.В. <i>Анализ вторичных структур белков с различным эволюционным родством</i>	12
Бакирова Э.Р., Чернова В.В., Кулиш Е.И. <i>Подходы к созданию материалов на основе смесей полилактида с хитином и хитозаном</i>	14
Балакина Е.С., Чеботарёв С.А., Комарова А.П., Хватов А.В., Зеликина Д.В. <i>Структурные и термодинамические аспекты целенаправленного регулирования функциональных свойств наноконтейнеров на основе изолята сывороточных белков молока и хитозана для доставки нутрицевтиков</i>	16
Белецан О.Б., Боченкова А.В. <i>Моделирование процессов колебательной автоэмиссии электронов из валентных и диполь-связанных состояний</i>	20
Блинова А.Р., Кулакова А.М., Григоренко Б.Л., Немухин А.В. <i>Молекулярное моделирование ацилирования глутамата под воздействием фермента N-ацетилглутаматсинтазы</i>	22
Бреева А.В., Первушин Н.В., Цурикова У.А., Елисеев А.А., Гонгальский М.Б., Осминкина Л.А. <i>Комбинационное рассеяние света для мониторинга композитных наночастиц, загруженных лекарством</i>	23
Бреннер П.К., Капралова М.А., Заварыкина Т.М., Козырко Е.В., Круз Ж. де С., Байгазиева Д.А., Ходырев Д.С., Хохлова С.В. <i>Связь полиморфных маркеров генов <i>ercc2</i>, <i>ercc5</i> и <i>abcb1</i> с ответом на лечение и акушерскими параметрами после химиотерапии препаратами платины при онкологических заболеваниях на фоне беременности</i>	24
Бреславская Н.Н., Тимохина Е.Н., Уголкова Е.А., Минин В.В., Ефимов Н.Н. <i>Квантово-химическое исследование комплексов с переносом заряда между органическими фрагментами</i>	28
Бровина С.Д., Гуйван М.Ю., Масталыгина Е.Е., Абушахманова З.Р., Овчинников В.А., Сухова А.А., Пантюхов П.В. <i>Изучение способности к биоразложению целлюлозы и вискозного волокнистого материала</i>	31
Булучевская А.Д., Беляева Н.О., Сухарев Н.Р., Сухарева К.В., Попов А.А. <i>Защитные озоностойкие покрытия на основе бутадиен-стирола и этилен-пропилен-диенового каучука</i>	34
Бурцев И.Д., Егоров А.Е., Костюков А.А., Дубинина Т.В., Кузьмин В.А. <i>Новые замещенные субфталоцианины бора как перспективные молекулы-кандидаты в тераностике</i>	36
Ванюшенкова А.А., Морозов А.Н., Белов А.А. <i>Влияние условий синтеза, хранения и эксплуатации комплексных перевязочных препаратов на основе модифицированной целлюлозы на процесс их деградации</i>	38
Василев Е.П., Смирнов П.А. <i>Оптимизация характеристик облучения растений в теплицах</i>	42
Виноградова Л.В., Комарова К.Ю., Лукин А.Ю. <i>Новые спироциклические производные ципрофлоксацина, синтез и антибактериальная активность</i>	43
Волдаева О.Н., Клещина Н.Н., Боченкова А.В. <i>Развитие методов расчета оптических спектров внутриклеточных индикаторов кальция</i>	46
Гаврилина Е.С., Васильева А.Д., Юрина Л.В., Иванов В.С., Гусарова Д.Ю., Индейкина М.И., Бугрова А.Е., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А. <i>Исследование влияния окислительной модификации на структуру и функциональную активность плазминогена</i>	47
Гаспарян К.Г., Тюбаева П.М. <i>Сравнение сроков деградации и физико-химических свойств нетканых и пленочных материалов из полигидроксibuтирата</i>	50
Горобец М.Г., Мурадова А.Г., Шарапаев А.И., Лопухова М.В., Бычкова А.В. <i>Детекция белков «белковой короны» на поверхности наночастиц</i>	53

Горобец М.Г., Абдуллина М.И., Мотякин М.В., Бычкова А.В. <i>Оценка пероксидазной активности наночастиц магнетита в присутствии белков крови</i>	55
Григорян И.В., Адельянов А.М., Кокшаров Ю.А., Спиридонов В.В., Потапенков К.В., Таранов И.В., Хомутов Г.Б., Ярославов А.А. <i>Поликомплексы со спермином</i>	57
Гусарова Д., Васильева А., Юрина Л., Гаврилина Е., Иванов В., Индейкина М., Бугрова А., Кононихин А., Николаев Е., Розенфельд М. <i>Исследование посттрансляционных модификаций фибриногена при болезни Альцгеймера</i>	58
Даничкина К.В., Стрельникова П.А., Кузин А.А., Индейкина М.И., Бугрова А.Е., Кононихин А.С. <i>Масс-спектрометрическое исследование p-Ser-8-Aβ протеоформы бета-амилоида</i>	59
Дудаев А.Е., Рыльцева Г.А., Липайкин С.Ю., Дорохин А.С. <i>Лазерная модификация полигидроксикарбонатов как подход к функционализации поверхности</i>	60
Евтушенко Е.Г., Гаврилина Е.С., Гусарова Д.Ю., Васильева А.Д., Юрина Л.В., Курочкин И.Н. <i>Разработка высокочувствительной системы регистрации активности пероксидазы с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния</i>	62
Ежова М.В., Метленкин Д.А., Платов Ю.Т., Платова Р.А. <i>Применение гиперспектральных изображений как неинвазивного метода сортировки плодов авокадо</i>	65
Захаров М.С., Тертышная Ю.В., Жданова К.А. <i>Спектральные, теплофизические и физико-механические свойства систем порфирин-полимер на основе полилактида и мезо-арилпорфиринов</i>	69
Зинатуллина К.М., Орехова А.В., Касаикина О.Т., Храмеева Н.П. <i>Сходство и различия в поведении N-ацетилцистеина и глутатиона в условиях окислительного стресса</i>	72
Иванова С.М., Потапова М.С. <i>Рациональное использование молочной сыворотки в пищевом производстве и сельском хозяйстве</i>	75
Капралова М.А., Бреннер П.К., Заварыкина Т.М., Ганьшина И.П., Гордеева О.О., Ходырев Д.С., Колядина И.В., Хохлова С.В. <i>Связь полиморфных маркеров генов XRCC1, ERCC5, TP53, CDKN1A1 с выживаемостью больных тройным негативным раком молочной железы после платиносодержащей химиотерапии</i>	77
Каримуллина Л.Б., Кривицкая А.В., Хренова М.Г. <i>Влияние протокола расчета на описание стадии нуклеофильной атаки реакции гидролиза нитроцефина металло-β-лактамазой L1</i>	82
Китушина Е.В., Орешкина А.В., Лобанов А.В. <i>Комплексообразование порфиринов с гетерополианионами</i>	83
Климович И.Д., Худякова К.А. <i>Влияние тепловых эффектов на метаболизм цианобактерий и сопряженные с ним экологические особенности (обзор)</i>	86
Комарова К.Ю., Виноградова Л.В., Лукин А.Ю. <i>Синтез и антибактериальная активность производных 9-азаспиро[5,5]-ундекана</i>	88
Кормухина А.Ю., Покидова О.В., Санина Н.А. <i>Нитрозильные комплексы железа с тиосульфатными и тиомочевинными лигандами: взаимодействие с бычьим сывороточным альбумином in vitro</i>	90
Коровина А.В., Квашнин Д.Г. <i>Предсказание и исследование новых двумерных наноструктур на основе ковалентно-связанных органических молекул</i>	91
Костюков А.А., Яковлева М.А., Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Соколова В.В., Хубецова М.Х., Арбуханова П.М., Борзенко С.А., Кузьмин В.А., Фельдман Т.Б., Островский М.А. <i>Сравнительный анализ физико-химических характеристик групп флуорофоров липофусциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека в зависимости от возраста</i>	92
Кривицкая А.В., Хренова М.Г. <i>Механизм реакции ингибирования пенициллин-связывающего белка 2 из штаммов FA19, 35/02 и H041 Nisseria Gonorrhoeae цефтриаксоном</i>	97
Куликова О.Р., Антипова К.Г., Крашенинников С.В., Григорьев Т. Е., Храмова Е.А. <i>Оценка затухания ультразвука в химически сшитых гидрогелях на основе полиакриламид для регенеративной медицины</i>	98

Кура Л.Або, Морозова Е.А., Куликова В.В., Коваль В.С., Покровский В.С., Демидкина Т.В. <i>Цитотоксическая и противоопухолевая активность фармакологической пары метионин γ-лиаза-дайдзеин + сульфоксид S-пропил L-цистеина на модели рака предстательной железы 22Rv1</i>	101
Курносое А.С., Яковлева М.А., Горшенев В.Н., Донцов А.Е., Ольхов А.А. <i>Биокмползиторы на основе полигидроксибутирата и природного антиоксиданта – меламина</i>	103
Кусяпкулова А.Б., Покидова О.В., Санина Н.А. <i>Исследование взаимодействия тиосульфатного нитрозильного комплекса железа с цитохромом С</i>	107
Марьина А.В., Покидова О.В., Санина Н.А. <i>Влияние гемоглобина на NO-донорную активность нитрозильного комплекса железа с тиосульфатными лигандами</i>	108
Матиев О.В., Ванюшенкова А.А., Белов А.А. <i>Биодеградируемые полисахариды медицинского назначения не только основа для терапевтических агентов, но и пролекарства</i>	109
Мацокин Н.А., Квашнин А.Г. <i>Сверхтвердые смесевые бориды вольфрама типа WB5-х с примесями переходных металлов</i>	113
Метленкин Д.А., Киселев Н.В., Платов Ю.Т. <i>Определение кислотного числа жира и сроков хранения гречневой крупы сочетанием ИК-спектроскопии и хемометрики</i>	113
Моллаева М.Р., Яббаров Н.Г., Сокол М.Б., Чиркина М.В., Никольская Е.Д. <i>Оценка синергетического эффекта и оптимизация комбинаций вориностата и доксорубицина для терапии опухолевых заболеваний</i>	116
Морозова Е.А., Писаревская В.А., Журавлева А.С., Шагаев А.А., Марквичев Н.С. <i>Исследование колонизации корневой системы <i>Cucumis sativus</i> клетками <i>Bacillus subtilis</i> и <i>Pseudomonas fluorescen</i></i>	118
Мулашкина Т.И., Кулакова А.М., Хренова М.Г. <i>Использование лапласиана электронной плотности в качестве критерия определения типа механизма ферментативного разрыва Р-О связи в нуклеозидфосфатах</i>	122
Никольская Е.Д., Сокол М.Б., Моллаева М.Р., Чиркина М.В., Гуляев И.А., Клименко М.А., Яббаров Н.Г. <i>Разработка технологии совместного инкапсулирования вориностата и доксорубицина в полимерные наночастицы</i>	123
Новикова В.О., Покидова О.В., Санина Н.А. <i>Распад нитрозильного комплекса железа с 3,4-дихлортиофенольными лигандами в модельной системе с глутатионом и муцином</i>	125
Огородников В.Э., Пристромова Ю.И., Едчик А.В., Соломевич С.О., Бычковский П.М., Юркштович Т.Л. <i>Получение наночастиц селена, стабилизированных фосфатом декстрана</i>	126
Одинцов К.В., Домрачева Т.М. <i>Моделирование реакций сопряженного переноса электрона и протона во флавин-связывающих ферментах</i>	131
Петрова В.И., Козлов С.С., Алексеева О.В., Никольская А. Б., Шевалеевский О.И. <i>Создание высокоэффективных перовскитных солнечных элементов путем модификации светопоглощающего слоя биополимерами</i>	132
Покидова О.В., Татьянаенко Л.В., Горячев Н.С., Козуб Г.И., Кондратьева Т.А., Санина Н.А. <i>Влияние нитрозильных комплексов железа с ароматическими тиолигандами на активность Са²⁺-АТФазы и фосфодиэстеразы</i>	135
Поляков И.В., Немухин А.В., Домрачева Т.М., Кулакова А.М., Григоренко Б.Л. <i>Моделирование взаимодействия флавина, урацила и молекулярного кислорода в активном сайте белка RutA с помощью молекулярной динамики с квантовыми потенциалами</i>	136
Попов З.И., Чичеватов Г.Д., Суханова Е.В. <i>Новые двумерные металл-углеродные структуры</i>	138
Потапов Д.О., Евлашин С.А., Орехов Н.Д. <i>Молекулярно-динамическое моделирование восстановления оксида графена под действием сверхбыстрого лазерного нагрева</i>	139
Садыкова Э.З., Гришко Н.Е., Бычкова А.В., Сыксин С.В. <i>Разработка магнитных сорбентов для выделения макромолекул из биологических жидкостей</i>	140

Сафинова А.Я., Беликов Н.Е., Петровская Л.Е., Лукин А.Ю., Демина О.В., Варфоломеев С.Д., Ходонов А.А. <i>Синтез и оптические свойства юлолидинового аналога ретиналя</i>	142
Селезнева Л.Д., Попов А.А., Аншин С.М. <i>Влияние факторов окружающей среды на структуру и свойства смесей полилактида (ПЛА) и полибутиленадипинаттерефталата (ПБАТ)</i>	144
Семенова Е.В., Белова Е.В. <i>О причинах различия биоактивности энантиомеров хиральных лекарств</i>	146
Сокол М.Б., Гуляев И.А., Моллаева М.Р., Кузнецов С.Л., Зенин В.А., Клименко М.А., Яббаров Н.Г., Чиркина М.В., Никольская Е.Д. <i>Совместный анализ доксорубицина и вориноста в полимерных наночастицах с помощью планов Бокса-Бенкена</i>	148
Соколова В.В., Трофимова Н.Н., Петронюк Ю.С., Гурьева Т.С., Медникова Е.И. <i>Роль спектрального состава повседневного освещения в провоцировании близорукости при биомоделировании на птенцах японского перепела</i>	150
Степанюк Р.А., Маджидов Т.И., Коротаев В.Ю. <i>Молекулярное моделирование взаимодействия производных спирохромено[3,4-с]-пирролидинов с белком MDM2</i>	153
Суханова Е.В., Сагатов Н., Орешонков А.С., Гаврюшкин П.Н., Попов З.И. <i>Новые 2D Янус структуры для производства водорода в фотокаталитической реакции расщепления воды</i>	153
Торопцева А.В., Хачатрян Д.С., Горобец М.Г., Пронкин П.Г., Градова М.А., Садыкова Э.З., Абдуллина М.И., Лопухова М.Л., Колотаев А.В., Бычкова А.В. <i>Модификация фолиевой кислотой наносистем на основе магнитных наночастиц и человеческого сывороточного альбумина</i>	155
Чиркина М.В., Сокол М.Б., Яббаров Н.Г., Моллаева М.Р., Подругина Т.А., Павлова А.С., Темнов В.В., Никольская Е.Д. <i>Увеличение эффективности инкапсуляции производных Pt в полимерные наночастицы путем их структурной модификации</i>	158
Cherkasov I.V., Maltsev A.P. <i>Comparison of data mining approaches and USPEX for predicting phase equilibria</i>	161
Чернышов С.В., Люсова Л.Р. <i>Влияние каучука СКД-777 на когезионную прочность синтетического полиизопрена</i>	163
Чичеватов Г.Д., Суханова Е.В., Попов З.И. <i>Теоретическое исследование двумерных халькогенидов платины</i>	165
Шеленков П.Г., Попов А.А., Пантюхов П.В. <i>Структура и свойства тройных композиций полиэтилен низкой плотности (ПЭНП)/ сополимер этилена с винилацетатом (СЭВА)/природный полимерный наполнитель</i>	167
Шуршина А.С., Афанасьева М.А., Кулиш Е.И. <i>Сорбционные свойства полимерных пленок, модифицированных двухосновными кислотами</i>	171
Щелконогов В.А., Шипелова А.В., Иншакова А.М., Дарнотук Е.С., Баранова О.А., Чеканов А.В., Казаринов К.Д., Шастина Н.С., Соловьева Э.Ю., Федин А.И. <i>Антиоксидантные свойства наночастиц с липоевой кислотой и её эфирами</i>	172
Юрина Л.В., Васильева А.Д., Евтушенко Е.Г., Гаврилина Е.С., Обыденный С.И., Индейкина М.И., Чабин И.А., Розенфельд М.А. <i>Исследование влияния окисления на структуру фибринового сгустка</i>	174
Яббаров Н.Г., Сокол М.Б., Моллаева М.Р., Чиркина М.В., Никольская Е.Д. <i>Разработка мультинанправленных систем доставки лекарственных препаратов в опухолевые клетки</i>	177
Якубова Л.Ю., Подзорова М.В., Дмитриенко А.О., Тертышная Ю.В. <i>Анализ структуры полиэфиров методом рентгеновской дифракции</i>	180

ТРУДЫ
XXII Ежегодной молодежной конференции с международным участием
ИБХФ РАН-ВУЗЫ "БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА",

Влияние окислительной модификации на устойчивость покрытия из сывороточного альбумина на поверхности наночастиц магнетита



**М. И. Абдуллина¹, М. В. Мотякин^{1,2}, Е.Е. Важенкова¹,
В. В. Каспаров¹ А. В. Бычкова¹**

¹*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия*

119334, Россия, г. Москва, ул. Косыгина, д.4, ibcp@sky.chph.ras.ru

²*Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук, Москва, Россия*

119991, Россия, г. Москва, ул. Косыгина, д.4, icp@chph.ras.ru

В последние годы было предложено множество медицинских областей применения магнитных наночастиц оксида железа (МНЧ). Например, адресная доставка лекарств и магнитофекция, гипертермия и термоабляция, магнитная сепарация, магнитно-резонансная томография, ферроптоз [1]. К тому же, при оценке цитотоксичности наночастицы оксидов железа проявляли нулевую или слабую цитотоксичность [2].

При введении в кровоток живого организма наноразмерные системы на основе МНЧ могут взаимодействовать с компонентами крови, подвергаться атаке иммунной системы и т. д. Под воздействием этих факторов возможно нарушение свойств наночастиц — изменение заряда в случае заряженных частиц, увеличение размера вследствие образования агрегатов или адсорбции белков крови, а также выведение МНЧ из организма до выполнения их функции. Нежелательная адсорбция белков на поверхность модифицированных наночастиц может вытеснять или нарушать искусственно созданное покрытие либо нарушать его функциональность. Другими факторами, влияющими на прочность покрытия, являются изменение температуры или pH, разбавление.

Поверхность наночастиц модифицируют — то есть, создают различные покрытия — для того, чтобы а) избежать их опсонизации (то есть, адсорбции антител и факторов комплемента на поверхность, стимулирующих и облегчающих фагоцитоз частиц), а также увеличить биосовместимость и время циркуляции в крови; б) избежать нежелательных воздействий магнитных наночастиц на организм; в) придать иные свойства — флуоресценция, термочувствительность; г) увеличить стабильность в физиологических условиях; д) обеспечить контролируемое высвобождение лекарственных препаратов; е) варьировать некоторые физико-химические свойства — размер, форма, заряд; ё) облегчить дальнейшую модификацию функциональными компонентами.

Наиболее распространённым белком в плазме крови является человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) (около 60% от количества белка в плазме). Нормальная концентрация ЧСА в крови человека достигает 40 г/л (0,6 мМ), в лимфе до 15-36 г/л, в межклеточной жидкости — 3 г/л. Человеческий сывороточный альбумин — глобулярный белок, который синтезируется в печени, содержит 585 аминокислот, обладает массой 66,5 кДа и имеет отрицательный заряд. В центре молекулы расположены гидрофобные аминокислоты, которые позволяют связываться со многими лигандами, тогда как наружная часть ее содержит гидрофильные аминокислоты, что обеспечивает полифункциональность действия ЧСА. Основные функции альбумина — транспорт нерастворимых или плохо растворимых в воде веществ, например, жирные кислоты, билирубин, гормоны, полипептиды, лекарственные препараты (аспирин, ибупрофен, диазепам, варфарин и др.), а также поддержание осмотического давления плазмы. Другие функции альбумина — перехват активных форм кислорода (более 70% активных форм кислорода сыворотки, что обеспечивает защиту других белков крови от окисления).

Иммуноглобулин G (IgG) представляет собой Y-образную молекулу, состоящую из четырех пептидных цепей, и характеризуется молекулярной массой 150 кДа. IgG содержит две идентичные тяжелые цепи класса γ (50 кДа) и две идентичные легкие цепи (25 кДа). Тяжелые цепи соединены между собой и с легкими цепями с помощью дисульфидных связей. Концентрация в крови 8-12 мг/мл. Обладая большим сродством к поверхности МНЧ, иммуноглобулин G может

адсорбироваться на частицах при их попадании в кровоток, а также способен вытеснять с поверхности МНЧ неустойчивое покрытие из ЧСА [3].

В настоящей работе проведена оценка стабильности покрытий из ЧСА (неокисленного либо окисленного УФ-светом либо окисленного в присутствии 3% пероксида водорода) на поверхности магнитных наночастиц. Связывание ЧСА с МНЧ обеспечивали путём адсорбции неокисленного и предварительно окисленного белка на поверхности МНЧ. Предварительное окисление ЧСА проводили путем облучения раствора ЧСА светом УФ-лампы, имеющим максимум мощности излучения на 280 нм, облучали альбумин в течение различного времени. Изменение белковой молекулы под действием ультрафиолетового излучения происходит за счёт наличия в ней хромофоров – группы атомов, способных к избирательному поглощению в УФ-спектре. Для белков хромофорами являются остатки ароматических аминокислот. В наибольшей степени среди всех аминокислот это триптофан, который содержит индольную группу. Также поглощением в УФ-спектре характеризуются тирозин и фенилаланин, однако они оказывают значительно меньшее влияние. При поглощении кванта света может происходить фотоионизация аминокислотных остатков, вследствие чего возможно образование радикалов, которые являются основной причиной повреждения белковой молекулы. Человеческий сывороточный альбумин содержит 1 остаток триптофана, 31 остаток фенилаланина и 18 остатков тирозина. Окислительную модификацию подтверждали спектрофотометрически. Также проводили окисление ЧСА на поверхности МНЧ путём добавления в раствор пероксида водорода.

С использованием способности иммуноглобулина G вытеснять молекулы других белков, в том числе, и ЧСА, с поверхности МНЧ и детекции увеличения относительной толщины покрытия на МНЧ методом ФМР [4] проводили оценку устойчивости созданных альбуминовых покрытий в зависимости от концентрации ЧСА. В работе для описания изменения спектров использовали g-фактор как параметр положения центра спектра в магнитном поле. Величина H_1 локального поля от частиц в агрегатах, ориентированных вдоль силовых линий внешнего поля, пропорциональна магнитному моменту частиц μ и обратно пропорциональна кубу расстояния D между частицами [5]. Сдвиг спектра ЭМР пропорционален H_1 [6]. Согласно условиям резонанса, спектр частиц, в некоторой степени участвующих в формировании линейных агрегатов, расположен в более низких полях относительно спектра отдельных частиц. Следовательно, чем больше расстояние между МНЧ, тем выше поле положения центра спектра H_c и тем меньше g-фактор.

Были анализированы спектры магнитных наночастиц до и после инкубации с иммуноглобулином G. В присутствии белка центр спектра заметно смещён вправо, то есть, в сторону уменьшения g-фактора, что свидетельствует о более изолированных друг от друга частицах в образце. Это означает, что на поверхности МНЧ образовалось белковое покрытие, увеличивающее их размеры. В случае МНЧ без покрытия g-фактор равен 2,23, в случае МНЧ с покрытием из иммуноглобулина G — 2,09. При этом альбуминовое покрытие на поверхности наночастиц на g-фактор влияет незначительно. Для образцов с альбуминовым покрытием g-фактор равен 2,21 (к МНЧ с концентрацией 0,18 мг/мл был добавлен ЧСА с концентрацией 5 мг/мл или 10 мг/мл). Впервые с использованием метода электронного магнитного резонанса проведена оценка устойчивости адсорбционного слоя из неокисленного и окисленного сывороточного альбумина на поверхности магнитных наночастиц, обладающих пероксидазоподобной активностью, в различных условиях.

Было установлено, что окислительная модификация ЧСА способствует образованию более устойчивых покрытий на МНЧ. Корректное сравнение устойчивости покрытий из белков, подвергнутых различным окислительным воздействиям требует дополнительных исследований. Доказано, что при концентрации магнитных наночастиц 0,18 мг/мл устойчивый адсорбционный слой из неокисленного ЧСА формируется при концентрации белка от 5 мг/мл. Из окисленного ЧСА устойчивый адсорбционный слой формируется при концентрации белка 0,75 мг/мл. Также доказано, что устойчивость адсорбционного слоя зависит от температуры: при 25°C формируется более устойчивое покрытие, чем при 4°C.

Пероксидазоподобная активность МНЧ была подтверждена с применением тетраметилбензидина (ТМБ) и орто-фенилендиамина (о-ФДА). При взаимодействии (ТМБ) с пероксидазой хрена в присутствии пероксида водорода и стоп-реагента происходит окисление ТМБ образующимися активными формами кислорода (АФК), что детектируется спектрофотометрически появлением и ростом пика на 450 нм. Схожие процессы происходят при взаимодействии ТМБ с МНЧ в присутствии пероксида водорода и стоп-реагента, доказывают пероксидазоподобную активность магнитных наночастиц. Вследствие пероксидазной активности МНЧ происходило образование АФК, которые модифицировали молекулы ЧСА.

Воздействие магнитных наночастиц в присутствии пероксида водорода также приводит к окислению орто-фенилендиамина. Пероксидазоподобная активность магнитных наночастиц связана с наличием на их поверхности ионов Fe^{2+} . При взаимодействии МНЧ с кислородом воздуха происходит окисление ионов Fe^{2+} до ионов Fe^{3+} , и соответственно, утрата пероксидазоподобной активности. Было показано, что на поверхности магнитных наночастиц, окисленных кислородом воздуха в течение 14 дней, образуется менее устойчивое покрытие из ЧСА по сравнению с аналогичным покрытием на поверхности неокисленных кислородом воздуха МНЧ. Добавление в систему пероксида водорода при инкубации МНЧ с ЧСА позволяет повысить стабильность белкового покрытия на поверхности магнитных наночастиц, которые были окислены кислородом воздуха.

Работы по подбору условий получения устойчивых белковых покрытий выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 22-75-10150, <https://rscf.ru/project/22-75-10150/>, остальные работы – в рамках государственного задания №01201253311.

Авторы благодарят Константина Олеговича Муранова и Николая Борисовича Полянского за помощь в окислении ЧСА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chubarov, A.S. Serum Albumin for Magnetic Nanoparticles Coating. *Magnetochemistry* 2022, 8, 13.
2. Karlsson H.L., Cronholm P., Gustafsson J. M. L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. // *Chem Res Toxicol.* 2008. №9(21). С. 1726–1732
3. A. V. Bychkova, M. V. Lopukhova, L. A. Wasserman, Y. N. Degtyarev, A. L. Kovarski, S. Chakraborti, V. A. Mitkevich. The influence of pH and ionic strength on the interactions between human serum albumin and magnetic iron oxide nanoparticles // *International Journal of Biological Macromolecules.* 2022. №194. С. 654-665.
4. Bychkova A. V., Lopukhova M. V., Wasserman L. A., Degtyarev Y. N., Kovarski A. L., Chakraborti S., Mitkevich V. A. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2022, 194, 654-665.
5. S. V. Dolotov and V. I. Roldughin. Simulation of ESR spectra of metal nanoparticle aggregates // *Colloid J.* №69(1). С. 9–12.
6. A. Abragam and M. Goldman, *Nuclear Magnetism: Order and Disorder.* Oxford: Clarendon, 1982.

Влияние окружения хромофора белка EGFP на сечение двухфотонного поглощения



Аслоповский В.Р.¹, Боченкова А.В.¹

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, Россия

Флуоресцентные белки используются в биологических исследованиях в качестве маркеров для изучения живых клеток и тканей. Модифицированный зеленый флуоресцентный белок EGFP с улучшенными спектральными характеристиками является одним из наиболее широко используемых для этих целей. В настоящее время активно развивается и применяется двухфотонная флуоресцентная микроскопия, которая имеет ряд преимуществ перед традиционной конфокальной. Поскольку метод должен быть чувствительным, яркость флуоресценции должна быть как можно выше. Она зависит, в частности, от сечения двухфотонного поглощения и квадрата интенсивности падающего излучения, поэтому поиск флуоресцентных белков с большим сечением двухфотонного поглощения является важной задачей. Целью работы является анализ влияния окружения хромофора на сечение двухфотонного поглощения в белке EGFP.

В данной работе на основе полной атомистической модели белка EGFP из работы [1] построена модель мутации EGFP T203I, оптимизирована ее геометрия, рассчитано сечение двухфотонного поглощения и проведен анализ факторов, влияющих на него. Оптимизация геометрии проводилась методом QM/MM в варианте PBE0/(aug)-cc-pVDZ//CHARMM; квантовая часть содержала 154 или 159 атомов, описываемых 1550 или 1585 базисными функциями, для EGFP и EGFP T203I соответственно. Квантовая часть включает в себя хромофор и его ближайшее окружение. Энергии вертикальных электронных переходов рассчитаны методом ХМCQDPT2 в базисе (aug)-cc-pVDZ с векторами нулевого приближения, полученными методом CASSCF в

активном пространстве, состоящем из 14 электронов на 13 π -орбиталях хромофора, с усреднением электронной плотности по семи состояниям. Расчет момента перехода и разности средних дипольных моментов проведен в нулевом порядке этой теории. Электростатическое поле остального белкового окружения учитывалось методом EFP. Для сравнения такой же расчет (в активном пространстве, состоящем из 16 электронов на 14 π -орбиталях хромофора и в aug-сс-pVTZ базисе) проведен для анионного хромофора EGFP в газовой фазе (HBDI).

Сечение двухфотонного поглощения (σ_{TPA}) является макроскопической характеристикой вещества. Оно может быть рассчитано из микроскопической вероятности двухфотонного перехода (δ_{TPA}) по формуле (1) (см., например, [2])

$$\sigma_{TPA}(\omega) = \frac{4\pi^3 a_0^5 \alpha}{c} \omega^2 \langle \delta_{TPA} \rangle g(E_f - E_i; 2\omega; \Gamma) \quad (1)$$

где a_0 – борковский радиус, α – постоянная тонкой структуры, c – скорость света в вакууме, ω – энергия фотона, g – форма линии, связанная с эффектами уширения (например, лоренцева, гауссова и т. д.), Γ с параметром затухания, который обычно принимается равным 0,1 эВ в большинстве теоретических расчетов [2]. Микроскопическая вероятность двухфотонного перехода выражается через компоненты тензора двухфотонного поглощения, которые могут быть рассчитаны суммированием по состояниям. Точная формула при этом выглядит следующим образом:

$$S_{fi}^{\alpha\beta} = \sum_n \frac{\mu_{fn}^\alpha \mu_{ni}^\beta + \mu_{fn}^\beta \mu_{ni}^\alpha}{E_n - E_i - \hbar\omega} \quad (2)$$

где $\mu_{pq}^\alpha = \langle \psi_p | \mu^\alpha | \psi_q \rangle$ – декартовы компоненты дипольного момента перехода. Индексы i , n и f относятся к начальному, промежуточным и конечному состояниям соответственно, и $\alpha, \beta = x, y, z$. В рамках N-уровневой модели (NLM) суммирование проводится по конечному числу состояний:

$$S_{if}^{\alpha\beta} = \frac{\mu_{if}^\alpha \mu_{ii}^\beta + \mu_{if}^\beta \mu_{ii}^\alpha}{-\hbar\omega} + \frac{\mu_{ff}^\alpha \mu_{fi}^\beta + \mu_{ff}^\beta \mu_{fi}^\alpha}{E_f - E_i - \hbar\omega} + \sum_{n \neq i, f} \frac{\mu_{fn}^\alpha \mu_{ni}^\beta + \mu_{fn}^\beta \mu_{ni}^\alpha}{E_n - E_i - \hbar\omega} \quad (3)$$

Принимая $E_f - E_i = 2\omega$ и опуская сумму с $n \neq i, f$, получаем выражение для компонент тензора двухфотонного поглощения в рамках двухуровневой модели (TLM):

$$S_{if}^{\alpha\beta} \approx \frac{(\mu_{ff}^\alpha - \mu_{ii}^\alpha) \mu_{fi}^\beta + (\mu_{ff}^\beta - \mu_{ii}^\beta) \mu_{fi}^\alpha}{\hbar\omega} = \frac{\Delta\mu_{fi}^\alpha \cdot \mu_{fi}^\beta + \Delta\mu_{fi}^\beta \cdot \mu_{fi}^\alpha}{\hbar\omega} \quad (4)$$

Микроскопическая вероятность в рамках двухуровневой модели зависит от разности энергий электронных уровней S_0 и S_1 , дипольного момента перехода $S_0 \rightarrow S_1$ (μ) и разности средних дипольных моментов состояний S_0 и S_1 ($\Delta\mu$) (см. формулу (4)). В рамках данной модели показано, что основной вклад в сечение двухфотонного поглощения вносит разность средних дипольных моментов при переходе $S_0 \rightarrow S_1$. Показано также, что переход к N-уровневой модели не дает существенного изменения в сечениях двухфотонного поглощения, что подтверждает применимость двухуровневой модели для переходов, в которых $\mu \neq 0$ и $\Delta\mu \neq 0$ (см. табл. 1). Полученные значения сечений двухфотонного поглощения согласуются с экспериментальными данными.

Табл. 1. Рассчитанные в рамках N-уровневой модели ($N = 2, 3, \dots, 7$) сечения двухфотонного поглощения трех исследуемых систем для перехода $S_0 \rightarrow S_1$ и сравнение их с экспериментальными данными [3].

	HBDI	EGFP T203I	EGFP
μ_{10}, D	10.5	10.6	10.5
$\Delta\mu_{10}, D$	2.9	3.3	4.4
N		$\sigma_{NLM}, GM (\delta_{NLM}, a.u.)$	
2	19 (7448)	25 (11300)	45 (19262)
3	19 (7439)	25 (11358)	45 (19333)
4	18 (7340)	26 (11441)	45 (19474)
5	18 (7270)	25 (11132)	45 (19213)
6	18 (7312)	25 (11134)	45 (19209)
7	19 (7396)	25 (11109)	44 (19184)
Experiment	—	19	42

В случае EGFP и EGFP T203I изменение вектора разности средних дипольных моментов направлено от имидазолонового кольца хромофора к фенольному, что соответствует переносу электронной плотности с фенольного кольца на имидазолоновое при переходе $S_0 \rightarrow S_1$. (см. рис. 1).

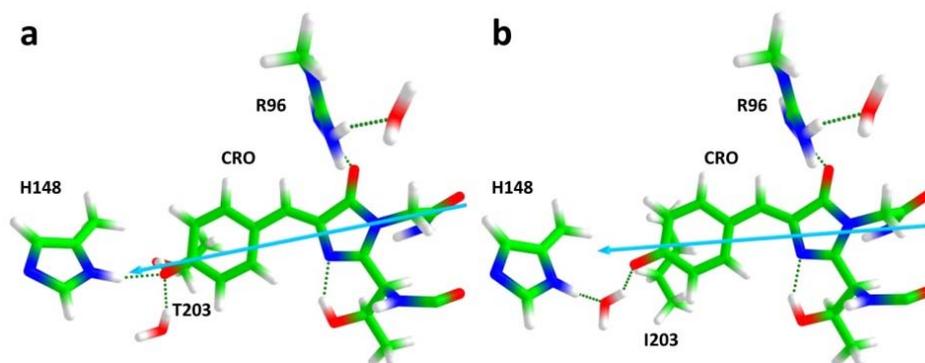


Рис. 1. Направление вектора $\Delta\mu$ в белках EGFP и EGFP T203I.

Замена полярного треонина на неполярный изолейцин уменьшает количество водородных связей кислорода хромофора. Также в случае EGFP T203I поляризующий электронную плотность хромофора гистидин H148 находится дальше от хромофора (см. рис. 2), что уменьшает длину вектора $\Delta\mu$ и, следовательно, уменьшает сечение двухфотонного поглощения.

Таким образом, увеличение сечения двухфотонного поглощения EGFP может быть достигнуто путем модификации белкового окружения хромофора при введении точечных мутаций, влияющих на электростатическое поле белка вблизи хромофора. Увеличению сечения отвечает усиление напряженности электрического поля вдоль направления от фенольного кольца хромофора к имидазолоновому (противоположному направлению вектора $\Delta\mu$, см. рис. 1), которое может быть достигнуто, например, изменением заряда окружения фенольного кольца хромофора на более положительный, а имидазолонового – на более отрицательный, что подтверждается экспериментальными данными [4].

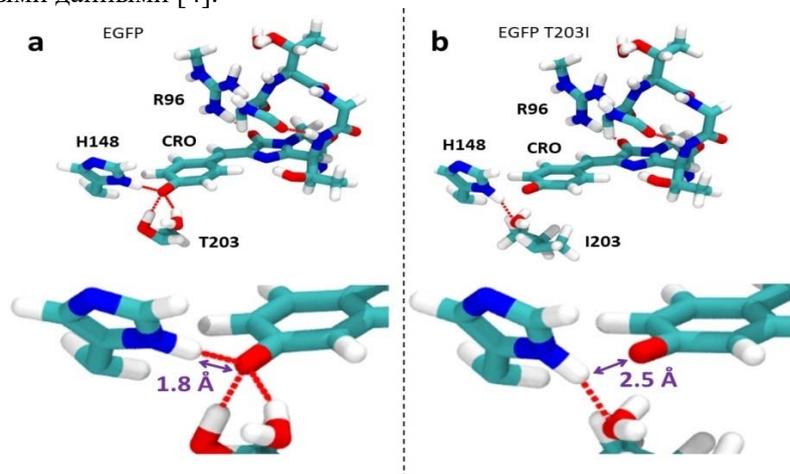


Рис. 2. Равновесные геометрии хромофора и его ближайшего окружения EGFP и EGFP T203I.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №21-73-00145 с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова, а также вычислительного кластера лаборатории квантовой фотодинамики, закупленного по программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

Список литературы:

1. Bochenkova A. V., Andersen L.H. Ultrafast dual photoresponse of isolated biological chromophores: link to the photoinduced mode-specific non-adiabatic dynamics in proteins // *Faraday Discuss.* 2013. Vol. 163. P. 297.
2. Macak P., Luo Y., Ågren H. Simulations of vibronic profiles in two-photon absorption // *Chem. Phys. Lett.* 2000. Vol. 330, № 3–4. P. 447–456.
3. Stoltzfus C.R., Barnett L.M., Drobizhev M., Wicks G., Mikhaylov A., Hughes T.E., Rebane A. Two-photon directed evolution of green fluorescent proteins // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 5, № 1. P. 11968.
4. Molina R.S., Tran T.M., Campbell R.E., Lambert G.G., Salih A., Shaner N.C., Hughes T.E.,

Анализ вторичных структур белков с различным эволюционным родством



Багрова О.Е., Лапшина К.К., Белова Е.В.

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
физический факультет, г. Москва*

Белки – одна из самых разнообразных групп биомолекул. Многообразие их аминокислотного состава и структурных организаций позволяет выполнять им самые разные функции: от ферментативной до защитной. Функция полипептида определяется его структурой [1]. Появление таких сложных систем в живых организмах обусловлено их эволюционным развитием. Считается, что структура полипептида в некоторых случаях более консервативна, нежели его аминокислотная последовательность [2]. Первичная структура белка может накапливать мутации, которые не изменяют его пространственную структуру или не затрагивают его активный центр. Настоящая работа посвящена исследованию структурных особенностей белков эволюционно связанных групп.

В данной работе выполнен анализ распределений вторичных структур (α -спиралей, β -листов, 3_{10} -спиралей, нерегулярных структур) по полипептидным цепям различных групп белков. Выбор групп белков осуществлялся с помощью баз данных CATH [3] и Pfam [4]. В базе данных CATH структуры белков из PDB рассматриваются на разных уровнях схожести их структур и аминокислотных последовательностей (класс, архитектура, топология, гомологичные группы). Для анализа были выбраны следующие гомологичные группы:

- глобины – группа, белки которой считаются произошедшими от общего предка;
- фикоцианины – группа той же топологии, что и предыдущая (глобин-подобные). Существует упоминание о возможном эволюционном родстве глобинов и фикоцианинов [5];
- оставшиеся группы гомологов с глобин-подобной топологией рассмотрены нами как третья группа (колицины, дифтерийный токсин, РНК-зависимая-РНК-полимераза бактериофага ϕ и некоторые другие). Литературные данные об их возможной эволюционной связи с глобинами и фикоцианинами не найдены.

Для изучения структурных особенностей отобранных групп была подготовлена выборка из 180 белков (131 глобин, 37 фикоцианинов, 12 белков третьей группы). Суммарно было проанализировано 482 полипептидные цепи (370 глобинов, 95 фикоцианинов, 17 белков третьей группы). Данные о расположении вторичных структур получены из базы данных PDB [6]. Для анализа выбранных структур использовался ранее разработанный алгоритм, реализованный с помощью программ на языке C++ и Python [7]. Полученные диаграммы распределения вторичных структур по полипептидным цепям позволили выявить как общие тенденции, так и отдельные особенности выбранных групп белков.

На распределении (рис.1а), включающем все цепи глобинов, отчетливо видны 6 красных пиков, соответствующих наибольшей встречаемости α -спиралей на данном участке цепи, а также соответствующий 3_{10} -спиралям пик. В литературе [5] встречается упоминание типичной глобиновой складки, состоящей из 8 спиралей, однако это справедливо для миоглобинов и гемоглобинов, что составляет лишь часть нашей подборки.

Дополнительно были построены диаграммы распределения вторичных структур глобинов различных групп организмов (рис.2): Archaeplastida (9 белков), Opisthokonta (90 белков) и Bacteria (23 белка). Если распределения первых двух подгрупп глобинов близки и имеют вид, похожий на общее распределение, то распределение вторичных структур глобинов бактерий значительно отличается. Такие существенные различия структуры могут быть связаны с различиями в функциях глобинов бактерий и глобинов эукариот. Предполагается, что первоначальные роли бактериальных глобинов были ферментативными, также они участвовали в защите от токсичности оксида азота и, возможно, использовались в качестве датчиков кислорода, регулирующих

движение в сторону высоких концентраций O_2 [8]. Стоит отметить, что β -листы во вторичных структурах присутствуют только у белков бактерий.

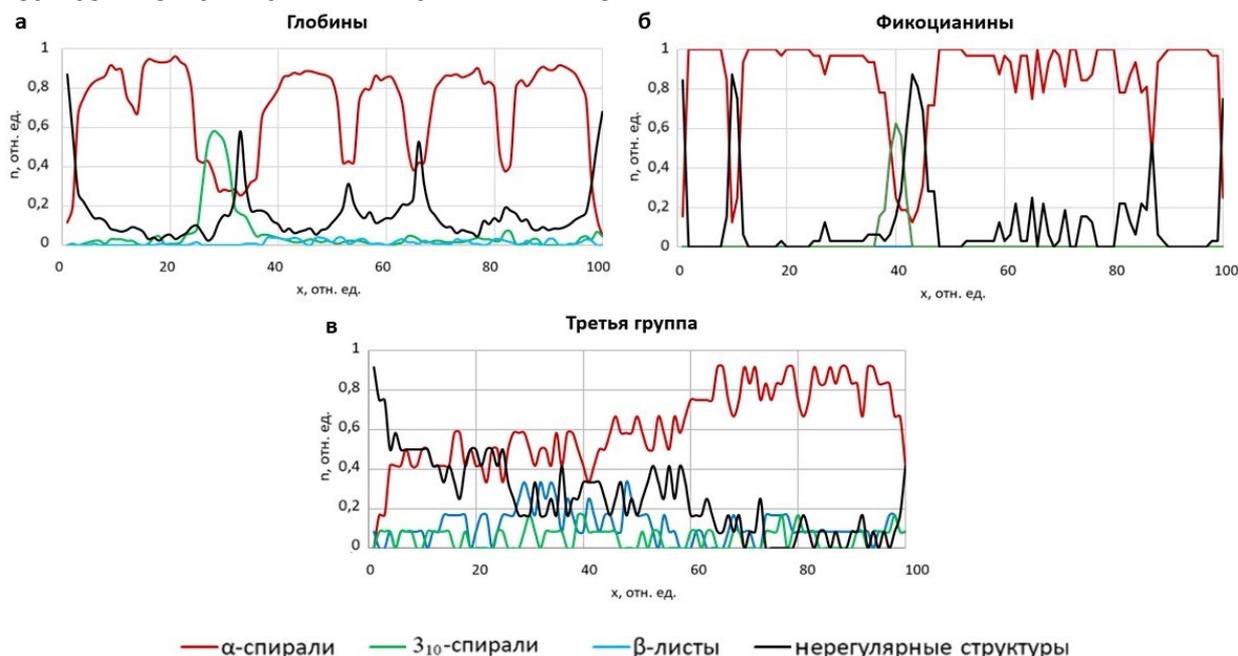


Рис.1. Распределение вторичных структур глобинов (а), фикоцианинов (б), третьей группы (в). Вдоль оси абсцисс x отложена нормированная на 100 длина полипептидной цепи в аминокислотных остатках. Вдоль оси ординат n – число аминокислотных остатков, принадлежащих конкретной вторичной структуре, отнесенное к общему числу цепей подборки. Координата 0 – N-конец молекулы, 100 – С-конец.

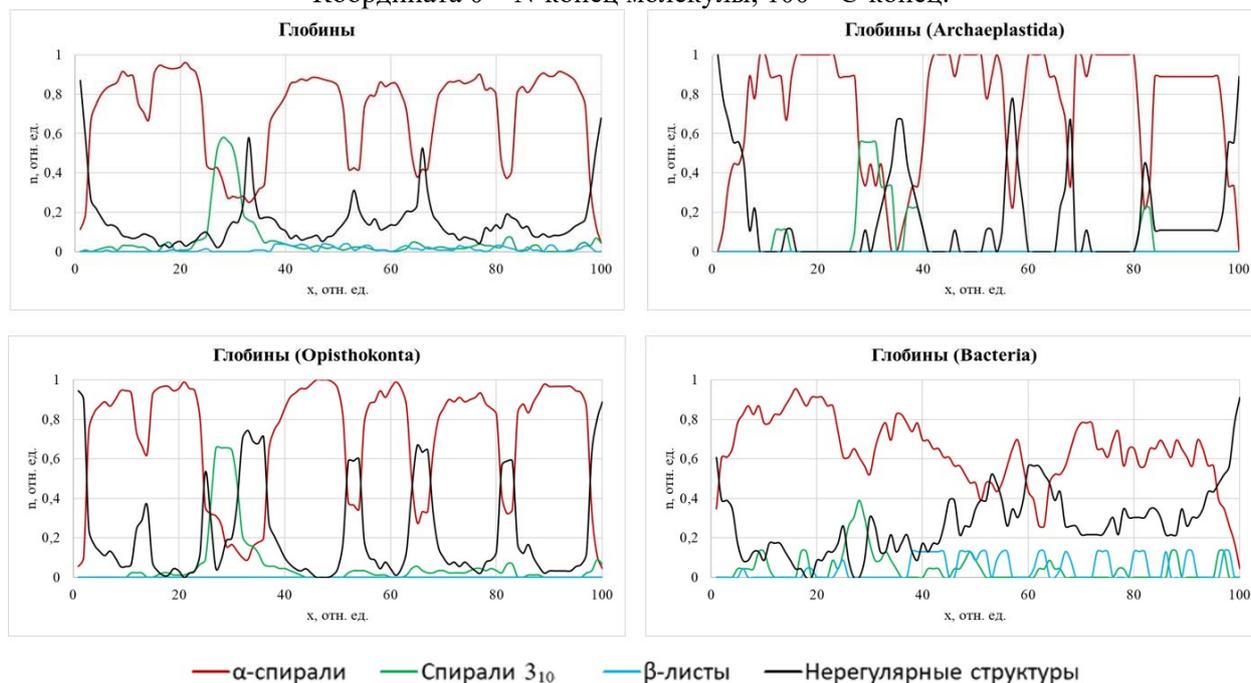


Рис.2. Распределение вторичных структур подгрупп глобинов по организмам. Вдоль оси абсцисс x отложена нормированная на 100 длина полипептидной цепи в аминокислотных остатках. Вдоль оси ординат n – число аминокислотных остатков, принадлежащих конкретной вторичной структуре, отнесенное к общему числу цепей подборки. Координата 0 – N-конец молекулы, 100 – С-конец.

Для фикоцианинов (рис. 1б) была получена аналогичная диаграмма. На графике заметны несколько пиков по нерегулярным структурам и один заметный пик по 3_{10} -спиралям. Что касается α -спиралей, то здесь выделить отдельные участки преобладания этих структур не удаётся. β -листы в данных белках не были обнаружены.

Диаграмма распределения вторичных структур белков-представителей третьей группы значительно отличается от первых двух (рис.1в). Для них не характерны особенности, присущие

глобинам и фикоцианинам. Выделить отдельные закономерности сложно, можно лишь проследить общие тенденции: убывание числа нерегулярных структур и возрастание числа α -спиралей к С-концу молекулы.

Среди общих закономерностей, наблюдаемых в распределениях вторичных структур, глобинов и фикоцианинов можно отметить преобладание нерегулярных структур по концам молекул, а также пики по 3_{10} -спиральям и нерегулярным структурам на координатах 30-40 отн. ед. С-концы молекул данных классов различаются: у глобинов заметны четкие области α -спиралей, а у фикоцианинов различимо преобладание α -спиралей в данной части молекулы, но выделить конкретные области отдельных структур не представляется возможным. Таким образом, в этой области у фикоцианинов не наблюдается общая для них структура, в то время как структура большинства представителей глобинов схожа между собой. Что касается третьей группы белков, то здесь описанные закономерности не наблюдаются. Мы видим лишь общую тенденцию. Во всех приведённых группах α -спирали преобладают в белках.

В настоящее время работа над данной темой продолжается. В дальнейшем планируется провести детальный анализ аминокислотной последовательности белков подборки.

Литература:

1. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка: курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами. М.: кдУ. 2012.
2. Muñoz, V., Blanco, F. J., Serrano, L. The distribution of α -helix propensity along the polypeptide chain is not conserved in proteins from the same family // *Protein Science*. 1995, №4(8), p. 1577–1586.
3. <https://www.cathdb.info/> (CATH: Protein Structure Classification Database) (дата обращения: 14.12.2021).
4. <http://pfam.xfam.org> (PFam: The protein families database in 2021) (дата обращения: 14.12.2021).
5. Pastore, A., Lesk, A. M. Comparison of the structures of globins and phycocyanins: Evidence for evolutionary relationship // *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 1990, №8(2), p. 133–155.
6. <http://www.rcsb.org> (The Protein Data Bank) (дата обращения: 08.06.2022).
7. Малышко Е.В., Багрова О.Е., Твердислов В.А. Связь хиральных иерархических структур белков с их функциями // *Биофизика*. 2020, №65(3), с. 439–444.
8. Wajcman, H., Kiger, L. L'hémoglobine, des micro-organismes à l'homme: un motif structural unique, des fonctions multiples // *Comptes Rendus Biologies*. 2002, №325(12), p. 1159-1174.

Подходы к созданию материалов на основе смесей полилактида с хитином и хитозаном



Бакирова Э.Р., Чернова В.В., Кулиш Е.И.
Башкирский государственный университет, г.Уфа

Биоразлагаемые пластики в последнее время вызывают большой интерес из-за экологических проблем, связанных с накоплением перерабатываемых полимерных отходов. В качестве замены традиционных пластмасс весьма перспективным представляется использование полилактида (ПЛА), представляющего собой полимер молочной кислоты. Этот полимер, кроме биоразлагаемости, обладает превосходной механической прочностью, прозрачностью и биосовместимостью. Однако, скорость биоразложения у ПЛА невысока. Добавление к ПЛА других биоразлагаемых полимеров, например, полисахаридов, таких как хитин (ХТ) и хитозан (ХТЗ) может стать выходом из сложившейся ситуации. Варьируя количество вводимого в композицию наполнителя, можно целенаправленно изменять не только скорость биодеструкции материала, но и регулировать его физико-механические свойства.

К сожалению, и ХТ, и ХТЗ не способны перерабатываться через расплав, а их введение в композицию может в существенной мере затруднить переработку ПЛА. В связи с этим, целью данной работы стало изучение возможности получения композитов на основе смесей ПЛА с ХТ и ХТЗ путем переработки расплава, а также влияние введенного наполнителя на некоторые характеристики композиционного материала.

В работе использовали два образца ПЛА: марки bio-101 (Biopoly, Shanghai Huiang Industrial Co.) – ПЛА-1 и марки L175 (Product Data Sheet Luminy) – ПЛА-2, два образца ХТЗ: ХТЗ-1 с молекулярной массой 334000 и ХТЗ-2 с молекулярной массой 116000 производства ЗАО Биопрогресс (Щелково, Россия) и один образец ХТ.

Процесс получения композитов осуществляли на лабораторном пластографе Plastograph ЕС (Vrabender, Германия) при нагрузке 200 Н. Необходимое время нахождения композитов в камере пластографа оценивали путем наблюдения за кривыми 160 °С (для ПЛА-1) и 190°С (для ПЛА-2). Скорость вращения роторов составляла 10 об/мин. Образцы ХТ и ХТЗ-1 были расфракционированы на три фракции: фракция 1 (частицы со средним размером 0,5 мм), фракция 2 (частицы со средним размером от 0,3 мм) и фракция 3 (частицы с размером порядка 0,15 мм). ХТЗ-2 фракционированию не подвергался, он изначально содержал частицы со средним размером 0,05 мм. Прессование осуществляли на автоматическом гидравлическом прессе AutoMH-NE (Carver, США) при 160 (для ПЛА-1) и 190°С (для ПЛА-2) и выдержке под давлением 1000 кгс в течение 10 мин.

В ходе выполнения исследования было показано, что композиты на основе ПЛА, наполненные до пятидесяти массовых частей полисахаридами ХТ и ХТЗ, могут быть получены путем переработки расплава. При содержании полисахаридов более пятидесяти массовых частей происходит резкое падение значений показателя текучести расплава, связанное с существенным ухудшением текучести композиции.

Также было установлено, что введение полисахаридов сказывается на физико-механических свойствах ПЛА, а именно, приводит к увеличению модуля упругости и уменьшению значений разрывного напряжения и разрывного удлинения. При этом, чем размер частиц наполнителя, тем больше значение модуля упругости, разрывного напряжения и разрывного удлинения.

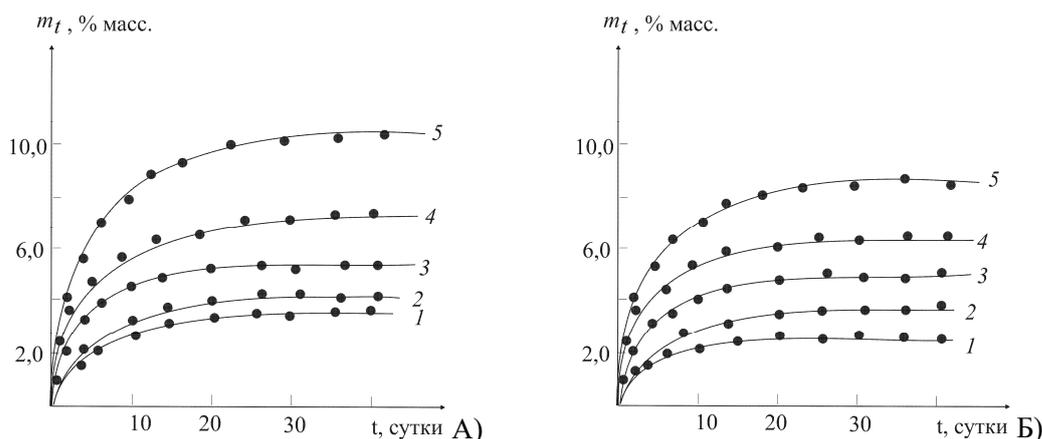
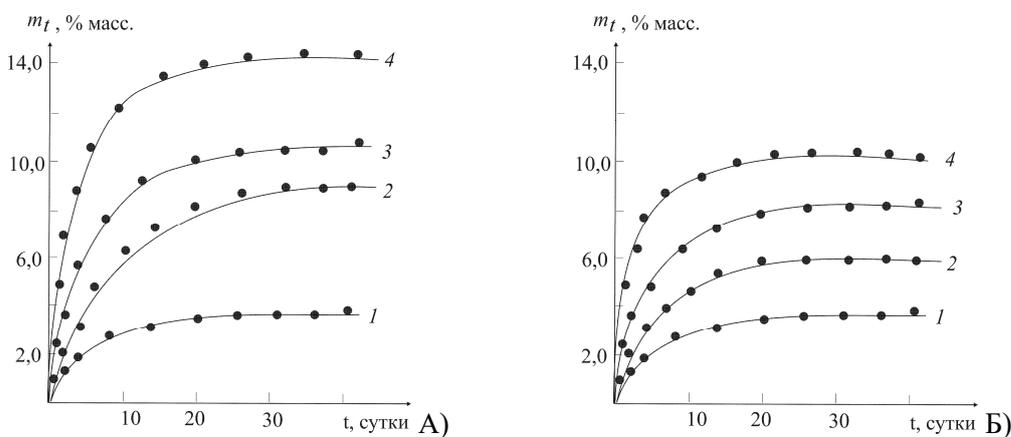


Рис. 1 Сорбция паров воды композитами на основе ПЛА-1 (рисунок а) и ПЛА-2 (рисунок б)



, содержащих 0 (1), 5 (2), 10 (3), 20 (4) и 50 (5) м.ч. ХТЗ-2.

Рис.2. Сорбция паров композитами на основе ПЛА-2 (1), содержащей 20 м.ч. ХТЗ-1 (рисунок а) и ХТ (рисунок б) (2-4) фракции 1 (2), фракции 2(3) и фракции 3 (4).

Наличие в композиции наполнителя и его дисперсность сказывается на способности композитов к водопоглощению, а стало быть, потенциально, и к биоразложению. Чем больше наполнителя присутствует в композиции (рис.1) и чем меньше его размер (рис.2), тем больше

степень сорбции паров воды и выше скорость процесса. Наибольшей степенью и скоростью сорбции характеризуются образцы ПЛА, наполненные ХТЗ-2, наименьшей - наполненные крупной фракцией ХТ, что коррелирует со степенью и скоростью сорбции самих наполнителей (рис.3.). В целом, можно отметить, что наличие наполнителя в полилактидной матрицы увеличивает ее способность к водопоглощению в 4-5 раз.

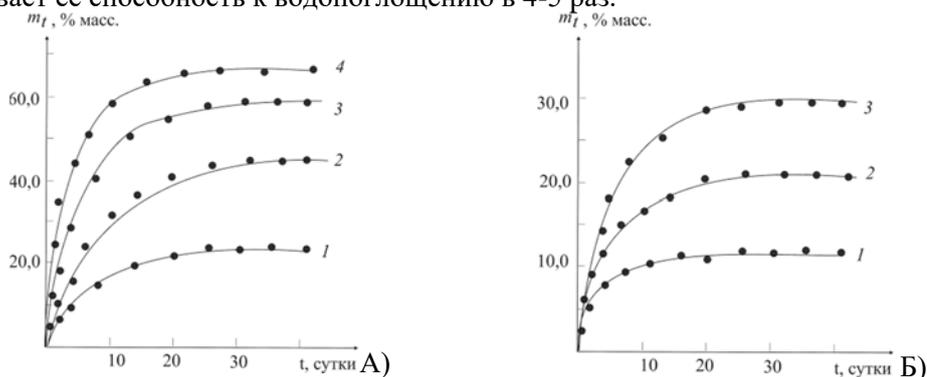


Рис. 3. Сорбция паров воды образцами ХТЗ (рисунок а) и ХТ (рисунок б) фракции 1(1), 2 (2), 3 (3) и ХТЗ-2 (4).

Таким образом, проведенные исследования показали, что композиты на основе ПЛА, наполненные до 50 м.ч. полисахаридами хитином и хитозаном, могут быть получены путем переработки расплава. Полученные материалы обладают удовлетворительными физико-механическими, сорбционными и реологическими характеристиками.

Структурные и термодинамические аспекты целенаправленного регулирования функциональных свойств наноконтейнеров на основе изолята сывороточных белков молока и хитозана для доставки нутрицевтиков



Введение

Развитие научных исследований, направленных на профилактику наиболее распространенных неинфекционных заболеваний, является одной из приоритетных задач в области создания полноценных продуктов питания для населения [1]. При этом, одним из ключевых решений этой задачи остается развитие инновационных технологий для получения новых видов специализированной, функциональной и обогащенной пищевой продукции, и в том числе, физиологически-функциональных пищевых ингредиентов, обеспечивающих доставку дефицитных незаменимых биологически активных веществ в организм человека. Такими биологически активными веществами (БАВ) являются, например, полиненасыщенные жирные кислоты (в частности, длинноцепочечные омега-3 ПНЖК (докозагексаеновая (ДГК) и эйкозапентаеновая (ЭПК)), полифенолы (куркумин и др.) и другие нутрицевтики [2-8]. К биологической активности данных БАВ, оказывающей положительное влияние на организм человека, можно отнести следующее: антиоксидантное, противовоспалительное, антикоагулянтное, антибактериальное и иммуномодулирующее действие, а также ингибирование пролиферации раковых клеток (куркумин, ДГК и ЭПК) [2-5] и синергизм действий куркумина, ДГК и ЭПК в предотвращении диабета 2 типа и в механизмах, проявляющих антираковую активность [6,7].

При этом, критическими факторами, ограничивающими использование данных нутрицевтиков в пищевых продуктах с низким содержанием жира, является их гидрофобная природа, а также высокая чувствительность к неблагоприятным факторам окружающей среды (кислород воздуха, свет, ионы переходных металлов и др.), приводящая к их окислению и деградации при хранении и в процессах производства [3,8,9]. Кроме того, низкая растворимость в

**Балакина Е.С.^{1,2}, Чеботарёв С.А.¹, Комарова А.П.^{1,2}, Хватов А.В.¹,
Зеликина Д.В.¹**

¹ *Институт биохимической физики. им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г. Москва*

² *Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, г. Москва*

водной среде также является фактором, ограничивающим их биоусвоение в биологических жидкостях пищеварительного тракта, на 97-99.5% состоящих из воды [3,8,9]. В этой связи актуальным является разработка водорастворимых биополимерных наноконтейнеров, подходящих для инкапсулирования, защиты и повышения биодоступности выбранных БАВ [10,11]. При этом структура биополимеров для таких наноконтейнеровдолжна быть подобрана с учетом возможности формирования специфических физических взаимодействий и связей (водородных, гидрофобных, электростатических) как между молекулами биополимеров, так и молекул биополимеров с низкомолекулярными БАВ [11-14]. Кроме того, структура биополимерных наноконтейнеров может быть усилена с помощью формирования ковалентных связей между биополимерами, с целью улучшения таких их свойств, как растворимость в водной среде в широком диапазоне рН [11], структурообразующие способности (эмульгирующие, пенообразующие, влагоудерживающие [15-18]), физическая и химическая стабильность [15-18], а также гастро ретенционные свойства [19].

Целью данной работы явилась разработка стимул-чувствительных биополимерных наноконтейнеров на основе изолята сывороточных белков молока (ИСБ) и хитозана (ХИТ) для адресной доставки липосом фосфатидилхолина (ФХ), загруженных длинноцепочечными омега-3 ПНЖК рыбьего жира (РЖ) и куркумином (КУР). Для реализации этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1) Обеспечить растворимость гидрофобных нутрицевтиков в широком диапазоне рН водной среды; 2) Обеспечить защиту нутрицевтиков (ФХ, длинноцепочечных омега-3 ПНЖК из рыбьего жира, куркумина (КУР)) от потери их биологической активности при хранении; 3) Обеспечить целенаправленный и высокий уровень биодоступности нутрицевтиков в пищеварительном тракте; 4) Выявить основные взаимосвязи между структурными/термодинамическими параметрами разработанных биополимерных систем доставки нутрицевтиков и их функциональными свойствами (п.1-3).

Материалы

- **Фосфатидилхолин (ФХ)** (LipoidS 100, чистота 99.5%), поставлен Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany). Жирнокислотный состав (в % к общему количеству липидов): пальмитиновая кислота (ПК; C16:0) - 15; стеариновая кислота (СК; C18:0) - 4; олеиновая кислота (C18:1 омега-9) - 13; линолевая кислота (ЛК; C18:2 омега - 6) - 65; α -линоленовая кислота (АЛК; C18:3 омега - 3) - 5.
- Препарат **рыбьего жира** (РЖ) «Fishoil Omega-3 Concentrate», производство "Рускапс" (Москва, Россия) был выбран в качестве источника омега-3 ПНЖК. Жирнокислотный состав (в % к общему количеству липидов), согласно данным газо-жидкостной хроматографии: пальмитиновая кислота (C16:0) - 12.4 ± 0.6 ; стеариновая кислота (C18:0) - 3.9 ± 0.2 ; олеиновая кислота (C18:1, ω -9) - 8.1 ± 0.4 ; линолевая кислота (C18:2 ω - 6) - 1.10 ± 0.06 ; α -линоленовая кислота (C18:3, ω - 3) - 2.3 ± 0.1 ; арахидоновая кислота (C20:4, ω - 6) - 1.7 ± 0.1 ; докозатетраеновая кислота (C22:4, ω - 6) - 3.4 ± 0.2 ; эйкозапентаеновая кислота (C20:5 ω - 3) - 27.6 ± 1.4 ; докозапентаеновая кислота (C22:6; ω - 3) - 20.0 ± 1.0 .
- **Куркумин (КУР)** (C7727, CAS-No 458-37-7, Sigma-Aldrich, Stockholm, Sweden), чистота $\geq 80\%$, молекулярная масса 368.38 г/моль.
- **Изолят сывороточных белков молока** (ИСБ) (Unflavored BiPro). Характеристика: 91 % сывороточных белков, 0% липидов, 0% углеводов, 0% сахара, Ca_2^+ 0.045%, Mg_2^+ 0.008%, Na^+ 0.77%.
- **Хитозан (ХИТ)** (448869, Sigma-Aldrich Chemie GmbH), степень деацетилирования $>75\%$, с низким молекулярным весом (от 50 до 190 кДа).

Методы

- Прежде всего, была получена **липосомальная форма омега-3 полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК) и куркумина (ФХ – РЖ – КУР)**. Для этого были подобраны такие количества компонентов, при которых достигалось равное весовое соотношение ω -3/ ω -6 ПНЖК в смеси (ФХ – РЖ). Технология получения липосомальной формы БАВ (ФХ – РЖ – КУР) в ацетатном буфере (ацетатный буфер (рН 7.0, I = 0,001 М) включала следующие основные стадии: (i) механическую гомогенизацию (20000 об/мин («Heidolph, Instruments GmbH & Co.», Германия), (ii) пропускание аргона; (iii) ультразвуковую гомогенизацию (VCX-130 («Sonic Materials, Inc.», США) во льду в течение 10 мин (30 секунд – работа, 30 секунд – отдых), (iv) центрифугирование (20°C, 1800 об/мин, 30 мин), (v) экструзия через мембранный фильтр с размером пор 100 нм, 19 раз (Avanti Polar Lipids (США)). Содержание нутрицевтиков от рекомендуемой суточной нормы (согласно

данным Всемирной организации здравоохранения, ВОЗ) в 100 мл водных растворов липосом составило: ФХ – 3% = 156 мг; РЖ: ДГК + ЭПК – 14% = 70 мг; КУР – 15% = 7,5 мг.

• Методы получения растворов комплексов включали подготовку биополимеров согласно методам, описанным ранее [20]. Так, *раствор ИСБ* (~8% вес/объем) готовили с использованием ацетатного буфера (рН 7.0, I = 0.001M). *Раствор хитозана* (~2% вес/объем) готовили с использованием ацетатного буфера (рН 2.0, I = 0.001M) при интенсивном перемешивании, выдерживали до следующего дня затем центрифугировали (1800 g, 20°C, 30 мин) для удаления нерастворившейся части. Концентрации ИСБ и ХИТ после центрифугирования/фильтрации (для ИСБ) определяли рефрактометрическим методом, а также проводили дополнительную проверку путем высушивания растворов до постоянного веса при 110°C («BinderRedLine RF 53», Binder GmbH, Tuttlingen, Германия). *Комплексы* [ИСБ – (ФХ – РЖ – КУР) – ХИТ] формировали в два этапа таким образом, чтобы итоговое массовое отношение ИСБ (2.42% вес/объем) было равно 8, как к хитозану (0.302 % вес/объем), так и общему количеству липидов в липосомах (ФХ-РЖ-КУР) ФХ (0,156% вес/объем) + РЖ (0,146% вес/объем) = 0.302% вес/объем. Содержание куркумина составляло 0.0075 % вес/объем.

Результаты и обсуждение. Согласно данным динамического светорассеяния, полученная липосомальная форма омега-3 ПНЖК и куркумина с равным весовым соотношением ω -3 и ω -6 ПНЖК(ФХ-РЖ-КУР) характеризовалась наноразмерами ($R_h = 71.3 \pm 8.9$ нм), что хорошо коррелировало с данным ТЭМ (Рисунок 1).

Были получены водорастворимые электростатические наноразмерные комплексы изолята сывороточных белков (ИСБ) молока и хитозана (ХИТ), а также охарактеризованы их структурные особенности, с помощью данных лазерного светорассеяния (в статическом, динамическом, и электрофоретическом режимах) [9].

Были разработаны водорастворимые ковалентные комплексы (конъюгаты) изолята сывороточных белков (ИСБ) молока и хитозана (ХИТ), структурные особенности которых были охарактеризованы по методу ИК-Фурье спектроскопии (Рисунок 2).

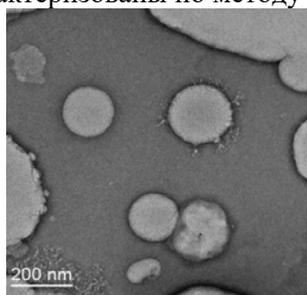


Рисунок 1 – Микрофотографии липосом фосфатидилхолина, нагруженных рыбьим жиром и куркумином. Получены с помощью ТЭМ.

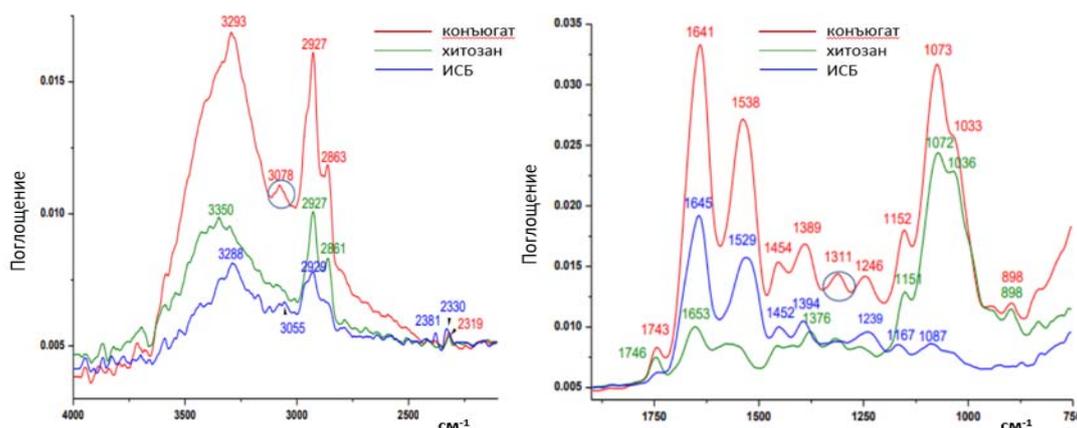


Рисунок 2 - ИК спектры конъюгата на основе хитозана и изолята сывороточных белков молока (весовое соотношение ИСБ : хитозан = 1 : 1, 72 часа, $t = 60^\circ\text{C}$, 75% влажность).

Так, на формирование ковалентного конъюгата за счёт образования новых амидных связей [C-N] между аминогруппами белка и концевой альдегидной группой хитозана указывали следующие изменения ИК спектра прогретой смеси ИСБ и хитозана по сравнению с ИК спектрами отдельных молекул ИСБ и хитозана (Рисунок 2):

✓ Ярко выраженное увеличение интенсивности полосы поглощения амидной связи I (1600-1700 cm^{-1}) конъюгата (1641 cm^{-1}), по сравнению с интенсивностями полос поглощения ИСБ (1645 cm^{-1}) и хитозана (1653 cm^{-1});

- ✓ Ярко выраженное увеличение интенсивности полосы поглощения амидной связи II (1500-1560 см⁻¹) конъюгата (1538 см⁻¹), по сравнению с интенсивностью полосы поглощения ИСБ (1529 см⁻¹);
- ✓ Появление новой полосы поглощения (1311 см⁻¹) в спектре конъюгата, характерной для связи [C-N] первичных, вторичных или третичных ароматических аминов;
- ✓ Заметное увеличение интенсивности полосы поглощения химической связи [=C-H] (3078 см⁻¹) в спектре конъюгата, по сравнению с интенсивностью полосы поглощения в спектре ИСБ (3055 см⁻¹);
- ✓ Значительно более высокая интенсивность полосы поглощения (3293 см⁻¹) конъюгата, а также его полос поглощения (2863 и 2927 см⁻¹) по сравнению с полосами поглощения ИСБ (3288 и 2929 см⁻¹) и хитозана (3350, 2861 и 2927 см⁻¹), что может быть связано с большим числом, как N-H, так и O-H групп, в макромолекуле конъюгата в результате ковалентного связывания ИСБ и хитозана по реакции Майара.

В разработанных водорастворимых наноконтейнерах на основе электростатических комплексов ИСБ-ХИТ для доставки липосомальной формы омега-3 ПНЖК куркумина (с наиболее полезным для здоровья равным весовым количеством в них ω-3 и ω-6 ПНЖК) была достигнута высокая степень 83.5 ± 6.6% инкапсулирования полученных липосом (ФХ-РЖ-КУР). Благодаря достаточной плотности частиц комплекса (~ 2 мг/мл), при хранении его растворов на свету и при комнатной температуре достигалась 60% защита от окисления биологических активных липидов (на 14 сутки хранения), а также 44% защита куркумина от деградации (на 4 сутки хранения). Изучено поведение разработанных наноконтейнеров в условиях, моделирующих переваривание *in vitro*. Показано, что около 69.76 ± 0.22% куркумина высвобождается на стадии «кишечник». Установлено, что разработанные наноконтейнеры наиболее эффективно взаимодействуют с муцином на стадии желудка *in vitro* [9].

Таким образом, комбинированное использование электростатических комплексов ИСБ и хитозана показало свою высокую эффективность для защиты и доставки липосомальной формы омега-3 ПНЖК и куркумина с равным весовым соотношением ω-3 и ω-6 ПНЖК. Дальнейшие исследования ковалентных комплексов ИСБ и хитозана для доставки БАВ являются перспективными для получения наноконтейнеров с улучшенными функциональными свойствами.

Благодарность. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-76-00045 <https://rscf.ru/project/21-76-00045/>. Авторы благодарят Lipoid GmbH за бесплатный образец фосфатидилхолина. Авторы также выражают благодарность за исследование ТЭМ, проведенное в ЦКП УНО «Электронная микроскопия в науках о жизни» МГУ (уникальное оборудование «Трехмерная электронная микроскопия спектроскопия») и в ЦКП ИБХФ РАН за измерение дзета-потенциала. Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам лаборатории функциональных свойств биополимеров ИБХФ РАН (д.х.н. Семёновой М.Г., к.х.н. Антиповой А.С., к.б.н. Мартиросовой Е.И.) за помощь в проведении исследований и обсуждении их результатов.

Список литературы:

1. Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года (Распоряжение Правительства Российской Федерации от 29.06.2016 г. №1364-р.).
2. Lin, D. Preparation, characterization and antioxidant properties of curcumin encapsulated chitosan/ D. Lin, L. Xiao, W. Qin, D.A. Loy, Z. Wu, H. Chen, Q. Zhang, lignosulfonate micelles//Carbohydr. Polym. 281. – 2022.-P. 119080
3. Delfanian M. Improving functionality, bioavailability, nutraceutical and sensory attributes of fortified foods using phenolics-loaded nanocarriers as natural ingredients/ M. Delfanian, M.A. Sahari // Food Res. Int. 137 (2020), 109555, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109555>
6. Gutierrez S. Effects of omega-3 fatty acids on immune cells/ S. Gutierrez, S.L. Svahn, M.E. Johansson// Int. J. Mol. Sci. 20 (20), 2019.– 5028. 5. B. Pradhan. Bioactive metabolites from marine algae as potent pharmacophores against oxidative stress-associated human diseases: a comprehensive review/ B. Pradhan, R. Nayak, S. Patra, B.P. Jit, A. Ragusa [et al.] // Molecules, 2021; 26 (1)-37
7. Thota R.N. Curcumin and long-chain Omega-3 polyunsaturated fatty acids for Prevention of type 2 Diabetes (COP-D): study protocol for a randomised controlled trial/ R.N Thota., S.H. Acharya, K.A. Abbott, M.L.Garg// Trials 17 (2016) 565
8. Chapkin R.S. Mechanisms by which pleiotropic amphiphilic n-3 PUFA reduce colon cancer risk/ R.S. Chapkin, V. DeClercq, E. Kim, N.R. Fuentes, Y.Y. Fan // Curr. Colorectal Cancer Rep. 10 (2014) 442–452

9. Zelikina, D. Efficiency of an oral delivery system based on a liposomal form of a combination of curcumin with a balanced amount of n-3 and n-6 PUFAs encapsulated in an electrostatic complex of WPI with chitosan/ D. Zelikina, S. Chebotarev, A.Komarova , E. Balakina [et al].// *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspect*, 2022, Volume 651, 129630 <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129630>
10. Tvrzicka E. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease – a review, Part 1: classification, dietary sources and biological functions/ E. Tvrzicka, L.-S. Kremmyda, B. Stankova, A. Zak // *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc Czech. Repub.* 155 (2) (2011) 117–130, <https://doi.org/10.5507/bp.2011.038>
11. Lu, W. The future trends of food hydrocolloids/W. Lu, K. Nishinari, S. Matsukawa, Y. Fang// *Food Hydrocolloids*, 2020. -103. – 105713
12. Semenova, M.G. *Biopolymers in Food Colloids: Thermodynamics and Molecular Interactions/* M.G. Semenova, E. Dickinson. –Leiden, Boston: Brill, 2010. –421 P.
13. MaurícioPalmeira Chaves de Souza. Highlighting the impact of chitosan on the development of gastroretentive drug delivery systems/ MaurícioPalmeira Chaves de Souza, Rafael Miguel Sábio, Tais de Cassia Ribeiro, Aline Martins dos Santos, AndréiaBagliottiMeneguim, and MarlusChorilli//*Int J Biol Macromol.* 2020 Sep 15; 159: 804–822
14. Laura Nicolle. Chitosan Functionalization: Covalent and Non-Covalent Interactions and Their Characterization/ L. Nicolle, Céline M. A. Journot, S. Gerber-Lemaire// *Polymers* 2021, 13(23). - 4118; <https://doi.org/10.3390/polym13234118>
15. Zelikina, D.V. Functional food compositions based on whey protein isolate, fish oil and soy phospholipids / D.V. Zelikina, M.D. Gureeva, S.A. Chebotarev [et al.] // *Food systems*, 2020, 3 (1), 16-20 doi.org/10.21323/2618-9771-2020-3-1-16-20
16. Furtado, Guilherme. Model infant formulas: Influence of types of whey proteins and lipid composition on the in vitro static digestion behavior/ Furtado, Guilherme &Methodolgy, Flávia& Sato, Ana &Hubinger, Miriam// *Food Research International*, 2022. -161. - 111835. [10.1016/j.foodres.2022.111835](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111835).
17. Duoxia Xu. Impact of whey protein – Beet pectin conjugation on the physicochemical stability of β -carotene emulsions/Duoxia Xu, Xiaoya Wang, Junping Jiang, Fang Yuan, Yanxiang Gao. / *Food Hydrocolloids*, 2012. - Volume 28. - Issue 2. – P. 258-266
18. Xiuxiu Zhang. Covalent conjugation of whey protein isolate hydrolysates and galactose through Maillard reaction to improve the functional properties and antioxidant activity/Xiuxiu Zhang, Xiaodong Li, Lu Liu, Lina Wang, Awa Fanny Massounga Bora, Lingling Du // *International Dairy Journal*, 2020. -V. 102. -104584
19. Huang, Z. Protective Effects of Chitosan-Bilirubin Nanoparticles Against Ethanol-Induced Gastric Ulcers/ Zhiwei Huang, Yannan Shi, Hengcai Wang, Changju Chun, Longwang Chen, Kang Wang, Zhongqiu Lu, Yingzheng Zhao, Xinze Li// *International Journal of Nanomedicine*, 2021. 16. -P. 8235-8250
20. Комарова А. П., Чеботарёв С.А., Балакина Е.С., Зеликина Д.В. Структурные изменения изолята сывороточных белков молока под действиемпищеварительных ферментов в модельных условиях желудочно-кишечного тракта *invitro*/ А.П. Комарова, С.А. Чеботарёв, Е.С. Балакина, Д.В. Зеликина// *Биохимическая физика: труды XXI ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-вузы. Москва, 15-16 ноября 2021 г., 2022 г. 2022, Москва. Изд.: РУДН, стр. 75-78*

Моделирование процессов колебательной автоэмиссии электронов из валентных и диполь-связанных состояний



Белецан О. Б., Боченкова А. В.

*Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия*

Фотоиндуцированный перенос электрона играет ключевую роль в таких процессах как фотоактивация сенсорных белков, радиационное повреждение ДНК, процессах астрофизики.

Механизмы образования и релаксации метастабильных электронно-возбужденных состояний, являющихся ключевыми в процессах переноса электрона, в настоящее время изучаются с помощью фотоэлектронной спектроскопии молекулярных анионов в газовой фазе. При исследовании механизмов фотоокисления хромофорных групп фотоактивных белков особое внимание уделяется низколежащим электронно-возбужденным валентным и диполь-связанным состояниям в видимой области электромагнитного спектра, перенос электрона из которых обусловлен электронно-колебательным взаимодействием. Такие процессы приводят к появлению низкоэнергетических электронов в фотоэлектронных спектрах, но, в отличие от статистического процесса электронной эмиссии из основного электронного состояния, распределение электронов по кинетической энергии в этом случае имеет ярко выраженную структуру, положение пиков в которой не зависит от энергии возбуждения. Целью данной работы является развитие теоретических подходов изучения механизмов образования низкоэнергетических электронов из слабосвязанных состояний анионов биологических хромофоров.

В работе разработан и реализован метод расчета фотоэлектронных спектров при колебательной автоэмиссии электронов из слабосвязанных электронно-возбужденных состояний молекулярных анионов: валентных и диполь-связанных. Метод основан на расчете матричных элементов неадиабатического взаимодействия в пространстве как электронных, так и ядерных переменных. Матричные элементы неадиабатического взаимодействия в пространстве ядерных переменных рассчитывались в базисе колебательных волновых функций в модели смещенных многомерных гармонических поверхностей с параллельными нормальными модами. При расчетах также учитывалась термически неравновесная заселенность колебательных уровней в электронно-возбужденном состоянии молекулярного аниона при возбуждении из основного электронного состояния лазерными импульсами с различной энергией. Матричные элементы вектора неадиабатической связи между электронно-возбужденными и ионизированным состоянием молекулярного аниона в пространстве электронных переменных, спроектированные на нормальные моды, рассчитывались с помощью многоконfigurационного метода самосогласованного поля в полном активном пространстве CASSCF(2,5)/(aug)-cc-pVTZ+. Вычисления энергий и градиентов в различных электронных состояниях аниона проведены с использованием инвариантной многоконfigurационной квазивырожденной теории возмущений второго порядка в варианте XMCQDPT2/CASSCF(14,14)/(aug)-cc-pVDZ+. Диполь-связанные состояния были описаны тремя диффузными молекулярными обителями симметрии A' (две орбитали) и A'' (одна орбиталь), включенными в активное пространство. Орбитали получены как линейные комбинации подмножества диффузных функций [6s6p6d], дополнительно добавленных в базисный набор. Функции базисного набора, используемые для описания состояний, располагались в центре масс молекулы. Данный подход позволил получить сбалансированные оценки энергий срыва электрона и смещений поверхностей потенциальной энергии аниона и нейтрального молекулярного остова при усреднении электронной плотности по состояниям валентного и ионизированного типов в рамках одного расчета.

С помощью разработанного метода был исследован механизм колебательной электронной эмиссии из первого электронно-возбужденного состояния S1 аниона модифицированного хромофора зеленого флуоресцентного белка pHBDI- при его возбуждении в видимом диапазоне, а также проведена интерпретация низкоэнергетической области его экспериментальных фотоэлектронных спектров. Установлено, что электронно-возбужденное состояние S1 изолированного анионного хромофора pHBDI- является слабосвязанным. Показано, что распределение электронов по кинетической энергии в фотоэлектронных спектрах этого аниона определяется матричными элементами неадиабатического взаимодействия S1/D0+e-, связанными с определенными колебательными модами. Полученные результаты позволили идентифицировать канал колебательной автоэмиссии электронов в экспериментальных спектрах и разделить несколько каналов эмиссии, приводящих к образованию низкоэнергетических электронов.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова, а также вычислительного кластера лаборатории квантовой фотодинамики, закупленного по программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова. Работа поддержана Российским научным фондом (грант №22-13-00126).

Молекулярное моделирование ацилирования глутамата под воздействием фермента N-ацетилглутаматсинтазы



Блинова А.Р.¹, Кулакова А.М.¹, Григоренко Б.Л.¹, Немухин А.В.^{1,2}

*Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, Москва, Россия
Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии
наук, Москва, Россия*

N-ацетилглутаматсинтазы (NAGS) представляют собой семейство ферментов, катализирующих перенос ацетильной группы от ацетилкофермента А на глутамат с образованием N-ацетилглутамата—промежуточного продукта в цепи биосинтеза аргинина у бактерий и растений, а также необходимого аллостерического активатора карбамилфосфатсинтазы в орнитинном цикле. На основании филогенетического анализа и структурного сходства среди NAGS выделяют две подгруппы: “бактериальные NAGS”, распространенные у бактерий и растений; и “животные NAGS”, включающие в себя бифункциональные N-ацетилглутаматсинтазы/киназы, а также NAGS у грибов и животных. Ни для одного фермента данного семейства достоверный механизм катализируемой реакции не установлен. В данной работе сделаны первые шаги по установлению механизма ацилирования глутамата в активном центре бактериальных NAGS на примере NAGS из *Neisseria gonorrhoeae*.

“Бактериальные NAGS” – двудоменные гексамерные ферменты, у которых как в катализе реакции ацилирования, так и в связывании ацетил-КоА участвует лишь N-ацетилтрансферазный домен, входящий в семейство Gcn5-связанных ацетилтрансфераз. Для этого семейства известны пять различных механизмов N-ацилирования: железно-радикальный; при участии ацилпереносящего белка; посредством каталитической триады (Glu/His/Cys, Asp/His/Cys или Asp/His/Ser); через сериновый нуклеофил и прямая S_N2-атака. Для NAGS из *Neisseria gonorrhoeae* теоретически возможны представляются лишь два последних.

В отличие от других ферментов семейства для системы NAGS из *Neisseria gonorrhoeae* известна кристаллографическая структура комплекса с продуктами реакции ацилирования (PDBID3B8G), что позволяет примерно установить местоположение и геометрию активного центра, а также сайтов связывания ацетил-КоА и глутамата. На основании кристаллографических данных и классической молекулярной динамики с силовым полем CHARMM найден канонический для ацетил-КоА мотив узнавания (Arg/Gln)-Xaa-Xaa-Gly-Xaa-(Gly/Ala) в виде последовательности Gln364-Glu365-Gly366-Gly367-Tyr368-Gly369, а также установлено нехарактерное для семейства NAGS дополнительное связывание ацетил-КоА киназным доменом другого мономерного звена посредством образования водородной связи конечной фосфатной группы ацетил-КоА с Arg134, Arg151 и Lys152. Также наблюдается более подвижное положение глутамата: одна карбоксильная группа связана двумя водородными связями либо с Arg416, либо с Arg425, либо принимает промежуточное между ними положение, вторая образует две водородные связи или с Arg316, или с Arg316 и водородом при атоме азота основной цепи Leu314, или с водородами при атомах азота основной цепи Leu314 и Cys356.

Первой стадией любого из предположенных механизмов должно стать отщепление протона от цвиттер-ионной формы глутаминовой кислоты. Тем не менее в непосредственной близости от активного центра не выявлены аминокислоты, которые традиционно выступают в качестве оснований в подобных реакциях: Glu, Asp и His, кроме Glu353, которая образует солевой мостик с Arg416. Это позволяет предположить, что либо отщепление протона проходит предварительно на входе в карман связывания, либо в реакцию вступает депротонированная форма кислоты, что вполне возможно при характерном для бактерий pH внутренней среды клетки. Для механизма S_N2-атаки комбинированным методом квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) был получен интермедиат, в котором атом кислорода карбонильной группы ацетил-КоА становится гидроксильным, а атом азота, связанный с карбонильным углеродом, координирован посредством водородной связи с атомом кислорода основной цепи Leu391 (рис.1). В расчетах квантовой части использовали неограниченный метод теории функционала плотности: функционал PBE0 с дисперсионной поправкой D3 и базис 6-31G*. Молекулярно-механическую часть описывали с помощью силового поля CHARMM.

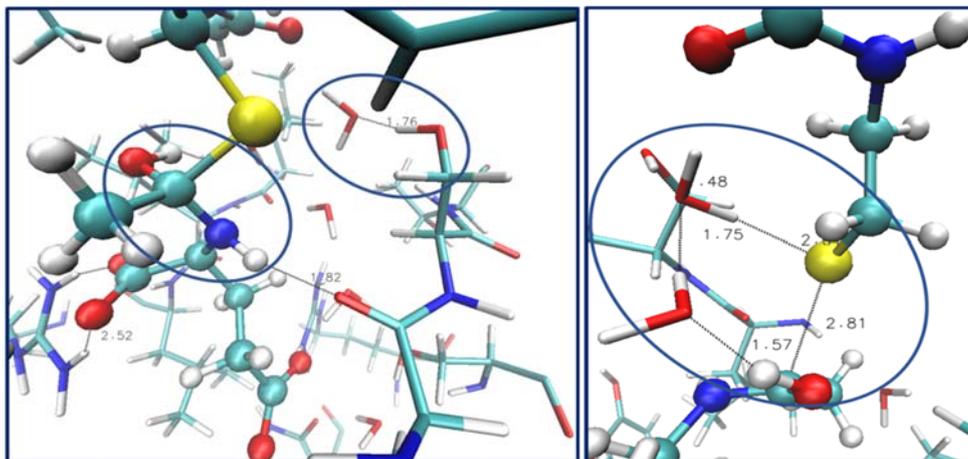


Рисунок 1. Слева – интермедиат, образующий в ходе реакции между ацетил-КоА и глутаматом по механизму S_N2 - замещения; справа – переходное состояние последней стадии данной реакции.

Для изучения пути перехода этого интермедиата в продукты был использован подход молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами (КМ/ММ-МД) PBE0-D3/6-31G**//CHARMM с добавлением смещающего потенциала методом зонтичной выборки (umbrella sampling). В качестве координаты реакции на рассматриваемой стадии было выбрано расстояние от атома серы ацетил-КоА до карбонильного углерода уходящей ацетильной группы. В результате обнаружено, что разрыв связи C-S, ведущий к получению КоА и N-ацетилглутамата, происходит при отрыве протона от гидроксильного кислорода, который снова становится карбонильным, и переносе по “эстафетному” механизму через две молекулы воды протона с образованием S-Hсвязи (рис.1). Боковая цепь остатка Ser392, замена которого, как показано в ранних исследованиях, приводит к значительному снижению каталитической активности, по-видимому координирует положение “водяного моста”. Величина энергетического барьера данной реакции, вычисленная методами анализа взвешенных гистограмм (WHAM) и зонтичного интегрирования (UI), составляет 6 ккал/моль.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке РФФ(проект № 22-13-00012).

Комбинационное рассеяние света для мониторинга композитных наночастиц, загруженных лекарствами



Бреева А.В.¹, Первушин Н.В.², Цурикова У.А.¹, Елисеев А.А.³, Гонгальский М.Б.¹, Осминкина Л.А.¹

¹Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Физический Факультет, г.Москва, Россия

²Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Факультет Фундаментальной Медицины, г.Москва, Россия

³Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Факультет Наук о Материалах, г.Москва, Россия

e-mail: breeva.av19@physics.msu.ru, тел.: 8 (903) 7736396

Задачи разработки эффективных систем доставки лекарств для преодоления нежелательных побочных эффектов и максимизации терапевтической эффективности химиотерапии опухолей - одни из главных в современной медицине. Для этого активно используются различные носители лекарств нанометровых размеров (наноконтейнеры). Однако, для достижения максимальных терапевтических эффектов от использования наноконтейнеров, необходимо уметь отслеживать местонахождение наночастиц после введения в клетки и ткани.

В последнее время микро-спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) стала мощным и хорошо подходящим инструментом в биоаналитике. КР регистрирует молекулярные колебания, которые активируются лазерным излучением. На основе спектров КР можно определить химические отпечатки молекул, что позволяет отслеживать локализацию веществ внутри клетки [1].

В данной работе проведен мониторинг *invitro* композитных наночастиц пористого кремния с золотом, покрытых полиэтиленгликолем (ПЭГ-Аu-пКНЧ), в поры которых было загружено химиотерапевтическое лекарство Sunitinibmalate (СБ), при их взаимодействии с клетками колоректального рака НСТ116 методом спектроскопии комбинационного рассеяния света.

Показана интернализация ПЭГ-Аu-пКНЧ при их инкубации 3 -12 часов с клетками. В спектре КР наблюдаются пики на характерных частотах нанокристаллического кремния (518 см^{-1}), СБ (1320 и 1574 см^{-1}) и белков клетки. При этом необходимо отметить, что за счет эффекта гигантского КР на наночастицах золота, наблюдалось усиление интенсивности спектров от лекарства, адсорбированного в порах ПЭГ-АuКНЧ.

Размер нанокристаллов кремния рассчитывался из положения максимума в спектре КР формуле [2]:

$$D = 0.543 \left(\frac{52.3}{\Delta\omega} \right)^{0.63}, \quad (1)$$

где $\Delta\omega$ - сдвиг максимума спектра КР нанокристаллов относительно $520,5 \text{ см}^{-1}$ (максимум сигнала КРС кристаллического кремния). Рассчитанный по положению максимума диаметр D кремниевых нанокристаллов, из которых состоят ПЭГ-Аu-пКНЧ, составлял ~ 6 нм.

Таким образом, показано, что наноконтейнеры на основе наночастиц пористого кремния с загруженным в них химиотерапевтическим лекарством могут быть успешно обнаружены в раковых клетках и тканях с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-75-10107, <https://rscf.ru/project/22-75-10107/>.

Литература

1. Tolstik E. et al. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. **2016**. 12. 7. 1931-1940.
2. Gongalsky M. B. et al. FaradayDiscussions. **2020**. 222. 318-331.

Связь полиморфных маркеров генов *ercc2*, *ercc5* и *abcb1* с ответом на лечение и акушерскими параметрами после химиотерапии препаратами платины при онкологических заболеваниях на фоне беременности

**Бреннер П.К.¹, Капралова М.А.¹, Заварыкина Т.М.¹, Козырко Е.В.²,
Круз Ж. де С.², Байгазиева Д.А.², Ходырев Д.С.³, Хохлова С.В.²**

1 Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля» РАН, г. Москва

2 Федеральное государственное бюджетное учреждение «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова» Минздрава России, г. Москва

3 Федеральное государственное бюджетное учреждение «ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий» ФМБА России, Москва, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что одна на тысячу беременностей осложняется раком [1-3]. Наиболее часто встречающимися во время беременности солидными опухолями являются рак молочной железы, рак шейки матки, рак яичника, злокачественные новообразования желудочно-кишечного тракта и меланомы [4-5]. При настойчивом желании женщины сохранить беременность, матери может быть предложена химиотерапия (ХТ) до родоразрешения. В зависимости от вида рака применяются различные схемы лечения, однако большая часть из них содержит в своем составе соединения платины и другие повреждающие ДНК препараты, такие как алкилирующие соединения и антрациклины [6]. Существует группа АВС-транспортеров, среди которых АВСВ1, АВСС1, АВСС2, АВСС3 и АВСГ2 чаще всего ассоциируются с устойчивостью раковой клетки к нескольким лекарственным средствам, называемым множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [6-8]. Известно, что с данные специфические белки-переносчики лекарственных веществ являются ключевым фактором в лекарственной устойчивости опухолей и особенностях их ответа на лечение [9]. Ген *ABCB1*, ранее известный как ген множественной лекарственной устойчивости 1 (*MDR1*), кодирует р-гликопротеин (Pgp). Это первый обнаруженный АВС-транспортер, избирательно передающий МЛУ в раковую клетку путем прямого выведения широкого спектра противоопухолевых препаратов, включая паклитаксел и доксорубин [7, 10]. Было показано, что повышенная экспрессия *ABCB1* в опухолевых клетках коррелирует с худшим ответом на

паклитаксел [11-12]. При исследовании ряда полиморфных маркеров гена *ABCB1* у больных раком легкого выявлена связь с общей выживаемостью больных при платиносодержащей ХТ [13].

Хотя все ХТ препараты теоретически могут пересекать плацентарный барьер, степень плацентарного переноса значительно варьируется от одного соединения к другому [14]. Наиболее представленным белком-транспортером в плаценте является PgP, кодирующийся геном *ABCB1* [15].

Для гена *ABCB1* установлено большое число полиморфных вариантов, из которых наиболее функционально значимыми являются rs2032582, характеризующийся заменой С (цитозина) на А (аденин) в 2677 позиции, и rs1045642, в котором G (гуанин) заменяется на А (аденин) в 3435 позиции гена *ABCB1*, что сопровождается изменением аминокислотного состава белка PgP. Изоформы гликопротеина различаются по структурным, биохимическим и биологическим свойствам. Описано, что носительство минорного аллеля маркера rs1045642 гена *ABCB1* у больных раком яичника связано с повышением риска нейротоксичности ХТ ($p = 0.03$) [16]. В случае маркера rs2032582 гена *ABCB1* при носительстве минорного генотипа *AA* выявлено снижение частоты рецидива рака молочной железы на 31% [17]. При носительстве минорных аллелей маркеров rs2032582 и rs1045642 гена *ABCB1* наблюдалось снижение общей выживаемости больных раком легкого, получавших лечение с включением препаратов платины [13].

Ответ на ХТ может быть обусловлен активностью систем репарации ДНК, в частности, системы эксцизионной репарации оснований (BER) или нуклеотидов (NER). Интегральным белком BER, координирующим сборку всего белкового комплекса репарации, является XRCC1, который кодируется геном *XRCC1* [18-19]. Система репарации NER и изменения в ней, в частности, однонуклеотидные полиморфизмы, также играют важную роль в ответе на цитотоксическую терапию [20]. В случае острого лимфобластного лейкоза у детей были выявлены различия в экспрессии генов системы NER между группами с ранним и поздним рецидивом [21]. Ключевыми генами системы NER являются гены *ERCC2* и *ERCC5*. Ген *ERCC2* кодирует АТФ-зависимую ДНК-хеликазу, являющуюся важным компонентом протеинового комплекса ТФПН, необходимого для раскручивания двойной спирали ДНК после первоначального распознавания повреждения при репарации путем NER. *Lys751Gln* – один из основных полиморфизмов гена *ERCC2* (rs13181), который находится в 23 экзоне гена и выражается в замене Т (тимина) на G (гуанин), что приводит к изменению аминокислоты *Lys* (лизина) на *Gln* (глутамин) в С-концевой части белка и его функционирования, тем самым влияя на эффективность репарации ДНК. Аллель *G* связан с низкой репарационной способностью и увеличением частоты хроматидных разрывов.

Продукт гена *ERCC5* обладает эндонуклеазной активностью и участвует во внесении 3'-разреза в область повреждения при репарации путем NER [22]. Одним из наиболее изученных полиморфных маркеров гена *ERCC5* является rs17655, который выражается в замене G (гуанина) на C (цитозин), что приводит к аминокислотной замене аспарагиновой кислоты (*Asp*) на гистидин (*His*) в С-концевой части белка. Это вызывает изменения функции белка и его взаимодействия с комплексом белков NER, влияя тем самым на активность репарации ДНК [23]. Для данного гена была выявлена связь полиморфных маркеров -763A>G и +25A>G, находящихся в промоторе гена и изменяющих уровень синтеза мРНК, на риск прогрессирования и ОВ у больных распространенным колоректальным раком, получавших платиносодержащую ХТ [24], а также полиморфизма rs2228959 со снижением общей выживаемости больных [25].

Вопросы тактики лечения у беременных с онкологическими заболеваниями остаются дискуссионными. В связи с минимальным объемом научной информации по данному вопросу работа по индивидуализации лечения таких пациенток является крайне актуальной. В работе были изучены полиморфные маркеры генов как наименее подверженные метаболическим изменениям в ходе беременности.

Цель работы – изучение связи полиморфных маркеров генов репарации ДНК *ERCC2* (rs13181), *ERCC5* (rs17655), транспортного белка *ABCB1* (rs1045642, rs2032582) с клиническим ответом, степенью патоморфологической регрессии (ПР) опухоли, параметрами новорожденного и массой плаценты у беременных женщин с онкологическими заболеваниями после ХТ препаратами платины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В ходе исследования были изучены образцы крови 31 беременной пациентки с онкологическими заболеваниями, проходившей лечение НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова. Диагноз устанавливали на основании гистологического исследования в лечебном учреждении. Все пациенты получали ХТ с использованием препаратов платины. Образцы крови отбирались до проведения ХТ, после чего из них была выделена ДНК с

использованием набора реагентов «QIAamp DNA Mini Kit» (Qiagen, Германия). Полиморфные маркеры генов были исследованы методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентными аллельспецифичными зондами на приборе «CFX96 Touch Real-Time System» (Bio-Rad, США). Последовательности и температура отжига ($T_{отж}$) использованных в работе праймеров и зондов указаны в таблице 1.

Таблица 1. Условия проведения анализа полиморфных маркеров

Маркер	Праймеры и зонды	$T_{отж}$, °C / Длина ампликона, п.н.
<i>ABCB1</i> <i>rs2032582</i>	AGAGCATAGTAAGCAGTAG CAGGAGTTGTTGAAATGAA FAM: CACCTTCCCAGCACSTTCTAGT-BHQ-1 VIC: CACCTTCCCAGAACSTTCTAGT-BHQ-2	60.8/165
<i>ABCB1</i> <i>rs1045642</i>	GTGTGATTTGGTTGCTAA CTGAGAACATTGCCSTATG FAM: CTGCCCTCACGATCTCTTCC-BHQ-1 VIC: CTGCCCTCACAATCTCTTCC-BHQ-2	60.3/224
<i>ERCC2</i> <i>rs13181</i>	CTGACTTCATAAGACSTTCTAG TCTCCSTTTCTCTGTTC FAM: TCTATCCTCTTCAGCGTCTCC-BHQ-1 VIC: TCTATCCTCTGCAGCGTCTCC-BHQ-2	62.6/217
<i>Asp1104His</i> <i>ERCC5</i> <i>rs17655</i>	F: AGAGGCATAACAAATACC R: TCGTCATCACTATCACTA FAM: CTTC AAGTGAAGATGCTGAAAG-BHQ-1 VIC: CTTC AAGTGAACATGCTGAAAG-BHQ-2	60 / 290

Примечание. *F* и *R* – праймеры, где *F* – прямой, *R* – обратный; *FAM* и *VIC* – ДНК-зонды, меченные соответствующими флуоресцентными красителями; $T_{отж}$ – температура отжига.

Результаты определения статуса маркеров сопоставляли с клиническим ответом, степенью ПР опухоли с использованием метода логистической регрессии, с массой и длиной новорожденного и массой плаценты – методом Манн-Уитни, результаты для количественных показателей представлены в виде: медиана (нижний-верхний квартили).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлена связь полиморфного маркера *rs2032582* гена *ABCB1* с наличием полного клинического ответа опухоли при отсутствии аллеля *A* ($p = 0.03$) (рис.1а) и тенденция к значимости для маркера *rs1045642* гена *ABCB1* ($p = 0.08$) (рис. 1б).



Рис. 1. а – Связь маркера *rs2032582* гена *ABCB1* со степенью клинического ответа; б – тенденция к связи маркера *rs1045642* гена *ABCB1* со степенью клинического ответа

Данные о степени патоморфоза были доступны для 14 больных. Была выявлена связь маркера *rs1045642* гена *ABCB1* с достижением полной ПР (pCR+) и ПР III степени при носительстве аллеля *G* ($p = 0.006$) (рис. 2).

При носительстве аллеля *G* маркера *rs13181 ERCC2* наблюдался тренд к уменьшению массы новорожденного, $p = 0.08$ (при отсутствии аллеля *G* маркера гена *ERCC2* медиана массы составляла 2.826 (2.560-3.018) кг, а при наличии – 2.636 (1.859-2.883) кг, рис.3).

Обнаружена тенденция к увеличению массы плаценты в зависимости от носительства аллеля *G* маркера *rs17655 ERCC5*, $p = 0.11$ (при отсутствии аллеля *G* маркера гена *ERCC5* медианы массы плаценты составляли 261.5 (204-379) г, при наличии – 349.0 (320-402) г). Тенденция к

снижению массы плаценты наблюдается для носителей аллеля *A* маркера *rs2032582 ABCB1*, $p = 0.10$ (медианы массы плаценты составляли 403.5 (317-420) г и 331.0 (312-380) г, соответственно).

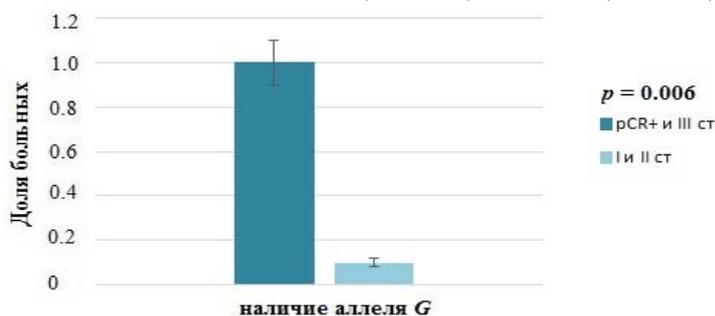


Рис. 2. Связь маркера *rs1045642* гена *ABCB1* со степенью патоморфологической регрессии опухоли

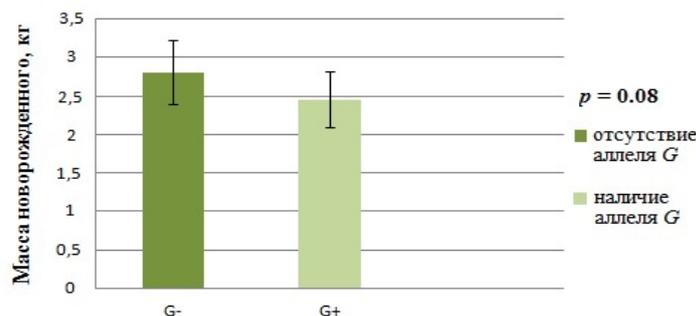


Рис. 3. Тенденция к связи маркера *rs13181* гена *ERCC2* с массой новорожденного

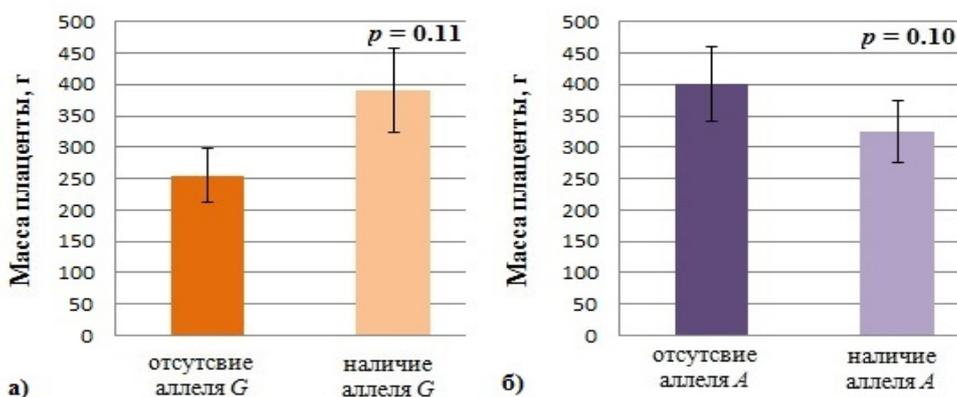


Рис. 4. а – Тенденция к связи маркера *rs17655* гена *ERCC5* с массой плаценты, **б** – тенденция к связи маркера *rs2032582* гена *ABCB1* с массой плаценты

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе выявлена связь полиморфного маркера *rs2032582* гена *ABCB1* с наличием полного клинического ответа опухоли ($p = 0.030$), полиморфного маркера *rs1045642* гена *ABCB1* со степенью патоморфоза опухоли ($p = 0.006$) у беременных пациенток с онкологическими заболеваниями. Обнаружена тенденция к изменению массы плаценты для маркеров генов *ERCC5* и *ABCB1* и массы новорожденного для маркера гена *ERCC2*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee Y.Y., Roberts C.L., Dobbins T. et al. Incidence and outcomes of pregnancy-associated cancer in Australia, 1994-2008: a population-based linkage study. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 2012; 119:1572-1582.
2. Parazzini F., Franchi M., Tavani A. et al. Frequency of Pregnancy Related Cancer: A Population Based Linkage Study in Lombardy, Italy. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2017; 27:613-619.
3. Eibye S., Krüger Kjær S., Mellemkjær L. Incidence of pregnancy-associated cancer in Denmark, 1977-2006. *Obstet Gynecol.* 2013 Sep; 122(3):608-17.
4. Maggen C., Wolters VERA, Cardonick E. et al. Pregnancy and Cancer: the INCIP Project. *Pregnancy and Cancer: the INCIP Project. Curr Oncol Rep.* 2020 Feb 5; 22(2):17.
5. de Haan J, Verheecke M, Van Calsteren K. et al. Oncological management and obstetric and neonatal outcomes for women diagnosed with cancer during pregnancy: a 20-year international cohort study of 1170 patients. *Lancet Oncol.* 2018 Mar; 19(3):337-346.

6. Benoit L., Mir O., Vialard F. et al. Cancer during Pregnancy: A Review of Preclinical and Clinical Transplacental Transfer of Anticancer Agents. *Cancers*. 2021; 13:1238.
7. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 2007; 11:1156-66.
8. Auner V., Sehoul J., Oskay-Oezcelik G. et al. ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. *Gynecol Oncol*. 2010; 117:198-201.
9. Miteva-Marcheva N. N., Ivanov H.Y., Dimitrov D.K. et al. Application of pharmacogenetics in oncology. *Biomarker Research*. 2020 Aug; 8:32.
10. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2007; 7:573-84.
11. Yusuf R.Z., Duan Z., Lamendola D.E. et al. Paclitaxel resistance: molecular mechanisms and pharmacologic manipulation. *Curr Cancer Drug Targets*. 2003; 3:1-19.
12. Baekelandt M.M., Holm R., Nesland J.M. et al. P-glycoprotein expression is a marker for chemotherapy resistance and prognosis in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res*. 2000; 20:1061-7.
13. Sharma P., Singh N., Sharma S. Impact of ABCB1, ABCC1, ABCC2, and ABCG2 variants in predicting prognosis and clinical outcomes of north Indian lung cancer patients undergoing platinum-based doublet chemotherapy. *J Gene Med*. 2022 Oct; e3460.
14. Pacifici G.M., Nottoli R. Placental Transfer of Drugs Administered to the Mother. *Clin. Pharmacokinet*. 1995; 28:235-269.
15. Joshi A.A., Vaidya S.S., St-Pierre M.V. et al. Placental ABC Transporters: Biological Impact and Pharmaceutical Significance. *Pharm. Res*. 2016; 33(12):2847-2878.
16. Ferracini A.C., Lopes-Aguiar L., Lourenço G.J. et al. GSTP1 and ABCB1 Polymorphisms Predicting Toxicities and Clinical Management on Carboplatin and Paclitaxel-Based Chemotherapy in Ovarian Cancer. *Clin Transl Sci*. 2021 Mar; 14(2):720-728.
17. Ahern T.P., Damkier P., Feddersen S. et al. Predictive pharmacogenetic biomarkers for breast cancer recurrence prevention by simvastatin. *Acta Oncol*. 2020 Sep; 59(9):1009-1015.
18. Kudo K., Gavin E., Das S. et al. Inhibition of Gli1 results in altered c-Jun activation, inhibition of cisplatin-induced upregulation of ERCC1, XPD and XRCC1, and inhibition of platinum-DNA adduct repair. *Oncogene* 2012; 31:4718-4724.
19. Wright G., Sonavane M., Gassman N. R. Activated STAT3 Is a Novel Regulator of the XRCC1 Promoter and Selectively Increases XRCC1 Protein Levels in Triple Negative Breast Cancer. *International journal of molecular sciences* 2021; 22(11):5475.
20. Pasqui A., Boddi A., Campanacci D. A. et al. Alteration of the Nucleotide Excision Repair (NER) Pathway in Soft Tissue Sarcoma. *International journal of molecular sciences* 2022; 23(15):8360.
21. Ibrahim O. M., As Sobeai H. M., Grant S. G. et al. Nucleotide excision repair is a predictor of early relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *BMC medical genomics* 2018; 11(1):95.
22. Fagbemi A.F., Orelli B., Scharer O.D. Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)* 2011; 10(7):722-729.
23. Wakasugi M, Sancar A. Order of assembly of human DNA repair excision nuclease. *J Biol Chem* 1999; 274:18759-18768.
24. Chen J., Luo X., Xie G. et al. Functional Analysis of SNPs in the ERCC5 Promoter in Advanced Colorectal Cancer Patients Treated With Oxaliplatin-Based Chemotherapy. *Medicine* 2016; 95(19):e3652.
25. Li Y. K., Xu Q., Sun L. P. et al. Nucleotide excision repair pathway gene polymorphisms are associated with risk and prognosis of colorectal cancer. *World journal of gastroenterology* 2020; 26(3):307-323.

**Квантово-химическое исследование комплексов с переносом заряда
между органическими фрагментами**

**Н.Н. Бреславская¹, Е.Н. Тимохина², Е.А. Уголькова¹,
Минин В.В.¹, Н.Н. Ефимов¹**

¹ *Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН,
г. Москва, Россия*

² *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, Россия*

Ранее в [1, 2] выполнены синтез, характеристика (РСА, РФА) и магнетохимические исследования двух серий (с тетраметилфенилендиаминном, ТМ PD или диаминодулолом, DAD) биядерных

карбоксилатных комплексов РЗЭ со структурой китайского фонарика, в которых между молекулами аминов и динитробензоатными (DNBZ) фрагментами наблюдается стекинг-взаимодействие. Стекинг-взаимодействие приводит к переносу заряда между органическими фрагментами, что проявляется в наличии характерных полос поглощения, в появлении сигнала в спектре ЭПР, а также – ненулевое значение магнитного момента поликристаллического порошка иттриевого (диамагнитного) комплекса при комнатной температуре.

В данной работе представлены квантово-химические расчеты этих систем – электронной структуры молекул донора (TMPD, DAD), акцептора (Y_dimers) и комплексов с переносом зарядов (Y_dimers_TMPD, Y_dimers_DAD). Использовано релятивистское приближение теории функционала плотности (DFT) с использованием функционала PBE0 и базисным набором old-ZORA-SVP с учетом дисперсионной поправки Гримме D3BJ. Расчеты выполнены по программе ORCA (version 4.2.1) [3]. Основная геометрия комплексов и димеров получены из cif структур. Положения атомов водорода уточнялись в приближении PBE/old-ZORA-SVP. Расчеты подтверждают наличие переноса заряда между молекулой-донором (TMPD или DAD) и лигандом-акцептором (DNBZ).

Свойства комплексов с переносом заряда в значительной степени зависят от природы донора и акцептора π -электронов. Эта зависимость может быть выражена через разность энергий нижней свободной молекулярной орбитали (LUMO) акцептора и высшей занятой молекулярной орбитали (HOMO) донора. На схеме представлены энергетические диаграммы комплексов TMPD и DAD. В Таблице 1 представлены рассчитанные значения энергий высшей занятой молекулярной орбитали (HOMO) и нижней свободной молекулярной орбитали (LUMO) для донора, акцептора, комплекса, разности энергий LUMO акцептора и HOMO донора, а также величины переноса заряда с донора на акцептор в комплексах.

Схема. Энергетические диаграммы комплексов TMPD и DAD.

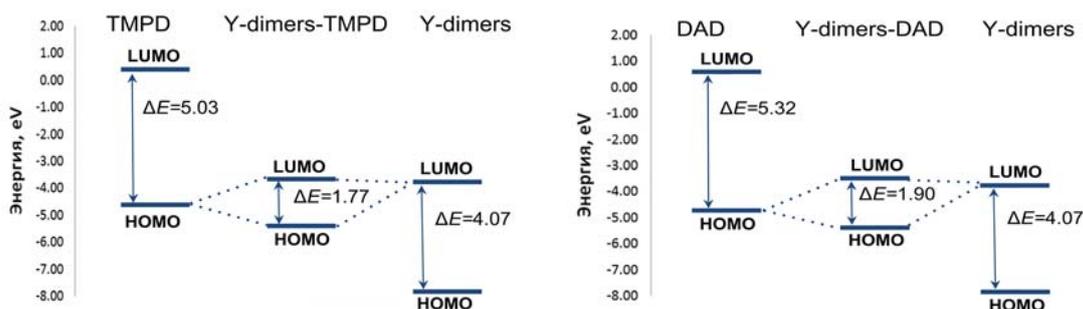


Таблица 1. Рассчитанные значения энергий (в эВ) HOMO и LUMO для донора (E_{MoD}), акцептора (E_{MoA}), комплекса (E_{MoC}), ΔE_{MoD} – разности энергий LUMO акцептора и HOMO донора, Δq и Δq^* – величины переноса заряда с донора на акцептор в основном состоянии и в первом возбужденном.

	E_{MoD}		E_{MoA}		E_{MoC}		ΔE_{MoD}	ΔE_{MoA}	ΔE_{MoC}	ΔE_{Mo}	Δq	Δq^*
	HOMO	LUMO	HOMO	LUMO	HOMO	LUMO						
TMPD	-4.62	0.41	-7.85	-3.78	-5.41	-3.64	5.03	4.07	1.77	0.84	0.16	0.91
DAD	-4.76	0.57	-7.85	-3.78	-5.40	-3.50	5.32		1.90	1.12	0.09	0.97

Расчитанное значение энергии LUMO орбитали акцептора составляет -3.78 эВ; значения энергии HOMO орбиталей донора составляют -4.62 и -4.67 эВ для TMPD и DAD, соответственно. Понижение энергии HOMO-орбитали донора при переходе от TMPD к DAD свидетельствует об уменьшении донорных свойств, и, как следствие разность энергий орбиталей LUMO акцептора и HOMO доноров увеличивается и составляет 0.84 и 1.12 эВ для TMPD и DAD, соответственно.

В комплексах с переносом заряда HOMO и LUMO орбитали остаются образованными преимущественно орбиталями фрагментов донора и акцептора, соответственно. Однако их энергии изменяются – энергии HOMO орбиталей комплексов ниже HOMO орбиталей доноров, энергии LUMO орбиталей комплекса выше LUMO орбитали акцептора. В результате разницы энергий HOMO-LUMO в комплексах существенно выше разниц энергий HOMO донора и LUMO акцептора – 5.03 и 5.32 эВ против 0.84 и 1.12 эВ для TMPD и DAD, соответственно. Одновременно разницы энергий HOMO донора и LUMO акцептора меньше разниц энергий HOMO-LUMO в доноре – 0.84 и 1.12 эВ против 1.77 и 1.90 эВ для TMPD и DAD, соответственно.

Величина переноса заряда с донора на акцептор была рассчитана с использованием заселенности по Левдину как разность сумм зарядов на атомах акцептора в свободном состоянии и в составе комплекса как в основном, так и в первом возбужденном состояниях. Величины переноса заряда в основном состоянии не велики, и составляют 0.16 и 0.09 электрона для TMPD и DAD соответственно. При переходе комплексов от основного состояния к первому возбужденному происходит перенос электронной плотности с атомов донора на атомы акцептора. И эта величина близка к 1 электрону. Рассчитанные значения лежат в пределах от 0.91 до 0.97 электрона.

На Рисунках 1-3 представлены молекулярные орбитали в донорах, акцепторе и комплексах с переносом заряда.

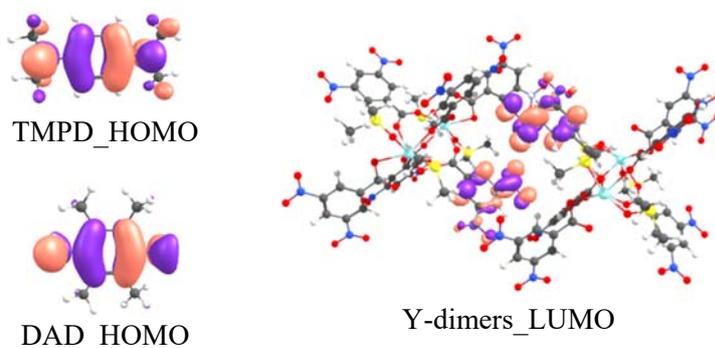


Рисунок 1. Молекулярные орбитали в донорах (TMPD, DAD) и акцепторе (Y_dimers).

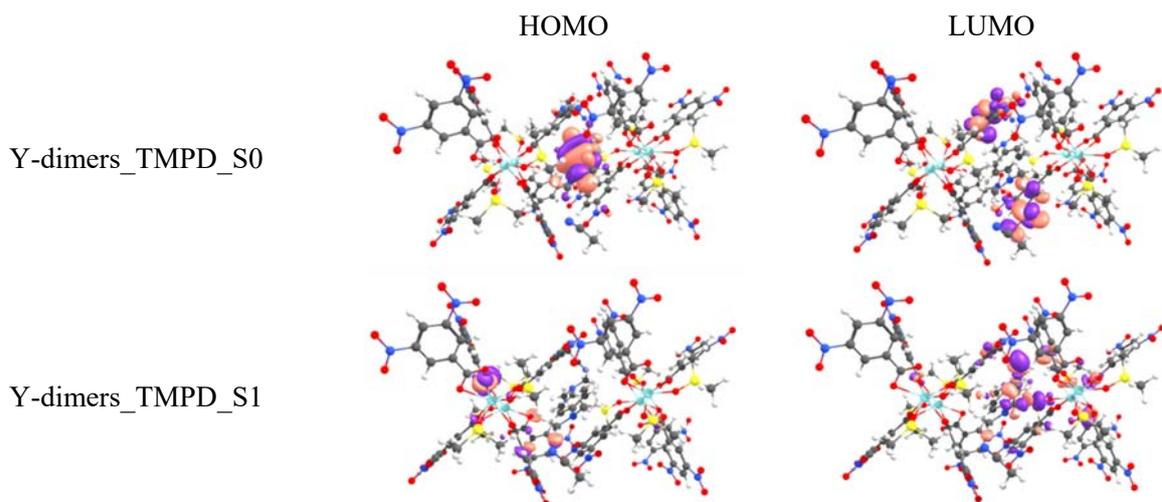


Рисунок 2. Молекулярные орбитали в комплексе Y_dimers_TMPD.

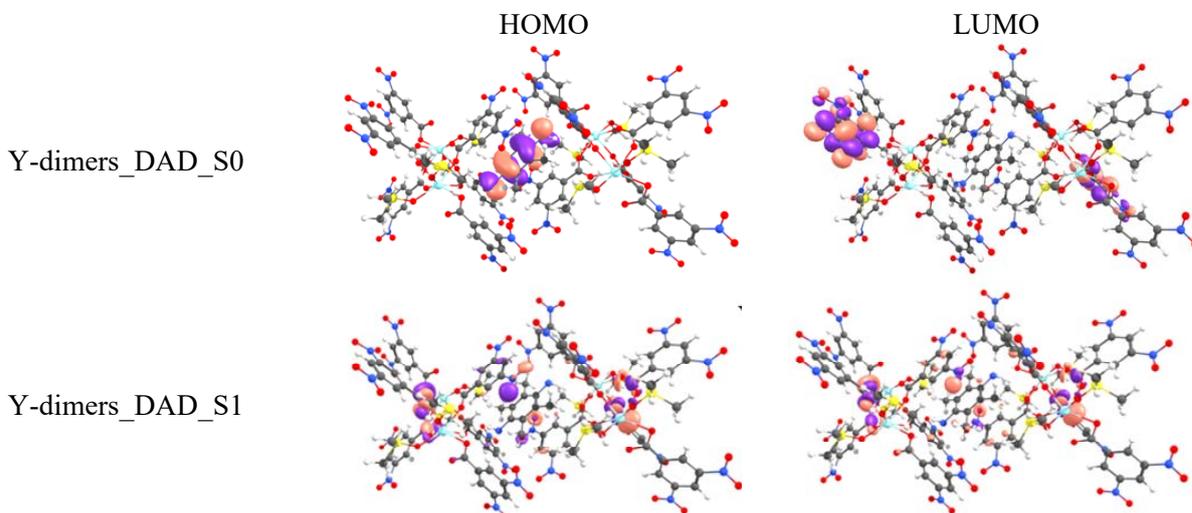


Рисунок 3. Молекулярные орбитали в комплексе Y_dimers_DAD.

Как видно из рисунков, НОМО и LUMO-орбитали комплексов остаются образованными преимущественно орбиталями фрагментов донора и акцептора соответственно. Однако их энергии изменяются, как было сказано выше.

Литература

1. Koroteev P.S., Ilyukhin A.B., Efimov N.N., et. al. // Polyhedron. 2015. V.89 P.238.
2. Koroteev P.S., Ilyukhin A.B., Efimov N.N., et. al. // Inorg. Chim. Acta. 2016. V.442 P.86.
3. F. Neese, F. Wennmohs, U. Becker, C. Riplinger, J. Chem. Phys. 2020, 152, 224108.

Изучение способности к биоразложению целлюлозы и вискозного волокнистого материала



**Бровина Софья Дмитриевна¹, Гуйван Мария Юрьевна¹,
Масталыгина Елена Евгеньевна^{1,2}, Абушахманова Зубаржат
Рафисовна^{1,2}, Овчинников Василий Андреевич^{1,3}, Сухова
Анастасия Александровна¹, Пантюхов Петр Васильевич^{1,2}**

¹Научная лаборатория «Перспективные композиционные материалы и технологии», ФГБОУ ВО «Российский экономический университет имени Г.В. Плеханова» (Москва)

²Лаборатория физико-химии синтетических и природных полимеров, ФГБУН «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля» РАН (Москва)

³Лаборатория фотобионики, ФИЦ ХФ «Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова» РАН (Москва)

Введение

Целлюлоза в нативном виде – это природный полимер, легко поддающийся биоразложению. Однако, данный материал не обладает достаточной термопластичностью и способностью к пленко- и волокнообразованию. Чтобы усовершенствовать свойства целлюлозы, создаются ее химически модифицированные производные, среди которых вискоза, которая имеет широкое применение в промышленности: изготовление вискозных неволокнистых изделий (целлофан) и прядение вискозного волокна (ткань, салфетки). Несмотря на преимущества такого материала, химические модификации могут негативно сказываться на способности к биологическому разложению. Поэтому, с целью определения влияния химической модификации на разлагаемость, было проведено исследование с помощью метода Штурма – образцы подвергались воздействию почвенных микроорганизмов в аэробной водной среде, после чего были проанализированы методами инфракрасной Фурье спектроскопии и оптической микроскопии.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования использовались следующие материалы: Референтный образец целлюлозы порошковой (ТМ «Полицелл ПЦС», ТУ 5410-029-32957739-2004, ЗАО «Полицелл», г. Владимир); материал нетканый из вискозных волокон (ТМ «Спанлейс», ООО «Авангард»); крахмал нативный растворимый (амилодекстрин) (ЧДА, ГОСТ 10163-76, ООО «Русский Химик»). Изображения образцов представлены на рисунке 1.



Рисунок 2. Объекты исследования: а) порошковая целлюлоза, б) нетканый вискозный материал, в) крахмал нативный

Целлюлоза – это линейный полимер, мономерами которого являются остатки D-глюкозы, соединенные между собой β -гликозидной связью. Состоит из двух фракций – аморфной и кристаллической, белое волокнистое вещество, нерастворимое в большинстве растворителей. Является биополимером, поэтому обладает способностью к биодegradации. Целлюлозу получают из растительного сырья, преимущественно путем варки измельченной древесной массы в химических растворах следующими методами: сульфитный, сульфатный, натронный, азотнокислый [1].

Вискоза – концентрированный раствор Na-соли ксантогената целлюлозы в разбавленном растворе гидроксида натрия. Производится с помощью обработки древесной целлюлозы водным раствором гидроксида натрия [2]. В данном случае материал изготовлен по технологии «Спанлейс», которая заключается в переплетении волокон вискозы водяными струями высокого давления – гидроструйном способе скрепления волокон в холсте [3].

Крахмал состоит из двух полисахаридов – амилозы и амилопектина, мономером которых является глюкоза. В отличие от целлюлозы, в крахмале мономеры соединяются α -гликозидной связью. Является природным полимером, который получают из органического сырья, например, картофеля, кукурузы и т.д. [4]. В испытании крахмал и целлюлоза выступают в роли контрольных (референтных) образцов для сравнения с вискозой.

Исследование динамики биоразложения проводилось по ГОСТ 32427-2013 «Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение биоразлагаемости: 28-дневный тест» (метод В): испытание по биодеградации под действием почвенных микроорганизмов по выделению диоксида углерода (метод Штурма)» [5]. Испытание проводилось в течение 98 суток при температуре (25 ± 2) °С. Установка представлена на рисунке 2.



Рисунок 3. Установка для исследования модифицированным методом Штурма

Принцип данного метода по определению биоразлагаемости веществ заключается в том, что воздух, поступающий в склянку Дрекслея с гидроксидом натрия, очищается от углекислого газа. Склянка с гидроксидом бария служит для контроля чистоты воздуха. Затем, кислород поступает в колбу, в которой содержится почвенный инокулят, приготовленный по ГОСТ 9.060-75 [6], с исследуемым образцом. Микроорганизмы, подвергая образец биодеструкции, выделяют углекислый газ, поступающий в четвертую склянку Дрекслея. Углекислый газ реагирует с гидроксидом бария, в результате чего pH среды изменяется. Для определения гидроксида бария, вступившего в реакцию, проба из склянки титруется 0,1N раствором соляной кислоты до полной нейтрализации раствора. По количеству оставшейся в склянке щелочи определяется количество выделившегося углекислого газа, что и характеризует степень биоразложения. Пятая и шестая склянки нужны для контроля – их содержимое не должно изменяться при успешном выполнении эксперимента.

Анализ химического состава образцов проводили методом инфракрасной спектроскопии с преобразователем Фурье с помощью ИК-Фурье микроскопа средней области инфракрасного спектра Lumos Bruker (Германия) в соответствии с ГОСТ Р 57941-2017 «Композиты полимерные. Инфракрасная спектроскопия. Качественный анализ» [7]. Спектры снимали при температуре (22 ± 2) °С в диапазоне волновых чисел $4600-650\text{ см}^{-1}$ методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) с применением алмазного кристалла (ATR Platinum Diamond). Обработка спектров производилась с помощью программного обеспечения Bruker OPUS. Для сравнительного анализа использовали базы данных ИК-спектров NicoDom Spectral Library.

Исследование структуры материала и измерение диаметра волокна как в целом, так и составляющих его микроволокон проводилось на оптическом микроскопе Olympus BX3M-PSLED при увеличении 50 и 200x в отраженном и проходящем свете. Кроме того, получали изучали изменение внешнего вида и массы материалов в процессе разложение под действием почвенных микроорганизмов.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе испытания масса образцов в различной степени уменьшилась, что представлено в таблице 1. Потеря массы вискозы не такая значительная, как у крахмала, однако практически идентична потере массы целлюлозы, что свидетельствует о том, что эти материалы в равной степени подвергаются биодеструкции. Стоит также отметить, что в целлюлозе была обнаружена кристаллическая фракция, составляющая 2,9 % от общей массы.

Таблица 1. Снижение массы образцов после эксперимента на биоразложение в течение 98 суток (метод Штурма)

Наименование образца	Исходная масса, г	Масса остатка, г	Степень биоразложения по методу Штурма, мас.% ($\pm 2,5\%$)
Вискоза (нетканый материал)	0,5423	0,2009	67,0
	0,5726	0,1430	
	0,5956	0,2107	
Порошковая целлюлоза	0,4995	0,1538	68,3
	0,5124	0,1670	
Крахмал нативный	0,1210	0,0085	94,1
	0,1223	0,0059	

С применением ИК-спектроскопии было проведено сравнение спектров исходных образцов с образцами после метода Штурма. Было заметно появление новых пиков в диапазоне волнового числа от 1700 до 1500 см^{-1} , что соответствует колебаниям N-H связей, входящей в состав хитина. Хитин является компонентом клеточных стенок грибов и некоторых бактерий.

На оптическом микроскопе было проведено сравнение образцов до и после испытания. Исходные вискоза и целлюлоза обладали ровными волокнами, а под воздействием микроорганизмов эти волокна разрушились. На остатках нетканого материала на основе вискозы были обнаружены признаки развития микроскопических грибов.

Заключение

Согласно результатам исследования вязкозный материал не содержит химические компоненты, подавляющие развитие микроорганизмов и препятствующие биологическому разложению. Средняя степень биоразложения ксантогената целлюлозы (вискозы) составила 67,0%, а чистой порошковой целлюлозы – 68,3%. Это доказывает, что вязкозный материал является биоразлагаемым в условиях окружающей среды. Прогнозируемый срок разложения вязкозного нетканого материала составит 146 суток при условии сохранения постоянной скорости биоразложения вещества.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБОУ ВО «РЭУ им. Г.В. Плеханова». Исследования проводились с применением оборудования центра коллективного пользования ФГБОУ ВО «РЭУ им. Г.В. Плеханова».

Список литературы

1. Целлюлоза / Химический портал ChemPort.ru - [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.chemport.ru/data/chemipedia/article_4320.html (дата обращения: 23.11.2022)
2. Вязкозные волокна / Химический портал ChemPort.ru – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.chemport.ru/data/chemipedia/article_628.html (дата обращения: 23.11.2022)
3. Спанбонд, СМС, Спанлейс – в чем различие? / МедБаза – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.medbaze.ru/blog1/Spanbond_SMS_Spanleys_v_chem_razlichie.html (дата обращения: 22.11.2022)
4. Биоразлагаемые материалы на основе растительных полисахаридов для упаковки пищевых продуктов. Часть 3: исследование способности к биоразложению / И.Ю. Потороко, А.В. Малинин, А.В. Цатуров, А.М.Я. Кади, Н.А. Ботвинников, З.Ю. Генжак // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. - Научная электронная библиотека «КиберЛенинка» - [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/biorazlagaemye-materialy-na-osnove-rastitelnyh-polisaharidov-dlya-upakovki-pischevyh-produktov-chast-3-issledovanie-sposobnosti-k> (дата обращения: 23.11.2022)
5. ГОСТ 32427-2013. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Определение биоразлагаемости: 28-дневный тест. Принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 5 ноября 2013 г. N 61-П): дата введения 2014-08-01. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200107611?ysclid=latl6yln38893512129> (дата обращения: 22.11.2022)
6. ГОСТ 9.060-75. Единая система защиты от коррозии и старения. Ткани. Метод лабораторных испытаний на устойчивость к микробиологическому разрушению. Введен в действие постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 15.12.75 N

- 3899: дата введения 1977-01-01. - [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200015033?ysclid=latlfkтуib49633615> (дата обращения: 22.11.2022)
7. ГОСТ Р 57941-2017. Композиты полимерные. Инфракрасная спектроскопия. Качественный анализ. Утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 ноября 2017 г. N 1731-ст: дата введения 2018-06-01. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200157582?ysclid=latlibah9e473056824> (дата обращения: 22.11.2022)

Защитные озоностойкие покрытия на основе бутилкаучука и этилен-пропилен-диенового каучука

**Булчевская А.Д.¹, Беляева Н.О.¹, Сухарев Н.Р.²,
Сухарева К.В.^{1,2}, Попов А.А.^{1,2}**

¹ФГБОУ ВО Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова,
г. Москва, Россия;

²ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
г. Москва, Россия;
e-mail: sukhareva.kv@rea.ru

Известно, что одной из основных причин старения и деструкции эластомерных материалов является их разрушение под воздействием озона. В данной работе было проведено исследование влияния озона на структуру эластомерных смесей на основе бутилкаучука (БК-1675) и этилен-пропилен-диенового каучука (СКЭПТ-40) в зависимости от соотношения эластомеров в смеси, а также от количества введённого хлорсодержащего модификатора. Были получены эластомерные смеси на основе бутилкаучука, этилен-пропилен-диенового каучука с соотношением каучуков в смеси 50/50 и 60/40, а также их смесь БК/СКЭПТ 50/50 с введённым хлорсодержащим модификатором в количестве 5 и 10 м.ч. Озонирование образцов проводилось в эксикаторе при постоянном продувании его озоном, концентрация озона в эксикаторе поддерживается на уровне 1,6 мг/л. Время выдержки образцов составило 63 часа. Образцы выдерживались в эксикаторе в нерастянтом состоянии. Исследование образцов, подвергнутых озонной деструкции, проводилось с помощью метода инфракрасной спектроскопии на ИК-Фурье микроскопе LUMOS Bruker кристалл — алмаз / селенид цинка (Германия). Спектры снимали при температуре (24±2)°С в диапазоне длин волн 4000-600 см⁻¹ с помощью метода неполного внутреннего отражения (НПВО). ИК-спектры образцов до и после озонного воздействия представлены на рисунках 1-4.

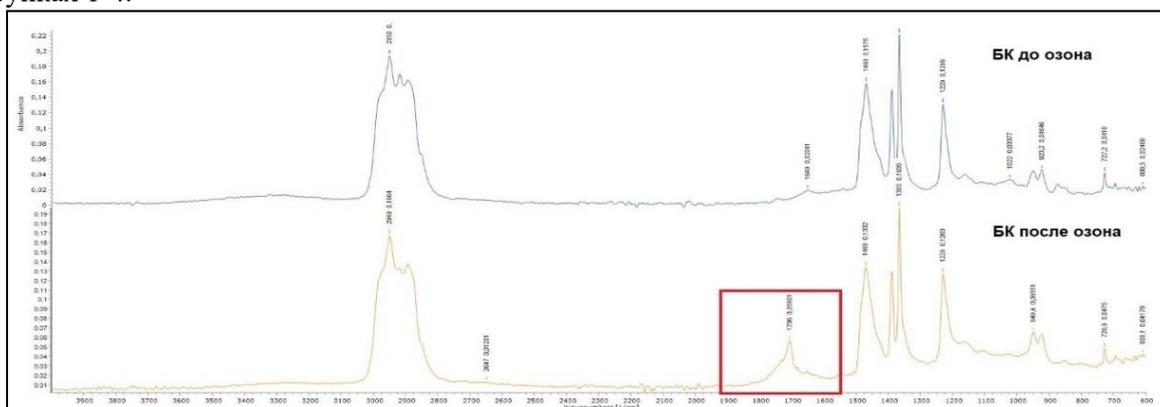


Рисунок 1 — ИК-спектры бутилкаучука (БК) до и после воздействия озона

Анализ спектров поглощения образцов полученных смесей показал, что у всех образцов смесей после 63 часов озонного воздействия появляется ярко выраженный пик в области 1720 см⁻¹. В области валентных колебаний 1720 -1725 см⁻¹ появляется довольно интенсивная полоса поглощения, характерная для валентных колебаний карбонильной группы [1]. При сравнении интенсивности пика в области 1720 см⁻¹ видно, что наибольшей интенсивностью этот пик обладает у образцов на основе чистого бутилкаучука (рисунок 4). Так же на рисунке 3 видно, что, в области 1300-1000 см⁻¹ появляется общее поглощение, характерное для окисленных полимеров и отсутствуют полосы поглощения в области 3350-3500 см⁻¹, характерные для валентных колебаний

гидроксильных группы [2]. По всей видимости озонное окисление вызывает накопления в образцах озонидов (полосы поглощения при 1100, 1062 см⁻¹)[3-4]. По мере снижения количества бутилкаучука в смеси, интенсивность полосы поглощения на 1720 см⁻¹ снижается, что может указывать на то что в смесях на основе БК и СКЭПТ стойкость к озону тем больше, чем меньше БК в смеси.

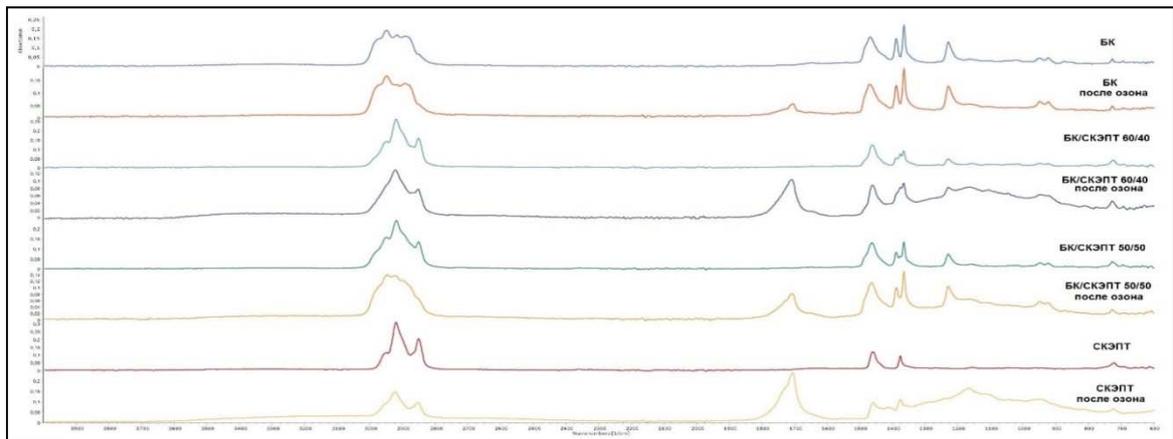


Рисунок 2 -- ИК спектры образцов смесей на основе СКЭПТ и БК до и после озонирования

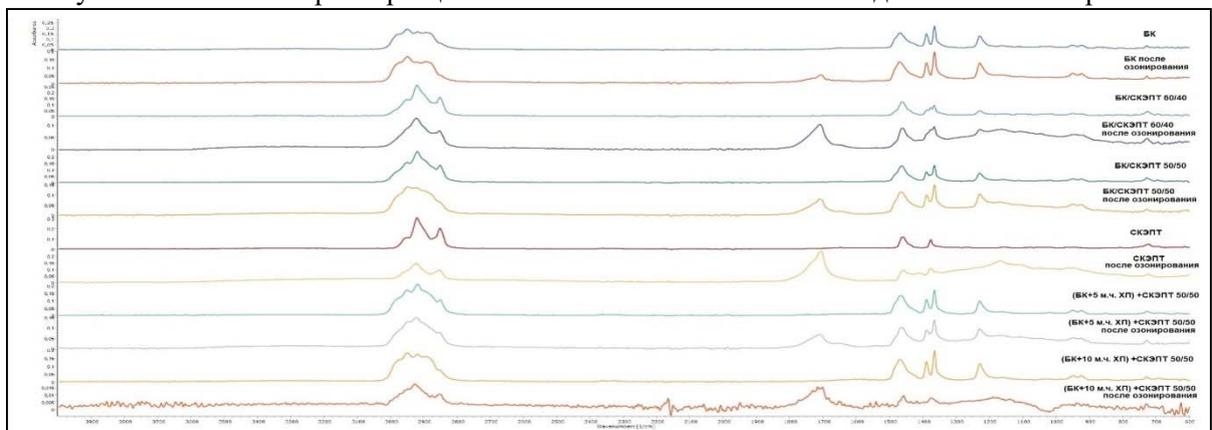


Рисунок 3 – ИК спектры образцов смесей на основе СКЭПТ и БК, а также смесей с хлормодификатором до и после озонирования

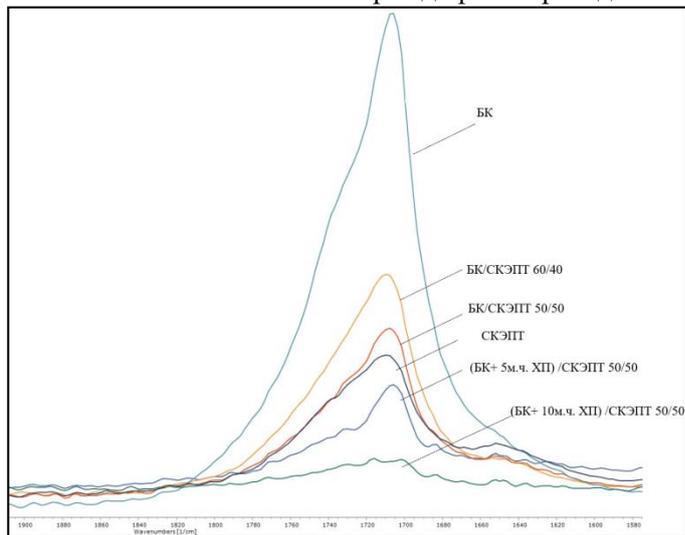


Рисунок 4 -- ИК спектры образцов смесей на основе СКЭПТ и БК после озонирования, а также смесей с хлормодификатором в области валентных колебаний 1900-1580 см⁻¹

Анализ ИК-спектров образцов на основе смеси БК/СКЭПТ с введённым хлормодификатором показал, что несмотря на то, что появляются типичные пики поглощения связанный с процессами окисления каучука, в сравнении с образцами без модификатора интенсивность полос поглощения значительно ниже (рисунок 4). Таким образом, образцы с введённым модификатором обладают более высокой стойкостью к воздействию озона, чем индивидуальные каучуки БК и СКЭПТ, что свидетельствует о положительном влиянии введения хлормодификатора на стойкость материала к озонному воздействию. Увеличение количества хлормодификатора, увеличивает стабильность материала в условиях воздействия озона.

Список литературы

1. Kim Ik-Sik, Lee DooYoul, Sohn Kyung-Suk, Lee Jung-Hun, Bae JoongWoo. Characterization on the Ozone Oxidation of Raw Natural Rubber Thin Film using Image and FT-IR Analysis. *Elastomers Compos.* 2019;54(2):110-117.
2. A. H. Eng, S. Kodama, K. Nagata, and H. Kawasaki, "Reaction of Moist Ozone with Natural Rubber: A Study by Attenuated Total Reflectance Spectroscopy", *Journal of Rubber Research*, 1, 3 (1998)
3. R. Criegee, "Peroxide Reaction Mechanisms", p. 29, Interscience publishers, New York, N.Y., 1962
4. R. W. Keller, "Oxidation and Ozonation of Rubber", *Rubber Chemistry and Chemical Technology*, 58, 3 (1985).

Новые замещенные субфталоцианины бора как перспективные молекулы-кандидаты в тераностике

**Бурцев И.Д., Егоров А.Е., Костюков А.А., Дубинина Т.В.,
Кузьмин В.А.**

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва

В настоящее время повышенный интерес представляют соединения, которые можно использовать в комбинированной фототерапии и диагностике заболеваний. Такие молекулы обладают структурными особенностями, которые обеспечивают как фотодинамическую активность, так и интенсивную флуоресценцию в видимой области.

Субфталоцианины (SubPc), описываемые в данной работе, представляют интерес благодаря особенностям строения их молекул: в отличие от аналогов фталоцианинов, данные соединения обладают конусообразной структурой с меньшим контуром сопряжения, вследствие чего обладают большей растворимостью в полярных растворителях, интенсивным поглощением в видимой области и потенциально фотохимически активны, оставаясь при этом термо- и фотостабильными.

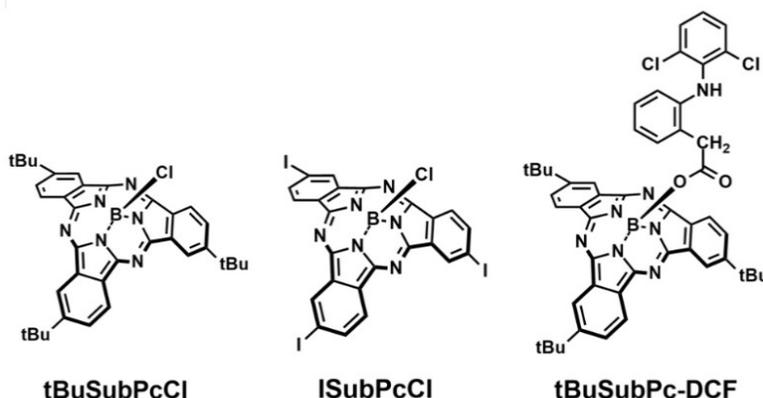


Рисунок 1. Структурные формулы части исследуемых субфталоцианинов.

Новые производные субфталоцианинов были исследованы методом электронной спектроскопии поглощения и характеризуются интенсивным поглощением в оранжевой области 550-580 нм.

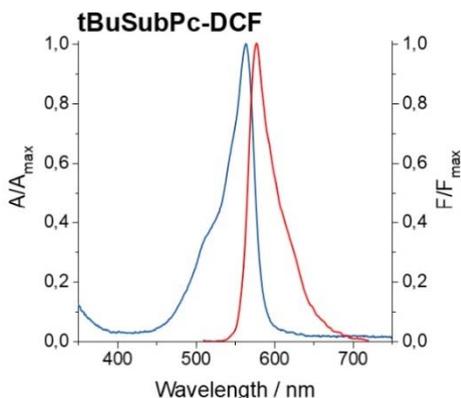


Рисунок 2. Нормализованные спектры поглощения и флуоресценции, характерные для субфталоцианинов.

Результаты, полученные в работе с новыми производными субфталоцианинов, показывают зависимость фотохимических характеристик от природы аксиальных заместителей в молекуле: наиболее перспективными соединениями оказались иодзамещенный и трет-бутилзамещенный субфталоцианины. Были зарегистрированы спектры флуоресценции и времена жизни флуоресценции, рассчитаны квантовые выходы (Φ_f) относительно стандарта родамина 6G. Исследуемые фталоцианины обладают интенсивной флуоресценцией в области 550-580 нм ($\Phi_f \sim 0.1 - 0.50$), что позволило применить их в дальнейших клеточных испытаниях. Соединения характеризуются различными временами жизни флуоресценции в зависимости от заместителей: эффект тяжелого атома для галогенсодержащих молекул приводит к понижению времени жизни флуоресценции вплоть до 0.3 нс для иодзамещенного производного, а заместители по типу трет-бутила приводят к стерическим затруднениям для вращения молекулы и повышению жесткости структуры (время жизни флуоресценции 3 нс). Для конъюгатов с диклофенаком время жизни флуоресценции снижается от 3 нс до 2 нс ввиду стерических затруднений и непланарной геометрии молекул.

Для представленных субфталоцианинов методом импульсного фотолиза были зарегистрированы спектры триплетного поглощения. Все соединения характеризуются наличием интенсивного триплетного сигнала в области 400-500 нм, а также полосой выцветания в области 500-600 нм, соответствующей синглетному состоянию. Кинетики гибели соответствуют закону первого порядка. Времена жизни триплетного состояния варьируются от 3 мс до 0.6 мс в зависимости от природы заместителя, что было указано выше.

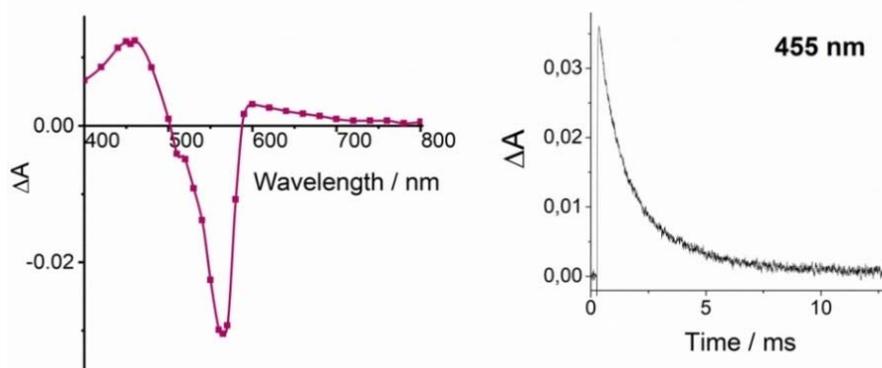


Рисунок 3. Дифференциальный триплет-триплетный спектр поглощения субфталоцианина $tBuSubPcCl$ в ацетонитриле (5×10^{-7} М, время вспышки 150 мкс) (слева). Кинетика гибели триплетного состояния на 455 нм (справа).

По спектрам люминесценции синглетного кислорода были рассчитаны квантовые выходы синглетного кислорода (Φ_Δ) для исследуемой панели соединений. Квантовые выходы синглетного кислорода максимальны для $ISubPcCl$ ($\Phi_\Delta = 0.85$), что согласуется со структурными особенностями этого соединения, содержащего в структуре тяжёлый атом иода, который сильно ускоряет процесс интеркомбинационной конверсии. Наименьшие значения квантовых выходов синглетного кислорода наблюдали для соединений, не содержащих тяжелых атомов, но имеющих в структуре такие группы, как фенил, феноксил и трет-бутил, приводящие к повышенной вибрационной релаксации.

Испытания цитотоксичности показали, что конъюгаты субфталоцианинов с диклофенаком при облучении красным светом раковых клеточных линий A431 имеют значения $IC_{50} = 2 - 0.4$ мкМ. Это подтверждает результаты по образованию триплетного состояния и синглетного кислорода, полученными фотохимическими методами. Также методом конфокальной микроскопии были зафиксированы флуоресцентные сигналы субфталоцианинов и определена их локализация в лизосомах клеток. Таким образом, исследованные субфталоцианины обладают низкой темновой токсичностью, что говорит о высоком потенциале этих соединений для комбинированной фототерапии и диагностики.

Перечень публикаций, в которых опубликованы результаты данной работы

- 1) Дубинина Т.В., Бурцев И.Д., Егоров А.Е., Костюков А.А., Кузьмин В.А., Милаева Е.Р. Синтез и фотохимические свойства замещенных субфталоцианинов бора – перспективных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии / 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим-Россия 2021», 2021, 1, 121. Doi: 10.19163/MedChemRussia2021-2021-121

- 2) Burtsev I.D., Dubinina T.V., Egorov A.E., Kostyukov A.A., Shibaeva A.V., Agranat A.S., Ivanova M.M., Sizov L.R., Filatova N.V., Rybkin A.Y., Varakina E.V., Bunev A.S., Antonets A.A., Milaeva E.R., Kuzmin V.A. Substituted boron subphthalocyanines – Prospective compounds for theranostics: Synthesis, photochemical properties and in vitro cytotoxicity / *Dyes and Pigments*, 2022, 207, 110690. Doi: 10.1016/j.dyepig.2022.110690

Влияние условий синтеза, хранения и эксплуатации комплексных перевязочных препаратов на основе модифицированной целлюлозы на процесс их деструкции



А.А. Ванюшенкова¹, А.Н. Морозов², А.А. Белов¹

¹*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
каф. биотехнологии,*

125480 г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, д.20, +7 (499) 978-95-15

²*Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,
каф. технологии неорганических веществ,*

125480 г. Москва, ул. Героев Панфиловцев, д.20, +7 (495) 495-21-57

E-mail: AVaniushenkova@yandex.ru

В медицине правильность подбора ранозаживляющего препарата принято основывать на совокупности этиологии и патофизиологии раны. Для каждой стадии необходим свой ряд критериев, которым должна соответствовать используемая система. Однако все они должны быть не аллергенны, атравматичны, биодеструктурируемы и не выделять токсичных продуктов распада в процессе эксплуатации пациентом [1,2].

Препараты, применяемые на воспалительной стадии, обязаны обладать большим перечнем свойств: они должны обеспечивать полноценное очищение от девитализированных тканей и детритных масс, обладать сорбционным, антиоксидантным, биоцидным действием; эффективно препятствовать выходу токсинов в рану и дисбалансу соотношения коллагеназа-коллаген [3]. Следовательно, разработчику подобного ранозаживляющего препарата необходимо ориентироваться на перечисленные выше свойства.

В литературе освещены преимущества внедрения в состав ранозаживляющей композиции таких компонентов, как аминокислоты [4], пептиды [5] и ферменты [6], перед применяемыми ранее химическими веществами. Применение энзиматического метода при лечении ран, т.е. удаление не жизнеспособных тканей с помощью ферментов и ферментных препаратов, является наиболее эффективным и при этом наименее болезненным для пациентов [6,7]. Для очищения девитализированных тканей сегодня используют протеолитические ферменты, которые являются наиболее лабильной составляющей комплексных препаратов. Ферментативные комплексы способствуют выведению белкового детрита с раневой поверхности. Одновременно с этим повышается снабжение прилегающих тканей кислородом и повышение циркуляции физиологических жидкостей. Системные гидролазы реализуют механизм дренажирования венозной и лимфатической системы, не давая сместиться раневому процессу в сторону хронического течения [8].

Одними из самых популярных форм ранозаживляющих препаратов являются аппликационные формы. Чаще всего в больничной практике используются повязки на основе хлопковой, реже вискозной марли, с применением дополнительных лекарственных средств.

На данный момент разработано великое множество модификаций целлюлозного волокна, отвечающих различным требованиям разработчиков. Одним из самых популярных является применение окислительных процессов с избирательным и варьиремым введением карбоксильных и карбонильных групп.

При разработке ранозаживляющих композиций нашей исследовательской группой используется метод периодатного окисления по реакции Malaprade [9]. В процессе окисления происходит образование двух альдегидных групп при разрыве глюкопиранозного кольца. Помимо этого, процесс может сопровождаться образованием различных побочных продуктов. При достаточно жестких условиях [10] процесс продолжается трансформацией альдегидных групп в карбоксильные. В водных растворах зафиксировано [11] существование полуацетальных форм, переходящих в спиртовые и/или карбоксильные группы со сменой кислотности в щелочную сторону. При сдвиге, наоборот, в кислую область, происходит снижение молекулярной массы волокна, за счет разрыва полуацеталей. Данное явление легче протекает с рыхлой аморфной

составляющей волокон, тогда как кристаллическая часть целлюлозы затрагивается только при значимом избытке окислителя. За счет неизменности высокоупорядоченной структуры, удается сохранить механические и, в частности, прочностные свойства волокна.

Диальдегидцеллюлоза занимает особое место среди модификационных форм целлюлозы. В ходе окисления, глюкопиранозное кольцо разрывается, что позволяет вывести ДАЦ из-под классификации оксигеллюлоз, однако, именно за этот счет достигается увеличение количества реакционноспособных групп [12].

Для определения процессов деструкции, происходящих в выбранных в качестве матрицы целлюлозных носителях, был проведен ряд физико-химических анализов. Так, в первую очередь были сделаны микрофотографии различных образцов целлюлозных носителей, для определения выраженных изменений структур волокна. Снимки микрофибрилл целлюлозных образцов получали на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) JSM JEOL 6510LV («JEOL», Япония). Микрофотографии нативной и модифицированной целлюлозы, где в скобках указано количество альдегидных групп на носителе изображены на рисунках 1 и 2.

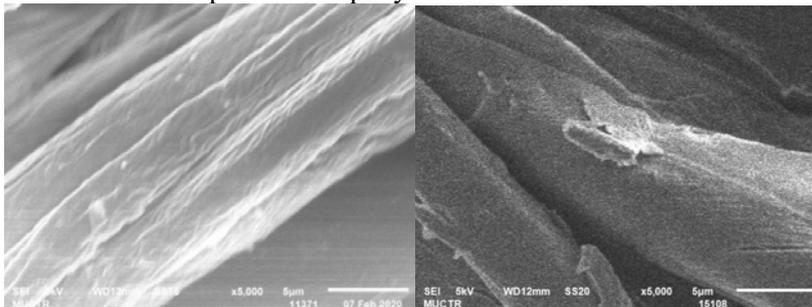


Рисунок 1. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), анализ образцов немодифицированной целлюлозы и ДАЦ(1,2) (до выдерживания в модельных условиях).

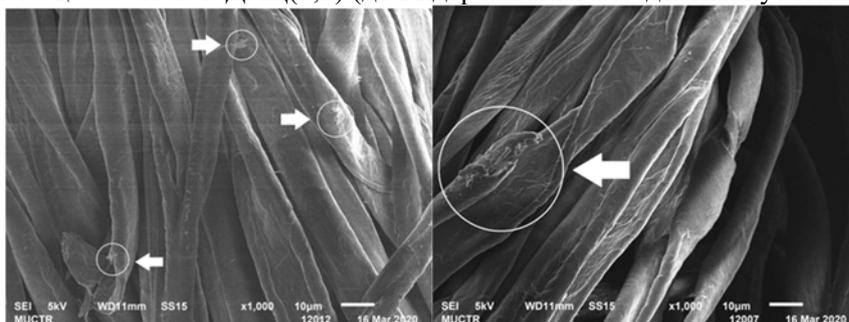


Рисунок 2. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), анализ ДАЦ (1,2), до и после выдерживания в модельных условиях (ФБ 6,2, 37°C) в течение 744ч.

Волокна целлюлозы на первом снимке относительно плотно упакованы, отличаются упорядоченностью, целостность волокон сохраняется. После окисления наблюдается разрыхление фрагментов волокон, видны сколы волокон, происходит образование чешуек материала. Структура волокон после выдерживания материала в модельной среде различна: наряду с гладкими волокнами присутствуют волокна с не до конца отделившимися чешуйками. Уменьшается толщина волокон по отношению к не деструктурированным образцам (Рисунок 2).

Анализ строения целлюлозных волокон, полученных с помощью СЭМ показывает нарушение структуры нативной целлюлозы после периодатного окисления. Это отчетливо видно по отслоению «чешуек» материала и выраженным сколам, отмеченным на рисунке 1. Данный факт не раз был освещен в литературе [13] и с ним, возможно, связано изменение санитарно-химических и механических свойств периодат окисленной целлюлозы по сравнению с нативной целлюлозой.

Для уточнения картины гидролитической деструкции матрицы, увиденной на снимках СЭМ, были сняты UV-Vis-спектры вытяжек исследуемых целлюлозных носителей. Результаты представлены на рисунках 3 и 4.

Из спектральных картин целлюлозы видно, что исходный носитель также подвержен гидролизу, но с меньшей скоростью и интенсивностью реакции, что отмечается на рисунке 3 в области 240 нм. Кроме того, значительность пика при 200 нм может быть обусловлена наличием изначально окисленных фрагментов матрицы, полученных в ходе предобработки и отбеливания целлюлозного волокна при производстве.

По спектрам ДАЦ(1,20) видно формирование, интенсификацию и последующее угасание пологого пика в области 240-280 нм характерное для структур, содержащих карбонильные группы. В особенности, отмечается пик при 240 нм, характерный для енольных форм дикарбоновых соединений. В литературе [11] подобное явление образования и угасания пика описывается деполимеризация больших карбоксильных осколков до дикарбоновых соединений с последующей их деградацией в кислоты.

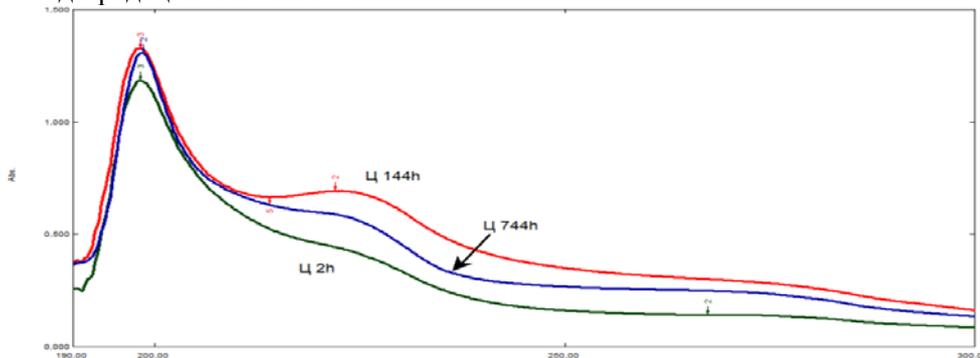


Рисунок 3. UV-Vis спектры вытяжек целлюлозы в 1/15М ФБ 6,2 при 37°С через 2, 144, 744 часа.

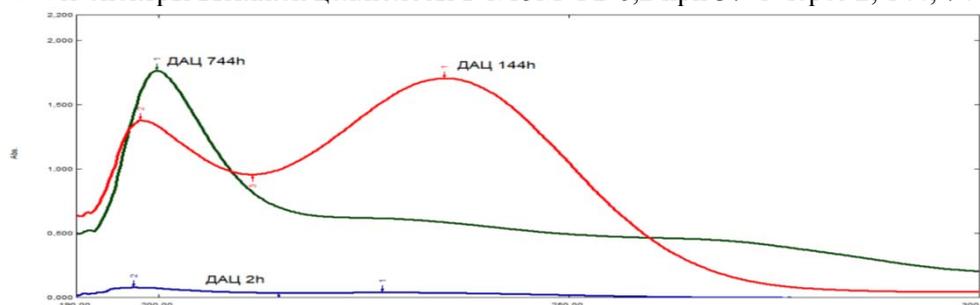


Рисунок 4. UV-Vis спектры вытяжек ДАЦ(1,20) (разбавлены в 10 раз) в 1/15М ФБ 6,2 при 37°С через 2, 144, 744 часа.

Интенсификация пика, лежащего в области 190-205 нм, соответствующего свечению –СНО и –СООН группы, указывает на образование альдегидсодержащих осколков и карбоновых кислот. Отмечается значительное увеличение данного пика по истечении 144-216 часов, объясняемое дальнейшим фрагментированием образовавшихся ранее структур до разорванных мономерных звеньев.

Для дальнейшего анализа процессов, происходящих с матрицей в процессе гидролитической деструкции были проведены исследования при помощи ИК-спектроскопии. Для проведения эксперимента образцы целлюлозных носителей помещались в модельную среду 1/15М ФБ (рН 6,2 и 37°С) на определенные временные отрезки. Были сделаны спектры носителей как до, так и после гидролиза в течение разных промежутков времени. Полученные данные представлены в таблице 1.

Согласно литературным данным [14], известно, что характеристические полосы ДАЦ отражены в областях близких к 1740 и 880 см⁻¹. Полоса на 1740 см⁻¹ характерна для образования карбонильных групп; в литературе [15] показано, что данная область характеризуется образованием производных альдегидов в процессе периодатного окисления. Образование пика при 880 см⁻¹ предположительно, можно соотнести с наличием полуацетальной и гидратированной форм.

Таблица 1. Соотнесение интенсивности свечения и характеристических полос, характерных для целлюлозных носителей.

Препарат	О-Н спиртовые	О-Н колебания	С-Н колебания	С=О вращения	С=О карбони-лы	С=C алкены	С=C ароматика	СН ₂	Целлюлоза, лигнин	С-Н целлюлоза, гемицеллюлоза	О-Н фено-лы	О-Н спирты и алифатиче-ские эфиры	С-О валентное колебание	β- гликозид-ные связи
ДАС(1,2) 0h	w	w	w	-	vw	vw	vw	w	w	w	w	w	m	m

DAC(1,2) 2h	w	w	w	-	-	w	vw	w	w	w	w	m	m
DAC(1,2) 24h	w	w	w	-	-	vw	vw	w	w	w	w	s	m
DAC(1,2) 48h	w	w	w	vw	-	vw	vw	w	w	w	w	s	m
DAC(1,2) 72h	w	w	w	vw	vw	vw	vw	w	w	-	w	s	m
DAC(1,2) 144h	w	w	w	-	-	vw	vw	w	w		w	s	m
DAC(1,2) 216h	w	-	w	vw	vw	vw	vw	w	w	-	w	s	m
DAC(1,2) 504h	w	w	w	-	-	w	-	w	w	w	w	s	m
DAC(1,2) 816h	w	-	w	vw	vw	vw	vw	w	w	w	w	m	w

, где

Vw – крайне слабое изменение показателей,

W - слабое изменение показателей,

M – умеренное изменение показателей,

S – существенное изменение показателей изменение показателей.

Как видно из полученных данных, для образцов целлюлозы не образуется новых характеристических полос в ходе процесса деструкции, из чего можно сделать вывод об отсутствии серьезных изменений, затрагивающих структуру полимера. Для образцов ДАЦ высокой степени окисления, отмечаются изменения, затрагивающие область 1800–1600 см⁻¹, являющейся маркером альдегидных групп, полученных при окислительной модификации. Кроме того, наблюдается уменьшение интенсивности свечения в области 900 см⁻¹, связанное, по мнению авторов [15], с разрушением ацетальных связей. Согласно таблице 1, отмечается снижение процессов деполимеризации при значительном времени выдерживания образцов в модельных условиях. Это объясняется снижением интенсивности изменений пика, характеризующего наличие β-гликозидных связей в образцах.

Было отмечено, что при длительном хранении модифицированного целлюлозного носителя происходит изменение его характеристик. Образцы приобретают более выраженный желтый оттенок. Отмечается дефрагментация полотна, образующиеся мельчайшие фрагменты носителя создают эффект «пыли». На микрофотографиях отчетливо заметны изменения, происходящие с длительно хранившимся образцом после выдерживания в модельной среде.

Из данных полученных при изучении изменения редуцирующих веществ на матрице носителя при помощи ДНСК, можно сделать вывод, что их содержание остается неизменным; в пределах погрешности метода измерения.

Также было изучено влияние композиций на основе хитозана на различные микроорганизмы гноеродной микрофлоры, в том числе и *Staphylococcus Aureus*. Было показано, что выделившиеся фрагменты целлюлозной матрицы обладают незначительным биоцидным действием. Установлено, что внедрение хитозана способствует увеличению антимикробного действия препарата, предположительно за счет образования олигохитозанов, обладающих значительно большим биоцидным действием, нежели высокомолекулярный биополимер, при взаимодействии с входящим в состав композиции ферментом.

Из всего вышеперечисленного можно сделать вывод, что диальдегидцеллюлоза является отличной матрицей для иммобилизации на нее терапевтических агентов. Это достигается за счет образования азометиновых и других слабых связей с реакционноспособными группами целлюлозы. В условиях, моделирующих гнойную рану, происходит постепенный гидролиз носителя, способствующий поддержанию терапевтической дозировки активного вещества в течение пролонгированного периода.

Список литературы.

- [1]. Phoon P. H. Y., Hwang N. C. Deep sternal wound infection: diagnosis, treatment and prevention //Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia. – 2020. – Т. 34. – №. 6. – P. 1602-1613.
- [2]. Dong R., Guo B. Smart wound dressings for wound healing //Nano Today. – 2021. – Т. 41. – P. 101290.
- [3]. Hernández-Rangel A., Martín-Martínez E. S. Collagen based electrospun materials for skin wounds treatment //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2021. – Т. 109. – №. 9. – P. 1751-1764.

- [4]. Курцева А. А., Смахтин М. Ю., Иванов А. В., Беседин А. В. Влияние аминокислот, составляющих пептид глицил-гистидил-лизин, на регенерацию кожных ран и функцию нейтрофилов // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2008. - №3. – С. 5-10.
- [5]. Ямщикова Е. В. и др. Влияние антимикробного пептида бактенецина 5 и его укороченных фрагментов на пролиферацию фибробластов кожи человека и на процесс заживления ран у экспериментальных животных //Современные проблемы науки и образования. – 2012. – №. 3. – С. 308-308.
- [6]. Жадинский А. Н., Жадинский Н. В. Гидролитические ферменты в комплексном лечении больных с гнойными ранами //Study of modern problems of civilization. – 2020. – С. 226.
- [7]. Белов А.А. Текстильные материалы, содержащие иммобилизованные гидролазы для медицинских и косметологических целей. Получение. Свойства. Применение. //LAP LAMBERT Acad. Pub., GmbH &Co. KG, Germany - 2012. - 242 с.
- [8]. Dessler L., Rehberger A., Paukovits W. Proteolytic enzymes and amylase induce cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells in vitro // Cancer Biotherapy. 1994. Vol. 9. № 3, p. 253–263. 140.
- [9]. Malaprade L. Action of polyalcohols on periodic acid. Analytical application //Bulletin de la Societe Chimique de France. – 1928. – Т. 43. – Р. 683-696.
- [10]. Singh, M.; Ray, A.R.; Verma, P.V.K.; Guha, S.K. Potential Biosoluble Carriers: Biocompatibility and Biodegradability of Oxidized Cellulose. // Biomaterials, Medical Devices, and Artificial Organs 1979 - 7 - P. 495–512.
- [11]. Singh M., Ray A. R., Vasudevan P. Biodegradation studies on periodate oxidized cellulose //Biomaterials. – 1982. – Т. 3. – №. 1. – Р. 16-20.
- [12]. Филатов В.Н., Рыльцев В.В. Биологически активные текстильные материалы. // М. 2002.- 248с.
- [13]. Роговин З.А. Химия целлюлозы. // М.: Химия. - 1972. - С.125-244.
- [14]. Kim, U.J.; Kuga, S.; Wada, M.; Okano, T.; Kondo, T. Periodate oxidation of crystalline cellulose. // Biomacromolecules. 2000 - 1 - P. 488-492.
- [15]. Q.G. Fan, D.M. Lewis, K.N. Tapley. Characterization of Cellulose Aldehyde Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. // Journal of Applied Polymer Science. 2001 - Vol.82. - P.1195-1202.

Оптимизация характеристик облучения растений в теплицах



Е.П. Василев, студ., рук. П.А.Смирнов, к.т.н., доц.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский университет
«МЭИ», г. Москва*

Для эффективного прохождения фотобиологических процессов в растениях требуется особый спектр излучения и благоприятная внешняя среда. Это обусловлено тем, что каждому пигменту соответствует свой индивидуальный спектр поглощения и, соответственно, своя спектральная характеристика световой активности возбуждающего излучения[1]. Для достижения максимально возможного результата при выращивании в условиях закрытого грунта, необходимо понимание, при каких параметрах и условиях внешней среды, будет наилучший результат в виде биомассы/плодов[2].

Для эффективного прохождения разнообразных фотобиологических процессов в растениях требуется особый спектр излучения. Это обусловлено тем, что каждому пигменту соответствует свой индивидуальный спектр поглощения и, соответственно, своя спектральная характеристика световой активности возбуждающего излучения[3].

Исходя из обширного литературного анализа, мной было приятно решение о создании установки с различными облучательными приборами разного спектра. Поскольку на данном этапе, не ставится цель изменять спектр растений на протяжении всего цикла, а зафиксировать какой либо один из спектров для растений в ходе всего цикла, была поставлена задача подбора

спектра для облучательной установки по определённым критериям. Этими критериями стали , исходя из анализа статей, которые я провёл – основные пигменты поглощения растений, такие как – Хлорофиллы А и Б, Бета каротиноиды, Фитохромы на 660 и 730 нм. Для этого для начала мной были найдены и оцифрованы графики поглощения этих кривых. Эффективности исследуемых светодиодов на пигментах представлены ниже на Рис.1, и 2 соответственно.

Результаты, полученные в ходе этой работы, могут иметь прикладную ценность при проектировании установок для выращивания в искусственных условиях(теплицы и т.д). Это позволило дать рекомендации по спектральному составу излучения и его эффективности в различных диапазонах ФАР для эффективного прохождения процесса фотосинтеза.

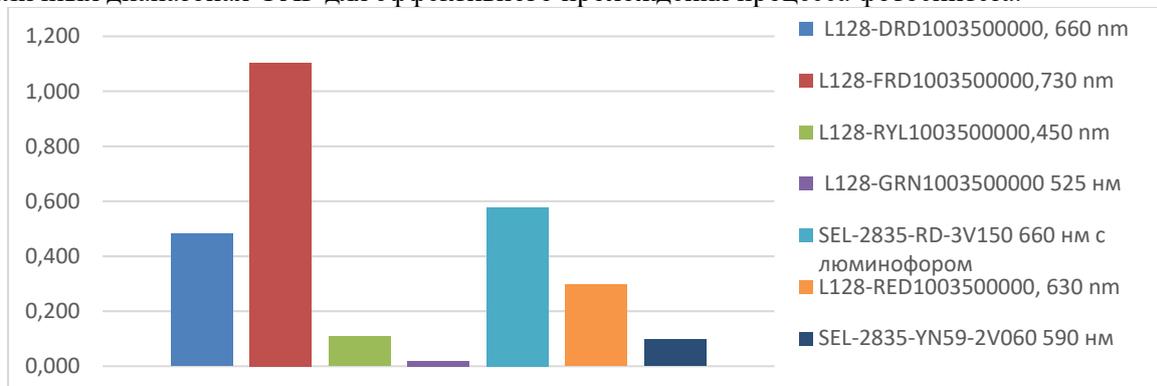


Рис.1 – Эффективность различных диодов на Фитохроме 730 нм.

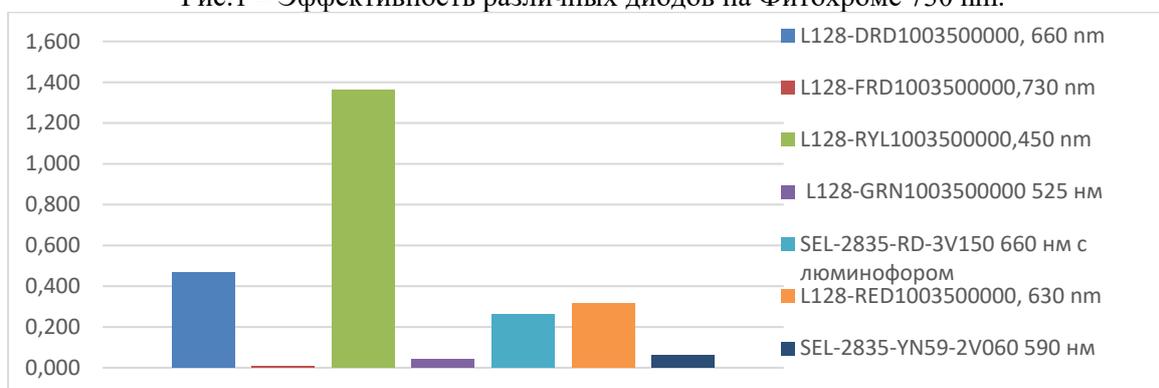


Рис.2 – Эффективность различных диодов на ХлорофиллеБ.

Литература

1. McCree, K.J. (1972) Action Spectrum, Absorptance and Quantum Yield of Photosynthesis in Crop Plants. *Agricultural Meteorology*, 9, 191-216.
2. Тихомиров А.А., Шарупич В.П. Светокультура растений: биофизические и биотехнологические основы // Изд. Сибирского отд. Российской академии наук, 2000.
3. McCree, Keith J. (1981). «Photosynthetically active radiation». In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, vol. 12A. Springer-Verlag, Berlin, pp. 41–55.

Новые спироциклические производные ципрофлоксацина, синтез и антибактериальная активность



Виноградова Л.В., Комарова К.Ю., Лукин А.Ю.

Институт Тонких Химических Технологий им. М.В. Ломоносова РТУ МИРЭА, Москва

В настоящее время резистентность к доступным антибиотикам у патогенных бактерий представляет собой глобальную проблему, так как число штаммов с множественной лекарственной устойчивостью резко увеличивается с каждым годом и распространяется по всему миру. Поэтому разработка новых антибактериальных агентов, как с повышенной эффективностью,

так и с новыми или измененными механизмами действия является актуальной и важной задачей современной медицинской химии.

Ранее в нашей лаборатории были разработаны простые методы синтеза спироциклических блоков 1-окса-9-азаспиро[5.5]ундекана посредством циклизации циклических кетонов с гомоаллиловым спиртом по Принсу под действием серной кислоты [1]. Серия полученных спироциклических соединений была модифицирована нитрофурановым фрагментом, данные соединения оказались эффективными *in vitro* против мультирезистентных *Mycobacterium tuberculosis* [2]. Поскольку мы увидели способность спироциклических фрагментов влиять на антибактериальную активность, то нашей следующей целью стало использование спироциклических соединений в разработке и синтезе фторхинолиновых антибактериальных препаратов, таких как ципрофлоксацин. Мы синтезировали и оценили антимикробный профиль фторхинолонов 1 (рис. 1), которые показали хорошую антибактериальную активность [3]. На основании этих результатов было принято решение дальше работать со фторхинолиновыми производными, содержащими различные спироциклические блоки 2 (рис.1).

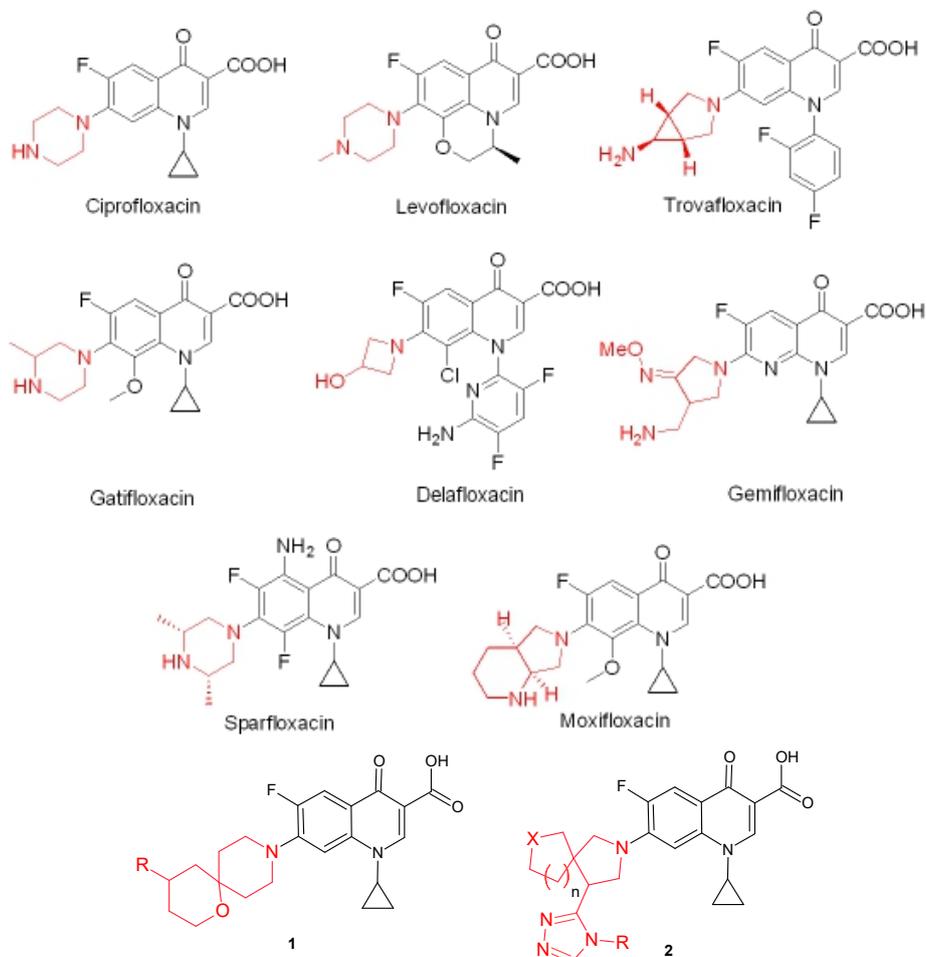


Рисунок 1. Структуры типичных одобренных фторхинолиновых антибактериальных средств, а также фторхинолонов хемотипа 1 и 2, исследованных в наших работах.

Синтез целевых фторхинолонов 2 а-к начинали с этерификации 7-хлор-1-циклопропил-6-фтор-4-оксо-1,4-дигидрохинолин-3-карбоновой кислоты (4) с получением сложного эфира 5. Последний был преобразован в комплекс 6 хелатирования бора с использованием опубликованного протокола [4]. В последнем случае хлор в положении 7 активируется в направлении нуклеофильного ароматического замещения. Соединения 7а-к были получены путем нагревания соединения 6 со спироциклическими пиперидинами 3а-к при 60 °С в присутствии триэтиламина. Хелатный комплекс бора [5] разрушали, подвергая промежуточные продукты 7а-к воздействию 2% водного раствора гидроксида натрия. В результате были получены фторхинолоны 2а-к со средними выходами (схема 1).

По схеме 1 было синтезировано 11 соединений. Структуры всех синтезированных соединений подтверждены с помощью спектроскопии ЯМР ¹H и ¹³C и масс-спектрами высокого разрешения.

Синтезированные спироциклические производные ципрофлоксацина были протестированы против бактерий группы ESKAPE с помощью диско-диффузионного теста Кирби-Бауэра в соответствии со стандартной рабочей процедурой Европейского комитета по тестированию чувствительности к противомикробным препаратам [6].

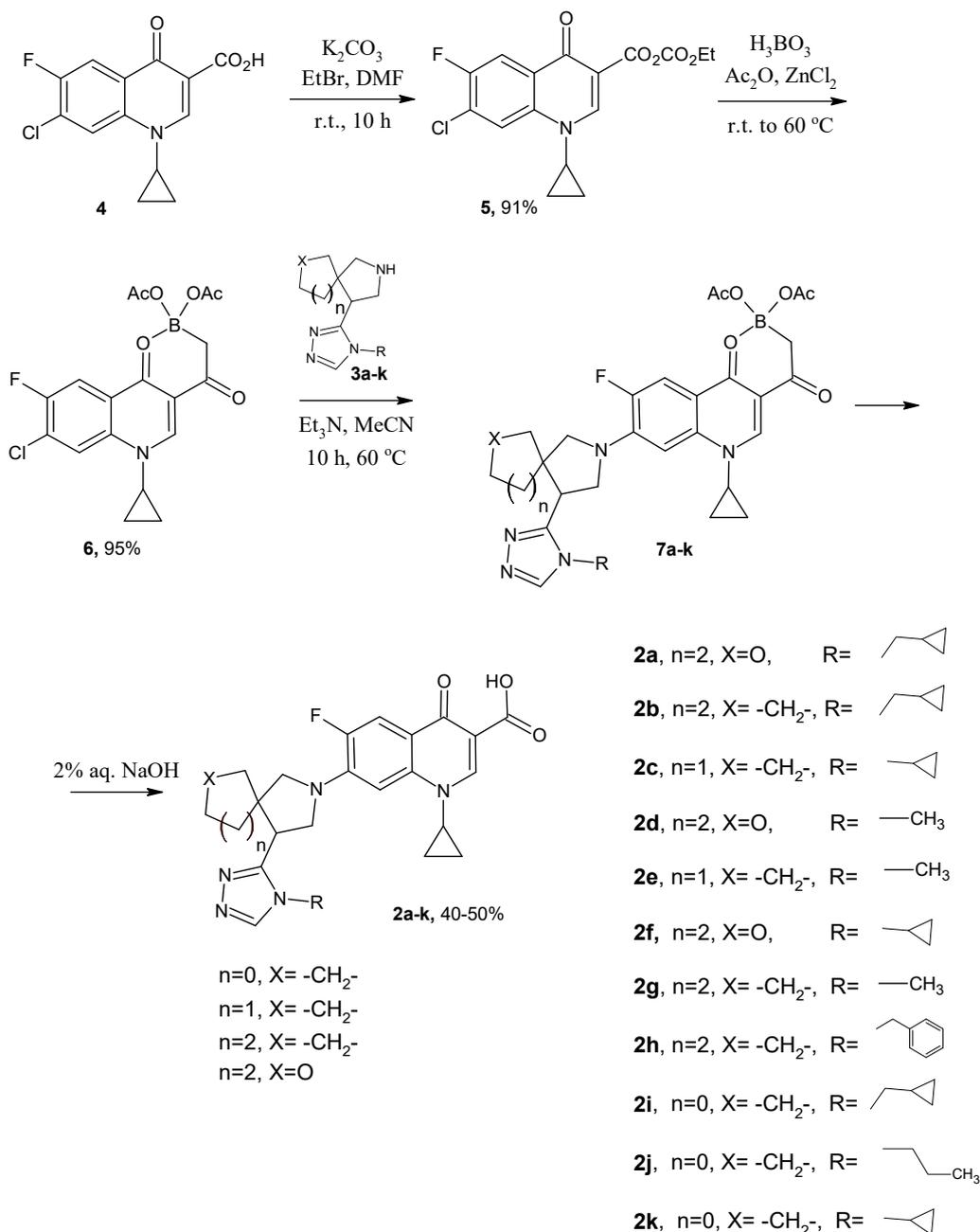


Схема 1. Синтез спироциклических фторхинолонов 2a-k.

Таблица 1. Диаметр зоны ингибирования (мм) роста бактерий соединениями 1a-k, протестированными методом дисковой диффузии Кирби-Бауэра.

Соединение	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. faecium</i>
2a	0	0	0	10	0	8
2b	0	0	0	17	0	11
2c	14	22	0	26	19	23
2d	0	0	0	5	0	0
2e	6	6	0	17	6	17
2f	0	0	0	14	0	12
2g	0	0	0	12	0	10
2h	0	0	0	9	0	0

2i	5	15	0	17	16	11
2j	9	11	7	22	10	22
2k	10	11	6	23	0	24

Согласно данным о диаметре зоны ингибирования роста бактерий (мм), приведенным в таблице 1, ряд тестируемых соединений проявили бактерицидную активность. Пять соединений (2с, 2е, 2i, 2j, 2k), которые ингибировали более одного штамма бактерий, были протестированы далее для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК, мг/мл) методом серийных разведений в бульоне.

Таблица 2. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК, \approx мг/мл), определенная для пяти соединений-лидеров.

Соединение	<i>K. pneumoniae</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. faecium</i>
2с	0.19	0,006	0,75	0,0015	0,003	0,0015
2е	0,19	0,012	>0,75	0,0015	0,003	0,0015
2i	0,012	0,012	0,75	0,0015	0,003	0,003
2j	>0,75	0,1	>0,75	0,0015	0,006	0,006
2k	0,025	0,006	0,75	0,0015	0,003	0,003
Ципрфлоксацин	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

Новый набор спироциклических производных ципрофлоксацина был отчетливо активен в отношении пяти из шести штаммов бактерий. Большая группа соединений проявляла такую же или более высокую активность, что и ципрофлоксацин. Эти результаты существенно расширяют возможности использования спироциклических мотивов в разработке лекарственных препаратов.

1. Lukin, A.; Vagnyukova, D.; Kalinchenkova, N.; Zhurilo, N.; Krasavin, M. *Tetrahedron Lett.* 2016, 57, 3311-3314.
2. Krasavin, M.; Lukin, A.; Vedekhina, T.; Manicheva, O.; Dogonadze, M.; Vinogradova, T.; Zabolotnykh, N.; Rogacheva, E.; Kraeva, L.; Sharoyko, V.; Tennikova, T. B.; Dar'in, D.; Sokolovich, E. *Eur. J. Med. Chem.* 2019, 166, 125-135.
3. Lukin, A.; Chudinov, M.; Rogacheva, E.; Kraeva, L.; Bakulina, O.; Krasavin, M. Exploration of spirocyclic derivatives of ciprofloxacin as antibacterial agents. *Molecules* 2022, 27, 4864
4. Zhang, Y.-B.; Feng, L.-S.; You, X.-F.; Guo, Q.; Guo, H.-Y.; Liu, M.-L. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2010, 343, 143-151.
5. Turel, I.; Leban, I.; Bukovec, P.; Barbo, M. *Acta Crystallogr. C* 1997, 53, 942-943.
6. E. Matuschek, D. F. J. Brown, G. Kahlmeter, *Clin. Microbiol. Infect.* 2014, 20, O255-O266.

Развитие методов расчета оптических спектров внутриклеточных индикаторов кальция



Волдаева О.Н., Клещина Н.Н., Боченкова А.В.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия

Fura-2 – один из флуоресцентных красителей, широко используемый для визуализации свободных ионов Ca^{2+} внутри клетки. С его помощью, например, изучают осцилляции концентрации ионов Ca^{2+} внутри тромбоцитов, что позволяет больше узнать о процессах сигнализации в этих клетках. В состав красителя входят 5 карбоксильных групп, которые могут образовывать хелатный комплекс с ионом Ca^{2+} . Исходя из литературных данных, на способность данного красителя к комплексообразованию и на его спектральные характеристики влияет pH, а также наличие других ионов в растворе.

Исследование фотофизических свойств флуоресцентных индикаторов с помощью методов квантовой химии позволяет получить информацию об основных факторах, влияющих на форму и положение их спектров в различном окружении. Однако моделирование спектров поглощения в реальном окружении – нетривиальная и до конца не решенная задача из-за наличия неоднородного уширения спектров как за счет окружения, так и конформационной подвижности красителя.

Цель данной работы – разработка методики моделирования структуры и фотофизических свойств полианионных комплексообразующих красителей на примере флуоресцентного индикатора Fura-2

в растворе и создание автоматизированного алгоритма для моделирования формы спектральных полос с учетом однородного и неоднородного уширения.

В работе предложена методика моделирования спектров поглощения комплексообразующих красителей в водном растворе в присутствии различных ионов металлов. Она включает в себя следующие этапы:

- 1) молекулярно-динамическое моделирование в NPT ансамбле при 300 К с использованием параметров силового поля CHARMM с целью выбора конфигураций для последующих этапов моделирования и усреднения;
- 2) оптимизация геометрических параметров выбранных структур с помощью метода КМ/ММ с использованием гибридного функционала PBE0 в сочетании с параметрами модифицированного силового поля CHARMM в варианте механического внедрения;
- 3) расчёт энергий вертикального возбуждения, вероятности переходов и параметров вибронной модели с помощью инвариантной многоконфигурационной квазивырожденной теории возмущений второго порядка ХМСҚDPT2 с учетом влияния окружения в рамках метода потенциала эффективных фрагментов EFP;
- 4) моделирование вибронной структуры спектра при гомогенном уширении на основе расчета перекрывания колебательных волновых функций различных электронных состояний в модели линейной связи в приближении Франка-Кондона;
- 5) расчёт интегрального электронно-колебательного спектра путем усреднения вдоль молекулярно-динамической траектории.

С использованием разработанной методики установлены основные факторы, влияющие на форму и положение полос в спектрах поглощения свободного кальциевого индикатора Fura-2, выявлены вклады однородного и неоднородного уширения, а также объяснена природа сдвига максимумов поглощения при связывании ионов кальция.

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ имени М.В. Ломоносова, а также вычислительного кластера лаборатории квантовой фотодинамики, закупленного по программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова. Работа поддержана Российским научным фондом (грант №22-13-00126).

Исследование влияния окислительной модификации на структуру и функциональную активность плазминогена



**Гаврилина Е.С.¹, Васильева А.Д.¹, Юрина Л.В.¹, Иванов В.С.¹,
Гусарова Д.Ю.¹, Индейкина М.И.², Бугрова А.Е.¹, Кононихин А.С.³,
Николаев Е.Н.³, Розенфельд М.А.¹**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Московский физико-технический институт

(национальный исследовательский университет)», Москва, Россия

³ Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологий», Москва, Россия

Белки являются восприимчивой мишенью для активных форм кислорода (АФК). Известно, что у белков, которые подвергаются воздействию АФК, могут наблюдаться химические и структурные повреждения, приводящие к изменению их биологических функций. Характер этих нарушений во многом зависит от структуры белка и от природы АФК. Действие АФК на белок может вызывать окисление боковых цепей аминокислотных остатков, образование межбелковых поперечных сшивок и окисление белкового остова, приводящее к фрагментации белка. Имеются убедительные доказательства того, что окислительно поврежденные белки накапливаются при старении, окислительном стрессе и различных заболеваниях. Поэтому выявление посттрансляционных модификаций в первичной структуре белков, подвергающихся окислительному стрессу, представляет большой интерес.

Поскольку плазмин(оген) относится к классу сериновых протеаз и обладает типичной для данного класса белков структурой (крингл-домены, сериновый протеазный домен),

идентификация посттрансляционных сайтов в молекуле плазминогена, профермента плазмина, подвергающегося окислительному стрессу, может способствовать пониманию общего механизма поддержания структуры и функций других сериновых протеаз в организме под действием АФК.

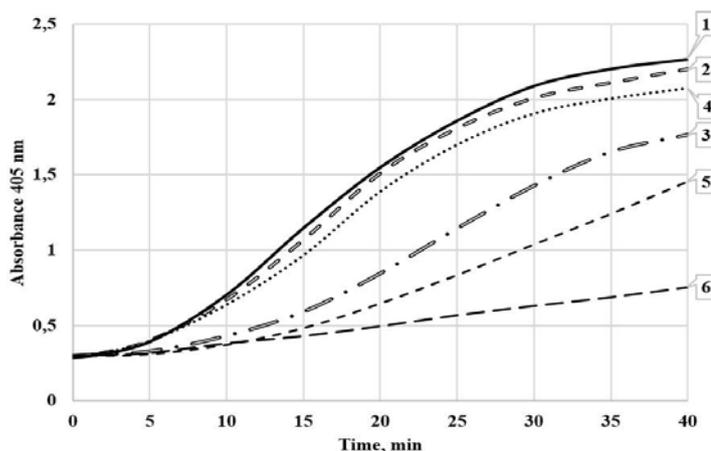
Glu-плазминоген циркулирует в плазме крови в виде одноцепочечного белка, содержащего 791 аминокислотный остаток. Его полипептидная цепь свернута в семь глобулярных доменов: N-концевой домен (Pan-apple, PAp: Glu1-Lys77), пять последовательно расположенных крингл-доменов, KR-1 (Lys78-Glu164), KR-2 (Glu165-Tyr264), KR-3 (Arg265-Ala347), KR-4 (Pro348-Asp461), KR-5 (Cys462-Ala542) и сериновый протеазный домен (SP), включающий остатки Val562-Asn791. Домен SP связан с KR-5 активационной петлей (Ala543-Arg582), часть которой (Val562-Arg582) структурно принадлежит домену SP.

Протеолитическая активация плазминогена происходит за счет гидролиза пептидной связи Arg561-Val562 в SP домене, что приводит к образованию двухцепочечной структуры (плазмина). Тяжелая цепь плазмина (Glu1-Arg561) связана двумя дисульфидными мостиками с легкой цепью (Ala562-Asn791), содержащей каталитическую триаду: His603, Asp646 и Ser741.

Целью данного исследования было определение влияния гипохлорит- и пероксид-индуцированного окисления плазминогена на модификацию отдельных участков в первичной структуре профермента и активность плазмина, образующегося из окисленного плазминогена.

Методом электрофореза в ПААГ было установлено, что независимо от выбранной концентрации $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ и H_2O_2 не происходит ни фрагментации полипептидной цепи, ни образования межмолекулярных ковалентных сшивок. Также не наблюдалось влияния окисления на способность стрептокиназы активировать плазминоген.

Изменение активности плазмина, образованного из плазминогена, окисленного разными концентрациями $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ и H_2O_2 , оценивали колориметрическим методом. Обработка плазминогена 100 мкМ H_2O_2 или 25 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ не оказывала статистически значимого влияния на активность окисленного плазмина. Однако при более высоких концентрациях окислителей активность окисленного плазмина значительно снижалась.

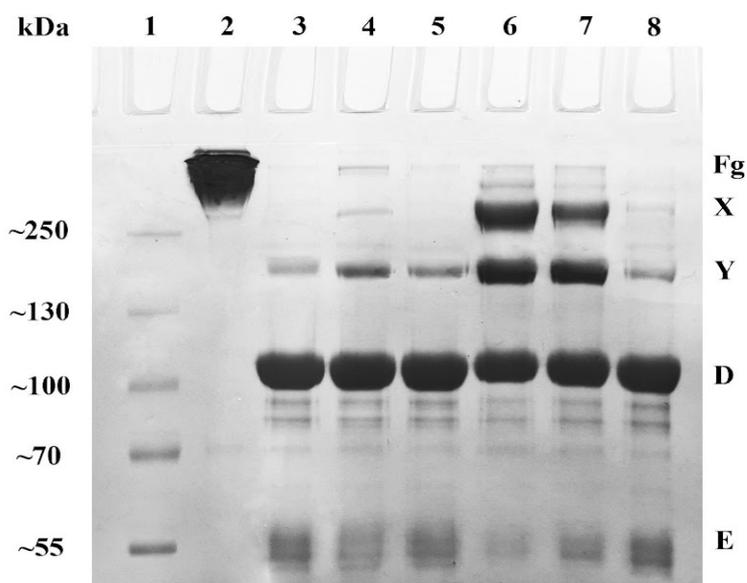


Влияние окислителей на активность плазмина, образующегося из нативного плазминогена (1); плазминоген, обработанный 100 и 300 мкМ H_2O_2 (2 и 3); плазминоген, обработанный 25, 50 и 100 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ (4–6).

Кроме этого, активность плазмина оценивали по гидролизу фибриногена. Плазмин-опосредованный гидролиз фибриногена приводил к накоплению продуктов деградации фибриногена, фрагментов X, Y, D и E. Окисление плазминогена 100 мкМ H_2O_2 или 25 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ практически не влияло на накопление продуктов деградации фибриногена по сравнению с таковым для контрольного образца. При более высокой концентрации окислителей (50 и 100 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ и 300 мкМ H_2O_2) ферментативная активность молекул плазмина снижалась, о чем свидетельствует снижение содержания продукта поздней деградации фибриногена – фрагмента E, увеличение количества ранних и промежуточных продуктов, фрагментов X и Y, при сохранении некоторого количества исходного фибриногена.

При изучении окислительной модификации плазминогена методом масс-спектрометрии анализировали контрольные образцы (необработанные окислителями) и окисленные разными количествами окислителей. Увеличение процента содержания окисленных и снижение содержания неокисленных пептидов наблюдали в различных окисленных образцах (обработанных 25, 50 и 100 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ или 100 и 300 мкМ H_2O_2) по сравнению с нативным плазминогеном.

В контрольном образце, за исключением двух остатков метионина, Met182 и Met404, которые участвовали в модификации с образованием сульфоксида метионина, все 8 дополнительных остатков Met, идентифицированных в первичной структуре необработанного плазминогена, остались незатронутыми.



Электофореграмма продуктов деградации фибриногена: 1 - маркерные белки; 2 - нативный фибриноген; продукты деградации фибриногена, продуцируемые плазмином, образованным из 3 - нативного плазминогена; 4 - плазминогена, обработанного 300 мкМ H₂O₂; 5 - плазминогена, обработанного 100 мкМ H₂O₂; 6 - плазминогена, обработанного 100 мкМ HOCl/OCl; 7 - плазминогена, обработанного 50 мкМ HOCl/OCl; 8 - плазминогена, обработанного 25 мкМ HOCl/OCl.

При обработке плазминогена 25 мкМ HOCl/OCl в окислительную модификацию вовлекались только остатки метионина и триптофана. Было обнаружено, что вместе с Met182 и Met404 окисляются дополнительные остатки метионина, Met57, Met385 и Met788, и три остатка триптофана, Trp417, Trp486 и Trp523. При умеренном окислении плазминогена 50 мкМ HOCl/OCl мишенью для окислителя стали также некоторые остатки Туг, наряду с фрагментами Met и Trp. Действие 100 мкМ HOCl/OCl на плазминоген сопровождалось повышением степени окисления остатков без вовлечения новых фрагментов.

В плазминогене, обработанном перекисью водорода, окислительной модификации подверглись только два типа аминокислотных остатков – метионины и триптофаны. Как и в случае с гипохлоритом, степень модификации аминокислотных остатков увеличивалась в зависимости от концентрации окислителя.

За механизм снижения биологической активности плазминогена, обработанного 50, 100 мкМ HOCl/OCl и 300 мкМ H₂O₂ могут отвечать некоторые из обнаруженных модификаций в функционально значимых ароматических фрагментах.

Из литературных данных известно, что некоторые обнаруженные нами окисленные аминокислотные остатки являются функционально значимыми для молекулы плазминогена. Например, остаток Trp235 участвует в образовании солевой связи между LBS на KR2 и доменом SP. Туг672, расположенный в SP домене, образуют взаимодействия с доменом KR2. Остатки Trp417 и Trp427 расположены в гидрофобном кармане LBS KR4, и их окисление может сильно влиять на способность KR4 связываться с субстратом.

Результаты, полученные с помощью МС/МС, электрофореза и колориметрии, показали, что ни один из окисленных аминокислотных остатков, обнаруженных в проферменте, обработанном 25 мкМ HOCl/OCl или 100 мкМ H₂O₂, не был функционально значимым для плазминогена. Однако обработка плазминогена более высокими концентрациями HOCl/OCl от 25 до 100 мкМ или H₂O₂ от 100 до 300 мкМ способствовала частичной потере активности плазмина.

Предполагается, что легко окисляемые остатки Met57, Met182, Met385, Met404, Met585 и Met788 могут служить антиоксидантными мишенями и обеспечивать тем самым эффективную защиту белка от окислительного стресса. Некоторые из обнаруженных модификаций функционально значимых ароматических аминокислотных остатков (Trp235, Trp417, Trp427, Туг672 и Trp761) могут быть причиной снижения биологической активности плазминогена.

В работе использовали оборудование ЦКП ИБХФ РАН.
Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда 21-74-00146.

Сравнение сроков деградации и физико-химических свойств нетканых и пленочных материалов из полигидроксибутирата



Гаспарян К.Г., Тюбаева П.М.

¹ Российский экономический университет им. Г. В. Плеханова, Москва

² Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, Москва

В связи со сложившейся экологической ситуацией на смену привычных синтетических полимеров приходят биополимеры, особое внимание уделяют полигидроксибутирату (ПГБ), который является биоразлагаемым полимером природного происхождения. В данной работе было проведено сравнение скорости биоразложения материалов на основе ПГБ: пленки и волокон. Было установлено влияние выдержки в почвенном грунте на структуру и свойства материалов, которые оценивались методами физико-механического анализа, методом ДСК и ИК-спектроскопией.

В последние годы люди стали более осведомлены о загрязнении окружающей среды и в связи с этим начали активно развивать изучение и применение биопластика, так как он является отличной альтернативой одноразовым изделиям и может производиться и разлагаться естественно микроорганизмами [1].

На данный момент используется множество биопластиков, таких как полилактид (ПЛА), поликапролактон (ПКЛ) и полигидроксибутират (ПГБ), которые могут заменить привычные пластмассы на нефтяной основе [2].

Полигидроксибутират (ПГБ) является первым биопластиком, который был открыт в 1926 году французским исследователем Морисом Ламуаном, его открытие игнорировалось в течение многих десятилетий, потому что уголь и нефть были недорогими, но в середине 1970-х годов мировая экономика пережила нефтяной кризис и начала изучать альтернативы. В природе этот полимер синтезируется некоторыми видами микроорганизмов, он находится в цитоплазме клеток микроорганизмов в виде гранул и обычно составляет более 40% от их массы в сухом состоянии [3].

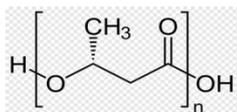


Рисунок 1 Структурная формула ПГБ

Пока ПГБ не так распространен из-за его хрупкости: он плохо растягивается и легко рвется по сравнению с другими видами биопластика [4]. Для улучшения физико-механических и других желаемых свойств добавляют различные вещества [8]: полимеры, наночастицы, металлы, пластификаторы и прочие добавки.

Полигидроксибутират применяется во многих сферах: текстильная промышленность, тканевая инженерия, биомедицинские товары, пищевая промышленность (одноразовые подносы, чашки, тарелки) [5].

В промышленности материал из ПГБ изготавливают двумя способами:

1. Пленка, полученная прямым прессованием:

Для такого прессования в основном требуется механический пресс. Процесс включает в себя дозировку материала, который помещается в пресс-форму, далее его выдерживают при температуре 130-190 °С и под давлением 20-60 Мпа, после изделие извлекается и очищается. Достоинства метода - простая конструкция пресс-форм и сравнительно малая стоимость оборудования [6].

2. Волокно, полученное электроформованием:

Готовится гомогенный раствор ПГБ с растворителем (хлороформом). Для приготовления волокнистого материала использовали устройство для электроформования, оснащенное ячейкой с раствором, иглой из нержавеющей стали, высоковольтным источником питания и вертикально

заземленным проводящим листом. После электроформования материал подвергается сублимационной сушке в течение не менее 2 дней для удаления остаточных растворителей и влаги [7].

После получения материалов мы можем провести исследование и узнать скорость разложения в подготовленной почве [9]. На рисунке 2 с помощью микроскопии мы можем рассмотреть волокно ПГБ до помещения в почву и после 8 дней разложения.

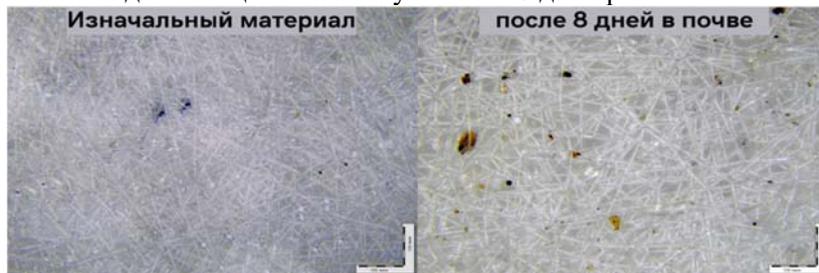


Рисунок 2 Микроскопия волокна изначального и после помещения в почву

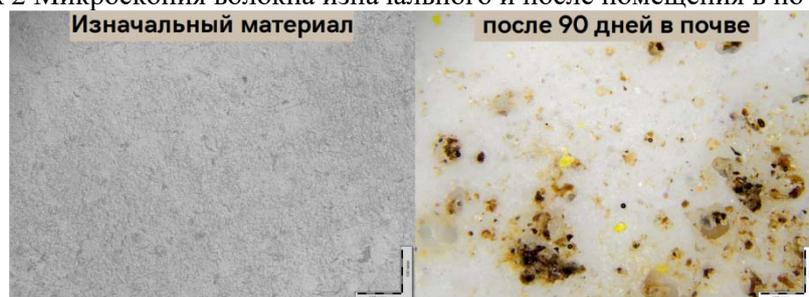


Рисунок 3 Микроскопия пленки изначальной и после помещения в почву

За 8 дней выдержки в лабораторном грунте микроструктура волокон изменилась в значительной степени. Следует отметить истончение волокон (у исходного образца средний диаметр волокон = 5,6 мкм, а у второго = 5 мкм), уменьшение плотности в 2 раза с 0,098 г/м³ до 0,047 г/м³ и вкрапление частичек почвы в материал.

Однако, для пленки срок выдержки 8 дней не имел никакого влияния ни на структуру, ни на свойства. Но за 90 дней у пленки появились заметные изменения. Следует отметить увеличение плотности с 0,155 кг/м³ до 0,192 кг/м³ и вкрапление частичек почвы в материал.

Вероятно, что начало процесса биodeградации, о котором свидетельствуют описанные структурные изменения, запущено активностью микроорганизмов почвы и также вызвано влиянием воды. Особый интерес представляет влияние выдержки в почвенном грунте на физико-механические свойства полимерного материала, результаты приведены на рисунках 4 и 5 и в таблице 1.

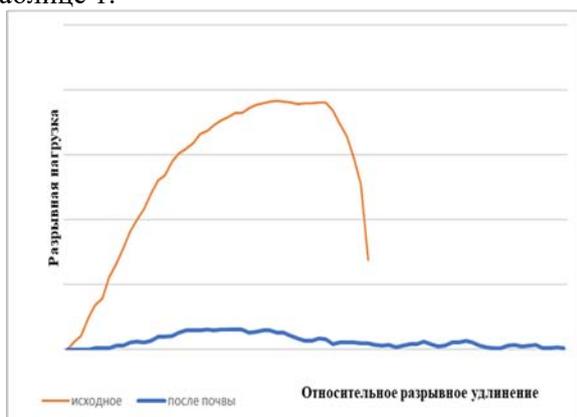


Рисунок 4 Изменение физико-механических свойств волокна до и после почвы (разрывная машина)

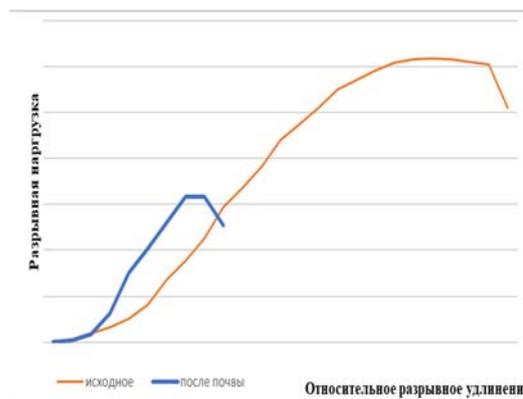


Рисунок 5 изменение физико-механических свойств пленки до и после почвы (разрывная машина)

Таблица 1 Физико-механические свойства

Материал	Разрывная нагрузка Fmax, Н	Относительное разрывное удлинение σ , %
Волокно	1,91	67,53
Волокно после почвы (8 дней)	0,16	49,93
Пленка	12,34	45,75

Пленка после почвы (90 дней)	6,31	19,61
------------------------------	------	-------

Приведенные данные свидетельствуют о значительном снижении прочности и удлинении полимерных материалов [15]. Хорошо видно, что метод выработки полимера вносит значительный вклад в скорость биоразложения. Так волокна за 8 дней достигли той стадии изменения структуры и свойств, которой пленка достигает за 90 дней. Ключевую роль в этом играет площадь поверхности и степень доступности полимера для микроорганизмов почвы. Площадь поверхности волоконистого материала во много раз превышает площадь поверхности пленки.

Подтверждение этого предложения следует из анализа надмолекулярной структуры методом ДСК. Данный метод позволяет определять и исследовать температуру плавления и кристаллизации [12]. Метод ДСК показал, что кристалличность пленки уменьшилась почти в 2 раза с 58,5% до 28%, у волокна же она снизилась с 56,3% до 55%. Это говорит нам о том, что и у волокна и у пленки начался процесс деградации, температура плавления уменьшается, что доказывает разрушение кристаллической фазы.

Кроме того, методом ИК удалось подтвердить биоразложение. Суть данного метода заключается в анализе материалов путем сопоставления ИК-спектра исследуемого вещества с аналогичным спектром их стандартного образца [3].

По частотам мы можем определить какие функциональные группы разрушились в полимерной цепи. Так на одну половину пиков пришлось валентные колебания С–О, а на другую половину - валентные колебания С–С. У пленки наблюдается большая деструкция функциональных групп, это объясняется тем, что пленка начинает разрушаться с внешней стороны, а пленка изнутри, поэтому имея в виду, что ИК спектрометр анализировал частоты с поверхности, у пленки показатели деструкции выше [14].

Таким образом, биодегградация волоконистого материала происходит в 1,2 раза быстрее пленочного материала. Деструкция ПГБ в почве происходит за счёт микроорганизмов и ферментов, а также за счёт температуры, влажности и т.д. [13]. Разрушение происходит в несколько этапов:

1. Разрыв макромолекулярных цепей, при этом вес материала не изменяется;
2. Из полимера вымываются низкомолекулярные составляющие, вследствие чего наблюдается потеря массы.

ПГБ обладает высокой биосовместимостью, поэтому для повышения скорости деградации в раствор полимера можно внедрить подходящие наполнители [10]. Производство и утилизация полигидроксibuтирата безотходное [11], его можно захоронить в земле без ущерба экологии, так как его продукты разложения это CO₂, вода и биомасса.

Благодарность: работа выполнена при поддержке Гранта президента (МК-1651.2022.1.3).

Список литературы

1. Bharti, S.N.; Swetha, G. «Need for Bioplastics and Role of Biopolymer PHB: A Short Review.» J. Pet. Environ. Biotechnol. 2016,7, 5–8. сайт. – URL: <https://doi.org/10.4172/2157-7463.1000272> (датаобращения: 20.09.2022).
2. Mohd Ishak, Z.A.; Ahmad Thirmizir, M.Z. «Editorial corner-a personal view producing green composites via polymer blending. Express Polym». 2021, 15, 910–911. сайт. – URL: <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2021.73> (дата обращения: 20.09.2022).
3. Э. Т. Крутько, Н. Р. Прокопчук, А. И. Глоба «Технология биоразлагаемых полимерных материалов.» - 1-е изд. - Минск: УО «Белорусский государственный технологический университет», 2014. - 106 с.
4. Raza, Z.A.; Khalil, S.; Abid, S. «Recent progress in development and chemical modification of poly(hydroxybutyrate)-based blends for potential medical applications.» Int. J. Biol. Macromol. 2020, 160, 77-100. сайт. – URL: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.114> (датаобращения: 25.09.2022).
5. Sreedevi S, Unni KN, Sajith S, Priji P, Josh MS, Benjamin S «Bioplastics: advances in polyhydroxybutyrate research» 2014 Advances in Polymer Science сайт. – URL: https://www.researchgate.net/publication/275042229_Bioplastics_Advances_in_Polyhydroxybutyrate_Research (датаобращения: 15.09.2022).
6. Fang Liu, David W. Grainger Fluorinated Biomaterials // Biomaterials Science (Third Edition). - 2013. - С. 5. сайт. – URL: <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/film-extrusion> (датаобращения: 15.09.2022).
7. Liwei Sun Lingjie Song Xu Zhang Poly(γ -glutamic acid)-based electrospun nanofibrous mats with photodynamic therapy for effectively combating wound infection // Materials Science and Engineering: C. - 2020. - С. 113. URL:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092849312030151X> (дата обращения: 15.09.2022).

8. Ю.Н.Филатов Электроформование волокнистых материалов (эфв-процесс). Учебное пособие- Москва: Под редакцией профессора В.Н.Кириченко, 2001. - 231 с.
9. ГОСТ Р 53381-2009 «Почвы и грунты Грунты питательные.Технические условия». Дата введения 2010-07-01.
- 10 Sudesh K., Abe H., Doi Y. «Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters.ProgPolym» URL: https://www.researchgate.net/publication/223900137_Synthesis_structure_and_properties_of_polyhydroxyalkanoates_Biological_polyesters (дата обращения: 15.09.2022).
11. А.Х. Купцов Г.Н. Жижин Фурье-КР и Фурье-ИК спектры полимеров. м., Физматлит,. - Москва: Техносфера, 2013. - 671 с.
12. Спивак Л. В., Симонов Ю. Н., Дышлюк М. А. Дифференциальная сканирующая калориметрия: новые экспериментальные возможности. Вестник Пермского университета. Физика. 2019. № 3. С. 52–57. doi: 10.17072/1994-3598-2019-3-52-57
- Spivak L. V., Simonov Y. N., Dyshlyuk M. A. Differential scanning calorimetry: new experimental feature. Bulletin of Perm University. Physics, 2019, no. 3, pp. 52–57. doi: 10.17072/1994-3598-2019-3-52-57
13. Бычук М.А. Получение и свойства полимерных пленок на основе поли-3-гидроксибутирата и поли-ε-капролактона: дис. д-р. хим. наук: 05.17.06. - М., 2016. - 130 с.
14. Н.А. Редькин «Ик-фурье спектрометрия и масс-спектрометрия в идентификации органических соединений.» - Самара: Самарский университет, 2019. - 92 с;
15. ГОСТ 28840-90 Машины для испытания материалов на растяжение, сжатие и изгиб : дата введения 1993-01-01. – Москва : Постановление Госстандарта, 29.12.1990. – 8 с.

Детекция белков «белковой короны» на поверхности наночастиц



**Городец М.Г.¹, Мурадова А.Г.², Шарапаев А.И.²,
Лопухова М.В.¹, Бычкова А.В.¹**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева», Москва

Разработка систем на основе магнитных наночастиц (МНЧ) является перспективным направлением нанобиотехнологии, нацеленным на получение материалов для таргетной доставки лекарственных веществ, магнитной гипертермии, магнитной сепарации, магнитно-резонансной томографии и др. Известно, что в биологических жидкостях наночастицы вступают во взаимодействие с многочисленными белками, формируя вокруг своей поверхности «белковую корону», определяющую распределение частиц в организме, их токсичность и функционирование [1]. Состав и структура «белковой короны» меняется в зависимости от многих факторов, таких как особенности самих наночастиц (состав, структура, рельеф поверхности), особенности биологической жидкости и условия протекания реакции. Для исследования «белковой короны» применяются разнообразные подходы и методы, которые оценивают различные параметры «белковой короны», такие как: ее структура, состав, количество и конформация образующих её белков.

В данной работе в качестве белков, присутствие которых оценивали на поверхности МНЧ, выбраны человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), иммуноглобулин G (IgG) и фибриноген (ФГ). Выбор данных белков обусловлен тем, что данные белки могут являться компонентами «белковой короны» [2], при этом стоит отметить, что ЧСА встречается в ней чаще всего, т.к. он является наиболее распространённым белком плазмы крови. Потенциал исследования ЧСА также связан с его применением в нанотехнологиях: будучи компонентом покрытия на МНЧ, ЧСА обеспечивает длительную циркуляцию частиц в кровотоке и возможность выполнения ими необходимых функций *in vivo*, а также используется как компонент покрытий для применений *in vitro*.

ЧСА и ФГ адсорбировали на поверхности МНЧ, синтезированных методом соосаждения

солей железа (II) и (III) в щелочной среде и стабилизированных фосфат-цитратным буфером. Покрытие из белков на поверхности МНЧ исследовали с применением методов: динамического светорассеяния, Zetasizer Nano-S (Malvern, Англия), спектрофотометрии в УФ/видимой областях, SPECTROstar NANO (BMG LABTECH, Германия), иммуноферментного анализа (ИФА).

Для оценки присутствия ЧСА и ФГ на МНЧ применялись моноклональные антитела к ЧСА и ФГ, иммобилизованные на магнитные частицы $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, активированные с использованием глутарового альдегида. С использованием метода ИФА было показано уменьшение концентрации ЧСА и ФГ в белковых растворах после добавления их к МНЧ, что позволяет делать выводы о количестве белка, адсорбированного на МНЧ. Начаты работы по оценке белка непосредственно на поверхности частиц, ведется подбор условий и компонентов для анализа.

Также была осуществлена оценка присутствия ЧСА на поверхности частиц с использованием магнитных частиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, модифицированных антителами к ЧСА. В более чем в 50% экспериментов наблюдалось взаимодействие МНЧ, на поверхности которых сорбирован ЧСА, и частиц, модифицированных антителами. В меньшей степени отмечено взаимодействие с немодифицированными частицами, что свидетельствует о наличии неспецифического связывания. Предположительно это связано с недостаточной инертностью поверхности частиц $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$, в настоящий момент ведутся работы по подбору и тестированию агентов для модификации поверхности данных частиц.

Методом динамического светорассеяния показано, что при добавлении ЧСА к дисперсии МНЧ гидродинамический радиус МНЧ увеличивается на 4 ± 1 нм (рис. 1А), что свидетельствует об образовании на поверхности МНЧ белкового слоя. В случае добавления ФГ и IgG к МНЧ взаимодействие протекает с получением частиц различных размеров, в том числе с образованием агрегатов микронных размеров.

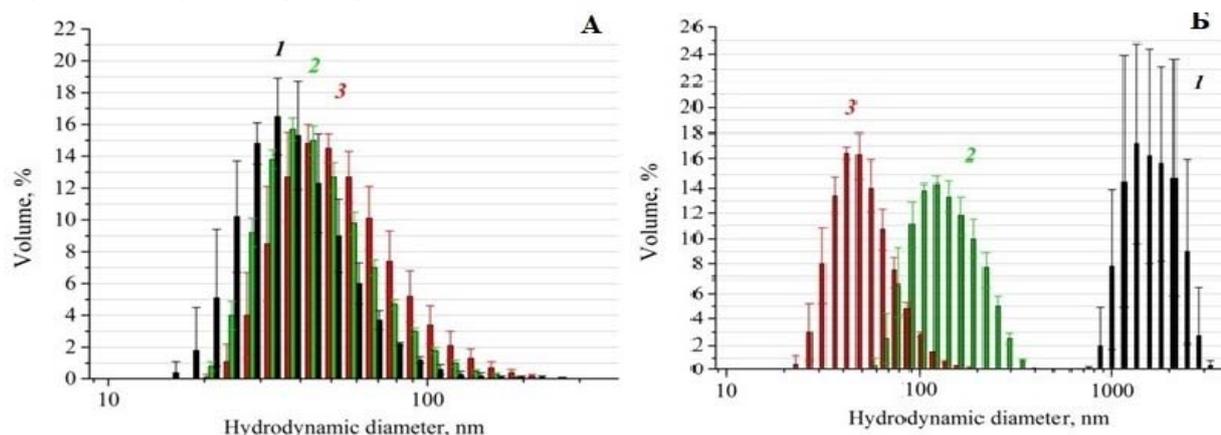


Рис. 1. Распределение гидродинамических размеров в образцах различного состава в воде (А) и после добавления IgG в 50 мМ фосфатном буфере рН 6,3 (Б): 1 – МНЧ, 2 – МНЧ+ЧСА; 3 – МНЧ+ЧСА+H₂O₂.

Стабильность адсорбционного слоя ЧСА на поверхности МНЧ оценивалась в присутствии иммуноглобулина G, обладающего большим чем ЧСА сродством к поверхности МНЧ [3]. Показано, что IgG способен вытеснять ЧСА с поверхности МНЧ с образованием агрегатов микронного размера в случае, если ЧСА был адсорбирован на поверхности МНЧ без применения дополнительных закрепляющих агентов, в то время как при дополнительном закреплении ЧСА на поверхности МНЧ с использованием пероксида водорода — покрытие обладает большей стабильностью (рис. 1Б).

Таким образом, в растворах состава МНЧ + белок продемонстрировано изменение гидродинамических размеров частиц. Отмечена различная устойчивость образующегося белкового покрытия, зависящая от используемого белка и наличия дополнительных агентов (пероксида водорода).

Показано взаимодействие между частицами, модифицированными антителами к ЧСА, и МНЧ с сорбированным ЧСА. Ведутся работы по подбору условий и компонентов для определения белков методом ИФА непосредственно на поверхности МНЧ.

Проводимое исследование «белковой короны» оказывает вклад как в предсказание поведения искусственных систем в биологических жидкостях, так и решает задачи разработки новых методов и подходов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-75-10150,

<https://rscf.ru/project/22-75-10150/>. Разработка ИФА-подходов к определению белков на поверхности МНЧ проводится в рамках государственного задания (тема 0084-2014-0001, № гос. рег. 01201253311).

Список литературы

1. Pederzoli F., Tosi G., Vandelli M.G., et al. WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology. 2017. Vol. 9. P.1–23.
2. Derakhshankhah H., Hosseini A., Taghavi F. et al. Scientific Reports. 2019. Vol. 9. Article number: 1558.
3. Bychkova A.V., Lopukhova M.V., Wasserman L.A., et al. International Journal of Biological Macromolecules. 2022. Vol. 194, P.654-665.

Оценка пероксидазной активности наночастиц магнетита в присутствии белков крови



Горобец М.Г.¹, Абдуллина М.И.¹, Мотякин М.В.^{1,2}, Бычкова А.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва
²Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва

Магнитные наночастицы (МНЧ) оксидов железа в течение последних десятилетий широко применяются для создания функциональных материалов биомедицинского назначения: материалов для адресной доставки лекарственных веществ, магнитной гипертермии, магнитной сепарации, магнитно-резонансной томографии и др. [1].

Способность магнитных наночастиц в физиологических условиях катализировать образование активных форм кислорода (АФК) и обеспечивать ферроптоз клеток используется для подавления роста опухолей [2]. В то же время при введении в организм через кровь МНЧ вступают во взаимодействие с многочисленными белками. В результате такого взаимодействия происходит модификация поверхности наночастиц оксидов железа и образуется, так называемая, «белковая корона». Вопрос о сохранении у поверхности наночастиц способности к катализу генерации АФК после связывания с ней белков на сегодняшний день мало изучен.

Целью настоящей работы являлось определение влияния белков крови (на примере человеческого сывороточного альбумина (ЧСА), иммуноглобулина G (IgG) и гемоглобина (Hb)) на генерацию АФК, катализируемую МНЧ в присутствии пероксида водорода.

В работе использовали МНЧ оксидов железа, синтезированные и электростатически стабилизированные в золе по описанной ранее методике [3]. Расчетная исходная массовая концентрация МНЧ в золе составляла 40 мг/мл. Хранение МНЧ обеспечивали в стеклянной посуде без доступа воздуха и света. Наличие у поверхности МНЧ способности участвовать в генерации АФК перед проведением экспериментов подтверждали по методике, изложенной в [4].

Для сравнительного исследования генерации гидроксил-радикалов, катализируемой МНЧ и пероксидазой хрена (HRP), в присутствии и в отсутствие белков, использовали субстрат – о-фенилендиамин (о-ФДА), образующий при взаимодействии с гидроксил-радикалом продукт окисления (окФДА) — 2,3-диаминофеназин с максимумом поглощения при 415-455 нм [5].

Измерения оптической плотности (OD) исследуемых растворов проводили на спектрофотометре SPECTROstar NANO (BMG LABTECH, Германия) при 37°C.

В экспериментах использовали следующие диапазоны концентраций: С (H₂O₂) — 9,8 - 33 мМ, С (о-ФДА) — 0,075 - 1,54 мМ.

Скорость образования 2,3-диаминофеназина, V [M/c], пропорциональную скорости генерации гидроксильных радикалов, определяли по тангенсу угла наклона начального участка изменения OD в ходе реакции с использованием коэффициента экстинкции 13000 М⁻¹·см⁻¹ [6].

Под действием МНЧ и HRP в присутствии пероксида водорода показана генерация АФК, зависящая от концентрации катализатора (рис. 1А).

В исследованном диапазоне концентраций МНЧ и HRP отмечена большая эффективность МНЧ в качестве катализатора, вероятно обусловленная большим содержанием активных ионов железа на 1 моль магнитных частиц у МНЧ по сравнению с HRP.

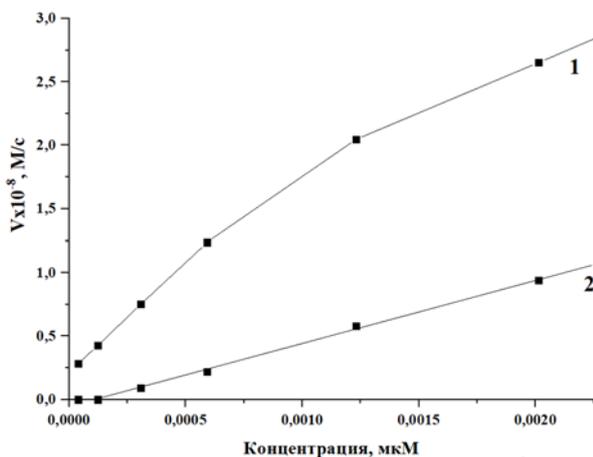


Рис. 1. Зависимость скорости образования 2,3-диаминофеназина (окФДА) от концентрации МНЧ (1), HRP (2). $C(H_2O_2) = 9,8$ мМ, $C(o\text{-ФДА}) = 0,075$ мМ.

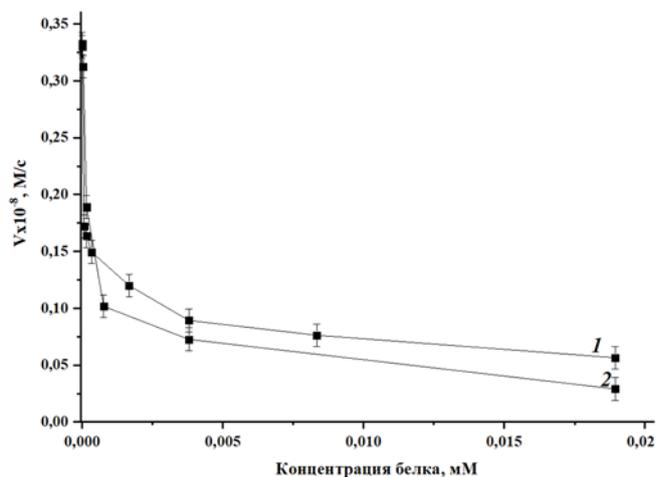


Рис. 2. Зависимость V продукта окисления о-ФДА (окФДА) от концентрации ЧСА (1) и IgG (2). $C(H_2O_2) = 9,8$ мМ, $C(o\text{-ФДА}) = 0,075$ мМ, $C(МНЧ) = 0,16$ нМ

Было установлено, что при добавлении к раствору о-ФДА + МНЧ + H_2O_2 растворов ЧСА и IgG в широком диапазоне концентраций белка происходит снижение генерации АФК. Этот эффект хорошо заметен по значениям скорости реакции (рис. 2А). Возможные причины данного результата: перехват АФК, генерируемых на поверхности МНЧ из пероксида водорода, молекулами белка; взаимодействие ЧСА/IgG с о-ФДА и/или окФДА, влияющее на спектр окФДА; стерическое экранирование поверхности МНЧ молекулами белка при адсорбции, снижающее доступ о-ФДА к поверхности МНЧ, на которой происходит генерация АФК.

Стоит отметить, что процент данного снижения чуть сильнее в случае IgG, что может быть связано с бóльшим чем у ЧСА сродством IgG к поверхности магнитных частиц [7].

В случае Hb снижения детектируемой каталитической активности поверхности МНЧ в результате добавления белка наблюдается только при концентрации белка до 12 нМ (рис. 2Б). Причиной этого явления может быть стерическое экранирование поверхности МНЧ молекулами гемоглобина.

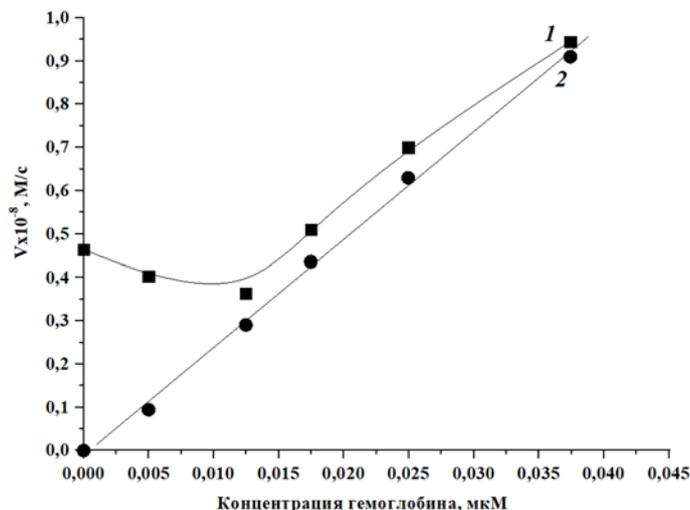


Рис. 3. Зависимость скорости образования окФДА от концентрации гемоглобина в присутствии магнитных наночастиц (1) и их отсутствии (2). $C(МНЧ) = 0,16$ нМ, $C(H_2O_2) = 9,8$ мМ, $C(o\text{-ФДА}) = 0,075$ мМ

В то же время в диапазоне концентраций Hb от 12 до 37 нМ наблюдается увеличение V образования окФДА, коррелирующее с концентрацией добавленного белка. Вероятно данный эффект обусловлен дополнительной генерацией АФК под действием гемового железа в составе гемоглобина, т.к. показано, что данная способность зависит от концентрации белка.

Путем многократной магнитной сепарации с последующим редиспергированием было показано, что в случае всех исследованных белков речь идет о адсорбционном связывании белка с поверхностью МНЧ.

Доказана зависимость V образования окФДА под действием редиспергированных осадков МНЧ от концентрации Hb в исходном растворе, что подтверждает адсорбционное связывание Hb с поверхностью МНЧ. Мы предполагаем, что полученные эффекты изменения пероксидазной активности реакционных систем, содержащих МНЧ, при добавлении ЧСА, IgG, Hb могут быть использованы при разработке новых материалов на основе МНЧ для терапии опухолей,

включающей их ферроптоз.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-75-10150, <https://rscf.ru/project/22-75-10150/>. Отдельные работы, связанные с исследованиями взаимодействия гемоглобина с наночастицами, выполнены в рамках государственного задания (тема 0084-2014-0001, № гос. рег. 01201253311).

Список литературы

1. Savliwala S., Chiu-Lam A., Unni M., et al. Magnetic nanoparticles. In: Chung E.J., Leon L., Rinaldi C., editors. Nanoparticles for Biomedical Applications. Amsterdam: Elsevier; 2020. P. 195-221.
2. Gao L., Fan K., Yan X. Theranostics. 2017. Vol. 7. №13. P.3207-3227.
3. Prusakov V.E., Maksimov Y.V., Krupyanskiy Y.F., et al. Russian Journal of Physical Chemistry B. 2018. Vol. 12. N 1. P.158-164.
4. Bychkova A.V., Lopukhova M.V., Wasserman L.A., et al. BBA - Proteins and Proteomics. 2020. Vol. 1868. №1. 140300.
5. Melad O. European Journal of Chemistry. 2016. Vol. 7. P.463–467.
6. Fu P.K.-L., Abuzakhm S., Turro C. Photochemistry and Photobiology. 2005. Vol. 81. P.89–97
7. Bychkova A.V., Lopukhova M.V., Wasserman L.A., et al. International Journal of Biological Macromolecules. 2022. Vol. 194, P.654-665.

Поликомплексы со спермином

**И.В. Григорян^{1,3}, А.М.Адельянов¹, Ю.А. Кокшаров^{1,3},
В.В.Спиридонов², К.В.Потапенков¹, И.В.Таранов³, Г.Б.Хомутов^{1,3},
А.А.Ярославов²**

¹Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
физический факультет, Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
химический факультет, Москва, Россия

³Институт радиотехники и электроники имени В.А. Котельникова РАН,
Москва, Россия

e-mail: grigorian.iv19@physics.msu.ru, тел.: 8 (915) 1732413

Проблема управляемой доставки лекарственных соединений для повышения эффективности их применения и преодоления нежелательных побочных эффектов является одной из наиболее актуальных проблем в медицине. Для её решения лекарство необходимо доставлять непосредственно в целевую область организма в специальных носителях.

В данной работе описаны новые магнитные поликомплексы на основе биосовместимых полимеров, модифицированные природным полиамином спермином.

В ходе работы:

1. Были получены поликомплексы на основе молекул полиакриловой кислоты различной молекулярной массы, модифицированных тетрагидрохлоридом спермина. Были определены основные характеристики поликомплексов: дзета-потенциалы, гидродинамические диаметры, изучена агрегативная устойчивость комплексов и определено оптимальное для дальнейшей модификации соотношение между числом звеньев полимера и числом молекул “сшивателя”.

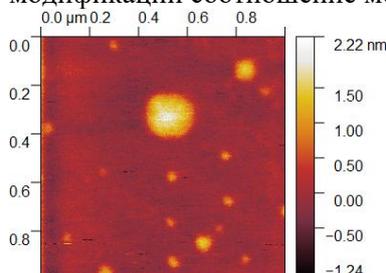


Рис.1. АСМ-изображение NaPa (2100) + Spermine \ 15:1

2. Была продемонстрирована возможность включения в поликомплексы лекарственных соединений, на примере доксорубина.

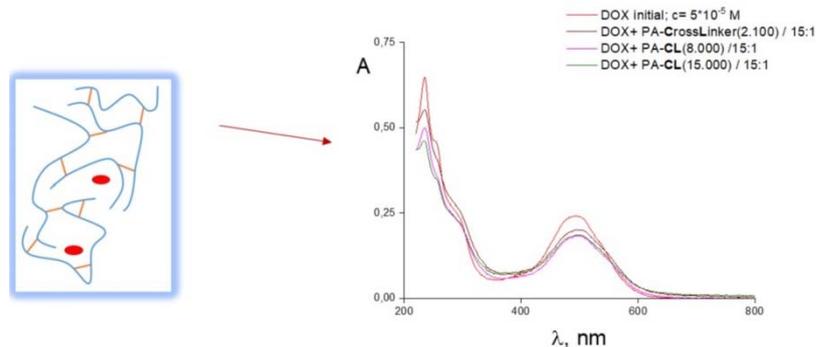


Рис.2.Спектры поглощения поликомплексов, полученные методом спектрофотометрии.

3. Методом ЭПР исследованы магнитные свойства поликомплексов, функционализированных наночастицами. Предположительно определены типы наночастиц, образующихся в биополимерной матрице.

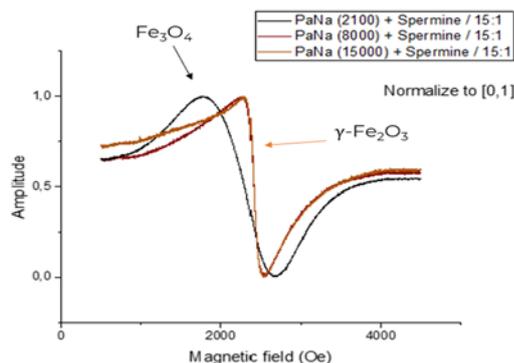


Рис.3. ЭПР-спектр поликомплексов, функционализированных магнитными наночастицами

Таким образом, в результате выполнения работы была продемонстрирована возможность создания магнитных поликомплексов на основе биосовместимых полимеров, модифицированных спермином.

Литература

- 1 - V.V.Spiridonov et al., "Magnetosensitive Water-Soluble Nanocomposite Based on Sodium Alginate and Fe₂O₃ Nanoparticles". Macromolecular Symposia. Том 389, № 1, 2020
- 2 - D.A. Gorin et al., "Effect of Microwave Irradiation on Composite Iron Oxide Nanoparticle/Polymer Microcapsules". Proc. of SPIE Vol. 6536, 2007.
- 3 - Yu. A. Koksharov et al., "Low temperature electron paramagnetic resonance anomalies in Fe-based nanoparticles". Journal of Applied Physics. Volume 88, Number 3. 1 august 2000.

Исследование посттрансляционных модификаций фибриногена при болезни Альцгеймера

**Даниэла Гусарова¹, Александра Васильева¹, Любовь Юрина¹,
Елизавета Гаврилина¹, Владислав Иванов¹, Мария Индейкина²,
Анна Бугрова¹, Алексей Кононихин², Евгений Николаев³,
Марк Розенфельд¹**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской Академии наук», Москва, Россия

²Московский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Московская область, Россия

³Сколковский институт науки и технологий, Московская область, Россия

Болезнь Альцгеймера - это нейродегенеративное заболевание, наиболее распространенное в мире. БА поражает примерно 5% людей старше 65 лет и 20% людей старше 80 лет. Учитывая тенденцию к демографическому старению людей практически по всему миру и сопутствующий рост затрат государств на социальные нужды и здравоохранение, необходимость поиска способов лечения БА является очевидной. При этом, учитывая необратимый характер нейродегенеративных последствий этого заболевания, для успешного лечения с рациональным использованием лекарственных средств, не менее важной становится проблема ранней диагностики БА и изучения

механизмов развития заболевания на самых ранних стадиях. Исследование и поиск биомаркеров ранней стадии БА часто невозможно проводить с использованием тканей мозга. Использование малоинвазивных способов забора образцов является приоритетным направлением развития для ранней диагностики заболеваний. Однако на данный момент не выявлено достоверных маркеров БА в периферических жидкостях организма. Взаимосвязь между структурно-химической модификацией белков и нарушением механизма их функционирования является ключевой проблемой современной биохимии, биофизики и целого ряда других смежных областей знаний. В этом контексте посттрансляционные модификации (ПТМ), во многом регулирующие функции и деградацию белков, и их углубленное изучение играет значительную роль в идентификации новых биомаркеров и мишеней для лекарственной терапии.

Масс-спектрометрическое исследование p-Ser-8-A β протеоформы бета-амилоида

**Даничкина К.В.^{1,2}, Стрельникова П.А.^{2,3}, Кузин А.А.¹,
Индейкина М.И.², Бугрова А.Е.², Кононихин А.С.^{2,3}**

¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный

² Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

³ Сколковский институт науки и технологий, Москва

danichkina.kv@phystech.edu

Бета-амилоидные пептиды (A β) — это общее название для нескольких пептидов длиной 38-43 аминокислотных остатка, образующихся из трансмембранного белка-предшественника APP. In vitro эксперименты указывают на важную роль различных посттрансляционных модификаций A β в стимулировании образования агрегатов, сопровождающих развитие болезни Альцгеймера (БА) [1]. Согласно литературным данным, степень фосфорилирования A β в нейрофибриллярных бляшках пациентов с БА коррелирует с прогрессированием патологии [2]. Таким образом, анализ фосфорилированной протеоформы может быть интересен в контексте изучения патогенеза, а также диагностики БА.

Исследования, посвященные количественной оценке содержания phospho-Ser-8-A β , в основном касаются тканей головного мозга, тогда как для диагностики больший интерес представляет анализ профиля фосфорилирования A β в крови или спинномозговой жидкости. Целью данной работы стала разработка масс-спектрометрического метода количественного определения доли p-Ser-8-A β в биологических жидкостях.

Основная часть работы была посвящена разработке метода детекции фосфорилированной протеоформы с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии. В результате проведенных экспериментов был подобран оптимальный состав матрицы DHB, демонстрирующий наилучшую интенсивность p-Ser-8-A β . Для бинарных смесей синтетических пептидов p-Ser-8-A β : A β (в различных процентных соотношениях) были построены калибровочные кривые, позволившие количественно определить долю фосфорилированной формы путем измерения интенсивностей пиков p-A β и A β в масс-спектре. Для образца p-A β 42 предел обнаружения на мишени MALDI составил 1 пмоль, для его гидролитического фрагмента p-A β 16 – 1 фмоль. Представленная методика может быть использована для исследования фосфорилированных A β -пептидов в биологических жидкостях пациентов с БА.

Литература

- 1) Busch L., Eggert S., Endres K., Bufe B., 2022. The Hidden Role of Non-Canonical Amyloid β Isoforms in Alzheimer's Disease. *Cells*, 11(21):3421. <https://doi.org/10.3390/cells11213421>
- 2) Rijal Upadhaya A., Kosterin I., Kumar S., Von Arnim Christine A.F., Yamaguchi H., Fändrich M., Walter J., Thal D.R., 2014. Biochemical stages of amyloid- β peptide aggregation and accumulation in the human brain and their association with symptomatic and pathologically preclinical Alzheimer's disease. *Brain*, Volume 137, Issue 3,, Pages 887–903, <https://doi.org/10.1093/brain/awt362>
- 3) Yin Z, Wang S, Shen B, Deng C, Tu Q, Jin Y, Shen L, Jiao B, Xiang J., 2019. Coimmunocapture and Electrochemical Quantitation of Total and Phosphorylated Amyloid- β 40 Monomers. *Anal Chem*. 5;91(5):3539-3545. <https://doi: 10.1021/acs.analchem.8b0530>

Лазерная модификация полигидроксиалканоатов как подход к функционализации поверхности



Дудаев А. Е.¹, Рыльцева Г. А.¹, Липайкин С. Ю.², Дорохин А. С.²

¹ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», г. Красноярск

²ФГАОУ ВО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск

Полигидроксиалканоаты (ПГА) – это класс биосовместимых биоразлагаемых термопластов с различной физико-химической структурой и свойствами [1]. Они поддаются переработке в различные изделия практически всеми доступными техническими методами (литьём, эмульгированием, экструзией, прессованием, электростатическим формованием и др.) [2], а также возможно производство композитных материалов на основе ПГА с различными наполнителями [3]. Области применения ПГА разнообразны, от сельского и бытового хозяйства до высокотехнологичной биомедицины и фарм промышленности [4], а также они играют весомую роль в «экономике замкнутого цикла» [5]. Отличная биологическая совместимость полигидроксиалканоатов на клеточном, тканевом и организменном уровнях, продолжительная и направленная резорбция *in vivo* выдвигают этот класс биополимеров в качестве наиболее перспективных для биомедицины. ПГА особенно перспективны в персонифицированной медицине, клеточной и тканевой инженерии [6]. Это обусловлено возможностью направленного биосинтеза ПГА с различным химическим составом и физическими свойствами (прочностью, гидрофобно-гидрофильным балансом и архитектурой поверхности получаемых изделий).

Первооткрытым и массово изучаемым представителем ПГА является (поли-3-гидроксibuтират, П(ЗГБ)) – гомополимер 3-гидроксимасляной кислоты. Несмотря на биоразрушаемость, потенциал применения этого представителя резко ограничен, ввиду высокой кристалличности (выше 70%) и гидрофобности, склонности к «физическому старению» и неупорядоченной кристаллизации [7]. В связи с этим на свойства полимеров, в том числе П(ЗГБ), можно воздействовать и улучшать их биологическими, химическими или физическими техниками, такими как биосинтез сополимерных ПГА разного состава, применение различных наполнителей для изготовления композитов на основе П(ЗГБ), обработка различными химическими реагентами, а также модификация с помощью физических методов, таких как обработка жидкой плазмой, протонирование, лазерное воздействие и др. [8]. Применение этих методов позволяет направленно модифицировать свойства полимеров, например изменять гидрофильность и структуру поверхности, увеличивать скорость биоразрушения, улучшать гибкость и прочность, изменять газодинамические свойства изделий, улучшая их проницаемость.

Методы лазерного воздействия для модификации полимерных изделий начали применять сравнительно недавно. Основное преимущество этого метода заключается в избирательном характере изменения поверхностных свойств изделия, не разрушая целостность самого материала и не аккумулируя токсичных веществ. В работах по данной тематике описаны результаты применения различных видов лазеров (газовых, твердотельных, полупроводниковых и др.) для модификации различными методами (абляция, гравировка, сварка, микропаттернирование и др.) поверхности различных биополимеров – полилактида, поликапролактона, полигликолида, хитозана и др. [9].

В работе исследована серия полигидроксиалканоатов с различным количественным и качественным составом включенных мономеров: гомополимер 3-гидроксibuтирата П(ЗГБ) [-O-CH(CH₃)-CH₂-CO-] и сополимеры, которые включают мономер ЗГБ и другой мономер в различных соотношениях (от 9 до 75,2 мол.%). Вторые мономеры различались по химическому строению и длине С-цепи: 4-гидроксibuтират (4ГБ) [-O-CH₂-CH₂-CH₂-CO-], 3-гидроксивалерат (ЗГВ) [-CH(C₂H₅)-CH₂-CO-], и 3-гидроксигексаноат (ЗГГ) [-O-CH(C₃H₇)-CH₂-CO-]. Биосинтез полигидроксиалканоатов осуществляли с использованием штамма бактерий *Cupriavidus necator* В-10646 по собственной разработанной технологии [10].

Лазерную модификацию тонких полимерных пленок проводили методом умеренного равномерного облучения поверхности с помощью CO₂-лазера LaserPro Explorer II (Coherent, США) со следующими характеристиками: длина волны 10,6 мкм, максимальная мощность 30 Вт, максимальная скорость 2 м/с, максимальное разрешение 1000 dpi, линза изSeZn, F=2'. Для изучения влияния режимов лазерной модификации варьировали мощность, скорость и

непрерывность волны. Первый режим: модификация поверхности проводилась в непрерывном режиме плавления с расстоянием между векторными линиями прохода лазера 1 мм: мощность 3 Вт, удельная мощность 20 000 Вт/м², скорость 2 м/с; диаметр пучка до фокусирующей линзы 2,5 мм, после фокусирующей линзы – 0,15 мм. Второй режим: модификация поверхности проводилась в квазиимпульсном режиме, с расстоянием между растровыми точками импульсов 0,5 мм: мощность 15 Вт, удельная мощность 100 000 Вт/м², скорость 1 м/с, диаметр пучка до фокусирующей линзы 2,5 мм, после фокусирующей линзы – 0,15 мм.

Пористость и структуру поверхности тонких пленок исследовали с применением сканирующей электронной микроскопии. Гидрофобно-гидрофильный баланс поверхности измеряли на приборе Drop Shape Analyzer DSA-25E (Krüss, Германия) с применением программы DSA-4 для Windows. Свободную поверхностную энергию и слагающие её полярную и дисперсионную составляющие (мН/м) рассчитывали по методу Оуэнса, Вендта, Рабеля и Кельбле. Среднеарифметическую шероховатость (Sa), среднеквадратичную шероховатость (Sq) и высоту от пика до впадины определяли с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) в полуконтактном режиме (DPN 5000, NanoInk, США), используя обычные уравнения [54]. Адгезивность и пролиферативный потенциал исследуемых тонких полимерных пленок исследовали в культуре фибробластов мыши NIH 3Т3, которые высевали на пленки в концентрации 5·10³ клеток/см², помещенные в 24-луночные планшеты. Жизнеспособность культивируемых фибробластов оценивали в МТТ-тесте с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида (Sigma, США).

Для использованных режимов лазерного излучения выявлены последствия модификации поверхности ПГА пленок в зависимости от состава и соотношения мономеров по результатам изучения СЭМ и АСМ, краевых углов смачивания водой, адгезии и роста фибробластов. Модификация поверхности после непрерывного режима обработки заключалась в образовании оплавленных областей в виде бороздок, совокупная площадь которых составила 11% от общей площади пленок для П(ЗГБ) и от 12 до 15% у сополимерных пленок. Квазиимпульсный режим растровым методом вызвал образование лунок без выраженных оплавленных зон, совокупная площадь которых была ниже на 20% по сравнению с площадью оплавленных бороздок. Режим обработки влиял на свойства поверхности, адгезию и рост фибробластов.

Все плёночные образцы, вне зависимости от физико-химических свойств и режима лазерной модификации, не вызывали негативного влияния на функциональные свойства культивируемых фибробластов. Несмотря на это, число жизнеспособных клеток по результатам МТТ-теста варьировало и зависело как от физико-химических свойств, так и от режима лазерной модификации. Количество жизнеспособных фибробластов на пленках после квазиимпульсного режима было в 1,5-2 раза выше по сравнению с непрерывным режимом, и в большей степени зависело от режима лазерной обработки, чем от состава ПГА.

Наличие ПГА различного состава и применение непрерывного и квазиимпульсного режимов лазерного излучения позволяет направленно влиять на морфологию и свойства поверхности полимерных пленок. Результаты позволяют направленно модифицировать поверхность полимерных изделий из ПГА – перспективного семейства биоразлагаемых полимеров.

Литература:

1. Koller M., Mukherjee A. A New Wave of Industrialization of PHA Biopolyesters // *Bioengineering*. 2022. Т. 9. № 2. С. 74.
2. Tarrahi R. и др. Polyhydroxyalkanoates (PHA): From production to nanoarchitecture // *Int J Biol Macromol*. 2020. Т. 146. С. 596–619.
3. Popa M. S., Frone A. N., Panaitescu D. M. Polyhydroxybutyrate blends: A solution for biodegradable packaging? // *Int J Biol Macromol*. 2022. Т. 207. С. 263–277.
4. Koller M., Mukherjee A. Polyhydroxyalkanoates – Linking Properties, Applications and End-of-life Options // *Chem Biochem Eng Q*. 2020. Т. 34. № 3. С. 115–129.
5. Adeleye A. T. и др. Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass // *Process Biochemistry*. 2020. Т. 96. С. 174–193.
6. Volova T. G. и др. Natural-Based Polymers for Biomedical Applications, 2017.
7. Philip S., Keshavarz T., Roy I. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2007. Т. 82. № 3. С. 233–247.
8. Riveiro A. и др. Laser Surface Texturing of Polymers for Biomedical Applications // *Front Phys*. 2018a. Т. 6.

9. Daskalova A. и др. Effect of surface modification by femtosecond laser on zirconia based ceramics for screening of cell-surface interaction // Appl Surf Sci. 2020. Т. 513. С. 145914.
10. Volova T.G. и др. Bacterial strain VKPM B-10646—a producer of polyhydroxyalkanoates and a method of their production). RF Patent No. 2439143 (2012).

Разработка высокочувствительной системы регистрации активности пероксидазы с использованием спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния



**Евтушенко Е.Г.^{1,2}, Гаврилина Е.С.¹, Гусарова Д.Ю.¹,
Васильева А.Д.¹, Юрина Л.В.¹, Курочкин И.Н.^{1,2}**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук», Москва, Россия

²Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова,
Москва, Россия

Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) с колориметрической регистрацией является одним из наиболее часто используемых вариантов иммуноанализа. На твердой поверхности последовательно собирается «сэндвич» из антител захвата, анализируемого антигена и конъюгата вторых антител с ферментной меткой, чаще всего пероксидазой хрена. Далее в ходе ферментативной реакции из бесцветного субстрата нарабатывается окрашенный продукт, и его оптическое поглощение является мерой концентрации антигена. Ряд потенциальных направлений развития твердофазного ИФА лимитируется возможностями колориметрической системы регистрации продукта ферментативной реакции. Поэтому существует тренд на ее замену более чувствительными методами. Во-первых, это существенно расширяет спектр анализируемых клинических маркеров, присутствующих в биологических жидкостях в низких концентрациях. Во-вторых, для уже существующих анализов это позволяет сокращать длительность иммунохимических процедур.

Одним из перспективных высокочувствительных методов регистрации является спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР). Комбинационное рассеяние (КР) является одним из видов колебательной спектроскопии, в которой путем облучения вещества лазером и регистрации неупругого Стоксовского рассеяния получают набор полос, соответствующих колебаниям различных группировок в молекуле. Эффект ГКР возникает, когда целевая молекула находится вблизи поверхности металлической наноструктуры. Резонансное возбуждение локализованных плазмонов при облучении наноструктуры вызывает многократное усиление напряженности электрического поля в приповерхностном слое по сравнению с падающим лазерным пучком, что обеспечивает усиление сигнала КР на несколько порядков. В качестве таких наноструктур в настоящей работе использовали золи наночастиц серебра (НЧС), полученные по методике Леопольда-Лендла [1]. Средний гидродинамический диаметр частиц, измеренный методом анализа траекторий наночастиц, составил 40 ± 1 нм. Для проявления максимальных коэффициентов усиления золи металлических наночастиц агрегируют повышением ионной силы. Межплазмонные взаимодействия в агрегатах, во-первых, позволяют подстроить спектр поглощения под используемый лазерный источник, а во-вторых, приводят к формированию т.н. «горячих точек» - областей дополнительно усиления электрического поля в зазорах между частицами.

Исходя из нашего опыта, наилучшим образом золи НЧС подходят для «чистых» систем, содержащих небольшое количество низкомолекулярных компонентов. При этом детектируемое соединение должно обладать высоким сродством к поверхности серебра. В этих условиях удастся достигать пределов обнаружения от долей до десятков нМ. Таким образом, данная система потенциально подходит для регистрации продуктов ферментативной реакции в ИФА. Действительно, на стадии проявления в растворе присутствуют лишь компоненты буфера, избыток субстрата и целевые малые количества наработанного продукта.

Учитывая возможности и особенности метода ГКР, представляется интересным оценить перспективы его использования для регистрации продуктов пероксидазной реакции в твердофазном ИФА. Ключевыми подходами настоящего исследования являются: (1) рациональный выбор пары субстрат-продукт и (2) оптимизация условий ГКР-регистрации продукта

ферментативной реакции в чистой системе, то есть в искусственных смесях субстрата с продуктом с последующим переходом к его ферментативной генерации.

В качестве субстрата был выбран *o*-фенилендиамин (оФД), димеризующийся при окислении в 2,3-диаминофеназин (ДАФ). Структуры этих соединений значительно различаются (Рис.1), что позволяет ожидать различия в сродстве к поверхности серебра, а также появление новых полос в ГКР спектрах продукта. Для регистрации спектров использовали спектрометр i-RamanPro BWS475-785H (BWТек), $\lambda_{\text{ex}} = 785 \text{ нм}$, $P = 120\text{-}150 \text{ мВт}$, объектив $\times 20$.

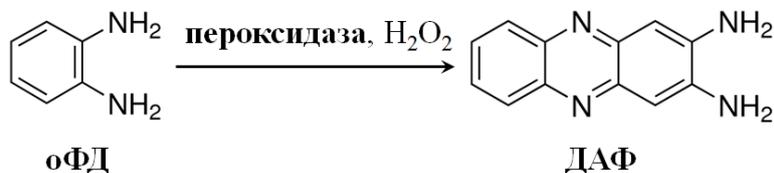


Рис. 1. Структуры субстрата *o*-фенилендиамина (оФД) и продукта 2,3-диаминофеназина (ДАФ)

Первой важной задачей при разработке любой ГКР методики является идентификация получаемых спектров. И оФД, и ДАФ в кислой среде протонируются с $pK_a = 4.6$ [2] и 5.1 [3] соответственно. При этом происходит протонирование аминогруппы оФД и азота кольца ДАФ [4]. При различных рН в диапазоне от 3 до 9 были получены спектры ГКР чистого ДАФ. Все спектры содержат два набора полос, переход между которыми наблюдается в диапазоне рН от 4 до 6, что согласуется с pK_a ДАФ. Наличие полного соответствия набора полос ГКР для крайних точек (рН 3 и 9) полосам КР твердых кристаллических соединений (гидрохлорида ДАФ и нейтрального ДАФ соответственно), показывает, что ГКР спектры принадлежат двум формам ДАФ, протонированной и нейтральной. Таким образом, чистый продукт можно регистрировать в широком диапазоне рН. Наиболее интенсивными полосами ГКР нейтральной формы являются $376, 744, 777, \text{ и } 1413 \text{ см}^{-1}$, протонированной формы- $383, 733, 772 \text{ и } 1374 \text{ см}^{-1}$.

Однако, в смесях с сильно превосходящими концентрациями оФД (5 мМ), выраженная зависимость сигнала ГКР от концентрации ДАФ наблюдается только в кислой среде, при рН = 3. Именно в протонированной форме продукт обладает высоким сродством к поверхности серебра и способен конкурировать с субстратом за связывание. Две наиболее интенсивных полосы продукта ($733 \text{ и } 1374 \text{ см}^{-1}$) можно использовать в качестве аналитических (Рис. 2).

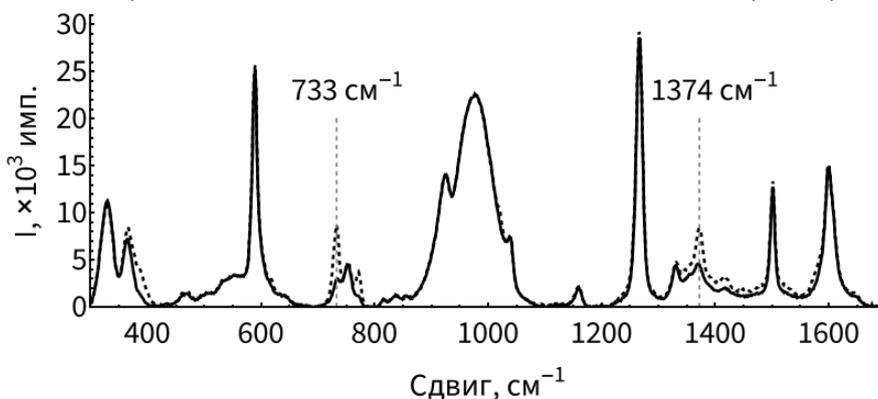


Рис. 2. Спектры ГКР смеси 5 мМ оФД и 160 нМ ДАФ (пунктирный), а также 5 мМ оФД (сплошной) при рН = 3.

На стадии предварительной оптимизации типа и концентрации агрегирующего агента наилучшие результаты продемонстрировал цитратный буфер с рН = 3 с пологим оптимумом в районе 750 мМ. Эти условия ГКР регистрации потенциально совместимы с ферментативной реакцией. Действительно, ее можно провести при рН = 6, оптимальном для фермента, а затем остановить реакцию добавлением концентрированного цитратного буфера с рН = 3. В полученной смеси можно проводить ГКР-регистрацию продукта ферментативной реакции.

Исследование модельных смесей ДАФ и оФД при концентрации субстрата 5 мМ, типичной для колориметрической регистрации пероксидазы, показало, что ГКР обладает более высокой чувствительностью, и по этой причине малые примеси ДАФ в коммерческом оФД, а также медленно протекающее фоновое окисление оФД дают сигнал, равный примерно половине от максимального, даже в отсутствие искусственно добавленного ДАФ. Для снижения фонового сигнала необходимо снижать концентрацию субстрата. Чтобы сделать это рационально, при рН = 6 колориметрическим методом была получена зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации оФД. Эффективная константа Михаэлиса в этих условиях составила 0.13 мМ.

Исходя из этого, мы выбрали концентрацию субстрата в 0.6 мМ, обеспечивающую небольшую потерю в оборотистости фермента всего 17-20% по сравнению с максимальной.

Оптимизировав состав и концентрацию агрегирующего агента для модельных смесей оФД и ДАФ при концентрации оФД в 0.3 мМ (т.к. при остановке реакции происходит разведение в 2 раза), мы получили зависимость ГКР сигнала от концентрации ДАФ в этих условиях (Рис. 3).

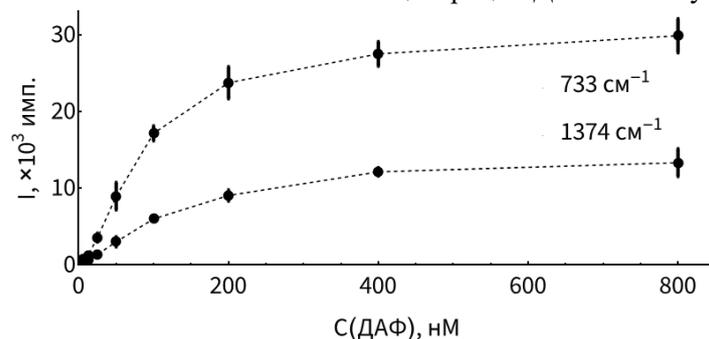


Рис. 3. Концентрационная зависимость ГКР сигнала (интенсивности полос 733 и 1374 cm^{-1}) ДАФ в модельных смесях с 0.3 мМ оФД в цитратном буфере с pH = 3. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.

Предел обнаружения по ДАФ составил 5.0 нМ для полосы 733 cm^{-1} и 11 нМ для полосы 1374 cm^{-1} .

На следующей стадии мы перешли от модельных смесей оФД и ДАФ к ферментативной генерации продукта под действием пероксидазы хрена в цитратном буфере при pH = 6. Реакцию проводили при C(оФД) = 0.6 мМ в течение 10 минут, затем останавливали разведением 1:1 агрегирующим агентом с pH = 3 и проводили ГКР регистрацию накопленного ДАФ (Рис. 4).

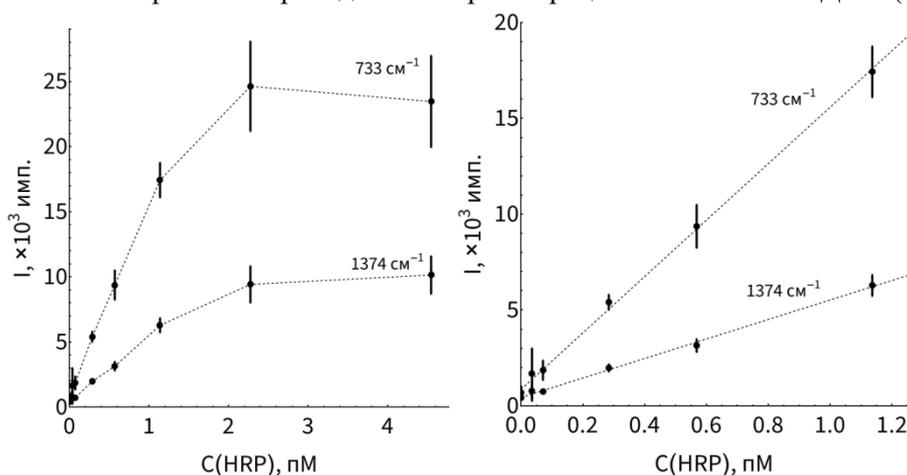


Рис. 4. Зависимость ГКР сигнала (интенсивности полос 733 и 1374 cm^{-1}) ДАФ от концентрации пероксидазы. Слева полные кривые, справа – область низких концентраций. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению.

Пределы обнаружения по пероксидазе хрена составили 0.05 пМ для полосы 733 cm^{-1} и 0.06 пМ для полосы 1374 cm^{-1} . Чувствительность (наклон линейного участка) составила 14 700 и 5 100 имп./пМ для полос 733 и 1374 cm^{-1} соответственно.

С использованием этого же субстрата (оФД) и тех же условий реакции была проведена колориметрическая регистрация активности фермента в иммунохимическом планшете при длине волны 454 нм (максимум поглощения ДАФ в кислой среде при pH = 3). Предел обнаружения пероксидазы составил 4.7 пМ, чувствительность 7.6×10^{-4} ОЕ/пМ. Таким образом, для одного и того же субстрата ГКР регистрация демонстрирует примерно в 100 раз более низкий предел обнаружения пероксидазы, чем колориметрическая.

Из проведенного исследования можно заключить, что ГКР регистрация продуктов пероксидазной реакции является весьма перспективной для использования в твердофазном ИФА. Даже на уровне прототипа, обладающего потенциалом к дальнейшей оптимизации, она демонстрирует чувствительность по ферменту примерно на 2 порядка лучше, чем колориметрия.

В работе использовали оборудование, приобретенное по Программе развития МГУ.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда, проект № 22-14-00213.

Список литературы:

1. Leopold N., Lendl B. *J. Phys. Chem. B* **107**, 5723 (2003).
2. Lin C.-E., Chen Y.-T. *J. Chromatogr. A* **871**, 357 (2000).
3. Brown K.C., Corbett J.F., Loveless N.P. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Spectrosc.* **35**, 421 (1979).
4. Mei L., Tai L.S., Tao F.H., Jie S., Rong L.Q. *Res. Chem. Intermed.* **38**, 499 (2012).

**Применение гиперспектральных изображений
как неинвазивного метода сортировки плодов авокадо**



Ежова М.В.¹, Метленкин Д.А.¹, Платов Ю.Т.¹, Платова Р.А.¹

¹ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им.
Г.В.Плеханова»

117997, г. Москва, Стремянный пер, д.36, Россия

Аннотация: Продемонстрированы различные подходы к использованию гиперспектральных изображений для сортировки плодов авокадо по разным критериям: степени зрелости, дефектам и влажности. Проанализированы и отобраны наиболее информативные спектральные индексы, отвечающие за изменения состояния качества плодов авокадо в течение времени. Методами гиперспектральной визуализации и многомерного анализа для неразрушающей сортировки плодов авокадо создана система классификации образцов по степени зрелости и наличию дефектов.

Ключевые слова: Гиперспектральное изображение, авокадо, влажность, индексы вегетации, дефекты, многомерный анализ, PCA, PLS-DA, SIMCA

Сортировка плодовоовощной продукции – комплексная задача, которая решается как органолептическими, так и инструментальными методами. Первые являются субъективными и неточными, вторые являются разрушающими [1] и сложными при подготовке проб [2].

Гиперспектральное изображение (HSI) [3] обладает преимуществами оптической спектроскопии [4] и предоставляет спектрально-пространственную информацию об объектах исследования. К важнейшим характеристикам, предъявляемым к цифровым камерам для регистрации HSI, относят: число пикселей и количество каналов спектра. При увеличении числа пикселей повышается детальность изображения поверхности плодов, а от числа каналов зависит точность и фиксируется изменчивость отражательной способности между областями поверхности одного плода или между множеством плодов.

Вегетационные индексы. Для сортировки плодов авокадо по степени зрелости отобраны и проанализированы следующие вегетационные индексы: индекс нормализованного различия произрастания (NDVI), в том числе его модификация (NDVI_{679/757}), индекс потребительской зрелости (CFI) и индекс растительной воды (PWI). Также предложен индекс NDVI_{757/679}, отличающийся от стандартного NDVI точкой экстремума диапазона red-edge, в котором была отобрана полоса при 757 нм, обладающая максимальной дисперсией.

Для оценки эффективности отобранных вегетационных индексов проведен отбор спектральных сигнатур плодов авокадо различного срока хранения (матрица X). По данным матрицы данных X спектральных сигнатур плодов авокадо рассчитаны вегетационные индексы. В табл. представлены средние значения индексов для различных категорий образцов авокадо, а также формулы расчета индексов.

Таблица Средние значения вегетационных индексов образцов авокадо от срока хранения

Индекс	Формула	Категории			
		fresh	7d	9d	12d
CFI	$\int_i^n R_i$	35,57	26,41	19,47	18,23
NDVI	$\frac{R_{800} - R_{680}}{R_{800} + R_{680}}$	0,858	0,74	0,66	0,52
NDVI _{757/679}	$\frac{R_{757} - R_{679}}{R_{757} + R_{679}}$	0,856	0,66	0,50	0,36
PWI	$\frac{R_{970}}{R_{900}}$	0,85	0,96	1,06	1,12

Визуализация гиперспектральных изображений плодов авокадо различного срока хранения, построенные с помощью двух вегетационных индексов: PWI и усовершенствованного NDVI757/679, в оттенках серого цвета (от темно-серого с минимальными значениями индексов до светло-серого с максимальными значениями индексов) представлены на рис. 1

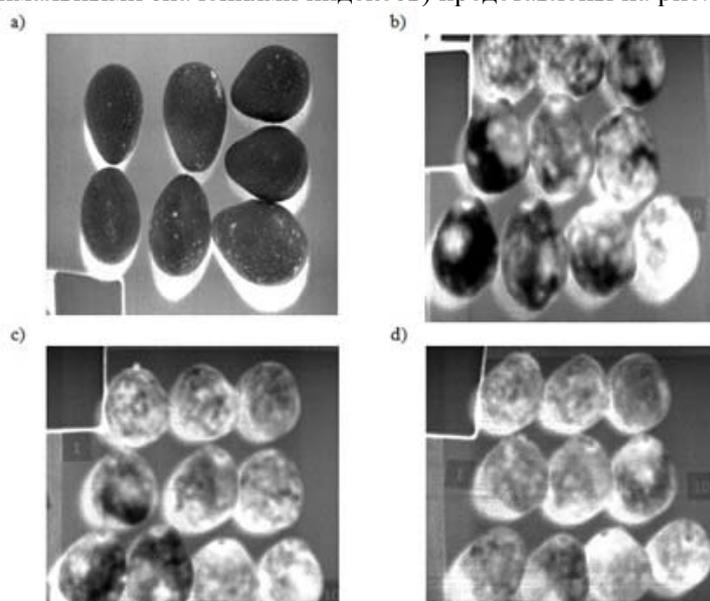


Рисунок 1. Гиперспектральные изображения плодов авокадо после применения индекса PWI: свежие (a); образцов на 7 день хранения (b); образцов на 9 день хранения (c); образцов на 12 день хранения (d)

Проведена процедура визуализации гиперспектральных изображений по значениям вегетационного индекса (PWI) рис.1 в оттенках серого цвета. Это позволило выявить изменение физиологического состояния плодов авокадо: потемнение и увеличение влажности экзокарпия, явно неопределяемые при органолептической оценке. Предложен подход к использованию гиперспектральной информации для определения потребительской зрелости и сортировки плодов авокадо в период их хранения в коммерческих организациях.

Неразрушающая идентификация дефектов и классификация плодов авокадо Хасс применением гиперспектрального изображения. Распознавание дефектов одна из сложных задач контроля показателей качества плодов из-за их разнообразия [5]. В обзоре [5] приведены исследования по обнаружению дефектов плодов и овощей: яблок, груш, бананов, картофеля, огурцов и других. А в работе [6] проведены исследования методами спектроскопии и HSI-технологии по выявлению поверхностных дефектов манго.

Очевидно, что при применении HSI-технологии обнаружение дефектов в отдельных плодах большой партии позволило бы их сортировать в режиме on-line на однородные по качеству группы. В связи с этим, целесообразна разработка неразрушающего метода распознавания (обнаружения) дефектов плодов авокадо и их классификация по наличию дефектов на категории качества с использованием методов HSI и многомерного анализа.

Для построения модели классификации плоды авокадо хранились в течение 10 дней в холодильнике при $t=4^{\circ}\text{C}$, после срока хранения проводили сенсорную оценку. По результатам сенсорной оценки плоды авокадо разделены на три категории в соответствии с [7]: критические дефекты (criticaldefects – «crit»); незначительные поверхностные дефекты (slight superficialdefects – «slight»); здоровые плоды, отсутствие дефектов (goodquality – «good»). В результате сенсорного анализа, плоды авокадо с недопустимыми дефектами выделены в отдельную категорию Crit.

Классификацию плодов авокадо на категории качества по наличию дефектов методами многомерного анализа проводили с использованием разных методов многомерной классификации [8], областей интереса (region of interest - ROI), спектрального диапазона [9]. Для увеличения точности итоговых моделей разработка моделей проводилась при отборе ROI - эллипсов ($n=10$), на плодах авокадо из разных категорий качества. Для разработки модели классификации было использовано три класса в соответствии с сенсорной оценкой категориями качества: 1) Crit – плоды с выраженным антракнозом кожуры (критические дефекты); Slight – плоды с повреждениями, вызванными низкой температурой, излишней внешней влажностью, опробковением кожуры и морщинами на кожуре (незначительные поверхностные дефекты); Good – плоды без дефектов.

При моделировании отмечалось низкая точность моделей с использованием в качестве ROI целых плодов, что связано с недостаточным количеством данных для классификации: при использовании ROI целых плодов количество переменных для калибровки составляло 10 шт., тогда как при использовании ROI эллипсов составило 100 шт. (10 эллипсов из 10 плодов). Низкая точность моделей с использованием ROI целого плода, в том числе, обусловлена включением в такие ROI спектральных сигнатур теней и отражений, обусловленных сильным освещением образцов галогеновой лампой. Также отмечено увеличение точности классификационных моделей в зависимости от выбора спектрального диапазона: удаление области 400-500 нм (слабый сигнал с низкой интенсивностью отражения или отсутствие сигнала), удаление области 990-1000 нм (значительные шумы). Таким образом, количество переменных-предикторов и выбор спектрального диапазона напрямую влияет на точность классификационных моделей.

По результатам моделирования построена многомерная модель метода SIMCA для классификации плодов авокадо на категории качества по наличию дефектов рис. 2

Таким образом, чтобы повысить эффективность сортировки большой партии плодов авокадо предложено использовать HSI-технологии для распознавания поверхностных и скрытых (внутренних) дефектов[10].

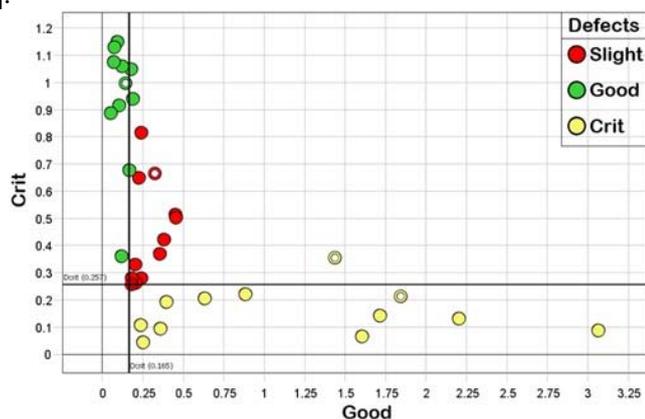


Рисунок 2. График модели SIMCA

Разработка калибровочных моделей определения влажности и сухого остатка плодов авокадо по данным HSI. Влажность является стандартным показателем качества плодов авокадо согласно стандарту UNECE, 2019. Однако, стандартная методика определения влажности имеет разрушающий характер, в связи с чем актуальна разработка калибровочных моделей определения влажности по данным HSI.

Измерение влажности (MS,%) проводилось с использованием влагомера MettlerToledoHB43-S. Для каждого образца авокадо из калибровочного набора отбиралась проба массой 10 г и высушивались при 100°C в до постоянной массы (45 мин). Разница между изначальной массой W_0 и массой после высушивания W_1 использовалась для расчета сухого вещества (DM,%) плодов авокадо из калибровочного набора, как представлено в уравнении (1).

$$DM(\%) = \frac{W_0 - W_1}{W_0} \times 100 \quad (1)$$

При разработке калибровочных моделей определения MS,% и DM,% используют матрицы данных X и Y. Матрица X – это матрица предикторов размерностью I×J, вторая матрица Y – матрица откликов размерностью I×K.

Выбрано два направления разработки калибровочных моделей:

- посредством отбора спектральных откликов HSI случайным образом с поверхности плодов;

- использование всей площади поверхности HSI (исходные HSI) плодов авокадо в качестве ROI.

Разработка калибровочных по спектральным откликам проведена методом PLS в программном комплексе UnscramblerX 10.0.4, по исходным HSI – в perClassMira 3.1 (perClass BV, Netherlands). По итогам моделирования были получены модели ПЛС для определения влажности и сухого остатка с точностью (R_p^2) равной 0,9 и 0,89 соответственно.

Разработку калибровочных моделей по исходным HSI плодов авокадо проводили с реализацией алгоритма: выделение плодов авокадо по контуру, удаление заднего фона и бликов от галогеновой лампы. После этого осуществлена сегментация объектов, то есть выделение каждого плода авокадо на передний план как отдельную область интереса (ROI).

Точность калибровочных моделей для определения DM,% и MS,% до удаления областей с бликами от галогеновой лампы составляла $R_C^2=0.93$ и $R_C^2=0.86$, соответственно. После сегментации HSI были разработаны калибровочные модели с высокой точностью $R_C^2=0.99$ для определения содержания MS,% (рис. 2a) и DM,% (рис. 2b). Высокая точность достигается за счет увеличения количества репрезентативных спектральных данных.

В отличие от калибровочных моделей по спектральным откликам, выбранным случайным образом с поверхности плодов, против моделей с использованием всей площади поверхности HSI достигается более высокая точность за счет увеличения спектральных данных - числа пикселей с площади изображения каждого плода авокадо из калибровочного набора.

Калибровочные модели по исходным гиперспектральным изображениям могут быть использованы для определения влажности и сухого вещества в интервалах допустимых значений в соответствии с действующим стандартом UNECE STANDARD FFV-42:2019.

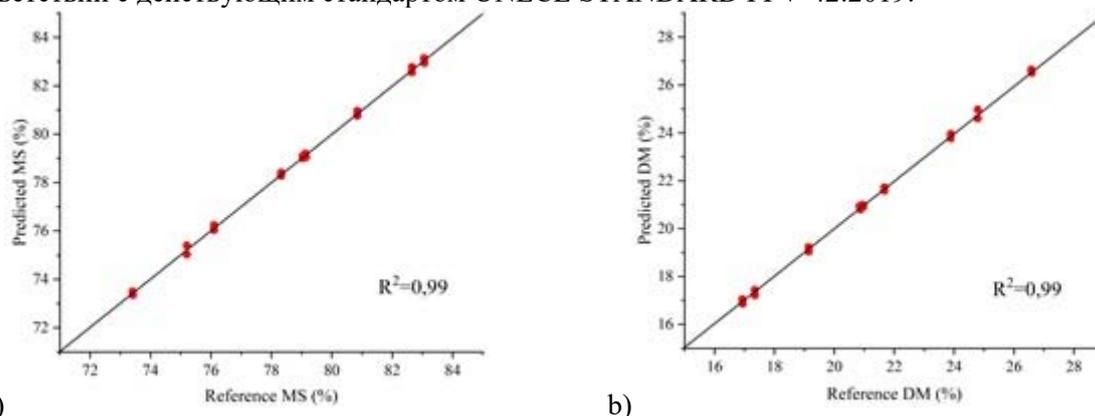


Рисунок 3. Калибровочные модели определения влажности (a) и сухого вещества (b) для плодов авокадо Хасс с использованием исходных HSI.

Заключение

Показан потенциал использования гиперспектрального изображения в видимом-ближнем инфракрасном диапазоне и многомерного анализа для неразрушающей идентификации плодов авокадо по различным критериям.

С помощью отбора информативных каналов методом главных компонент был модифицирован вегетационный индекс NDVI. Показано, что по координатам значений двух индексов PWI (оценка содержания воды) и NDVI757/679 (изменение пигментации кожуры) возможна градация плодов авокадо по срокам хранения.

Разработана и верифицирована классификационная модель метода SIMCA для классификации плодов авокадо на категории качества по наличию дефектов.

Продемонстрировано использование калибровочных моделей по исходным HSI для определения влажности и сухого вещества в интервалах допустимых значений в соответствии с действующим стандартом UNECE STANDARD FFV-42:2019.

Предложенный методический подход позволяет разработать технологию неразрушающего контроля качества при хранении в режиме реального времени на месте.

Список использованных источников

1. Ochoa-Ascencio S, Hertog ML, Nicolai BM. Modelling the transient effect of 1-MCP on 'Hass' avocado softening: A Mexican comparative study. *Postharvest Biol. Technol.* 2009;51(1):62-72.
2. Cerdas MM, Umaña G, Sáenz A. Documentorespaldo para la elaboración del Reglamento Oficial de Aguacate (Persea americana). Lab. Poscosecha, CIA, UCR. San José, CR. 2010;38(1):8.
3. Manley M. Near-infrared spectroscopy and hyperspectral imaging: non-destructive analysis of biological materials. *Chem. Soc. Rev.* 2014;43(24):8200-8214.
4. ElMasry G, Sun DW, Allen P. Near-infrared hyperspectral imaging for predicting colour, pH and tenderness of fresh beef. *J. Food Eng.* 2012; 110(1):127-140.
5. Bhargava, A., & Bansal, A. 2021. Fruits and vegetables quality evaluation using computer vision: A review. *Journal of King Saud University-Computer and Information Sciences*, 33(3), 243-257.
6. Patel, K. K., Kar, A., & Khan, M. A. (2019). Potential of reflected UV imaging technique for detection of defects on the surface area of mango. *Journal of food science and technology*, 56(3), 1295-1301.
7. UNECE STANDARD FFV-42. 2019. 'Concerning the marketing and commercial quality control of Avocados'. Agricultural Quality Standards, Geneva, Switzerland.

8. Torres, I., & Amigo, J. M. 2020. An overview of regression methods in hyperspectral and multispectral imaging. *Data Handling in Science and Technology*, 32, 205-230.
9. Jia, B., Wang, W., Ni, X., Lawrence, K. C., Zhuang, H., Yoon, S. C., & Gao, Z. 2020. Essential processing methods of hyperspectral images of agricultural and food products. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 198, 103936.
10. Metlenkin, D. A., Platov, Y. T., Platova, R. A., Zhirkova, E. V., & Teneva, O. T. 2022. Non-destructive identification of defects and classification of Hass avocado fruits with the use of a hyperspectral image. *Agronomy Research*, 20(2), 326-340.

Спектральные, теплофизические и физико-механические свойства систем порфирина-полимер на основе полилактида и мезо-арилпорфиринов

Захаров М.С.¹, Тertyшная Ю.В.^{1,2}, Жданова К.А.³

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля

Российской академии наук, Москва

Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, Москва, Россия

МИРЭА — Российский технологический университет, г. Москва, Россия

E-mail: Imbapason@yandex.ru

Ключевые слова: полилактид, тетрафенилпорфирин, композит, антибактериальные свойства.

Высокая резистентность патогенов к лекарственным препаратам является проблемой настоящего времени. Помимо сопротивляемости, некоторые виды микроорганизмов могут образовывать биопленки, в которых они устойчивы к внешним воздействиям [1-3]. В биопленке, помимо внешней защиты, микроорганизмы могут активно размножаться, вынуждая увеличивать концентрацию дозу лекарств или антибиотиков, что может негативно сказаться на организме человека, поэтому синтез новых полимерных биологически активных соединений и получение полимерных материалов биомедицинского назначения является активно развивающейся областью. Ведутся поиски новых композиционных материалов, которые будут не только обладать нужным лечебным эффектом, но и будут экологически безопасны для человека и окружающей среды.

Пристальное внимание уделяется так называемым «зеленым полимерам» из-за их экологичности. К таким полимерам относится полилактид (ПЛА). Полилактид – термопластичный полиэфир, синтезируемый методом полимеризации молочной кислоты, которую получают из возобновляемых источников растительного сырья (кукурузы, пшеницы, сахарной свеклы). Ввиду своей биосовместимости и биодеструкции полилактид широко применяется в медицине: для производства хирургических нитей и штифтов, в системах доставки лекарств. Однако полилактид не обладает антибактериальными свойствами. Ученые пытаются решить эту проблему путем добавления в него биологически активного соединения, получив при этом полимерный композиционный материал, который будет не только экологичным и биосовместимым с организмом человека, но и обладать антибактериальными свойствами.

В качестве такого биологически активного соединения можно рассмотреть синтетические порфирины, которые активно изучаются учеными в последние десятилетия. Синтетические порфирины используются в качестве катализаторов, сенсоров и в фотодинамической терапии. Также порфирины характеризуются наличием антибактериальных свойств. Известны работы с металлопорфиринами, где в качестве металла использовался палладий [4] и марганец [5,6], где были рассмотрены антибактериальные свойства порфиринов.

Сегодня большое внимание исследователей привлекает метод антимикробной фотодинамической терапии (АФДТ). АФДТ – это новая стратегия лечения патогенных микроорганизмов, которые устойчивы к лекарствам [7]. Метод основан на использовании фотосенсибилизаторов (ФС), они вводятся в организм и активируются световым излучением. Далее происходит образование синглетного кислорода и свободных радикалов, которые уничтожают клеточную стенку бактерии, приводя ее к гибели. Метод хорош тем, что у бактерий не возникает резистентность, как если бы были применены антибиотики [8].

Интерес к порфиринам не угасает, и на сегодняшний день синтезируются новые формы порфиринов, которые обладают необходимыми характеристиками и свойствами для того или иного процесса (катализаторы, ФС, хемосенсоры и др.) [9].

Известно, что незамещенные порфирины характеризуются низкой растворимостью, это может привести к образованию неупорядоченных агрегатов в органических или водных растворах. Присоединение высших алкильных заместителей может решить проблему с агрегацией. В результате добавления такого замещенного порфирина в полимерную матрицу позволит создать материал, который будет обладать бактерицидным эффектом, и который будет экологически безопасным и биосовместимым. В данной работе рассматривались 3 полимерные композиционные системы на основе полилактида с добавлением в его матрицу следующих мезо-арилпорфиринов: 1) 5,10,15,20-тетракис-(п-н-гексилорифенил)порфирин –ТФП4ОС₆, 2) 5,10,15,20-тетракис-(п-н-гексадецилорифенил)порфирина – ТФП4ОС₁₆, 3) 5-(4-пиридил)-10,15,20-трис-(4-н-гексадецилорифенил)порфирина – ТФПЗОС₁₆Ру.

Предполагается, что полученные материалы могут найти применение в качестве антибактериальных покрытий или материала медико-биологического назначения.

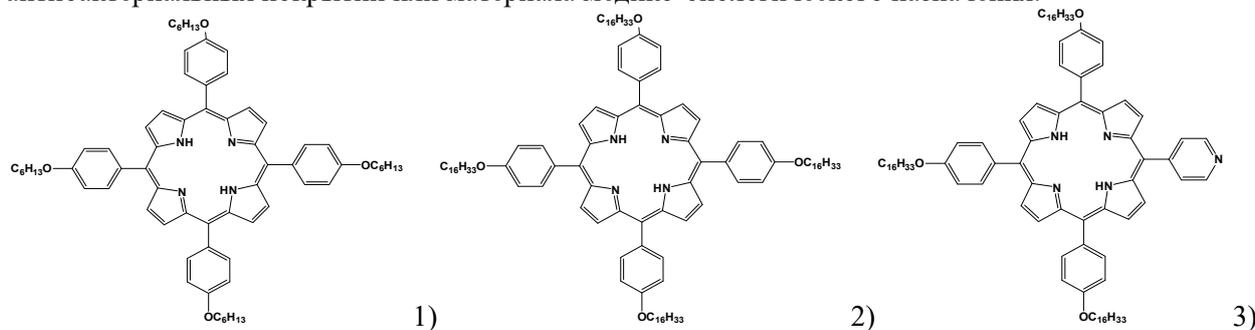


Схема 1. Молекулярные структуры порфиринов с различными заместителями.

Образцы ПЛА-ТФП были получены в виде пленок, методом полива из раствора. Растворитель – хлороформ. Содержание ТФП4ОС₆, ТФП4ОС₁₆ и ТФПЗОС₁₆Ру в пленочном композите составило 0.5 мас. %. После получения образцов изучались их спектральные, теплофизические характеристики, а также физико-механические свойства.

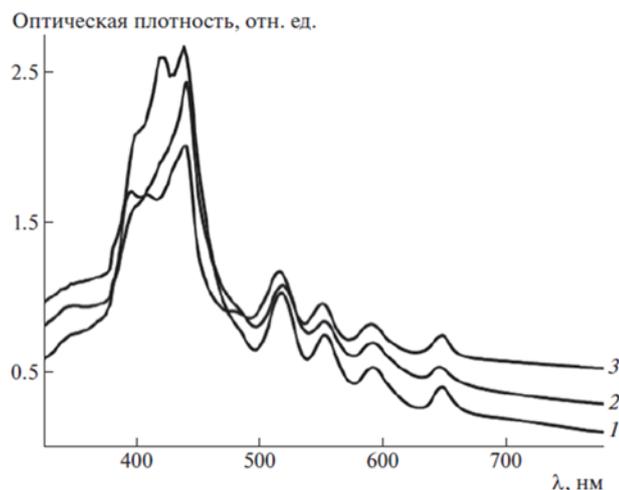


Рис. 1. Электронные спектры поглощения композиций ПЛА-ТФП4ОС₆ (1), ПЛА-ТФП4ОС₁₆ (2) и ПЛА-ТФПЗОС₁₆Ру (3).

Были получены УФ- спектры композитов (видимая область), чтобы проверить наличие порфирина в матрице ПЛА. Для всех порфиринов характерна полоса Soret – широкий пик в диапазоне около 400 нм. На рис.1 видно, что добавление порфиринов в ПЛА сопровождается bathochromic сдвигом. В случае с ПЛА-ТФП4ОС₆ и ПЛА-ТФПЗОС₁₆Ру, происходит расщепление полосы Soret на 420 и 440 нм для ТФП4ОС₆ (чистый ТФП4ОС₆ имеет полосу Soret 420 нм). Полоса Soret ТФПЗОС₁₆Ру расщепляется на 400, 420, и 440 нм (чистый ТФПЗОС₁₆Ру имеет полосу Soret 440 нм). Также для порфиринов с симметричными заместителями характерны 4 Q-полосы в диапазоне 500-650 нм, которые присутствуют на спектрах поглощения.

Чтобы определить влияние порфиринов на теплофизические характеристики полилактида, методом ДСК были получены термограммы плавления композитов (рис.2). На рисунке видно, что при введении в матрицу ПЛА порфиринов, у всех образцов с различными порфиринами температура стеклования T_с и температура “холодной” кристаллизация отсутствует. Объяснить такое можно следующим образом: в процессе кристаллизации полилактида порфирин заполняет свободный объем в матрице ПЛА, выступая в роли

пластификатора. Из-за этого теплофизические характеристики в композиционных образцах меняются.

Исходя из данных таблицы 1 следует, что добавление порфирина в ПЛА уменьшает температура плавления ($T_{пл}$) и степень кристалличности в зависимости от используемого порфирина на 3-4 °С и 4-7% соответственно.

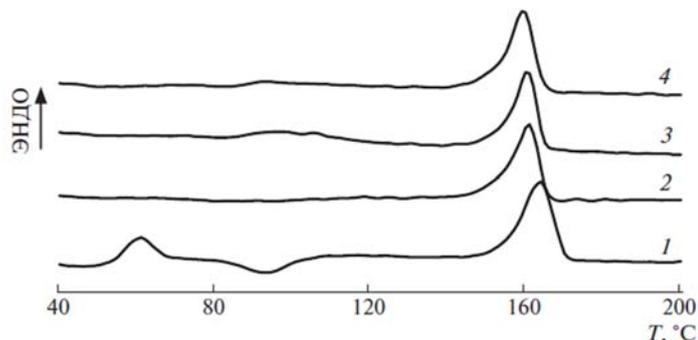


Рис 2. Термограммы ПЛА (1) и ПЛА-ТФП4ОС₆ (2), ПЛА-ТФП4ОС₁₆ (3) и ПЛА-ТФП3ОС₁₆Ру (4).

Таблица 1. Теплофизические показатели образцов ПЛА и ПЛА-ТФП4ОС₆

Образец	$T_c, °C \pm 0.3$	$T_{пл}, °C \pm 0.3$	$T_{кр}, °C \pm 0.3$	$\chi_{кр}, \% \pm 0.5$
ПЛА	59.6	165.0	92.5	38
ПЛА-ТФП4ОС ₆	—	162.4	—	33
ПЛА-ТФП4ОС ₁₆	—	162.0	—	31
ПЛА-ТФП3ОС ₁₆ Ру	—	161.2	—	34

Изменение степени кристалличности может повлиять на эксплуатационные характеристики полученных материалов. На рис.3. приведены физико-механические характеристики композитов. Прочность при растяжении уменьшается незначительно во всех образцах. Интересный факт наблюдается при добавлении порфиринов всех типов к ПЛА, они повышают относительное удлинение. Более значимое увеличение (примерно в 1.4 раза) наблюдается для композиций ПЛА-ТФП4ОС₆ и ПЛА-ТФП3ОС₁₆Ру.

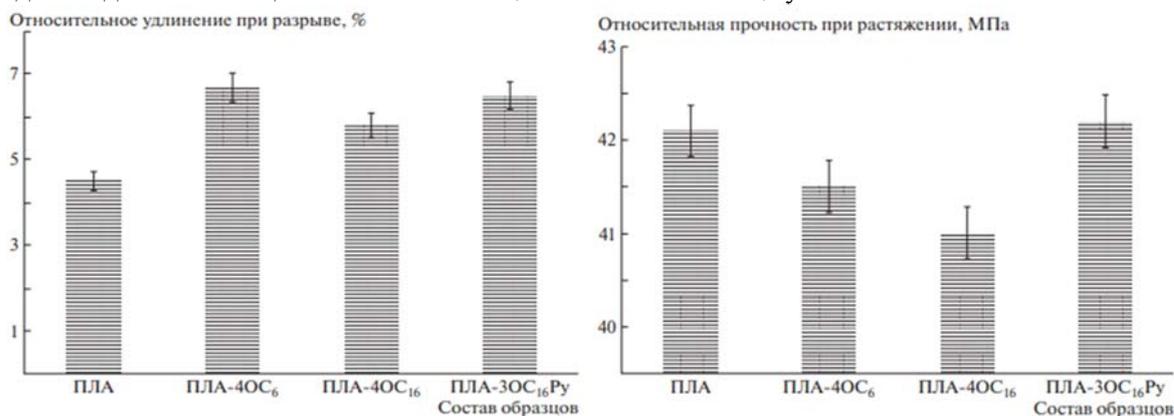


Рис 3. Физико-механические характеристики композитов с содержанием порфиринов в количестве 0.5 масс. %

Исходя из экспериментальных данных, можно заключить:

1. Получены новые полимерные композиционные материалы на основе полилактида с добавлением алкоксисамещенных мезо-арилпорфиринов.
2. С помощью электронных спектров было доказано наличие порфирина в матрице ПЛА.
3. Исследование физико-механических характеристик показало незначительное уменьшение относительной прочности и увеличение относительного удлинения при разрыве, до 1.4 раза у композитов ПЛА-ТФП4ОС₆ и ПЛА-ТФП3ОС₁₆Ру.
4. Методом ДСК установлено некоторое влияние порфиринов на теплофизические характеристики матрицы ПЛА. Температура стеклования и холодной кристаллизации у композитов трудноопределимая, температура плавления незначительно уменьшается на 3-4 °С, степень кристалличности уменьшается на 3-5% в зависимости от исследуемого порфирина.

Список литературы:

1. Boyle-Vavra S., Labischinski H., Eber C.C. Antimicrob Agents Chemother. 2001, 45, 280-287.
2. Roland K.L., Esther C.R., Spitznagel J.K. Bacteriol, 1994, 176. 589-597.
3. Harder K.J., Nikaido H., Matsuhashi M. Antimicrob Agents Chemother. 1981, 20, 549-552.
4. da Silveira C.H., Viviane V., Clericib D.J., Santos R.C.V., Iglesias B.A. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2020, 31. doi 10.1016/j.pdpdt.2020.101920
5. Тертышная Ю. В., Лобанов А. В., Хватов А. В. Хим. физика. 2020, 39, № 11, 52–57. [Tertyshnaya Yu. V., Khvatov A.V., Lobanov A.V. Russian journal of physical chemistry. 2020, 14, No. 6, 1022-1027.] doi 10.31857/S0207401X20110138
6. Tertyshnaya Yu.V., Lobanov A.V., Karpova S.G., Pantyukhova P.V. Journal of Molecular Liquids. 2020, 302, № 112176. doi 10.1016/j.molliq.2019.112176
7. Mesquita M.Q., Dias C.J., Neves M.G.P.M.S., Almeida A., Faustino M.A.F. Molecules. 2018, 23, 2424. doi 10.3390/molecules23102424
8. Vera D.M., Haynes M.H., Ball A.R., Dai T., Astrakas C., Kelso M. J., R Hamblin M., P Tegos G. Photochem Photobiol. 2012, 88, 499-511. doi 10.1111/j.1751-1097.2012.01087.x
9. Lucky S.S., Soo K.C., Zhang Y. Chem Rev. 2015, 115. 1990–2042. doi 10.1021/cr5004198

Сходство и различия в поведении *N*-ацетилцистеина и глутатиона в условиях окислительного стресса

К.М. Зинатулина¹, А.В. Орехова¹, О.Т. Касакина¹, Н.П. Храмеева²

¹ФГБУН Федеральный исследовательский центр химической физики
им. Н.Н. Семенова РАН,

г. Москва, e-mail: karinazinat11@gmail.com

²ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва

Уже более 20 лет *N*-ацетилцистеин (NSH), используется в клинической практике в качестве муколитического средства, вводимого ингаляционно. NSH разрушает дисульфидные связи в слизи, делая ее менее вязкой, а также используется в качестве эффективного противоядия при отравлении парацетамолом и защищает от токсичности доксорубина [1–3]. Присутствие тиоловой группы в *N*-ацетилцистеине объясняет его способность связываться с химически активными соединениями, в том числе аминокислотой L-цистеином, биоантиоксидантом глутатионом (GSH) и другими эндогенными сульфгидрилсодержащими молекулами в слизи, тканях и плазме. Основная роль NSH в организме – пополнение запасов GSH. Имеются отрывочные данные о его заметных терапевтических эффектах в условиях, характеризующихся снижением GSH или окислительного стресса: ВИЧ-инфекция, рак, болезни сердца и курение сигарет [4–9].

Восстановительная активность тиолов важна для протекания многих биохимических и фармакологических реакций, например, восстановления дисульфидных связей в белках и участие в процессах детоксикации ксенобиотиков. Тем не менее, восприимчивость тиолов к окислению, может привести к образованию свободных радикалов, что может быть важным фактором, опосредующим токсичность некоторых тиолсодержащих соединений [10]. Так было установлено, что GSH взаимодействует с H₂O₂ в отсутствие ферментов в деионизированной воде [11-14], и в этой реакции, в том числе и с NSH, образуются радикалы [14-16]. Скорость образования радикалов составляет небольшую долю в общем расходовании для GSH и NSH (<1%), но ее достаточно для инициирования цепной тиол-ен реакции с фенольными соединениями – ресвератролом и кофейной кислотой, имеющими двойные связи в боковой цепи [17,18]. Скорости тиол-ен реакций фенолов с GSH в присутствии H₂O₂ сильно зависят от ионного состава водной среды, типа буферных растворов и протекают при pH > 7 [19]. В одинаковых условиях GSH и NSH обеспечивают практически одинаковые скорости инициирования радикалов, и тиольные радикалы из NSH близки по активности к GS[•] в реакциях продолжения цепи. [20].

В данной работе сопоставлены данные взаимодействия NSH и GSH с природным фенолом ресвератролом в присутствии H₂O₂ в водной среде.

Материалы и методы

N-ацетилцистеин (NSH, «AcrosOrganics»), глутатион (GSH), реактив Элмана, DTNB, (5,5'-дителиобис-(2-нитробензойная кислота) – все «Sigma-Aldrich», пероксид водорода (H₂O₂,

«PanReacAppliChem»), транс-ресвератрол(RVT), «abcгmbH», $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ «Labkem», $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – «PCGroup», NaCl , KCl – «Компонент-реактив» использовали без предварительной очистки.

В качестве реакционной среды использовали деионизованную воду (Direct-Q UV Millipore, 18 МОм·см, pH 7). Базовый раствор RVT(10 мМ) готовили в этаноле («Медхимпром»), который добавляли к реакционной смеси. Концентрацию H_2O_2 (отсутствие тиолов) контролировали йодометрически. Концентрацию NSH и GSH измеряли методом Элмана[21].

Тиол-ен реакции NSH с RVT в присутствии H_2O_2 проводили при температуре 37°C в стеклянной термостатируемой ячейке, снабженной устройствами для отбора проб и барботажа воздухом. По ходу реакции из реакционного сосуда отбирали аликвоты по 120 мкл для анализа RVT и 45 мкл NSH. Аликвоты добавляли соответственно к 2 мл деионизованной воды и натрий-фосфатного буферного раствора (PBS, pH 7.4), содержащего 0,1 мМ DTTNB, и записывали УФ-спектры.

Исследования молекулярных продуктов реакции проводили методом масс-спектрометрии на комбинированном квадруполь-время пролётом масс-спектрометре сверхвысокого разрешения MaXis impact HDTM (Bruker Daltonics) методом электроспрейной ионизации в режиме измерения положительных ионов.

Измерения pH растворов проводили pH-метром-милливольтметром pH-410 «Аквилон». Ошибка в измерении $\text{pH} \pm 0,02$. Ошибка в измерении скоростей не превышала 15%.

Результаты и обсуждение

Ранее было установлено, что RVT не взаимодействует с H_2O_2 и с GSH по отдельности [17, 22]. RVT не взаимодействует и с NSH в отличие от цистеина [17], несмотря на то, что NSH является его ацетилированным вариантом. В работе [22] показано, что в присутствии RVT скорость расходования GSH в реакции с H_2O_2 не увеличивается за счет дополнительного расходования в цепной реакции с RVT, а уменьшается (табл.1). Этот эффект при составлении кинетической модели процесса получилось описать образованием комплекса GSH с RVT [22]. GSH и NSH содержат в молекуле карбоксильные группы (рис.1), диссоциация которых приводит к снижению pH реакционной среды в деионизованной воде (табл.1). В этих условиях GSH образует димеры, зарегистрированные масс-спектрометрически [22], которые влияют на кинетику реакции его участием [11, 22]. Димеры NSH масс-спектрометрически не регистрируются, и, вероятно, не образуются в виду меньшего количества функциональных групп в молекуле NSH, чем у GSH (рис.1). Скорее всего стерические эффекты NSH дают обратный эффект в тиол-ен реакции с RVT: скорость расходования NSH, в отличие от GSH, увеличивается почти в 2 раза при добавке RVT к реакционной смеси NSH с H_2O_2 , а скорость расходования RVT, наоборот, уменьшается (табл.1)



Рисунок 1. Структурные формулы глутатиона (GSH) и N-ацетилцистеина (NSH).

Таблица 1. Скорости расходования тиолов (W_{TSH}) и скорость расходования RVT (W_{RVT}) в тиол-ен реакции 0,5 мМ RVT с 2 мМ тиолов в присутствии 2 мМ H_2O_2 и в отсутствие RVT.

Реакция	$W_{\text{TSH}} \times 10^{-8}$	$W_{\text{RVT}} \times 10^{-8}$	pH
GSH + H_2O_2	$3,7 \pm 0,2$	–	$3,20 \pm 0,02$
GSH + H_2O_2 + RVT	$1,6 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,1$	$3,20 \pm 0,02$
NSH + H_2O_2	$1,4 \pm 0,1$	–	$3,13 \pm 0,02$
NSH + H_2O_2 + RVT	$2,5 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,04$	$3,13 \pm 0,02$

Стерические эффекты NSH и GSH в реакции с H_2O_2 имеют место в калий- и натрий-фосфатных буферах с одинаковыми pH 7,35: скорость расходования GSH в K-фосфатном буфере в 2,5 раза выше, чем в Na-фосфатном буфере, в то время как для NSH скорости различаются в 1,5 раза. Различия в скоростях расходования тиолов объясняются тем, что ионы K^+ связываются с пептидными карбонильными C=O группами аминокислот на 100–250 ккал/моль прочнее, чем ионы Na^+ [23]. Большую роль в селективности преимущественного связывания K^+ играет меньшая энергия гидратации (энергия гидратации Na^+ и K^+ составляет около –98 ккал/моль и –80 ккал/моль). В виду того, что плотность заряда на Na^+ выше, чем на K^+ , это обеспечивает лучшее

связывание Na^+ с диссоциированными карбоксильными группами аминокислот [23]. Связывание карбонильных групп GSH ионами K^+ затрудняет образование димеров глутатиона. В этом случае увеличивается доля молекул GSH, способных взаимодействовать с H_2O_2 , соответственно, увеличивается W_{GSH} в К-фосфатном буфере по сравнению с Na-фосфатным буфером.

Таблица 2. Скорости расходования 10×10^{-5} М GSH и NSH в реакции с 2×10^{-5} М H_2O_2 в разных средах.

Среда	$W_{\text{GSH}} \times 10^{-9}, \text{M} \times \text{c}^{-1}$	$W_{\text{NSH}} \times 10^{-9}, \text{M} \times \text{c}^{-1}$
Деионизированная вода (pH 7,00)	$2,3 \pm 0,1$	$8,0 \pm 0,4$
Na-фосфатный буфер (pH 7,35)	$7,6 \pm 0,4$	$9,3 \pm 0,5$
К-фосфатный буфер (pH 7,35)	$19,0 \pm 0,$	$15,5 \pm 0,8$

Отличия в скоростях расходования NSH и GSH в деионизированной воде подтверждают эти данные – для NSH значение величины скорости больше в 3,5 раза по сравнению с GSH, т.к. не затруднено взаимодействие SH-группы с H_2O_2 в виду отсутствия димеров NSH в растворе. Таким же образом ионы Na^+ практически не влияют на межмолекулярное взаимодействие молекул NSH в растворе, поэтому W_{ASH} в деионизированной воде и Na-фосфатном буфере близки (табл.2).

Авторы выражают благодарность Подольскому Илье Игоревичу за помощь в анализе молекулярных продуктов реакции на комбинированном квадруполь-времяпролётном масс-спектрометре сверхвысокого разрешения MaXis impact (Bruker Daltonics, Германия).

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №20-03-00753 и в рамках Гос.заданий 1220328000859, 0089-2019-0008 № АААА-А19-119041090087-4.

Литература

1. Tieu S., Karrow N., Mallard B., Bridle B., Charch A., Wagter-Lesperance L. // *SURG.* 2022. Vol. 14, № 1. <https://doi.org/10.21083/surg.v14i1.7081>.
2. Акако J. Y., Ramachandran A., Curry S. C., Rumack B. H., Jaeschke H. // *Archives of Toxicology*. 2022. Vol. 96. P. 453. <https://doi.org/10.1007/s00204-021-03211-z>.
3. Arica V., Demir I. H., Tutanc M., Basarslan F., Arica S., Karcoiglu M., Öztürk H., Nacar A. // *Hum Exp Toxicol*. 2013. Vol. 32. № 6. P. 655. doi: 10.1177/0960327112467043.
4. Zafarullah M., Li W. Q., Sylvester J., Ahmad M. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2003. Vol. 60. P. 6.
5. Kelly G. S. // *Alternative Medicine Review*. 1998. Vol. 3. No 2. P. 114.
6. Monograph. N-acetylcysteine. *Alternative Medicine Review* 2000. Vol. 5, No 5. P. 467.
7. Smilkstein M. J., Knapp G. L., Kulig K. W., Rumack B. H. // *N Engl J Med*. 1988. Vol. 319. P. 1557.
8. Aruoma O. I., Halliwell B., Hoey B. M., Butler J. // *Free Radical Biology and Medicine*. 1989. Vol. 6. № 6. P. 593.
9. Zalewska A., Szarmach I., Zendzian-Piotrowska M., Maciejczyk M. // *Nutrients*. 2020. Vol. 12. P. 458. doi:10.3390/nu12020458.
10. Mottley C., Toy K., Mason R. P. // *Molecular Pharmacology*. 1987. Vol. 31. P. 417.
11. Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Кузьмин В.А., Храмеева Н.П. // *Кинетика и Катализ*. 2019. Т. 60. № 3. С. 281.
12. Singh B., Das R. S., Banerjee R., Mukhopadhyay S. // *Inorganica Chimica Acta*. 2014. № 418 P. 51.
13. Winterbourn C.C., Hampton M.B. // *Free Radic Biol Med*. 2008. № 45. P. 549.
14. Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Мотякин М.В., Ионова И.С., Дегтярев Е.Н., Храмеева Н.П. // *Известия Академии наук. Серия химическая*. 2020. № 10. С. 1865.
15. Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Кузьмин В.А., Храмеева Н.П., Шапиро Б.И. // *Изв. АН. Сер. Хим.* 2017. № 7. С. 1300.
16. Карпухина А.В., Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Кузьмин В.А., Мотякин М.В. Взаимодействие ацетилцистеина с активными формами кислорода. Биоантиоксидант: материалы X Международной конференции, посвященной 105-летию со дня рождения академика Н.М. Эмануэля. Москва, 29 сентября – 2 октября 2020 г. – Москва: РУДН, 2020. – 119 с. ил.
17. Зинатуллина К.М., Храмеева Н.П., Касаикина О.Т., Шапиро Б.И., Кузьмин В.А. // *Изв. АН. Серия химич.* 2017. № 11. с. 2145.
18. Zinatullina K.M., Khrameeva N.P., Kasaikina O.T. // *Bulg. Chem. Comm.* 2018. Vol. 50. Special Issue C. P. 25.
19. К.М. Зинатуллина, О.Т. Касаикина, В.А. Кузьмин, Н.П. Храмеева, Л.М. Писаренко. // *Изв. АН. Сер. Хим.*, 2019, № 7. С. 1441.

20. Карпухина А.В., Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Храмеева Н.П., Орехова А.В. // В сборнике: Биохимическая физика. Труды XX ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-вузы и IV симпозиума «Современное материаловедение». Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. Москва, 2021. С. 83-86.
21. Ellman G. L. // Arch. Biochem. Biophys. 1959. Vol. 82. P. 70.
22. Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Храмеева Н.П., Индейкина М.И., Кононихина А.С. // Кинетика и Катализ. 2021. Т. 62. № 2. С. 198.
23. Korolev N. // BioEssays. 2020. 2000108; DOI: 10.1002/bies.202000108.

Рациональное использование молочной сыворотки в пищевом производстве и сельском хозяйстве

Иванова Софья Михайловна, Потапова Марина Сергеевна

Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, Белгород, 1555066@bsu.edu.ru

Переработка молока в молочно-белковые концентраты – сыр, творог, казеин, неизбежно связана с получением побочного продукта сладкой или кислой молочной сыворотки. Мировое производство сыворотки оценивается примерно от 180 до 190 тонн/год. Из этого количества только 50% перерабатывается. [2]. В Российской Федерации перерабатывается всего 30-40% от общего количества молочной сыворотки, что является нерациональным, так как её можно использовать в качестве ценного нутриента. [4]

Целью данного исследования было выявление наиболее перспективных вариантов использования молочной сыворотки в пищевом производстве и сельском хозяйстве. Для достижения данной цели необходимо понять, что из себя представляет молочная сыворотка.

Молочная сыворотка — это зеленовато-желтая жидкость, которая обладает выраженным кисло-молочным ароматом и слегка сладковатым вкусом. Она представляет собой побочное сырьё с высоким содержанием органических и солевых веществ, имеет высокую питательную ценность, а также является богатым источником сывороточных белков для пищевого, биологического и функционального применения. В молочной сыворотке содержится более 50 % ценных компонентов молока – легко усваиваемые сывороточные белки, а также лактоза и аминокислоты. [1]

Для рационального применения молочной сыворотки можно предложить следующие пути использования. Прежде всего, необработанную сыворотку возможно использовать в качестве корма для сельскохозяйственных животных или удобрений. Например, существуют технологии использования необработанной сыворотки в США, Италии, Дании и других странах, для полива полей – до 7 т/га, на свинофермах для кормления – 10– 15 л в день на 1 голову скота. [10]

Применение молочной сыворотке также находят и в технологической разработке функциональных продуктов. Одна из основных технических проблем при производстве — это выбор богатых белком ингредиентов. Сыворотка, в свою очередь, является дешевым и высокобелковым ингредиентом, содержащим не менее 10 грамм белка на 1 литр. [3] Именно поэтому использование молочной сыворотки как функциональной пищевой добавки позволит увеличить содержание белка в продукте.

Молочная сыворотка находит своё применение в качестве субстрата для ферментации при производстве биологических продуктов благодаря смеси лактозы, белков, жиров, витаминов, минералов. Данные вещества являются источником питательных веществ для роста микроорганизмов, что позволяет получать ряд производных: биоэтанол, глицерин, сывороточные вина, ацетат магния и кальция, летучие ароматизаторы, грибковые ферменты и др. [9]

В молочной сыворотке была выявлена способность предотвращать окисление липидов в мясных продуктах. Коммерческое использование сыворотки для таких целей не было оценено, но это свойство делает производные сыворотки безопасными в качестве антиоксидантов в продуктах с высоким содержанием жира. [8]

Благодаря большому разнообразию белков, молочную сыворотку возможно использовать в виде отдельных составляющих. Основными сывороточными белками в коровьей молочной сыворотке являются: β -лактоглобулин и α -лактоальбумин – низкомолекулярные белки, которые составляют около 70–80% общего белка молочной сыворотки. В состав сыворотки так же входит

бычий сывороточный альбумин, иммуноглобулины, некоторые фракции казеина и другие белки: гликомакропептиды, протеозопептоны, лактоферрин, многочисленные биоактивные вещества и ферменты. [6]

Рассмотрим ценность отдельных составляющих молочной сыворотки на примере белка лактоферрина. Данный белок имеет значительную биологическую ценность и является натуральным антиоксидантом, который обладает бактерицидными свойствами, он способствует защитным функциям новорожденных от инфекций. Больше всего лактоферрина в молозиве (около 5 мг/см³). Лактоферрин повышает иммунитет и сопротивляемость организмов в первые дни жизни. Кроме того, благодаря железосвязывающему свойству он ингибирует рост патогенных бактерий и грибков, способствует росту бифидобактерий, обеспечивая тем самым нормальное функционирование кишечной микрофлоры новорожденных. [7]

Большое содержание лактозы в молочной сыворотке дает возможность использовать ее как наполнитель для увеличения вкусовых качеств в напитках. Благодаря своим физико-химическим свойствам она менее сладкая и менее растворимая, чем сахароза, имеет низкий уровень гигроскопичности, что благоприятно влияет на качество готового продукта. [5]

Таким образом, многочисленные функциональные и пищевые свойства сывороточных белков и продуктов на их основе позволяют обеспечить применение производных молочной сыворотки в широких разветвлениях пищевой и сельскохозяйственной промышленности. А ее целебные свойства, такие как антиоксидантные, иммуномодуляторные, стимуляторные и противоопухолевые, позволяют получить разнообразный спектр биологических активных добавок, применяемых в фармацевтической отрасли.

Список литературы

1. И.В. Паладий, Е.Г. Врабие, К.Г. Спринчан, & М.К. Болога (2021). Молочная сыворотка: обзор работ. Часть 1. Классификация, состав, свойства, производные, применение. Электронная обработка материалов, 57 (1), 52-69. doi: 10.5281/zenodo.4456698
2. Baldasso, C., Barros, T. C., & Tessaro, I. C. (2011). Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. *Desalination*, 278(1-3), 381–386. <https://doi.org/10.1016/J.DESAL.2011.05.055>
3. Шарипова, М. Б. Использование молочной сыворотки в технологии хлеба / М. Б. Шарипова // Вестник Технологического университета Таджикистана. – 2020. – № 3(42). – С. 83-89. – EDN AEZODC.
4. Бобылев, Д. О. Применение микрофильтрации и ультрафильтрации с целью безотходной переработки молочной сыворотки / Д. О. Бобылев, В. А. Лазарев // Актуальные проблемы развития технических наук: Сборник статей участников XXI Областного конкурса научно-исследовательских работ «Научный Олимп» по направлению «Технические науки» / Департамент молодежной политики Свердловской области; ГАУ СО «Дом молодежи»; ФГАУ ВО Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина. – Екатеринбург: Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, 2018. – С. 45-50. – EDN YSSFIT.
5. Andiç, S., & Oğuz, Ş. Lactose and Lactose Derivatives. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 10(6), 1130–1137. <https://doi.org/10.24925/TURJAF.V10I6.1130-1137.4935>
6. Короткий Игорь Алексееви, Плотников Игорь Борисович, & Мазеева Ирина Александровн (2019). Современные тенденции в переработке молочной сыворотки. *Техника и технология пищевых производств*, 49 (2), 227-234. doi: 10.21603/2074-9414-2019-2-227-234
7. Sánchez, L. (1992). Biological role of lactoferrin. *Archives of Disease in Childhood*.
8. Ruann Janser Soares de Castro, Maria Aliciane Fontenele Domingues, André Ohara, Paula Kiyomi Okuro, Jessika Gonçalves dos Santos, Ramon Peres Brexó, Hélia Harumi Sato. (2017). Whey protein as a key component in food systems: Physicochemical properties, production technologies and applications, 17-29. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2017.05.004>.
9. Lappa IK, Papadaki A, Kachrimanidou V, Terpou A, Koulougliotis D, Eriotou E, Kopsahelis N. Cheese Whey Processing: Integrated Biorefinery Concepts and Emerging Food Applications. *Foods*. 2019; 8(8):347. <https://doi.org/10.3390/foods8080347>
10. Евдокимов, И. А. Современное состояние переработки молочной сыворотки / И. А. Евдокимов, А. Г. Храмцов, П. Г. Нестеренко // Молочная промышленность. – 2008. – № 11. – С. 36-39. – EDN LPWAWJ.

**Связь полиморфных маркеров генов *XRCC1, ERCC5, TP53, CDKN1A1*
с выживаемостью больных тройным негативным раком молочной железы после
платиносодержащей химиотерапии**

**Капралова М.А.¹, Бреннер П.К.¹, Заварыкина Т.М.¹, Ганьшина И.П.²,
Гордеева О.О.³, Ходырев Д.С.⁴, Колядина И.В.⁵, Хохлова С.В.⁵**

¹ ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119336,
г. Москва

² ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, г. Москва

³ ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, 119435, г. Москва

⁴ ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи и медицинских
технологий ФМБА России, 115682, г. Москва

⁵ ФГБУ «НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова»
Минздрава России, 117997, г. Москва

ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы является самым распространенным онкологическим заболеванием у женщин. Тройной негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) представляет собой наиболее неблагоприятный вариант этого заболевания, характеризующийся агрессивностью течения, высокой частотой раннего рецидивирования, а также отсутствием мишеней для таргетной терапии. Наиболее распространенной терапевтической опцией при ТНРМЖ на сегодняшний день является химиотерапия (ХТ), в том числе с включением производных платины. Кроме того, активно развивается направление иммунотерапии. Поиск маркеров эффективности платиносодержащей ХТ при ТНРМЖ является актуальной задачей, направленной на улучшение непосредственных и отдаленных результатов лечения больных и уменьшение токсичности терапии.

Механизм действия ХТ на основе препаратов платины заключается во внесении двунитевых разрывов в ДНК клетки, задержке клеточного цикла и инициации апоптоза опухолевой клетки [1]. Гены системы репарации ДНК являются ключевыми в ответе на платиносодержащую ХТ. Наиболее важными изученными нарушениями в случае РМЖ является носительство мутации в генах *BRCA1* и/или *BRCA2*. Они наблюдаются в 10% случаев РМЖ и характерны для наследственного варианта заболевания. Гены *BRCA1/2* являются генами-онкосупрессорами, они играют ключевую роль в системе репарации ДНК методом гомологичной рекомбинации. Известно, что большинство РМЖ с мутациями *BRCA1* ассоциировано с тройным негативным фенотипом, тогда как мутации гена *BRCA2* по большей части наблюдаются у больных с люминальным подтипом РМЖ. Опухоль, развивающаяся у носителей мутаций в гене *BRCA1/2*, имеет высокую чувствительность к широкому спектру современных химиопрепаратов, в частности препаратам платины, и лучший ответ на неoadъювантную ХТ в целом [2,3]. Однако применение препаратов платины обеспечивает высокую частоту полных патоморфологических регрессий (суррогатного маркера эффективности ХТ) как у больных *BRCA*-ассоциированным ТНРМЖ, так и у больных спорадическим ТНРМЖ [4], достоверных различий в частоте полных патоморфологических регрессий при сравнении носителей наследственной мутации гена *BRCA1* с больными без мутаций в этом гене выявлено не было [2].

Ответ на платиносодержащую ХТ может быть обусловлен активностью других систем репарации ДНК, в частности, системы эксцизионной репарации оснований (BER). Интегральным белком BER является белок *XRCC1*, который кодируется геном *XRCC1* [5]. Экспрессия гена *XRCC1* играет важную роль в качестве маркера состояния системы репарации BER и уровня повреждений опухолевых клеток при ТНРМЖ [6], а также имеет прогностическое значение для клинического ответа опухоли [7].

Наиболее изученным и важным с функциональной точки зрения является полиморфный маркер rs25487 гена *XRCC1*. Связь данного маркера с эффективностью платиносодержащей ХТ была показана в работах на ряде видов рака [8]. Полиморфный маркер rs25487 гена *XRCC1* проявляется в модификации аминокислотного состава кодируемого белка в 399 позиции: замене глутамина (*Gln*) на аргинин (*Arg*), что влияет на нормальную функцию белка *XRCC1*, изменяя эффективность репарации ДНК.

Система репарации NER и изменения в ней, в частности, однонуклеотидные полиморфизмы, также играют важную роль в ответе на цитотоксическую терапию [9]. Одним из ключевых генов системы NER является ген *ERCC5* (*XPG*). Продукт этого гена обладает эндонуклеазной активностью и участвует во внесении 3'-разреза в область повреждения при репарации путем NER [10]. Функционально важный полиморфный маркер rs17655 гена

ERCC5 выражается в замене *G* (гуанин) на *C* (цитозин), что приводит к аминокислотной замене аспарагиновой кислоты (*Asp*) на гистидин (*His*) в С-концевой части белка. Это вызывает изменения функции белка и его взаимодействия с комплексом белков *NER*, влияя тем самым на активность репарации ДНК [11].

В ответе на цитотоксическую терапию крайне важно функционирование системы контроля клеточного цикла, которое также влияет и на запуск репаративных процессов в клетке. Ген *TP53* кодирует важнейший белок этой системы – p53. Установлено большое число полиморфных вариантов, из которых функционально наиболее значимым является rs1042522. Он характеризуется заменой *C* (цитозин) → *G* (гуанин) в 4 экзоне гена *TP53*, что сопровождается аминокислотной заменой в 72 кодоне белкового продукта. Две изоформы белка p53, содержащие в данном полиморфном маркере аминокислоты пролин (*Pro*) или аргинин (*Arg*) различаются по структурным, биохимическим и биологическим свойствам. Важное звено в этой системе – белок p21, который кодируется геном *CDKN1A* и является одной из основных мишеней белка p53. p21 является основным белком, экспрессия которого повышается активированным p53 в ответ на повреждение ДНК [12]. Полиморфный маркер rs1801270 гена *CDKN1A* характеризуется заменой *C* → *A*, которая приводит к замене аминокислоты серин (*Ser*) на аргинин (*Arg*) в 31 кодоне белкового продукта.

Цель работы – изучение связи полиморфных маркеров генов *XRCC1* (rs25487), *ERCC5* (rs17655), *TP53* (rs1042522), *CDKN1A1* (rs1801270) с безрецидивной (БРВ) и общей выживаемостью (ОВ) больных после платиносодержащей неоадьювантной химиотерапии при ТНРМЖ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Были изучены образцы крови 67 пациенток с тройным негативным РМЖ II-III стадии, проходивших лечение в НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова и НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (таблица 1). Диагноз устанавливали на основании гистологического исследования в лечебном учреждении. Все пациенты получали платиносодержащую неоадьювантную ХТ (доцетаксел или паклитаксел в комбинации с карбоплатином/цисплатином). Образцы крови отбирались до проведения ХТ, после чего из них была выделена ДНК с использованием набора реагентов *Diatom DNA Prep 400* (Лаборатория Изоген, Россия). Полиморфные маркеры были исследованы методом ПЦР в реальном времени с флуоресцентными аллельспецифичными зондами на приборе «CFX96 Touch Real-Time System» (Bio-Rad, США). Последовательности и температура отжига ($T_{отж}$) использованных в работе праймеров и зондов указаны в таблице 2. Данные о носительстве мутаций в генах *BRCA 1/2* были получены из лечебных учреждений. Статистический анализ проводился в программе *Statistica 8.0* (StatSoft). Результаты определения маркера сопоставляли с БРВ и ОВ с использованием метода Каплана-Мейера и log-rank теста. Различия при значениях $p < 0.05$ оценивались как значимые.

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика больных

Показатель		Значение n, (%)
Возраст, медиана		- 51 год (22-77)
Стадия:	- IIa	- 8 из 67 (11.94%)
	- IIb	- 17 из 67 (25.37%)
	- IIIa	- 6 из 67 (8.96%)
	- IIIb	- 16 из 67 (23.88%)
	- IIIc	- 20 из 67 (29.85%)
Grade:	- 2	- 29 из 67 (43.28%)
	- 3	- 31 из 67 (46.27%)

Таблица 2. Условия проведения анализа молекулярно-генетических маркеров

Маркер	Праймеры и зонды	$T_{отж}$, °C / Длина ампликона, п.н.
<i>Gln399ArgXRCC1</i> <i>rs25487</i>	F: GCTCCTCTCAGTAGTCTG R: CTGGCATCTTCACTTCTG FAM: CCTTACCTCTGGGAGGGC VIC: CCTTACCTCCGGGAGGGC	65,7 / 283
<i>Asp1104His</i> <i>ERCC5</i> <i>rs17655</i>	F: AGAGGCATAACAATACC R: TCGTCATCACTATCACTA FAM: CTTCAAGTGAAGATGCTGAAAG VIC: CTTCAAGTGAACATGCTGAAAG	60 / 290

<i>Arg72Pro</i> <i>TP53</i> <i>rs1042522</i>	F: GGTGTAGGAGCTGCTGGTG R: CTGGTAAGGACAAGGGTTGGG FAM: AGGGGCCACGGGGGGAGCAG VIC: AGGGGCCACGCGGGGAGCAG	64 / 271
<i>Ser31ArgCDKN1A</i> <i>rs1801270</i>	F: CTGGAAGGAGTGAGAGAG R: GGTGACAAAGTCGAAGTTC FAM: AGCTGAGCCGCGACTGT VIC: AGCTGAGACGCGACTGT	64 / 296

Примечание: *F* и *R* – праймеры, где *F* – forward (прямой), *R* – reverse (обратный); *FAM* и *VIC* – ДНК-зонды, меченные соответствующими флуоресцентными красителями; $T_{отж}$ – температура отжига

РЕЗУЛЬТАТЫ

Медиана (*M*) времени наблюдения на момент анализа результатов составила 27.6 (минимум 6.4 – максимум 66.9) мес.

Маркер *rs25487* гена *XRCC1*

Была выявлена тенденция к уменьшению *M* БРВ у носителей аллеля *T* маркера *rs25487* гена *XRCC1* (*M* = 19.9 мес.) по сравнению с больными, у которых этот аллель отсутствовал (*M* = 32.6 мес.), $p = 0.077$ (рис. 1).

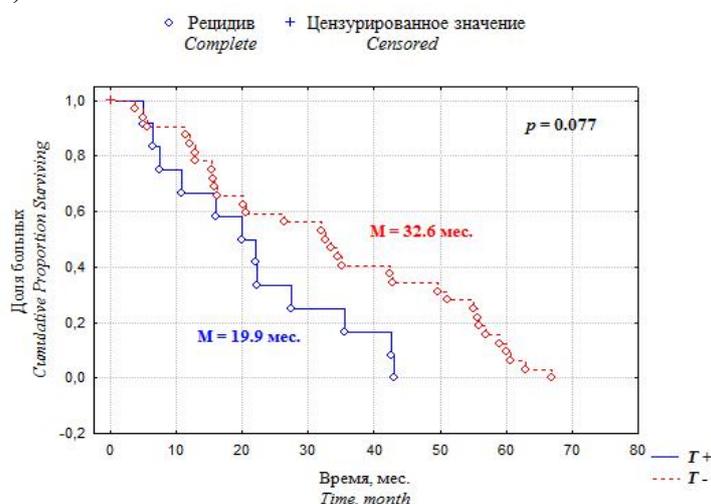


Рисунок 1. Связь полиморфного маркера *rs25487* гена *XRCC1* с безрецидивной выживаемостью у больных ТНРМЖ

Данные по носительству мутаций в генах *BRCA1/2* были доступны для 42 пациентов (у 13 мутации выявлены, у 29 – нет). При делении пациентов по *BRCA*-статусу выявлена тенденция к увеличению *M* БРВ при носительстве мутации в гене *BRCA1/2* (для носителей мутации *M* = 33.5 мес, при отсутствии – *M* = 16.0 мес.; $p = 0.085$). Была выделена подгруппа больных с отсутствием мутаций в генах *BRCA1/2*, при этом носительство генотипа *T/T* маркера *rs25487* гена *XRCC1* у данных больных было связано с уменьшением *M* БРВ (*M* = 15.7 мес.), тогда как носительство аллеля *G* связано с увеличением этого показателя (*M* = 32.6 мес.) (рис. 2). Это согласуется с результатами, полученными в общей группе больных.

При рассмотрении ОВ носительство аллеля *T* маркера *rs25487* гена *XRCC1* было связано с уменьшением *M* ОВ, при этом для носителей аллеля *T* *M* ОВ составляла 24.3 мес., тогда как при отсутствии аллеля *T* – 34.6 мес., $p = 0.04$ (рис. 3).

Выявлено отсутствие связи ОВ с носительством мутации в генах *BRCA1/2* (при носительстве мутации *M* = 35.2 мес., при отсутствии – *M* = 17.2 мес.; $p = 0.82$). При сочетанном носительстве мутации в генах *BRCA1/2* и генотипа *C/C* маркера *rs25487* гена *XRCC1* выявлено отсутствие событий (смертей), однако не достигшее статистической значимости.

Результаты, полученные нами в исследовании БРВ согласуются с результатами работы по изучению связи этого же маркера гена *XRCC1* с эффективностью платиносодержащей ХТ при раке яичников, в которой было выявлено уменьшение времени без прогрессирования при носительстве аллеля *T* ($p = 0.025$) [13]. В целом, полученные данные позволяют сделать вывод о важной роли изученного маркера гена *XRCC1* в ответе на платиносодержащую ХТ.

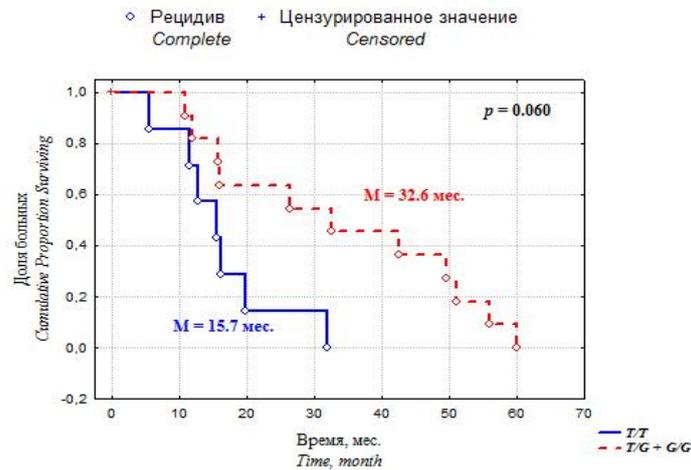


Рисунок 2. Связь полиморфного маркера rs25487 гена *XRCC1* с безрецидивной выживаемостью у больных ТНPMЖ с отсутствием мутаций в генах *BRCA1/2*

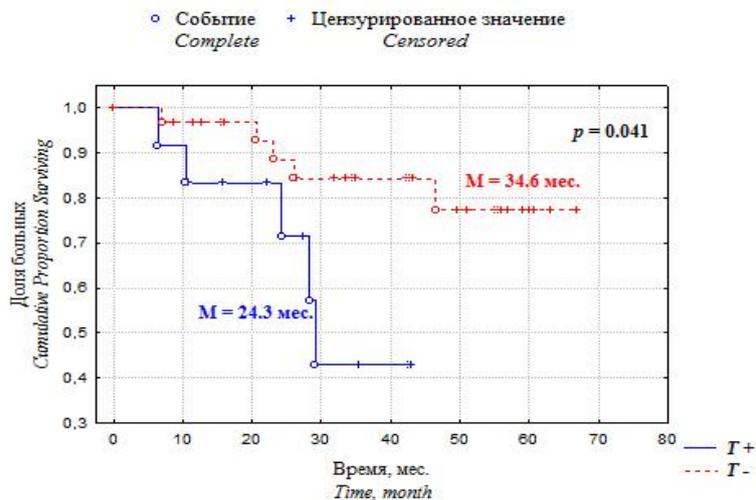


Рисунок 3. Изучение связи полиморфного маркера rs25487 гена *XRCC1* с общей выживаемостью у больных ТНPMЖ

Маркер rs17655 гена *ERCC5*

Для носителей аллеля *C* маркера rs17655 гена *ERCC5* были получены достоверные различия в БРВ в период от 15.4 до 60.0 мес. наблюдения ($p = 0.035$). При этом медиана БРВ составляла 20.0 мес. для носителей минорного аллеля *C* и 35.2 мес. при отсутствии этого аллеля. В подгруппе больных без мутаций в генах *BRCA1/2* провести анализ не представлялось возможным, так как в нее попало малое количество носителей минорного аллеля *C*.

При рассмотрении генотипов выявлены различия между больными с генотипом *C/C* ($M = 15.9$ мес.) и двумя другими генотипами (33.6 мес.), $p = 0.039$ (рис. 4).

Связи с ОВ для маркера rs17655 гена *ERCC5* выявлено не было.

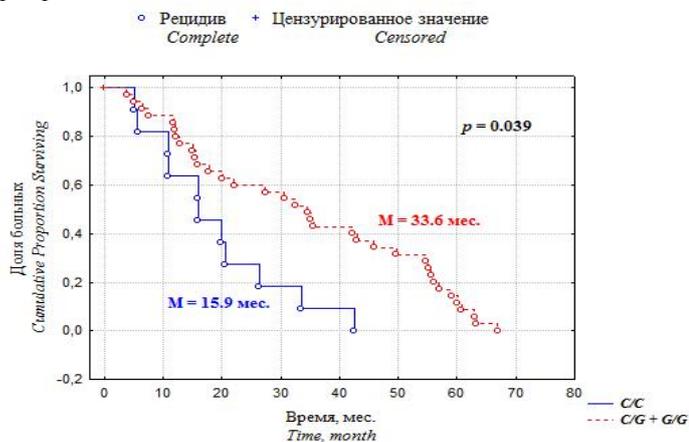


Рисунок 4. Связь генотипов полиморфного маркера rs17655 гена *ERCC5* с безрецидивной выживаемостью у больных ТНPMЖ

Маркер rs1801270 гена *CDKN1A*

При рассмотрении маркера rs1801270 гена *CDKN1A* выявлены значимые различия в БРВ в период от 15.4 до 60.0 мес. наблюдения ($p = 0.046$) в зависимости от наличия или отсутствия аллеля *A* (рис. 5). При этом для носителей аллеля *A* наблюдалось уменьшение медианы БРВ ($M = 16.6$ мес.), тогда как при его отсутствии – увеличение ($M = 32.0$ мес.). В случае подгруппы с отсутствием мутации в генах *BRCA1/2* провести анализ не удалось в связи с малым количеством носителей аллеля *A*, попавших в эту подгруппу. Анализ генотипов выявил тенденцию к уменьшению медианы БРВ у носителей генотипов *C/A* и *A/A* (18.3 мес. и 14.5 мес., соответственно) по сравнению с генотипом *C/C* (32.6 мес.), однако не достигшую статистической значимости из-за небольшого количества больных с генотипом *A/A* (7 человек, $p > 0.05$).

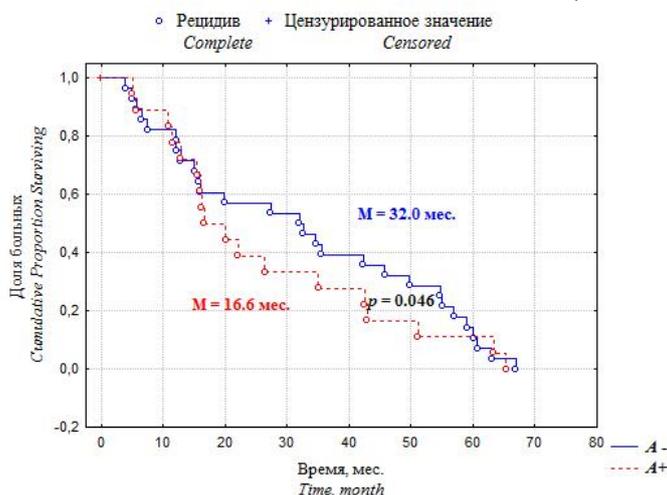


Рисунок 5. Связь носительства аллеля *A* полиморфного маркера rs1801270 гена *CDKN1A* с безрецидивной выживаемостью у больных ТНРМЖ

Связи с ОВ для маркера rs1801270 гена *CDKN1A* выявлено не было.

Маркер rs1042522 гена *TP53*

В случае маркера rs1042522 гена *TP53* носительство аллеля *G* наблюдалось у 5 больных. При этом медиана БРВ составляла 42.5 мес. по сравнению с 21.4 мес. для больных с отсутствием этого аллеля. Медиана ОВ для носителей аллеля *G* не достигнута, медиана наблюдения составляет 42.5 мес., тогда как для пациенток, у которых этот аллель отсутствовал (генотип *C/C*), медиана ОВ составляет 28.3 мес. Различия в обоих случаях не были статистически значимы, вероятнее всего, из-за небольшого числа носителей аллеля *G* ($p > 0.05$).

ВЫВОДЫ

Выявлена связь изученных полиморфных маркеров генов *XRCC1* (rs25487), *ERCC5* (rs17655) и *CDKN1A* (rs1801270) с БРВ у пациенток с ТНРМЖ. Связь с ОВ обнаружена для полиморфного маркера гена *XRCC1* (rs25487), а также тенденция к связи с ОВ для носителей минорной гомозиготы *C/C* маркера гена *TP53* (rs1042522), представляющаяся перспективной для последующего изучения. Эти данные могут позволить при дальнейшей валидации индивидуализировать лечение данной категории больных, оптимизировать режимы неoadъювантной химиотерапии и избежать нежелательной токсичности лечения.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Корман Д.Б. Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов. М.: Практическая медицина, 2014. 336 с.
2. Wunderle. M., Gass P., Häberle L. et al. BRCA mutations and their influence on pathological complete response and prognosis in a clinical cohort of neoadjuvantly treated breast cancer patients // Breast Cancer Res.Treat, 2018. № 171. P. 85-94.
3. Tutt A., Tovey H., Cheang M.C.U. et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial // Nat Med, 2018. № 24(5). P. 628-637.
4. Sharma P., Stecklein Sh. R., Kimler B.F. et al. Efficacy of neoadjuvant carboplatin/docetaxel chemotherapy in sporadic and BRCA-associated triple-negative breast cancer (TNBC) // ASCO Meeting Abstracts. 2014. Vol. 32(15). P. 1022.
5. Kudo K., Gavin E. Inhibition of Gli1 results in altered c-Jun activation, inhibition of cisplatin-induced upregulation of ERCC1, XPD and XRCC1, and inhibition of platinum-DNA adduct repair // Oncogene. 2012. Vol. 31. P. 4718-4724.

6. Lee K.J., Pielt C.G., Andrews J.F. et al. Defective base excision repair in the response to DNA damaging agents in triple negative breast cancer // PLoS One. 2019. Vol. 10(14).
7. Tarek M.A., Fatah A., Arora A. et al. DNA repair prognostic index modelling reveals an essential role for base excision repair in influencing clinical outcomes in ER negative and triple negative breast // Oncotarget. 2015. Vol. 26(6). P. 21 964-21 978.
8. Francia R.D., Lucia L.D., Paolo M.D. et al. Rational selection of predictive pharmacogenomics test for the Fluoropyrimidine/Oxaliplatin based therapy // Eur. Rev. Med. Pharmacol Sc. 2015. Vol. 22(19). P. 4 443-4 454.
9. Pasqui A., Boddi A., Campanacci D. A. et al. Alteration of the Nucleotide Excision Repair (NER) Pathway in Soft Tissue Sarcoma. International journal of molecular sciences 2022. Vol. 23(15). P. 8360.
10. Fagbemi AF, Orelli B, Scharer OD. Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair. DNA Repair (Amst) 2011. Vol. 10(7). P. 722-729.
11. Wakasugi M, Sancar A. Order of assembly of human DNA repair excision nuclease. J Biol Chem 1999. № 274. P. 18759-18768.
12. Gartel A. L., Radhakrishnan S. K. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. Cancer research 2005. Vol. 65(10). P. 3980-3985.
13. Заварыкина Т.М., Хохлова С.В., Тюляндина А.С. и др. Связь молекулярно-генетических маркеров генов репарации ДНК и контроля клеточного цикла с ответом на платиносодержащую химиотерапию при раке яичника // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2021. Том 171. №6. С. 745-750.

Влияние протокола расчета на описание стадии нуклеофильной атаки реакции гидролиза нитроцефина металло-β-лактамазой L1



Каримуллина Л.Б.¹, Кривицкая А.В.^{2,3}, Хренова М.Г.^{2,3}

¹Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

²ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва

³Московский Государственный Университет, Москва

На сегодняшний день β-лактамы антибиотики составляют около 70% от всех применяемых антибактериальных препаратов [1]. Однако их эффективность резко снижается в связи с распространением по всему миру бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Превалирующим среди всех механизмов антибиотикорезистентности является экспрессия бактериальных ферментов β-лактамаз, способных гидролизовать β-лактамное кольцо антибиотика. Реакция инициируется нуклеофильной атакой на карбонильный углерод β-лактамного кольца, что в дальнейшем приводит к разрыву связи углерод-азот и необратимой инактивации антибактериального средства. В одном из подклассов β-лактамаз, металло-β-лактамазах, активный центр содержит один или два катиона цинка. Металло-β-лактамазы обладают высокой каталитической активностью и широким спектром субстратной специфичности, включающем практически все β-лактамы антибиотики за счет сильной поляризации активного центра и гидроксид аниона в качестве нуклеофила [2]. К данному подклассу относится L1 металло-β-лактамаза, которая гидролизует субстрат нитроцефин по известному механизму, состоящему из трех элементарных стадий [3]. Первый шаг реакции заключается в нуклеофильной атаке гидроксид-аниона на углерод β-лактамного кольца нитроцефина. Затем β-лактамное кольцо рвется. И третьим шагом реакции является протонирование атома азота. Механизм реакции ранее рассчитывался методом квантовой-механики/молекулярной механики (КМ/ММ), который сканирует поверхность потенциальной энергии [4]. Анализ поверхности потенциальной энергии позволяет найти ближайший локальный минимум, однако этот минимум может оказаться высокоэнергетичным локальным минимумом. Такой современный подход, как КМ/ММ молекулярная динамика (МД) позволяет избежать этой проблемы. Также данный метод позволяет оценить особенности формирования фермент-субстратного комплекса и дать вероятностную характеристику эффекта активации субстрата

ферментом[5]. Надежные данные из описания активного центра можно получить, используя теорию функционала электронной плотности (ТФП) в квантовой подсистеме [6]. Однако результаты зависят от используемого функционала в ТФП.

Данная работа посвящена исследованию влияния протокола расчета на описание стадии нуклеофильной атаки реакции гидролиза нитроцефина металло- β -лактамазой L1. В работе применен ряд популярных гибридных обменно-корреляционных функционалов электронной плотности, с разным вкладом энергии точного (Хартри-Фоковского) обмена: PBE0, B3LYP, B3LYP, ω B97X. Все методы рассматривались с учетом эмпирической дисперсионной поправки и без. Рассмотрена молекулярная динамика фермент-субстратного комплекса металло- β -лактамазы L1 и субстрата нитроцефина, проанализированы геометрические характеристики комплекса, формирующие оксианионный центр и ответственные за возникновение эффекта активации субстрата ферментом. Состояние комплекса проанализировано электронно-плотностными дескрипторами на наличие реакционных структур. Также рассчитан профиль энергии Гиббса стадии нуклеофильной атаки методом зонтичной выборки.

Выбранные методы дают согласованную картину по константам скоростей, однако имеются существенные различия в описании активации субстрата ферментом и стабилизации интермедиата реакции.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 18-74-10056).

Список источников и литературы:

- [1] Lence, E., & González-Bello, C. (2021). Molecular Basis of Bicyclic Boronate β -Lactamase Inhibitors of Ultrabroad Efficacy - Insights From Molecular Dynamics Simulation Studies. *Frontiers in microbiology*, 12, 721826.
- [2] Horton, L. B., Shanker, S., Mikulski, R., Brown, N. G., Phillips, K. J., Lykissa, E., Venkataram Prasad, B. V., & Palzkill, T. (2012). Mutagenesis of zinc ligand residue Cys221 reveals plasticity in the IMP-1 metallo- β -lactamase active site. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(11), 5667–5677.
- [3] Khrenova M.G., Nemukhin A.V. (2018). Modeling the transient kinetics of the L1 metallo- β -lactamase. *J. Phys. Chem*, 122(4), 1378-1386.
- [4] Aquilante, F., Cossi, M., Crescenzi, O., Scalmani, G., & Barone, V. (2003). *Computation of the acetone ultraviolet spectrum in gas phase and in aqueous solution by a mixed discrete/continuum model. Molecular Physics*, 101(13), 1945–1953.
- [5] Parr R.G., Yang W. *Density-Functional Theory of Atoms and Molecules*. – N. Y.: Oxford University Press, 1989.
- [6] Koch W., Holthausen M.C. *A Chemists Guide to Density Functional Theory*, 2nd Edition. – N. Y.: Wiley- VCH, 2001.

Комплексообразование порфиринов с гетерополианионами



Китушина Е.В.^{1,2}, Орешкина А.В.², Лобанов А.В.^{1,2}

¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук,
119334, Москва, ул. Косыгина, 4

²ФГБОУ ВО «Московский педагогический государственный университет»,
119991, Москва, ул. Малая Пироговская, 1/1

Аннотация. Методами электронной абсорбционной спектроскопии и спектрофлуориметрии исследовано взаимодействие цинкового комплекса тетрафенилпорфирина с анионами гетерополисоединений (комплексов W, Mn) в растворах. В электронных спектрах поглощения проявляется либо суперпозиция полос, характерных для индивидуальных соединений, либо обнаруживаются новые полосы, свидетельствующие об образовании супрамолекулярных органо-неорганических комплексов, что также сопровождается тушением флуоресценции порфирина. Прослежена роль структурных особенностей порфиринов и стехиометрического состава гетерополианионов в процессе их взаимодействия.

Ключевые слова: гетерополисоединения, порфирины, физико-химические методы исследования, гетерополианионы.

Введение

Комплексные соединения, анионы которых образованы двумя различными кислотообразующими оксидами, при этом на молекулу одного из них приходится несколько

молекул другого оксида, называются гетерополисиодинениями (ГПС). Пять элементов периодической системы: ванадий, вольфрам, молибден, ниобий и тантал, способны образовывать гетерополианионы (ГПА).

Особые физико-химические свойства ГПС определяются такими характеристиками как высокая удельная поверхность, симметричность, островной характер структуры, а также невысокий делокализованный заряд ГПА. Обширные изучение в сфере химии этих сложных неорганических соединений не прекращаются с первой половины двадцатого века, поскольку интересны не только теоретические факторы их получения, но и сферы применения, прежде всего, катализ, аналитическая химия, биохимия и медицинская химия (в том числе направление в области онкологии) и супрамолекулярная химия. Большой интерес в этом плане представляет получение гибридных органо-неорганических структур с использованием практически значимых классов соединений, например, порфиринов.

Порфирины относятся к специфическому классу хромофоров, по структуре относятся к макрөгетероциклам, разнообразны по своей геометрической и электронной структуре, а также они могут кардинальным образом отличаться спектральными свойствами и реакционной способностью [1].

Экспериментальная часть

В данной работе было получено гетерополисиодинение – гексавольфрамоманганат натрия. Синтез проводился по модифицированной методике. К раствору вольфрамата натрия ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) добавляли раствор сульфата марганца ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) и перетертый персульфат натрия. Раствор солей кипятили в течение 10 мин, добавляли равный объем горячей воды и ставили в термостат на 30 мин при 45°C . Полученный раствор отделяли горячим фильтрованием от оксида марганца(IV), фильтрат переливали в чашки Петри и оставляют в эксикаторе. В течение 24 ч выпадают красно-оранжевые кристаллы состава $[\text{Na}_2(\text{H}_2\text{O})_{10}][\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_3]_2[\text{MnW}_6\text{O}_{18}(\text{OH})_6] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Рис. 1) [2].

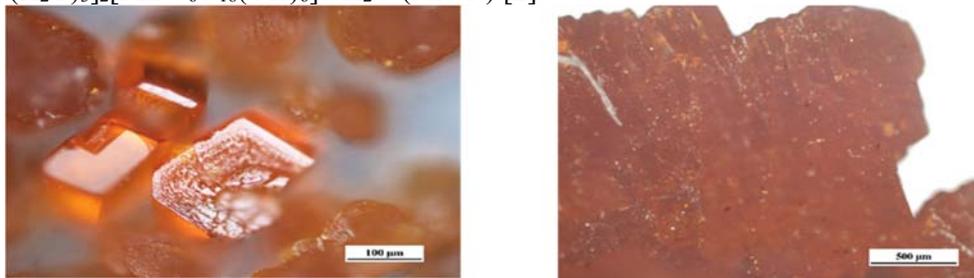


Рисунок 1. Микрофотография $[\text{Na}_2(\text{H}_2\text{O})_{10}][\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_3]_2[\text{MnW}_6\text{O}_{18}(\text{OH})_6] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Nikon LV100, 20X, 5X).

Обсуждение результатов

Для подтверждения структуры ГПС гексавольфрамоманганата натрия был проведен рентгеноструктурный анализ на автоматическом дифрактометре Enraf-Nonius CAD-4 ($\text{MoK}\alpha$ -излучение, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) при комнатной температуре. Структурные единицы кристалла ГПС представлены в виде: центросимметричный гексавольфрамоманганат-анион состава $[\text{MnW}_6\text{O}_{18}(\text{OH})_6]^{4-}$ и 1 внешнесферный катион $[\text{Na}_2(\text{H}_2\text{O})_{10}]^{2+}$, а также 2 катиона $[\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ и 6 молекул кристаллизационной воды.

Гетерополианион $[\text{MnW}_6\text{O}_{18}(\text{OH})_6]^{4-}$ построен из 6 искаженных октаэдров WO_6 , окружающих гетероатом Mn^{2+} (Рис.2). Все атомы вольфрама имеют искаженное октаэдрическое окружение из атомов кислорода. Связи W-O можно разделить на несколько групп (приведем средние значения длин связей): 12 концевых связей W- O_k 1,74 \AA , 12 дважды мостиковых (2W) связей W-(μ_2 - O_m) 1,94 \AA , 12 трижды мостиковых (2W+Mn) связей W-(μ_3 - OH_M) 2,18 \AA .

ТГА соединения $[\text{Na}_2(\text{H}_2\text{O})_{10}][\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_3]_2[\text{MnW}_6\text{O}_{18}(\text{OH})_6] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ проводили на установке Паулик-Паулик-Эрдей, в области температур 20-1000 $^\circ\text{C}$; скорость нагрева 10 град/мин, навеска 100 мг. Эталон – прокаленный оксид алюминия.

ТГА соединения показал наличие трех эндотермических эффектов. Первый эндотермический эффект (150 $^\circ\text{C}$) отвечает за удаление шести кристаллизационных молекул воды. Второй эндотермический эффект (при 190 $^\circ\text{C}$) соответствует удалению 16 молекул воды, координированной с атомами натрия. При заключительном эндотермическом эффекте (400 $^\circ\text{C}$) происходит удаление трех молекул воды (разрушается ГПА), и образуется смесь оксидов натрия, марганца и вольфрама.

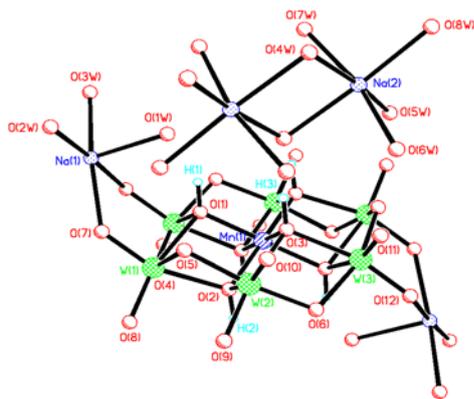
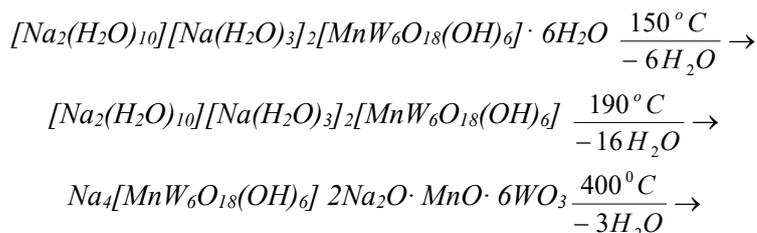


Рисунок 2. Фрагмент кристаллической структуры соединения $[\text{Na}_2(\text{H}_2\text{O})_{10}][\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_3]_2[\text{MnW}_6\text{O}_{18}(\text{OH})_6] \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Схема термического разложения соединения может быть представлена следующим образом:



Важными параметрами, характеризующими фотохимическую активность порфиринов как и любого фоточувствительного вещества, являются время жизни и квантовый выход возбужденных состояний. Во многом эти характеристики определяются природой центрального иона металла. Не менее значимым (особенно в медикофармакологическом аспекте) является величина энергетической щели высшей занятой молекулярной орбитали и нижней свободной молекулярной орбитали и соответствующая ей длина волны света в полосе поглощения.

Получение гибридного материала на основе гетерополиосоединения осуществляли с использованием цинкового комплекса тетрафенилпорфирина. С этой целью смешивали эквимольные растворы ГПС в воде и порфирина в ДМФА. Концентрации веществ изменяли от 10^{-6} до 10^{-5} М.

При сопоставлении спектров исходного цинкового порфирина с полученным гибридным материалом в электронных спектрах, зарегистрированных на спектрофотометре Lambda 1050 (PerkinElmer), наблюдали уширение полосы Core и уменьшение ее интенсивности в ~ 1.4 раза (рис.3).

При сравнительном анализе спектров флуоресценции, записанных на спектрофлуориметре RF-5301 (Shimadzu), был обнаружен гипсохромный сдвиг полосы эмиссии порфирина и существенное изменение ее формы, а также тушение флуоресценции порфирина в ~ 4 раза (рис.4), что характерно для случаев связывания хромофора [3-5].

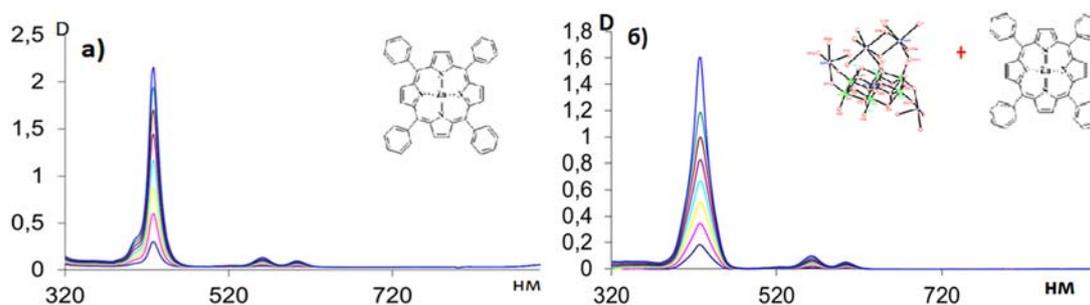


Рисунок 3. Электронные спектры поглощения а) цинкового порфирина; б) гибридного материала на основе ГПА и цинкового порфирина в системе вода-ДМФА.

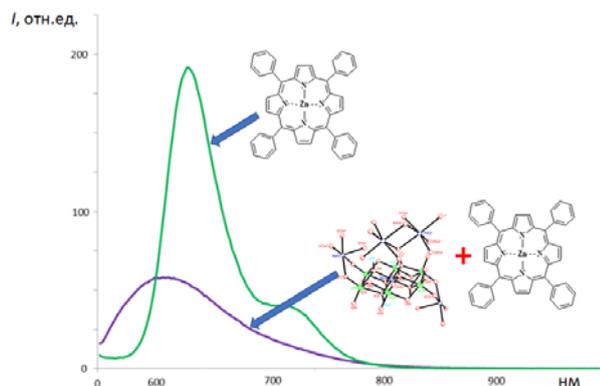


Рисунок 4. Спектр флуоресценции цинкового порфирина (зеленая линия) гибридного материала на основе ГПА и цинкового порфирина в системе вода-ДМФА (фиолетовая линия).

Выводы

Таким образом, можно предположить, что при совмещении гетерополисоединения гексавольфрамоманганата натрия и цинкового комплекса тетрафенилпорфирина наблюдается их координационное связывание с образованием гибридного органо-неорганического комплекса.

Список литературы

1. Березин Д.Б. Макроциклический эффект и структурная химия порфиринов. – 2010.- 417 с.
2. Мороз, Я.А. Закономерности синтеза гетерополисоединений с 3d-элементами / Я.А. Мороз // Вестник Донецкого национального университета. Серия А: Естественные науки. – 2017. – № 1. – С. 92–110.
3. Li, P. Self-assembly of tetrakis (3-trifluoromethylphenoxy) phthalocyaninato cobalt (II) on multiwalled carbon nanotubes and their amperometric sensing application for nitrite / P. Li, Y. Ding, A. Wang, L. Zhou, S. Wei, Y. Zhou, T. Lu // ACS Appl. Mat. Int. – 2013. – V.5, N.6. – P. 2255–2260.
4. Bazarnik, M. Tailoring molecular self-assembly of magnetic phthalocyanine molecules on Fe- and Co-intercalated graphene / M. Bazarnik, J. Brede, R. Decker, R. Wiesendanger // ACS Nano. – 2013. – V.7, N.12. – P.11341–11349.
5. Gol'dshleger, N.V. Phthalocyanines in organized microheterogeneous systems. Review / N.V. Gol'dshleger, V.E. Baulin, A.Y. Tshivadze // Prot. Met. Phys. Chem. Surf. – 2014. – V.50, N.2. – P. 135–172.

Влияние тепловых эффектов на метаболизм цианобактерий и сопряженные с ним экологические особенности (обзор)

Климович И.Д., Худякова К.А.

ГУО «Средняя школа №4 г. Дзержинска»

УДК 574.5+579.81+577.3

Аннотация. Влияние температуры, как абиотического фактора, на водную среду обитания является одним из важных факторов в эволюции водных видов. Различные приспособительные реакции к температурным эффектам отмечаются и у цианобактерий. Особо выделяются изменения, происходящие в основных метаболических путях при воздействии данного фактора. Приведены результаты анализа литературных данных по таким процессам.

Ключевые слова. Цианобактерии, метаболизм, биомасса, токсины, микроцистин,

Актуальность. Ранее проведенные исследования лимитирования метаболизма по температуре

Цель исследования. Анализ и обобщение литературных данных по влиянию тепловых эффектов на особенности метаболизма цианобактерий в естественных условиях и искусственных средах.

Результаты и их обсуждение. Ряд авторов [1-4] указывают на средние 26-28 С для некоторых видов, как оптимумов и максимумов в увеличении биомассы в структуре планктона и бентоса. Данным фактором предопределяется и глобальное распространение данных организмов [1,

4, 5], однако кроме того на него влияет и широкая экологическая пластичность [4] с различным уровнем приспособленности видов.

На протекание фотосинтетических реакций влияет снижение температуры [6-8], приводящее к снижению активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы [6]. Электронный перенос в фотосистемах клеток также лимитируется снижением температуры [7]. Снижение общей активности фотосинтеза при падении температурного режима среды, как можно понять, коррелирует со снижением активности накопления биомассы цианобактерий до уровней субоптима и пессимума.

Дыхательные и окислительные процессы в клетках цианобактерий, сопряженно с фотосинтетическими, снижаются в интенсивности вместе с температурой [9], что указывает на влияние температурных эффектов на работу митохондриального комплекса.

Токсиногенность цианобактерий оказывает влияние на условия среды и других организмов [10]. Общая тенденция повышения уровня токсинов и токсиногенных видов сопряжена с повышением температуры [10, 11]. Также показаны случаи увеличения экспрессии генов, кодирующих синтез токсинов, у нетоксиногенных видов (например *Planktothrix* sp.) с увеличением температуры [3]. Можно ожидать, что и отмечают многие авторы [2-4], увеличение концентрации токсинов ввиду глобального увлечения средней температуры. В ряду экспериментов отмечается опасность связи увеличения температуры с повышением уровня токсичности отдельных веществ (например микроцистина) [11]

Выводы. Большинство авторов указывают на высокую устойчивость цианобактерий к различным изменениям температурного режима среды, однако общих оптимумов на макроуровне не выделено. В ряду экспериментов показано снижение активности фотосинтеза и дыхания со снижением температуры. Биомасса понижается на уровнях субоптима и пессимума для каждого отдельного штамма и вида. Токсиногенность коррелирует с повышением температуры на уровень повышения.

Список использованных источников

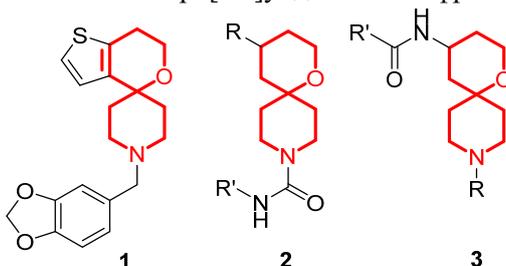
1. Оптимизация условий культивирования местных штаммов азотфиксирующих цианобактерий рода *Nostoc* // *Universum: химия и биология : электрон. научн. журн.* Пайзиллоев А.К. [и др.]. 2021 7(85). URL: <https://7universum.com/ru/nature/archive/item/11927>
2. Поляк Ю.М., Сухаревич В.И. 2019. Бентосные цианобактерии: особенности роста, физиологии и токсинообразования // *Региональная экология.* № 2(56). С. 57.
3. Поляк Ю.М., Сухаревич В.И. 2017. Токсигенные цианобактерии: распространение, регуляция синтеза токсинов, способы их деструкции // *Вода: химия и экология.* № 11–12. С. 125.
4. Сухаревич, В. И. Глобальное распространение цианобактерий: причины и последствия (Обзор) / В. И. Сухаревич, Ю. М. Поляк // *Биология внутренних вод.* – 2020. – № 6. – С. 562-572. – doi: 10.31857/S0320965220060170. – EDN LSHCHO.
5. Шлык-Кернер, О. В., Овечкин, С. В., Гасников, А. С. (2014). Изучение механизмов адаптации цианобактерий к повышенным температурам: платформа для создания стрессоустойчивых продуцентов биоводорода. *Вестник Удмуртского университета. Серия «Биология. Науки о Земле»*, (3), 27-38.
6. Staehr, P. A., and Birkeland, M. (2006). Temperature acclimation of growth photosynthesis and respiration in two mesophilic phytoplankton species. *Phycologia* 45, 648–656. doi: 10.2216/06-04.1.
7. Pimentel, C., Bernacchi, C., and Long, S. (2007). Limitations to photosynthesis at different temperatures in the leaves of *Citrus limon*. Brazil. *J. Plant Physiol.* 19, 141–147. doi: 10.1590/S1677-04202007000200006.
8. Davison, I. R. (1991). Environmental effects on algal photosynthesis: temperature. *J. Phycol.* 27, 2–8. doi: 10.1111/j.0022-3646.1991.00002.
9. Atkin, O. K., and Tjoelker, M. G. (2003). Thermal acclimation and the dynamic response of plant respiration to temperature. *Trends Plant Sci.* 8, 343–351. doi: 10.1016/S1360-1385(03)00136-5.
10. Lürling M, van Oosterhout F, Faassen E. Eutrophication and Warming Boost Cyanobacterial Biomass and Microcystins. *Toxins* (Basel). 2017 Feb 11;9(2):64. doi: 10.3390/toxins9020064. PMID: 28208670; PMCID: PMC5331443.
11. Dziallas C, Grossart HP. Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. *Environ Microbiol.* 2011 Jun;13(6):1632-41. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02479.x. Epub 2011 Apr 14. PMID: 21492362.

Синтез и антибактериальная активность производных 9-азаспиро[5,5]-ундекана



К.Ю. Комарова, Л.В. Виноградова, А.Ю. Лукин
 МИРЭА – Российский технологический университет, институт тонких
 химических технологий им. М.В.Ломоносова, Москва

Сегодня разработка новых антибиотиков для борьбы с лекарственной устойчивостью является актуальной задачей во всем мире¹. Появившееся в литературе новое антибактериальное спироциклическое пиперидиновое соединение **1** подтолкнуло нас на синтез серий веществ, имеющих в своей структуре 1-окса-9-азаспиро[5.5]ундекановый фрагмент **2** и **3**, содержащийся в **1**^{2,3}.



Синтез проводился из структурных блоков **4**, **5** и **6**, полученных по схеме 1.

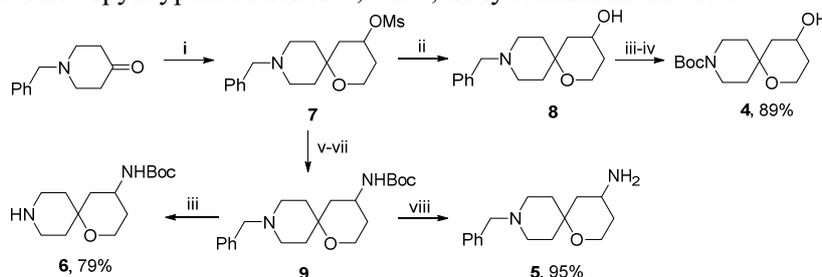


Схема 1. Реагенты и условия: i. homoallylic alcohol, MsOH, CH₂Cl₂, r. t., 24 h (62%); ii. NaOH, aq. MeOH, r. t., 6 h (98%); iii. HCO₂NH₄, Pd/C, EtOH reflux, 10 h; iv. Boc₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, r. t., 12 h; v. NaN₃, DMF, 80 °C, 12 h; vi. PPh₃, aq. MeOH, reflux, 3 h; vii. Boc₂O, CH₂Cl₂, r. t., 5 h (69% over 3 steps); viii. 4M HCl in 1,4-dioxane, r. t., 10 h.

Синтез конечных соединений проводился по схеме 2. В результате чего было получено 20 новых соединений с хорошими выходами. Далее вещества были протестированы в отношении штаммов бактерий ESKAPE методом дисковой диффузии Кирби-Бауэра по стандарту. Восемь соединений, вызывающих ингибирование более чем одного бактериального штамма, были дополнительно протестированы для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИС, мкг/мл) с использованием метода серийных разведений в бульоне. Как следует из данных, представленных в табл. 2, активность восьми соединений подтверждалась значениями МИС в диапазоне от 19 до 150 мкг/мл.

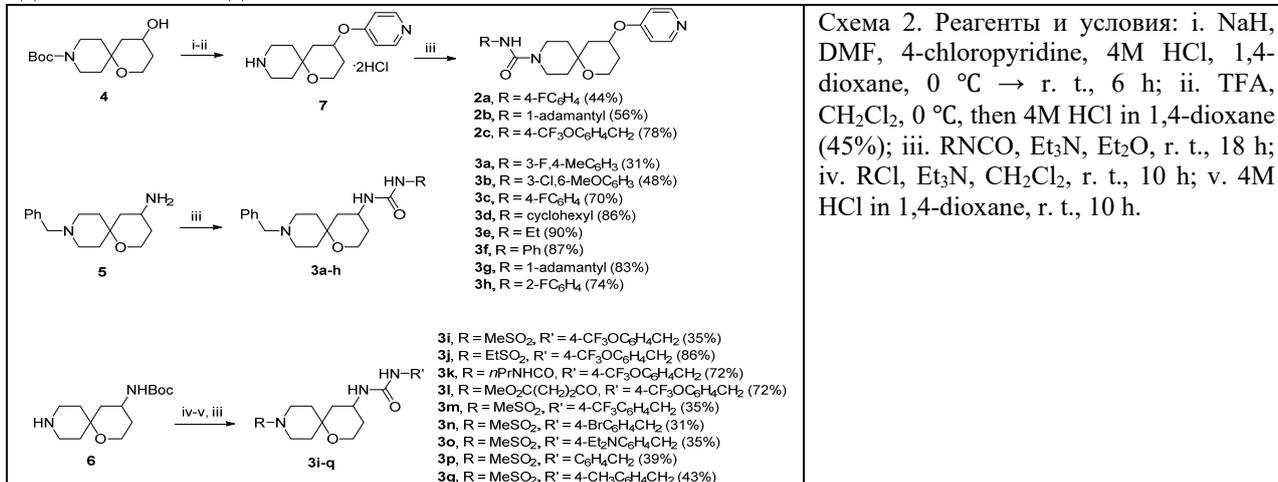


Таблица 1. Диаметр зоны ингибирования роста бактерий, отображаемый соединениями 2a-с и 3a-q, протестированными методом дисковой диффузии Кирби-Бауэра.

Compound	<i>E. faecium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. aerogenes</i>
2a	8			10		
2b						
2c						
3a	9		9	11	11	9
3b	9		11			
3c						
3d						
3e						
3f						
3g		11	9	10		
3h						
3i	10		11	12		
3j			9			
3k				8		
3l			11	11		
3m			8			
3n						
3o	12		9			
3p			9			
3q			9	10		

Таблица 2. Минимальная ингибирующая концентрация (МИС, ≈г/мл), определенная для восьми соединений-лидеров.

Compound	<i>E. faecium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. aerogenes</i>
2a	75	>150	>150	38	>150	150
3a	38	150	38	19	19	38
3b	38	>150	19	>150	>150	>150
3g	>150	19	38	38	>150	>150
3i	38	150	19	19	150	>150
3l	>150	>150	19	19	>150	>150
3o	19	>150	38	>150	>150	>150
3q	>150	>150	38	38	150	>150
Ciprofloxacin	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

Вывод: были синтезированы новые серии спироциклических производных 9-азоспиро[5,5]-ундекана, и подтверждена их значительная антибактериальная активность в отношении бактерий панели *ESKAPE*. Хотя уровень антибактериальной активности (МИС 19-150 мкг/мл) полученных соединений ниже, чем у эталонного антибиотика широкого спектра действия ципрофлоксацина (МИС 0,3 мкг/мл), специфическая антибактериальная активность, выявленная для до сих пор неопisanного хемотипа, очевидна и будет предметом дальнейшего исследования.

Список литературы

1. F. Derral, F. A. Castello, E. J. Sosa, A. M. Pardo, M. C. Palumbo, C. Modenutti, M. M. Palomino, A. Lazarowski, J. Auzmendi, P. I. P. Ramos, M. F. Nicolás, A. G. Turjanski, M. A. Martí, D. F. Do Porto, *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 647060.
2. . Guardia, J. Baiget, M. Cacho, A. Perez, M. Ortega-Guerra, W. Nxumalo, S. D. Khanye, J. Rullas, F. Ortega, E. Jimenez, E. Perez-Herra, M. T. Fraile-Gabaldon, J. Esquivias, R. Fernandez, E. Porrás-De Francisco, L. Encinas, M. Alonso, I. Giordano, C. Rivero, J. Miguel-Siles, J. G. Osende, K. A. Badiola, P. J. Rutledge, M. H. Todd, M. Remuiñan, C. Alemparte, *J. Med. Chem.* **2018**, *61*, 11327-11340.
3. M. Krasavin, A. Lukin, T. Vedekhina, O. Manicheva, M. Dogonadze, T. Vinogradova, N. Zabolotnykh, E. Rogacheva, L. Kraeva, V. Sharoyko, T. B. Tennikova, D. Dar'in, E. Sokolovich, *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, *166*, 125-135.

Нитрозильные комплексы железа с тиосульфатными и тиомочевинными лигандами: взаимодействие с бычьим сывороточным альбумином *in vitro*



Кормухина А.Ю.^{1,2}, Покидова О.В.², Санина Н.А.^{1,2,3}

¹Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

²Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, г. Черноголовка, Россия

³Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского государственного областного университета, г. Черноголовка, Россия

Как известно, NO (монооксид азота) является важнейшим агентом, который участвует в различных физиологических процессах, включая сосудистый тонус, ингибирование агрегации тромбоцитов и много другое. Установлено, что нитрозильные комплексы железа (НКЖ) с функциональными серосодержащими лигандами являются стабильной формой существования NO в организме. Данные соединения имеют ряд преимуществ перед другими экзогенными донорами NO, а именно: i) самопроизвольная генерация NO в водных растворах, не требующая дополнительной активации; ii) наличие двух важных фармакологических фрагментов и т.д. Вследствие этого НКЖ представляют большой интерес для их изучения в качестве перспективных соединений для создания на их основе лекарств для терапии социально-значимых болезней, связанных с нарушением обмена NO [1].

В ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН были синтезированы анионный биядерный тетранитрозильный комплекс железа с тиосульфатными лигандами $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (комплекс 1) [2] и $[\text{Fe}(\text{SC}(\text{NH}_2)_2)_2(\text{NO})_2][\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]$ (комплекс 2), который содержит в своей структуре комплекс 1 и тиомочевинные лиганды [3]. Данные комплексы, будучи представителями широкого класса НКЖ, обладают всеми его свойствами, описанными ранее, при этом комплекс 1 обладает антигипертензивным действием [4], комплекс 2 является эффективным цитопротектором [5]. Структурные формулы комплекса 1 и комплекса 2 представлены на рисунке 1. В настоящей работе приведены результаты изучения влияния бычьего сывороточного альбумина на распад представленных комплексов.

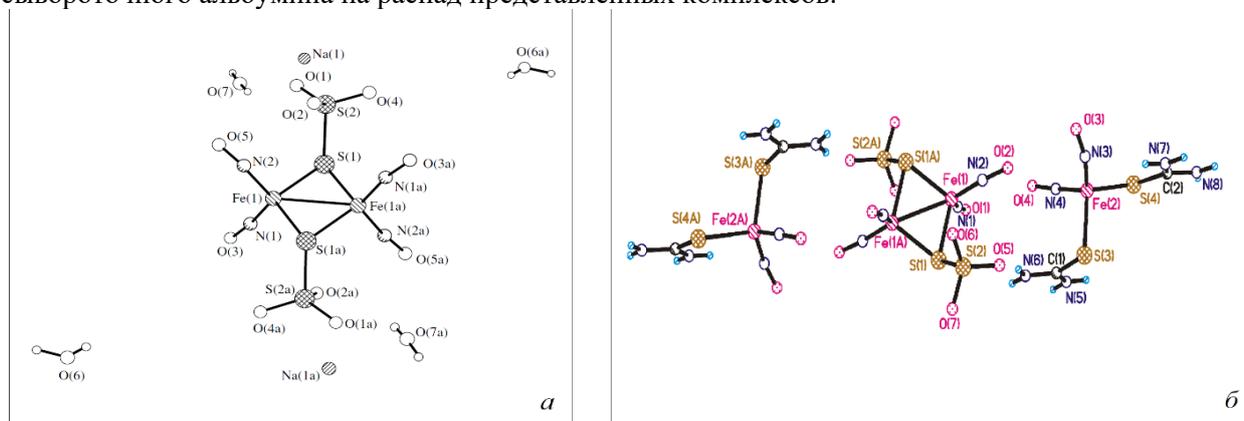


Рис. 1. Структурные формулы: а) комплекс 1, б) комплекс 2.

Методом УФ-спектроскопии был изучен распад комплексов в присутствии и отсутствии белка. В спектрах комплекса 1 в аэробных условиях не наблюдаем полос на 310 и 360 нм, которые характерны для биядерных НКЖ. При этом в спектрах комплекса 1 в присутствии альбумина полоса на 360 нм сохраняется в течение первых 30 минут от начала реакции, а далее становится менее выраженной.

Сравнение спектров комплекса 2 в анаэробных и аэробных условиях, записанных сразу после растворения, свидетельствует о быстрой реакции комплекса с кислородом. В отличие от спектра в аэробных условиях в анаэробных условиях присутствуют характерные полосы на 310 и 360 нм. Через 2,5 часа от начала растворения наблюдается нарастание оптической плотности в районе 290-340 нм, что, вероятно, связано с образованием продуктов взаимодействия комплекса с кислородом. После же оптическая плотность убывает, что может быть связано с распадом образующихся продуктов. Спектры поглощения двойной системы «комплекс 2 - альбумин» однозначно отличаются от описанных выше результатов. В данном случае полоса при 360 нм более выражена, можно предположить, что моноядерные и биядерные комплексы за счет

межмолекулярных взаимодействий адсорбируются на поверхности белка, что ограничивает доступ воды к ним и, следовательно, приводит к более медленному разложению комплексов.

Таким образом, альбумин может активно участвовать в процессе биотрансформации нитрозильных комплексов железа, модулируя их свойства в качестве перспективных лекарственных препаратов.

Работа по исследованию комплекса 1 выполнена по теме Государственного задания, № гос. регистрации № АААА-А19-119071890015-6, а комплекса 2 за счет гранта президента (№ МК-1634.2021.1.3.).

1. Pectol D.C., Khan S., Chupik R.V., et.al, 2019, Molecular Pharmaceutics. **16**. 3178–87.
2. Санина Н.А., Серебрякова Л.И., Шульженко В.С., и др., Патент RU 2437667 (2010).
3. Sanina N.A., Aldoshin S.M., Shmatko N.Yu., et.al, 2015, New Journal of Chemistry. **39**. 1022–30.
4. Vasil'eva S. V., Sanina N. A., Moshkovskaya E. Yu., et.al, 2005, Doklady Biological Sciences. **402**. 230–32.
5. Gizatullin A. R., Akentieva N.P., Sanina N. A., et.al, 2018, Doklady Biochemistry and Biophysics. **483**. 337–40.

Предсказание и исследование новых двумерных наноструктур на основе ковалентно-связанных органических молекул



Коровина А.В.*, **Квашнин Д.Г.****

* Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»,
г. Долгопрудный

** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук,
г. Москва

Многообразие форм и составов полупроводниковых органических молекул в сочетании с быстроразвивающимися технологиями синтеза двумерных материалов приводят к возможности использования отдельных органических молекул в качестве строительных блоков для создания новых двумерных материалов на их основе. Так, в 2008 году появилось первое сообщение об успешном синтезе органического каркаса на основе триазина [1], а уже в 2012 был найден способ синтеза с более мягкими условиями [2], что дало больше возможностей для изучения этого класса материалов. Каркасы на основе триазина (CFT), благодаря возможности настройки размера пор и однородности их распределения в материале, стали ключевыми элементами для создания микропористых органических материалов наряду с металлоорганическими каркасами и полимерными материалами.

Молекула F4-TCNQ имеет четыре циановые группы, необходимые для синтеза, и повышающие её акцепторные свойства атомы фтора. Однако молекула F4-TCNQ до сих пор была изучена только как основа для трехмерного полимера [3].

В данной работе с помощью теории функционала электронной плотности исследованы возможные пути синтеза молекулярного (двумерного) слоя, состоящего из молекул F4-TCNQ. С помощью метода молекулярной динамики была оценена температурная стабильность полученных слоев, рассчитаны электронные и механические свойства. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования молекул F4TCNQ для получения новых стабильных двумерных материалов, пригодных для использования в элементах гибкой опто- и наноэлектроники.

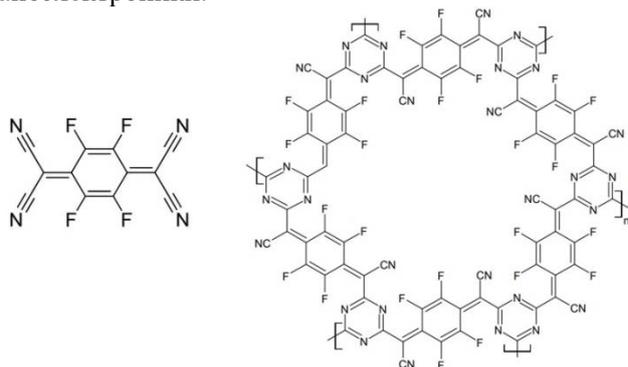


Рисунок 1 – Молекула F4-TCNQ (слева) и слой, полученный на её основе (справа)

Список используемой литературы:

1. Kuhn, P., Antonietti, M., & Thomas, A. (2008). *Angewandte Chemie International Edition*, 47(18), 3450-3453.
2. Ren S. et al. Porous, fluorescent, covalent triazine-based frameworks via room-temperature and microwave-assisted synthesis // *Advanced materials*. – 2012. – Т. 24. – №. 17. – С. 2357-2361.
3. Li, Yajuan, et al. *Angewandte Chemie* 130.27 (2018): 8124-8128.

Сравнительный анализ физико-химических характеристик групп флуорофоров липофусциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека в зависимости от возраста

**А.А. Костюков¹, М.А. Яковлева¹, А.Е. Донцов¹, Н.Л. Сакина¹,
В.В. Соколова¹, М.Х. Хубецова², П.М. Арбуханова², С.А. Борзенко²,
В.А. Кузьмин¹, Т.Б. Фельдман^{1,3}, М.А. Островский^{1,3}**

¹*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук, Москва, Россия*

²*Межотраслевой научно-технический комплекс "Микрохирургия глаза" им. С.Н. Фёдорова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия*

³*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

В настоящее время активно развивается неинвазивный метод диагностики глазных заболеваний - аутофлуоресценция глазного дна (АФ). Детектируемая этим методом аутофлуоресценция обусловлена, в основном, флуорофорами липофусциновых гранул (ЛГ) в клетках ретинального пигментного эпителия (РПЭ) глаза человека. Ранее было показано, что с возрастом в клетках РПЭ в ЛГ накапливаются окисленные формы флуорофоров. В настоящей работе показано, что этот процесс можно оценить количественно спектральными методами как по соотношению максимумов флуоресценции в разных спектральных диапазонах, так и по изменению характеристик кривых затухания флуоресценции, а именно по увеличению среднего времени жизни флуоресценции и увеличению амплитуды долгоживущей компоненты. Полученные результаты важны для дальнейшего расширения возможностей метода АФ.

Ключевые слова: липофусциновые гранулы, флуорофоры, ретинальный пигментный эпителий, аутофлуоресценция, метод подсчета коррелированных по времени фотонов.

Введение

Одним из наиболее перспективных методов диагностики заболеваний сетчатки является неинвазивный метод - аутофлуоресценция глазного дна (АФ). За флуоресценцию, регистрируемую этим методом с глазного дна, отвечают в основном флуорофоры липофусциновых гранул (ЛГ). ЛГ накапливаются в клетках РПЭ с возрастом и наиболее интенсивно при патологии. Основными флуорофорами ЛГ являются производные полностью-*транс*-ретинала (ПТР) - бисретиноиды (бисрет). Наиболее изученным бисретиноидом является бисретинилиденэтаноламин - А2Е. Ранее мы показали, что при патологии в составе ЛГ обнаруживается большее количество окисленных бисретиноидов (окси-бисрет), чем в норме, что приводит к тому, что в суммарном спектре флуоресценции ЛГ усиливается интенсивность более коротковолнового максимума флуоресценции [1]. На основании этого факта нами предложен критерий для доклинической диагностики возрастной макулярной дистрофии сетчатки (ВМД). Наряду с глаукомой и диабетической ретинопатией, ВМД является одной из важнейших причин слепоты во второй половине жизни человека. Заболевание считается неизлечимым, поэтому важно как можно более раннее выявление этой тяжелой глазной патологии с целью принятия своевременных защитно-профилактических мер, позволяющих замедлить ее развитие и сохранить хорошее качество жизни пациента на долгие годы. Новый метод, основанный на применении нашего критерия оценки риска развития патологии, предназначен для выявления ВМД на ранних доклинических стадиях развития заболевания, например, в ходе профилактических осмотров по программам диспансеризации населения. Кроме того, другим возможным способом расширения возможностей метода АФ, является картированное детектирование кривых затухания флуоресценции с поверхности глазного дна человека. И по изменению характера распределения параметрических данных тоже можно судить о патологических изменениях. Мы ранее показали, что при патологии увеличивается среднее время жизни флуоресценции (ВЖФ), а также то, что флуорофоры с

наибольшем ВЖФ, которые относятся к группе окси-бис-рет, преобладают у доноров с патологическими изменениями, по сравнению с нормой. Таким образом, оба подхода выявляют схожие динамические особенности изменений в составе флуорофоров ЛГ при развитии патологии [2]. Однако несмотря на то, что спектры флуоресценции в норме у доноров практически идентичны, наши хроматографические данные выявили некоторое увеличение содержания окси-бис-рет с возрастом, что несомненно, пусть и не очень значительно, влияет на показатели флуоресценции ЛГ [3]. Этот процесс можно оценить количественно спектральными методами как по соотношению максимумов флуоресценции в разных спектральных диапазонах, так и по изменению характеристик кривых затухания флуоресценции, а именно по увеличению среднего ВЖФ и увеличению амплитуды долгоживущей компоненты. Логично предположить, что в разных возрастных группах может быть выявлен свой критерий риска развития дегенеративных заболеваний сетчатки, который немного меняется с возрастом.

Целью данной работы было выявление спектральных показателей, характеризующих возрастное накопление окисленных бисретиноидов у пациентов в норме, необходимое для дальнейшей разработки критериев риска развития заболеваний глаза, в частности, например, для доклинической диагностики различных возрастных групп в норме.

Для этого были применены методы конфокальной флуориметрии, спектрофлуориметрии, с использованием различных оптических фильтров, ВЭЖХ-анализ, метод счета коррелированных во времени фотонов.

Экспериментальная часть

Реактивы. В работе были использованы реактивы и растворители производства “Sigma-Aldrich”, “Fluka” и “Компонент-реактив”. **Материал.** Кадаверные глаза человека были получены из Глазного банка ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» на основании договора о научном сотрудничестве между ИБХФ РАН и ФГАУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» [1]. **Получение из клеток РПЭ хлороформных экстрактов, содержащих бисретиноиды и их производные.** РПЭ извлекали из кадаверных глаз согласно методике, описанной в [1]. Ретиноидные флуорофоров ЛГ экстрагировали из клеток РПЭ по методу Фолча смесью хлороформ–метанол (2 : 1) [1]. **ВЭЖХ-анализ.** Хроматографическое разделение бисретиноидов и продуктов их фотоокисления и фотодеградации в хлороформных экстрактах РПЭ проводили на хроматографе фирмы «Knauer» (Германия) с колонкой «Диасфер 120 С18» (4x250 мм, размер сорбента 5 мкм), как описано ранее в [1]. В качестве стандарта использовали бисретиноид А2Е, синтезированный согласно методу, описанному в работе [4]. **Измерение спектров флуоресценции.** Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Shimadzu RF-5301PC (“Shimadzu”, Япония). **Регистрация аутофлуоресценции ткани РПЭ на конфокальном микроскопе.** Выделение монослоя клеток РПЭ отдельно из каждого отобранного кадаверного глаза по методике, описанной в работе [5]. Образцы были исследованы на флуоресцентном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5, Германия. Для регистрации спектров флуоресценции использовали длину волны возбуждения 488 нм. Для сравнительного анализа интенсивностей флуоресценции на поверхности ткани РПЭ в двух спектральных диапазонах, возбуждение осуществляли при длине волны 488 нм, а регистрацию флуоресценции проводили на при длинах волн 510 нм и 540 нм. **Регистрация кинетики затухания флуоресценции.** Измерения времени жизни флуоресценции (ВЖФ) хлороформного экстракта РПЭ выполняли методом «время разрешенного счета фотонов» с использованием флуориметра FluoTime 300 («PicoQuant, GmbH», Германия) в Центре коллективного пользования «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН. Возбуждение флуоресценции образца производили при помощи лазера (PicoquantSolea 490 нм, 40 пс). Сигнал флуоресценции регистрировали при длине волны 556 нм. Кинетики затухания флуоресценции обрабатывали в рамках трех-экспоненциальной модели. ВЖФ и вклад отдельных групп флуорофоров в детектируемые кривые затухания флуоресценции рассчитывали по формуле с учетом собственной функции прибора (instrument response function, IRF):

$$I(t) = \int_{-\infty}^t IRF(t') \sum_i A_i \exp(-(t-t')/\tau_i) dt'$$

где i – номер компоненты, A – амплитуда, τ - время жизни флуоресценции.

Результаты

Исследование изменения соотношения окисленных и неокисленных флуорофоров в норме в зависимости от возраста

1) Метод оценки по характеристикам кривых затухания флуоресценции

Распределение ВЖФ и их вкладов в ЛГ из клеток РПЭ глаза человека от доноров разных возрастных групп в норме. Были проведены исследования спектрально-кинетических характеристик ЛГ. По спектрально-кинетическим характеристикам флуоресценции ЛГ образцов трех возрастных групп были установлены различия распределения интенсивности ВЖФ между возрастными группами. Было отмечено, что для старшей возрастной группы спектр флуоресценции имеет большую интенсивность в области 530-540 нм (рис. 1-1. А-Б). Данная характеристика соответствует повышенному содержанию окси-бис-рет. Кинетики гибели флуоресценции были охарактеризованы трех экспоненциальной моделью с разделением компонент по интенсивности (рис. 1-2. А-Б). Анализ результатов показывает, что короткоживущая компонента обладает характерным временем жизни порядка 0.5нс и может быть отнесена к бис-рет.

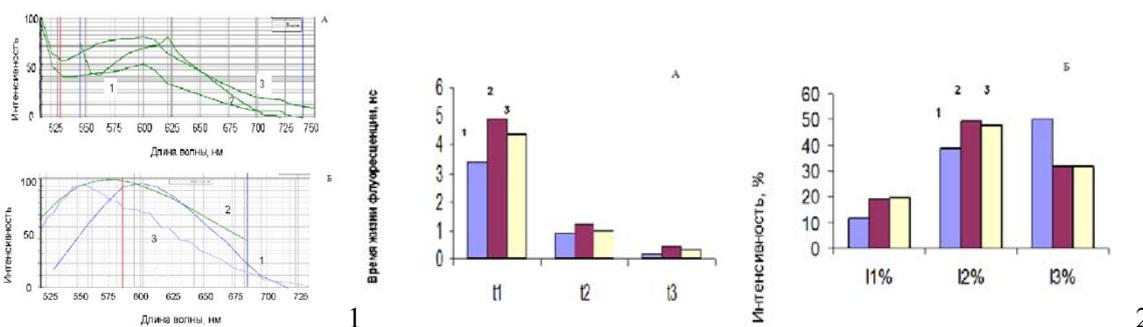


Рис. 1 - Спектры флуоресценции при возбуждении 490 нм. А - суспензия гранул ЛГ, Б - хлороформные экстракты из ЛГ. 2- А- Распределение вкладов времен жизни флуоресценции по возрастным группам. Б - Распределение интенсивности флуоресценции компонент по возрастным группам. 1 – доноры до 32 лет, 2 – доноры 33-63 лет, 3 – доноры старше 65 лет. Т1 – 5нс самые окисленные, Т2 – 1нс слабо окисленные, Т3 – 0,5 нс не окисленные бисретиноиды в ЛГ [2]. Возбуждение 490nm, эмиссия 510nm и 540nm.

Вклад данной компоненты в распределение времен жизни является наибольшим для образцов без патологии от молодых доноров до 32 лет, 50% против 30% для образцов старших возрастных групп (33-63 года и старше 65 лет). Компонента со временем жизни 1 нс отнесена к продуктам моно- и бис-окси-А2Е [2], ее распределение между возрастными группами составляло 37% для доноров без патологии в возрасте до 32 лет, а для возрастных групп 33-63 лет и старше 65 лет составляла 45-50%. Компонента со временем жизни флуоресценции порядка 5 нс соответствовала продуктам сильного окисления ЛГ и имела больший вклад в кинетику гибели флуоресценции для образцов от доноров в возрасте от 33 до 63, а также старше 65 лет и составляла порядка 20% против 13% для доноров в возрасте до 32 лет, что соответствует предположению о большей степени деградации флуорофоров ЛГ с возрастом. Показано, что с возрастом немного увеличивается содержание окси-бис-рет, нарастает максимум флуоресценции в более коротковолновой области (рис. 1-1). При этом среднее ВЖФ увеличивается, и вклад долгоживущей компоненты нарастает. Вклад самых окисленных флуорофоров с возрастом растет, как и степень окисленности (т.к. время жизни тоже увеличивается), а вклад бис-рет уменьшается с возрастом. Таким образом, мы показали, что можно этими методами детектировать в том числе и возрастные изменения, с высокой чувствительностью и соответственно определять риски по развитию ВМД с возрастом.

2) Метод оценки по спектрам флуоресценции

Сравнительный анализ спектров флуоресценции для хлороформных экстрактов флуорофоров ЛГ из РПЭ глаз доноров разных возрастов показал, что с увеличением возраста донора максимум флуоресценции немного сдвигается в более коротковолновую область.

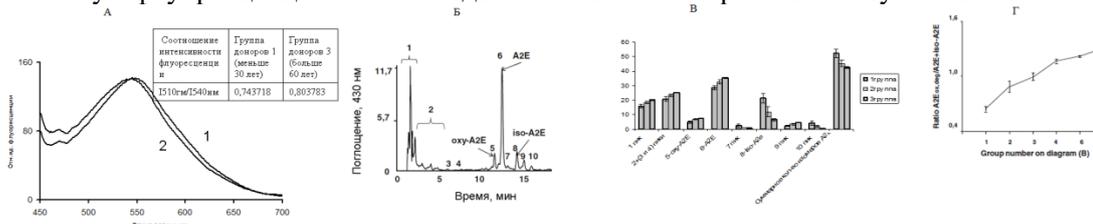


Рис. 2. А - Спектры флуоресценции хлороформного экстракта липофусциновых гранул из клеток РПЭ при возбуждении длиной волны 430 нм. 1 – меньше 30 лет, 2- больше 60 лет,

Б - Характерная хроматограмма хлороформного экстракта из ЛГ кадаверных глаз человека. Детектирование по поглощению на 430нм. В - Диаграмма распределение отдельных флуорофоров в хлороформном экстракте из ЛГ различных возрастных групп доноров на основании хроматограмм с детектированием по поглощению на длине волны 430 нм. Г - Кривая изменения соотношения окисленные/исходные флуорофоры в составе ЛГ в зависимости от возраста доноров. На основании хроматографических данных.

Это хорошо согласуется с результатами ВЭЖХ-анализа, из которого следует, что с увеличением возраста донора количество начальных пиков (у которых максимум флуоресценции более коротковолновый, чем у А2Е) увеличивается, а изомеров А2Е снижается [3]. Т.е. сдвиг максимумов флуоресценции хлороформных экстрактов из РПЭ индивидуальных доноров логически обоснован снижением количества флуорофоров с более длинноволновой флуоресценцией (А2Е) и увеличением количества продуктов с более коротковолновой флуоресценцией (начальные пики на хроматограмме).

3) Исследование *in situ* (конфокальная флуоресцентная лазерная микроскопия)

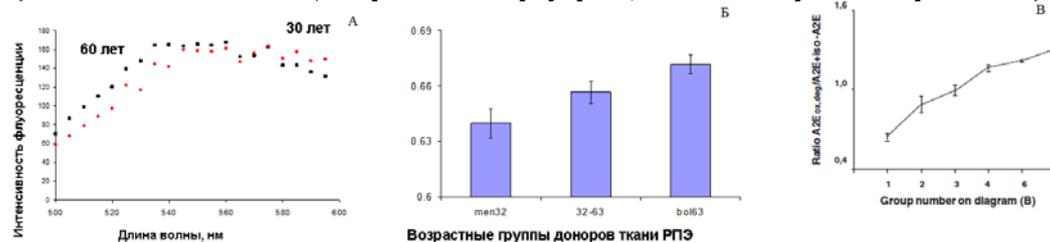


Рис. 3. А - Спектры флуоресценции при возбуждении длиной волны 488нм, полученные на конфокальном микроскопе для РПЭ двух возрастов. Б -Диаграмма динамики в различных возрастных группах доноров РПЭ изменения в соотношении интенсивности при детектировании флуоресценции в двух спектральных диапазонах (510 и 540нм) при возбуждении 488нм. Данные с конфокального микроскопа. В - Кривая изменения соотношения окисленные/исходные флуорофоры в составе ЛГ в зависимости от возраста доноров. На основании хроматографических данных.

Получены данные анализа с использованием конфокального сканирующего микроскопа образцов клеток РПЭ. Полные спектры флуоресценции в отдельных точках с поверхности образца и свечении флуоресценции в двух спектральных диапазонах со всей поверхности образца РПЭ представлены на рис. 3. В спектрах флуоресценции с поверхности монослоя РПЭ, полученных на конфокальном микроскопе, мы видим ту же динамику, что и на стационарных спектрах флуоресценции в суспензии клеток РПЭ (рис. 1-1) и ЛГ (рис. 2-1), а именно небольшое смещение максимума флуоресценции в коротковолновую часть спектра при увеличении возраста донора. При детектировании на конфокальном микроскопе флуоресценции с РПЭ в двух спектральных диапазонах (510 нм и 540 нм) и получении соотношения этих интенсивностей определен критерий, по которому видно небольшое, но достоверное увеличение содержания окси-бис-рет с возрастом донора. Полученные соотношения хорошо коррелируют с литературными данными [6]. В этой работе авторы посмотрели распределение флуоресценции вдоль ткани РПЭ, возбуждая ее длиной волны 488 нм и детектируя ее в двух диапазонах (515-575 нм и в 575-650 нм), и потом поделили интенсивность в одном диапазоне на интенсивность в другом, и у них получились те же значения (0,64-0,75), что и у нас, и этот показатель увеличивается в возрастном донора в норме. Эта динамика, полученная на конфокальном микроскопе для ткани РПЭ с увеличением возраста доноров РПЭ коррелирует с данными, полученными при ВЭЖХ-анализе, а именно в нарастании содержания окисленных форм флуорофоров с возрастом.

3) Определение соотношения окисленных и неокисленных флуорофоров путем измерения флуоресценции, фильтрованной оранжевым (ОС-14) и желтым (ЖС-18) светофильтрами

Поскольку мы показали, что с возрастом в составе ЛГ увеличивается содержание окси-бис-рет и это влияет на спектральные характеристики, а именно происходит небольшой сдвиг максимума флуоресценции в коротковолновую область спектра, то получается, что по спектру флуоресценции можно определять относительное содержание окси-бис-рет в составе ЛГ. Для этого достаточно сравнить соотношение суммарной флуоресценции в различных областях спектра и построить зависимость этого соотношения от содержания окисленных продуктов. Поэтому в данной работе мы проводили измерение флуоресценции образцов ЛГ от различных возрастных групп доноров в двух режимах – с фильтрацией эмиссии фильтром ЖС-18 и с фильтрацией эмиссии фильтром ОС-14. Для возбуждения флуоресценции была использована длина волны 488

нм – общепринятая для измерения АФ. Фильтр ЖС-18 пропускает флуоресценцию в диапазоне длин волн 510-715 нм. Фильтр ОС-14 пропускает флуоресценцию в диапазоне длин волн 575-715 нм. Обозначив интенсивность флуоресценции буквой Φ , имеем: $\frac{\Phi(\text{ЖС-18}) - \Phi(\text{ОС-14})}{\Phi(\text{ОС-14})}$ или $R = \frac{\Phi(\text{ЖС-18})}{\Phi(\text{ОС-14})} - 1$

После измерения суммарной флуоресценции с использованием фильтров ЖС-18 и ОС-14, были рассчитаны отношения желто-зеленой флуоресценции к оранжево-красной флуоресценции для образцов ЛГ. Полученные данные представлены в таблице 1. Из таблицы 1 видно, что содержание окси-бис-рет с возрастом увеличивается. Таким образом, мы получили данным методом критерий, характеризующий параметр нормы для выбранных возрастных групп.

Таблица 1. Сравнение величин R для ЛГ трех возрастных групп

Образец ЛГ	Величина R для длины волны возбуждения флуоресценции 488 нм		
	Возрастная группа		
	Первая (20-39 лет)	Вторая (40-59 лет)	Третья (60 лет +)
Исходный	1,58	1,64	1,66

Обсуждение результатов

Показано, что с возрастом немного увеличивается содержание окси-бис-рет, что приводит к нарастанию максимума флуоресценции в более коротковолновой области. При этом среднее ВЖФ увеличивается, и вклад долгоживущей компоненты нарастает. Как мы показали ранее, окислительная деструкция ЛГ приводит к изменению параметров флуоресценции ЛГ, при этом наблюдается сдвиг максимума флуоресценции в коротковолновую область спектра. Это связано с окислением бис-рет ЛГ. Отсюда следует, что по спектру флуоресценции можно определять относительное содержание окси-бис-рет в составе ЛГ. Для этого достаточно сравнить соотношение суммарной флуоресценции в различных областях спектра и построить зависимость этого соотношения от содержания окисленных продуктов. К сожалению, существующие приборы для неинвазивной диагностики АФ, измеряют флуоресценцию и не могут различать спектральный состав. Однако, если такой прибор дополнить цветной камерой и снимать две картинки АФ через разные фильтры, отсекающие либо коротковолновую, либо длинноволновую области спектра, то по соотношению интенсивностей флуоресценции можно будет судить о содержании окси-бис-рет в липофусцине РПЭ. В настоящей работе мы попытались подобрать фильтры таким образом, чтобы соотношение флуоресценции изменялось в зависимости от содержания в ЛГ окисленных флуорофоров. Показано, что полученный критерий увеличивается с возрастом, что подтверждает наши данные о нарастании содержания окси-бис-рет в ЛГ с возрастом. Кроме того, мы получили численный критерий для оценки показателя в норме флуоресценции ЛГ для трех возрастных групп, в зависимости от метода детектирования. Таким образом мы показали, что можно этими методами оценивать в том числе и возрастные изменения, с высокой чувствительностью и соответственно риски по развитию ВМД с возрастом.

Выводы

Были проведены измерения динамики флуоресценции флуорофоров ЛГ. Установлено распределение ВЖФ и их вкладов для различных возрастных групп доноров в норме без патологии, показано, что для возрастной группы до 32 лет интенсивность короткоживущей компоненты (бис-рет) имела наибольший вклад. Для образцов от доноров старшей возрастной группы результаты показали преобладание доли продуктов окси-бис-рет в кинетике гибели флуоресценции. Разработан относительно простой метод оценки содержания окси-бис-рет в ЛГ из РПЭ глаза, который может быть использован для расширения диагностических возможностей существующего метода АФ. Показано, что содержание в ЛГ здоровых доноров окси-бис-рет достоверно возрастает с возрастом.

Работа выполнена в рамках проекта № 075-15-2020-773 «Молекулярно-клеточные механизмы онкологических, иммунных, метаболических заболеваний, моделирование и экспериментальное обоснование методов репрограммирования и онкотаргетинга».

Список литературы.

1. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Larichev A.V., Arbukhanova P.M., Radchenko A.Sh., Borzenok S.A., Kuzmin V.A., Ostrovsky M.A. // *Eye*, 2018, 32(9), 1440-1448.
2. Yakovleva M.A., Radchenko A.Sh., Feldman T.B., Kostyukov A.A., Arbukhanova P.M., Borzenok S.A., Kuzmin V.A., Ostrovsky M.A. // *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2020, <https://doi.org/10.1039/C9PP00406H>
3. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Arbukhanova P.M., Borzenok S.A., Kononikhin A.S., Popov I.A., Nikolaev E.N., Ostrovsky M.A. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015, 407 (4), 1075-1088.

4. Parish CA, Hashimoto M, Nakanishi K, Dillon J, Sparrow JR. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998;95:14609–13.
5. Арбуханова П.М., Борзенко С.А., Яковлева М.А., Фельдман Т.Б., Островский М.А. // Сенсорные системы, 2012, 26 (2), 117–123.
6. Sparrow JR, Yoon KD, Wu Y, Yamamoto K. // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 Sep;51(9):4351-7.

Механизм реакции ингибирования пенициллин-связывающего белка 2 из штаммов FA19, 35/02 и H041 *Nisseria Gonorrhoeae* цефтриаксоном



Кривицкая А.В.¹, Хренова М.Г.^{1,2}

¹ФИЦ Биотехнологии РАН

²МГУ им. М.В. Ломоносова

Одним из современных методов лечения гонореи является ингибирование пенициллин-связывающих белков 2 (PBP2) антибиотиком цефалоспоринового ряда цефтриаксоном. PBP2 катализируют последние стадии образования пептидогликана клеточной стенки бактерий. Антибиотики, содержащие β-лактамное кольцо, способны связываться с PBP2 и, таким образом, ингибировать его действие [1].

В клинической практике известны случаи выявления резистентности PBP2 из штаммов возбудителя гонореи *Nisseria gonorrhoeae* к цефалоспориновым антибиотикам расширенного спектра действия. За возникновение резистентности отвечают мутации в гене penA, кодирующем PBP2 *N. gonorrhoeae*. PBP2 из дикого штамма FA19 не проявляет устойчивости к пенициллину, в PBP2 штаммов 35/02 и H041 появляется ряд мутаций, которые позволяют им быть высоко устойчивыми к действию антибиотиков, в том числе к антибиотикам цефалоспоринового ряда [2]. В 35/02 появляется 57 мутаций, но ответственны за резистентность три: I312M, V316T и G545S. В H041 появляются еще 13 мутаций, но на реакцию влияют только A311V, V316P и T483S. Разница в константах эффективности ферментов (k_2/K_s) составляет 150 раз, между FA19 и 35/02, и 2300 раз, между FA19 и H041, соответственно. Для FA19 из литературы известны индивидуальные параметры реакции: константа ацилирования (k_2) и константа связывания (K_s). Но для мутантных форм определить эти параметры экспериментально по отдельности не представляется возможным [3]. Таким образом, на данный момент неизвестно, рост резистентности достигается за счет снижения сродства к антибиотику, снижения скорости ацилирования или за счет комбинирования обоих этих механизмов.

В работе выполнено молекулярное моделирование механизма реакции ингибирования PBP2 из штаммов FA19, 35/02 и H041 антибиотиком цефалоспоринового ряда цефтриаксоном. Рассчитаны молекулярно-динамические траектории фермент-субстратных комплексов, позволяющие проанализировать состояния активных центров. Изучено строение оксианионного центра и выявлено наличие реакционных структур фермент-субстратных комплексов. Показано, что мутация в 545 остатке в мутантных формах PBP2 в области активного центра фермента изменяет положение субстрата в каталитическом кармане. Субстрат находится ближе к выходу из каталитического кармана, что отражается в формировании оксианионного центра и как следствие высоте энергетического барьера нуклеофильной атаки. С помощью метода зонтичной выборки просканированы поверхность энергии Гиббса, построены энергетические профили каждой стадии реакции до образования комплекса ацил-фермента. Показано, что механизм реакции в мутантных PBP2 и из штамма дикого типа отличаются. Разрыв связи C–N и отрыв фрагмента антибиотика происходит последовательно в белке из штамма дикого типа и одновременно в мутантных белках. Профили энергии Гиббса позволили рассчитать индивидуальные параметры, константы ацилирования и константы связывания для мутантных форм белка.

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект 18-74-10056).

Список литературы:

1. Stefanova M.E., Tomberg J., Olesky M., Holtje J.-V., Gultheil W. G., Nicholas R. A. Neisseria gonorrhoeae Penicillin-Binding Protein 3 Exhibits Exceptionally High Carboxypeptidase and β-Lactam Binding Activities// Biochemistry — 2003. Vol 42, — P. 14614-14625.

- Tomberg J., Unemo M., Ohnishi M., Davies C., Nicholas R. A. Identification of Amino Acids Conferring High-Level Resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins in the *penA* Gene from *Neisseria gonorrhoeae* Strain H041// *Antimicrob. Agents Chemother.* — 2013. — Vol. 57, no. 7. — P. 3029-3036.
- Singh A., Turner M.J., Tomberg J., Fedarovich A., Unemo M., Davies C., Nicholas R. A. Mutations in penicillin-binding protein 2 from cephalosporinresistant *Neisseria gonorrhoeae* hinder ceftriaxone acylation by restricting protein dynamics// *J. Biol. Chem.* — 2020. Vol 295, no. 21. — P. 7529-7543.

Оценка затухания ультразвука в химически сшитых гидрогелях на основе полиакриламида для регенеративной медицины



**О.Р. Куликова¹, К.Г. Антипова², С.В. Крашенинников²,
Т. Е. Григорьев², Е.А. Храмцова¹**

¹Институт биохимической физики им Н.М. Эмануэля РАН, Москва
²НИЦ «Курчатовский институт», Москва

Необходимым этапом разработки и проектирования новых материалов, имитирующих *in vivo* условия с благоприятной микросредой для миграции клеток и обмена питательными веществами за счет точных характеристик пористости, геометрии, толщины и соответствующих механических свойств, является тщательный контроль их структуры и упругих свойств[1].

Ультразвуковые методы исследования материалов при изучении объектов регенеративной медицины, позволяют неинвазивно и бесконтактно получать качественные изображения объемной микроструктуры с одновременным анализом локальных упругих характеристик, таких как затухание ультразвукового сигнала, скорость звука в материале и т.д.[2].

Гидрогелевые полимерные материалы применяются в регенеративной медицине в качестве искусственных матриц и в рутинной практике в виде фантомов для имитации упругих свойств нативных тканей. Знания о механических свойствах ткани или материала оказываются важными при изучении воздействия клеточного компонента на матрикс, а также при диагностике патологий[3]. Для имитации свойств мягких тканей часто используют гидрогелевые материалы на основе природных (агар-агар, желатин, хитозан и др.) и синтетических полимеров (полиуретаны, поливиниловый спирт, полиакриламид и др.) [4].

Целью данной работы является исследование ультразвуковых свойств гидрогелевых матриц на основе полиакриламида с регулируемыми механическими свойствами.

В качестве материала использовался полиакриламид, поскольку он является коммерчески доступным водорастворимым синтетическим полимером. Гидрогели на его основе получали свободно-радикальной полимеризацией. Варьирование концентрации мономера – акриламида и сшивателя – N,N' метилен-бис-акриламида позволяет получать воспроизводимые материалы с различной степенью сшивки.

В данной работе проведено исследование механических свойств полиакриламидных гидрогелей с различной степенью сшивки при разных типах нагружения. Гидрогели синтезировали из раствора мономера с концентрацией 20%, а количество сшивателя варьировали от 1% до 9% (таб. 1).

Таблица 1. Соотношение концентрации сшивателя к степени сшивки полимера.

Концентрация сшивателя от общей массы мономера, %	Количество звеньев мономера, ед.
9,0	20
4,0	50
2,0	100
1,5	150
1,0	200

Полученные образцы после синтеза отмывали в дистиллированной воде в течение 7 суток для удаления непрореагировавших компонентов и достижения ими равновесной степени набухания.

При изготовлении гидрогелевых образцов, концентрации сшивателя подбирались таким образом, чтобы вязкоупругие свойства геля соответствовали нативным тканям живого организма. В данном случае одним из ключевых параметров является модуль Юнга, значения которого находятся в диапазоне от десятков до сотен кПа[5].

Механические испытания на сжатие и растяжение проводились на разрывной машине Instron. Бесконтактные и неинвазивные исследования выполнены на ультразвуковом микроскопе высокого разрешения SIAM-2010, с использованием акустической линзы 50 МГц.

Для разных типов испытаний получали образцы разной геометрии. В форме дисков – для акустической микроскопии, лопаток – для растяжения, в форме цилиндров - для сжатия.

С ростом концентрации сшивающего агента в гидрогеле его модуль упругости и предел прочности увеличиваются, а деформация разрыва уменьшается. Изотропность механических свойств гидрогелей исследовали, сравнивая значения модулей Юнга, полученные в испытаниях на растяжение и сжатие. Все материалы можно считать изотропными с некоторым допущением. При высоких степенях сшивки, 2%, 4% и 9% гидрогели показывают высокую изотропность. При более низких сшивках 1% и 1,5% модуль упругости при сжатии превышает аналогичный при растяжении (таб. 2).

Таблица 2. Механическое поведение гидрогелей в зависимости от концентрации сшивателя

Сшивка, %	Растяжение, кПа	Сжатие, кПа
9,0	157 ± 5	163 ± 2
4,0	75 ± 5	86 ± 18
2,0	56 ± 7	69 ± 4
1,5	31 ± 3	42 ± 2
1,0	19 ± 2	30 ± 1

Существует четкая корреляция между химическим строением, структурой, молекулярной подвижностью полимерных цепей и такими параметрами, как скорость звука, коэффициент затухания, амплитуда отраженного сигнала и т.д. Используя возможности акустической микроскопии, была проведена дефектоскопия полученных гидрогелевых пластин в режиме В/D-сканирования (рис.1). В результате эксперимента неоднородности, воздушные включения, дефекты литья, перепады толщины гидрогелевых пластин на основе полиакриламида с различной концентрацией сшивки, выявлены не были.

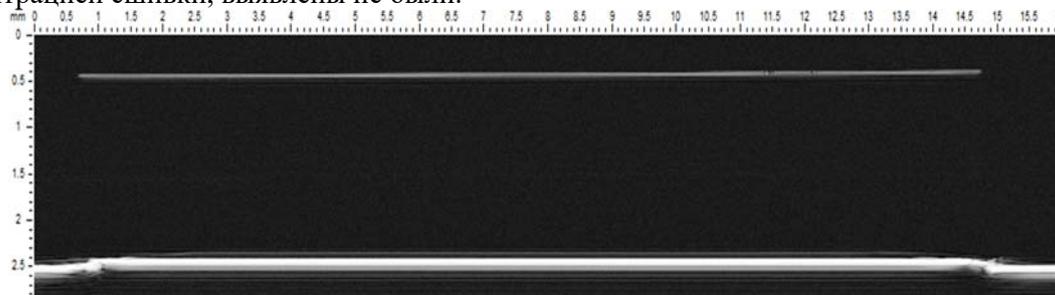


Рисунок 1. В/D-скан всего объема гидрогелевой пластины, расположенной на стекле

При исследовании затухания применялся метод SHADOWED REFLECTOR, когда отражение ультразвукового сигнала регистрируется от подлежащей плоской эхогенной подложки. Условия проведения эксперимента: выровненная подложка (предметное стекло), постоянная температура (22°C), иммерсионная среда с известными ультразвуковыми параметрами (дистиллированная вода), плоскопараллельный образец с минимальным перепадом толщины, фокус строго на подложке и равновесное набухание образцов.

Измерение затухания ультразвукового сигнала в объеме гидрогеля было проведено двумя способами: при прилегании и при отсутствии прилегания образца к отражающей подложке (рис.2)

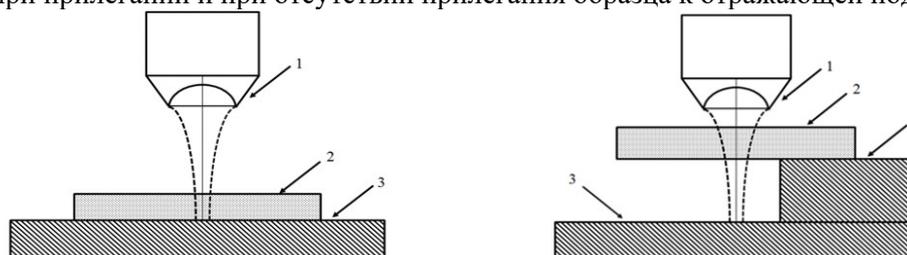


Рисунок 2. Схема эксперимента: 1 – акустическая линза, 2 – образец, 3 – отражающая подложка, 4 – вставка 250 мкм.

В зависимости от концентрации сшивателя установлена разница в затухании сигнала при прохождении через образец (рис.3).

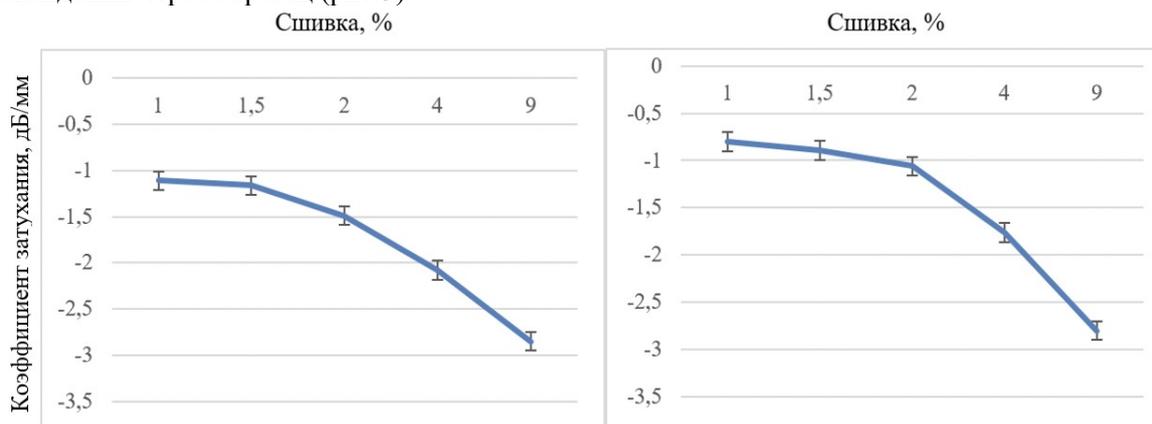


Рисунок 3. Коэффициент затухания ультразвукового сигнала в зависимости от концентрации сшивателя. А – при прилегании образца к стеклянной подложке; Б – при отсутствии прилегания образца к стеклянной подложке

Чем ниже концентрация сшивающего агента, тем меньше соединений между молекулами полимера и соответственно меньше затухание ультразвука. При этом в эксперименте с отсутствием прилегания образца к подложке наблюдается снижение абсолютных значений затухания, по сравнению с прилегающим к подложке образцом. Это связано с рассеянием сигнала в области между нижним краем образца и отражателем.

Данная информация имеет важное значение при проведении экспериментов *in vivo*, так как метод с отражателем может быть реализован в условиях, когда непосредственно под мягкой тканью находится сильно отражающий элемент, например кость, или же между мягкой тканью и отражателем имеется полость.

Расчеты ультразвуковых модулей и коэффициента затухания производился по формулам (рис.4).

$$I_n = \left(20 \lg \frac{A_1}{A_0} \right) : \frac{1}{2l}$$

I_n - коэффициент затухания, нормированный на толщину [дБ/мм], где A_0 - амплитуда сигнала, отраженного от подложки при прохождении через иммерсию, A_1 - амплитуда сигнала, отраженного от подложки при прохождении через образец, l - толщина образца в месте измерения амплитуды отраженного сигнала

$$UM_{EM} = \rho SOS^2$$

UM_{EM} - ультразвуковой модуль объемной упругости, при котором гидрогель моделируется как жидкость благодаря высокому содержанию воды в гидрогеле, где ρ – плотность гидрогеля, SOS - скорость звука в образце гидрогеля

$$UM_{PEM} = \frac{SOS^2(n_f^2 \rho_{b,s} + n_s^2 \rho_{b,f})}{n_f^2}$$

UM_{PEM} - ультразвуковой модуль объемной упругости, при котором гидрогель моделируется как бинарная смесь линейно эластичных твердых полимеров и вязких компонентов жидкости, где ρ – объемная плотность, n – объемная фракция компонентов системы, SOS - скорость звука в образце гидрогеля

Рисунок 4. Формулы ультразвуковых модулей и коэффициента затухания.

В таблице 3 представлены результаты расчетов вязкоупругих характеристик гидрогелевых матриц на основе полиакриламида в зависимости от концентрации сшивателя.

сшивка, %	SOS, м/с	ρ , г/см ³	UM_{EM} , ГПа	UM_{PEM} , ГПа	E , (сжат) кПа	E , (растяж) кПа
9,0	1566	1,056	2,59	2,09	163±2	157±5
4,0	1546	1,041	2,49	2,05	86±18	75±5
2,0	1532	1,031	2,42	2,02	69±4	56±7
1,5	1527	1,024	2,39	2,01	42±2	31±3
1,0	1517	1,02	2,35	1,98	30±1	19±2

Таблица 3. Результаты расчетов: скорость звука; плотность; ультразвуковой модуль объемной упругости, при котором гидрогель моделируется как жидкость благодаря высокому содержанию воды в гидрогеле; ультразвуковой модуль объемной упругости, при котором гидрогель моделируется как бинарная смесь линейно эластичных твердых полимеров и невязких компонентов жидкости; а также модули Юнга по сжатию и растяжению.

В работе показана корреляция ультразвуковых параметров (скорость звука и амплитуды затухания), измеренных неинвазивным и бесконтактным методом, с данными, полученными на испытательной машине Instron, а также установлена зависимость между количеством химического сшивателя и вязкоупругими свойствами итогового геля.

Разработанная методика бесконтактного измерения вязкоупругих свойств биоматериалов может быть применена для определения патологии нативных тканей, а полученные гидрогели использованы для изготовления механических и ультразвуковых фантомов биомедицинского назначения, и в качестве подложек с заданными вязкоупругими параметрами для механотрансдукции клеточных линий при культивировании *invitro*.

Синтез гидрогелей и механические испытания выполнены при поддержке НИЦ «Курчатовский институт», ультразвуковые исследования выполнены в рамках государственного задания по теме №122041400112–8.

Литература

1. Ruland A, Chen X, Khansari A, Fay CD, Gambhir S, Yue Z, Wallace GG. A contactless approach for monitoring the mechanical properties of swollen hydrogels. *Soft Matter*. 2018 Sep 11;14(35):7228-7236. doi: 10.1039/c8sm01227j. PMID: 30132499.
2. Ruland A, Onofrillo C, Duchi S, Di Bella C, Wallace GG. Standardised quantitative ultrasound imaging approach for the contact-less three-dimensional analysis of neocartilage formation in hydrogel-based bioscaffolds. *Acta Biomater*. 2022 Jul 15; 147:129–146. doi: 10.1016/j.actbio.2022.05.037. Epub 2022 May 25. PMID: 35643197.
3. Ruland A, Hill JM, Wallace GG. Reference Phantom Method for Ultrasonic Imaging of Thin Dynamic Constructs. *Ultrasound Med Biol*. 2021 Aug;47(8):2388-2403. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2021.04.014. Epub 2021 May 29. PMID: 34059374.
4. Sennakesavan, G., Mostakhdemin, M., Dkhar, L. K., Seyfoddin, A., & Fatihhi, S. J. (2020). Acrylic acid/acrylamide-based hydrogels and its properties - A review. *Polymer Degradation and Stability*, 109308. doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2020.109308
5. Handorf, Andrew M., et al. "Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression." *Organogenesis*, 2015; 11 (1): 1-15.

Цитотоксическая и противоопухолевая активность фармакологической пары метионин γ -лиаза-дайдзеин + сульфоксид S-пропил L-цистеина на модели рака предстательной железы 22Rv1

**Л. Або Кура¹, Е.А. Морозова^{2*}, В.В. Куликова², В.С. Коваль²,
В.С. Покровский^{1,3*}, Т.В. Демидкина²**

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины, Россия 117198, г. Москва;

²ФГБУН «Институту молекулярной биологии. В. А. Энгельгардта» Российская академия наук, Россия; 119991, г. Москва;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, г. Москва;

*Равный вклад авторов

Метионин γ -лиаза (МГЛ, КФ 4.4.1.11) — пиридоксаль-5'-фосфат-зависимый фермент, катализирующий реакцию γ -элиминирования L-метионина и его аналогов и реакцию β -элиминирования S-замещенных аналогов L-цистеина [1]. Эффективность катализа реакции β -элиминирования сульфоксидов S-алк(ен)ил-L-цистеина мутантной формой фермента с заменой цистеина 115 на гистидин (C115H) оказалась выше по сравнению с ферментом дикого типа [2]. Дипропилтиосульфидат, получаемый фармакологической парой *Citrobacter freundii* C115H МГЛ + сульфоксид S-пропил-L-цистеина (пропиин), обладает цитотоксической активностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий, включая мультирезистентные микроорганизмы [3]. Дайдзеин обладает структурным сходством с 17 β -эстрадиолом и может связываться с высоким сродством с мембранным рецептором эстрогена (GPER1) [4]. В настоящей работе для направленной доставки ферментного компонента (C115H МГЛ) к поверхности

эстроген-зависимых опухолей нами был получен конъюгат С115Н МГЛ с дайдзеином (С115Н МГЛ-Dz).

Цель исследования. Изучение антипролиферативной активности фармакологической пары С115Н МГЛ-Dz + пропин на культуре клеток рака предстательной железы 22Rv1.

Материалы и методы. Конъюгат С115Н МГЛ-Dz и пропин получены в ИМБ им. В.А.Энгельгардта РАН. Для оценки цитотоксичности фармакологической пары С115Н МГЛ-Dz + пропин использовали МТТ-тест. Индукцию апоптоза и изменение клеточного цикла клеток линии 22Rv1 исследовали с помощью набора реагентов Muse® Caspase-3/7 и Muse® Cell Cycle Assay kit. Оценку противоопухолевого эффекта осуществляли на модели подкожных ксенографтов 22Rv1 у мышей Balb c/nude.

Результаты. Цитотоксический эффект фармакологической пары С115Н МГЛ-Dz + пропин. Направленная доставка С115Н МГЛ в составе фармакологической пары для образования дипропилтиосульфидата непосредственно на поверхности опухолевых клеток повышает цитотоксичность на культуре клеток предстательной железы 22Rv1 с IC_{50} ($5,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$) по сравнению с дипропилтиосульфидатом, полученным при использовании неконъюгированной с дайдзеином пары С115Н МГЛ + пропин *in vitro* ($IC_{50} = 66,4 \pm 2,6 \mu\text{M}$). Таким образом, конъюгаты С115Н МГЛ-Dz могут непосредственно связываться на поверхности раковых клеток и при введении пропина катализировать реакцию β -элиминирования с образованием цитотоксического дипропилтиосульфидата непосредственно на поверхности клеток 22Rv1.

Индукция апоптоза под влиянием пары С115Н МГЛ-Dz + пропин. Инкубация культуры клеток 22Rv1 с С115Н МГЛ-Dz в концентрациях 0,1, 0,4, и 0,5 μM + пропин (1 мг/мл) приводила к ранней фазе апоптоза, увеличивая концентрацию апоптотических клеток на 21,2%, 19,5%, и 24,0%, соответственно, по сравнению с контролем (<2%). После коинкубации с фармакологической парой С115Н МГЛ-Dz + пропин в течение 30 мин при 37 °С в атмосфере с 5% CO_2 наблюдалось увеличение популяции клеток в поздней стадии апоптоза с 35,9% до 38,9%. Полученный результат свидетельствует о том, что дипропилтиосульфидат индуцирует апоптоз.

Изменения распределения клеток 22Rv1 по фазам клеточного цикла под действием С115Н МГЛ-Dz + пропин. При коинкубации клеток с С115Н МГЛ-Dz в концентрациях 0,1 или 0,4 μM + пропин 1 мг/мл, клетки более активно переходили в фазу G_2/M (24,7% и 29,9%, соответственно) по сравнению с контрольной группой (19,7%). Наблюдали уменьшение концентрации клеток в состоянии G_0/G_1 : с 60,8% в контрольной группе до 55,7% и 52,3%, соответственно. Таким образом, эти результаты свидетельствуют о том, что фармакологическая пара С115Н МГЛ-Dz + пропин задерживала клеточный цикл в фазе G_2/M .

Противоопухолевая активность С115Н МГЛ-Dz + пропин. На модели ксенографтов 22Rv1 наиболее эффективной по сравнению с другими опытными группами С115Н МГЛ-Dz + PBS или С115Н МГЛ + пропин оказалась фармакологическая пара С115Н МГЛ-Dz + пропин: ТРО= 70%; $p = 0,043$, при среднем объеме опухолей $138,5 \pm 73,3 \text{ мм}^3$ ($V_{\text{ср}} = 460,2 \pm 74 \text{ мм}^3$ в контроле). Немодифицированная МГЛ С115Н + пропин продемонстрировали более низкий эффект: ТРО=5%; $p > 0,05$. Фермент, модифицированный дайдзеином + буферный раствор (PBS): ТРО = 23,5 %; $p = 0,165$. Эти результаты показывают, что применение фармакологической пары С115Н МГЛ-Dz + пропин позволяет вырабатывать противоопухолевые тиосульфидаты непосредственно у поверхности раковой клетки.

Выводы. Показано, что дипропилтиосульфидат, образованный фармакологической парой С115Н МГЛ-Dz + пропин *in situ*, подавляет рост опухолевых клеток рака предстательной железы 22Rv1 *in vitro* и *in vivo*. Полученные результаты послужат основой для дальнейших исследований использования фармакологических пар как нового подхода для лечения рака.

Литература.

- [1] H. Tanaka, N. Esaki, and K. Soda, "A versatile bacterial enzyme: l-methionine γ -lyase," *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 7, no. 11, pp. 530–537, Nov. 1985, doi: 10.1016/0141-0229(85)90094-8.
- [2] V. V. Kulikova *et al.*, "Gene cloning, characterization, and cytotoxic activity of methionine γ -lyase from *Clostridium novyi*: Expression and Characterization of MGL from *C. novyi*," *IUBMB Life*, vol. 69, no. 9, pp. 668–676, Sep. 2017, doi: 10.1002/iub.1649.
- [3] E. A. Morozova, V. V. Kulikova, A. N. Rodionov, S. V. Revtovich, N. V. Anufrieva, and T. V. Demidkina, "Engineered *Citrobacter freundii* methionine γ -lyase effectively produces antimicrobial thiosulfonates," *Biochimie*, vol. 128–129, pp. 92–98, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.biochi.2016.07.007.
- [4] F. H. Sarkar and Y. Li, "Soy Isoflavones and Cancer Prevention: CLINICAL SCIENCE REVIEW," *Cancer Invest.*, vol. 21, no. 5, pp. 744–757, Jan. 2003, doi: 10.1081/CNV-120023773.



**Яковлева М.А.¹, Курносое А.С.¹, Горшенев В.Н.¹,
Донцов А.Е.¹, Ольхов А.А.^{1,2}**

¹ - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, lina.invers@gmail.com

² - Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова, Москва

Биополимеры в настоящее время являются основой для создания новых перспективных лекарственных форм и различных технологий в современной медицине [1]. В настоящее время биополимеры используются по двум основным медицинским применениям: для тканевой инженерии и целенаправленной доставки лекарств [2-7]. Полимерные матрицы с лекарственной формой могут состоять из смеси синтетических и природных биоразлагаемых полимеров с гидрофобными и гидрофильными свойствами. Комбинацией таких смесей можно изменять соотношение гидрофильных и гидрофобных участков в композициях, регулировать прочностные и биоразлагаемые свойства композитов. В работах [8-9] рассматриваются эффекты дозированного воздействия биологически активных веществ на протекание процессов в биологических объектах на различных уровнях организации живых систем. Создание биокомпозитов на основе биоразлагаемых полимеров с антиоксидантами позволяет осуществлять их дозированное пролонгированное выделение при деструкции полимерной матрицы. Применению в медицине антиоксидантов, выделяемых из лекарственных растений, а также других природных соединений для лечения различных заболеваний, посвящены многочисленные международные конференции [10-11], число которых в последнее время увеличивается в связи с активным применением природных антиоксидантов. Известно, что антиоксиданты нейтрализуют свободные радикалы и, тем самым, ослабляют их негативное действие на сосуды организма, препятствуют развитию рака, старению организма. В работе [12] отмечено, что в последнее время большое значение в качестве противоядий приобретают антиоксиданты, которые тормозят окислительные превращения соединений в токсичные вещества, избирательно влияющие на биоструктуры. Из большого многообразия веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, в данном исследовании выбраны природные антиоксиданты меланины.

Природные и синтетические меланины являются ловушками свободных радикалов и ингибиторами окислительных процессов. В экспериментах на животных показано, что меланины предотвращают образование язв, вызванное стрессом, снижают число кровоизлияний в слизистую желудка [13]. Меланины применяют как антимуtagenные средства для профилактики генетических и онтогенетических последствий радиоактивного облучения. [14]. Кроме того, в последнее время меланины стали использовать в качестве противораковых средств. Так, например, по данным Онкологического центра имени Андерсона (Хьюстон, США) меланин, выделенный из антарктических дрожжей, проявляет высокую цитотоксичность в отношении опухолевых клеток человека, таких как клетки рака молочной железы, рака толстого кишечника, рака легкого, меланомы, лейкемии [15]. Цель данной работы состояла в разработке методов изготовления полимерных композиций на основе полигидроксibuтирата с меланинами, обладающими антиоксидантной активностью.

Экспериментальная часть

Изготовление композитов на основе биоразлагаемого полимера поли-3-гидроксibuтирата (ПГБ) ("Biomer"®) и природных антиоксидантов проводили смешением 6-7% раствора полимера в хлороформе с растворами природных антиоксидантов. В качестве второго полимерного компонента применяли 3% водный раствор альгината натрия. Основную часть работы выполняли с применением природного антиоксиданта - меланина, а для смешения растворов полимеров также применяли другие природные антиоксиданты, выделяемые из различных источников: оммохромы глаза беспозвоночных животных [16] и ДКВ-дигидроокверцитин из листовенницы [17]. В качестве природного антиоксиданта меланина использовали меланин из антарктических дрожжей (астромеланин), который был получен из ООО «Артос».

При смешении растворителя- хлороформа с водой в условиях ультразвукового диспергирования образуется эмульсия белого цвета, которая с течением времени расслаивается на две отдельные прозрачные жидкости. Для повышения устойчивости смешанных жидкостей к расслаиванию в их состав был добавлен глицерин. Измерения распределений частиц хлороформа в

воде в течение 30 минут после УЗ-диспергирования компонентов показали, что время устойчивости смешанных жидкостей достаточно для проведения термостимулированного нагрева в СВЧ-печи.

Ультразвуковым диспергированием было проведено смешение растворов полимера (ПГБ) в хлороформе и меланина в воде. Достаточное время устойчивости смешанных компонентов различной природы в ультразвуковом поле (УЗ-поле) позволило СВЧ-нагревом получить композиты в твёрдой фазе. При нагревании суспензии, состоящей из частиц полимера в хлороформе и водного раствора меланина в зависимости от концентрации полимера, вязкости среды, времени ультразвукового диспергирования и времени СВЧ-нагрева происходит образование пористого образца композита (рис. 1). Образцы на основе ПГБ и меланина были приготовлены по первой экспериментальной схеме высушиванием смешанных коллоидных растворов в соотношении (13:1 и 5:1) в условиях УЗ-диспергирования и СВЧ-нагрева. Слой раствора меланина перед диспергированием располагался на поверхности раствора полимера.

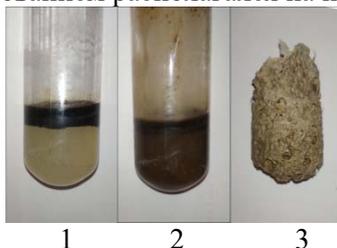


Рис. 1. Стадии смешения раствора ПГБ с меланином. 1 - Наслоение водного раствора меланина на раствор ПГБ в хлороформе, 2 Ультразвуковое (УЗ) диспергирование растворов, 3 - образование пористого композита в результате СВЧ-нагрева.

После УЗ-диспергирования смеси полимера и меланина образцы высушивали в течение 3-х минут с интервалом по 1 минуте с образованием пористого образца композита из ПГБ и меланина.

Антирадикальную активность определяли с помощью гомогенной гидрофильной хемиллюминесцентной системы, состоящей из гемоглобина, пероксида водорода и люминола [18]. В качестве измеряемых параметров были взяты латентный период достижения максимальной интенсивности свечения и амплитуда свечения без и в присутствии ингибитора. Кинетику хемиллюминесценции регистрировали на спектрофлуориметре «Shimadzu» RF 5301PC (Япония) при длине волны люминесценции 470 нм при комнатной температуре. В качестве контроля использовали буферный раствор без добавления биоактивных компонентов.

По первой схеме после ультразвукового диспергирования (УЗДН-А) в течение течение 1-2 минут смесь подвергалась микроволновому нагреву в СВЧ-печи (частота 2,45 ГГц, мощность 800 Вт, SHARP) в течение 1-3 минут. В результате постепенного высушивания изготовлены пористые образцы биокомпозитов. По второй схеме смешение раствора полимера осуществляли в цилиндрическом реакторе, в который помещали излучатель ультразвуковых колебаний (УЗДН-А). После 1-3 минут диспергирования смеси в реактор вводился слой воды. Над нижним слоем смеси полимеров с растворами антиоксидантов размещался слой воды высотой 3-5см. Подготовленный таким способом реактор помещался в СВЧ-печь на 30-60 секунд. В результате нагрева при взаимодействии с СВЧ-излучением на поверхности воды формировался пористый композит. По второй экспериментальной схеме над нижним слоем жидкостей помещали слой 3% раствора альгината натрия или раствор другого полимера. В результате термостимулированного нагрева, кипения хлороформа происходил выброс смешанных композитов на водную поверхность.

Составы композитов, смешанных по двум технологическим схемам, контролировали термическими методами: ТГА и ДСК. Термогравиметрический анализ (ТГА) образцов проводили на термомикровесах TG 209 F1 Iris фирмы «Netzsch» (Германия). Навески образцов составляли 5-8 мг, анализ проводился при скорости нагревания 20 град/мин. Методом дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК) определяли тепловые эффекты образующиеся при нагревании антиоксидантов и тепловые эффекты смешанных композиций (на сканирующем калориметре «Netzsch», Германия, модель DSC-204 F1) при скорости нагревания 10 град/мин в диапазоне 30-250°C в токе инертного газа - аргона. Выход меланина из полученных пористых композиций оценивали методом УФ-спектрометрии. Спектр поглощения надосадочной жидкости прописывали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700 в кювете на 3мл с длиной оптического пути 1см. В качестве раствора сравнения использовали фосфатный буфер pH=7,4 с добавлением азиды натрия (NaN_3 ; 0,2g/100ml). Содержание меланина оценивали по интенсивности поглощения на длине волны 450 нм.

Результаты и их обсуждение

Анализ смеси ПГБ/меланин, полученной в результате УЗ смешения компонентов и СВЧ-нагрева, методом ЭПР (спектры регистрировали на спектрометре “Bruker EMX-8/2” в X-диапазоне длин волн), показал, что спектр биокомпозита имеет меньшую интенсивность сигнала по сравнению со спектром для кристаллов меланина (Рис.2).

Исходный сигнал ЭПР для кристалла меланина показывает присутствие в образце свободных радикалов (рис. 2Б). В ПГБ-композитах, содержащих меланин, сигналы ЭПР малы и незначительно превышают уровни шумов, что связано с низкими концентрациями меланина в полимерной матрице (рис. 2А).

Спектральным методом (рис. 3) зарегистрирован выход меланина в буферный раствор из смешанной биокомпозиции меланина с ПГБ, что подтверждает сохранность формы меланина в композиции. На рис. 3А представлены данные по выходу меланина в буферный раствор из образца биокомпозита. Показано, что происходит постепенный выход меланина из образца в раствор.

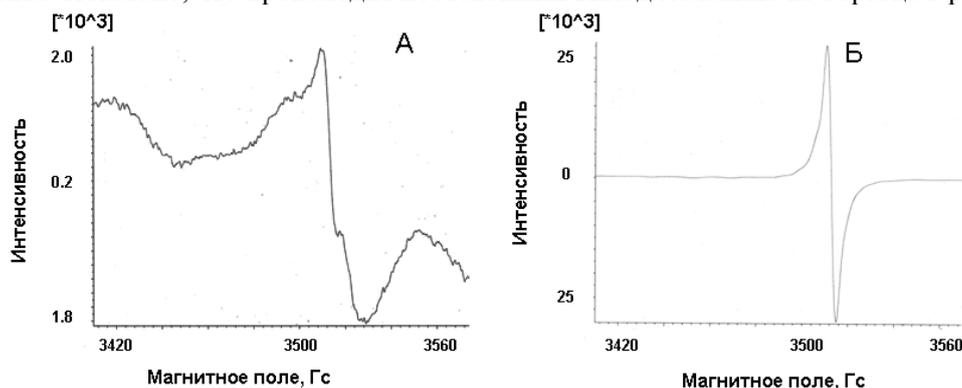


Рис. 2. Спектры ЭПР меланина. А - в составе биокомпозита, Б - кристаллы меланина.

На рис. 3Б представлены данные по антиоксидантной активности меланина после выхода из биокомпозитного образца ПГБ-меланина. Из данных на рисунке 3Б видно, что меланин тушит люминесценцию люминола приблизительно в 3 раза, что говорит о проявлении его антиоксидантных свойств при выходе из биокомпозита. Поэтому этот результат подтверждает, что антиоксидантная активность меланина в биокомпозите сохраняется. Смешение термодинамически не смешиваемых жидкостей с применением техники ультразвукового диспергирования и микроволнового нагрева можно проводить в различных условиях. В отличие от первой схемы смешения (рис. 1) смешение жидкостей по второй и третьей схемам расширяют по свойствам спектр жидких сред. Для примера было проведено смешение раствора полимера - ПГБ в хлороформе с водным раствором альгината натрия.

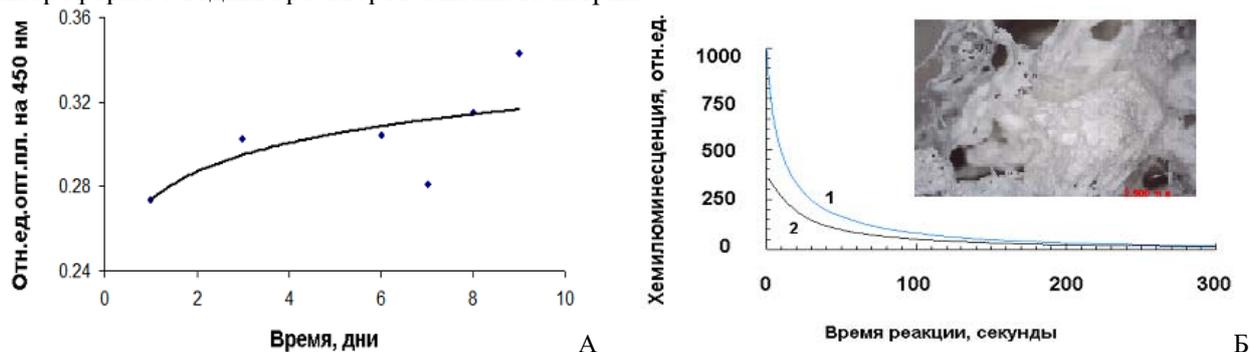


Рис. 3. А - Зависимость выхода меланина в буферном растворе в зависимости от количества дней инкубации пленки при температуре 37°C. Образец биокомпозита, полученный смешением эмульгированием, Б - Тушение хемилюминесценции люминола меланином, высвободившимся из биоразлагаемого материала. 1- контроль, 2 - образец с добавлением меланина. На вставке: Образец из волокон ПГБ после диспергирования 7% раствора ПГБ в хлороформе в воде при соотношении (1;13, по массе).

При такой постановке эксперимента водорастворимые антиоксиданты можно смешивать с альгинатом натрия и затем получать композит с биоразлагаемыми полимерами в хлороформе. В отличие от первой технологической схемы смешения (рис. 1), по второй схеме смешения термостимулированный нагрев жидких компонентов осуществлялся через слой жидкости. При этом компонент с меньшей температурой кипения диспергировали в жидкости с большей температурой кипения (или в жидкости с меньшей величиной дипольного момента). По третьей

экспериментальной схеме смешение проводили путём построения конструкции, в которой нижний слой получали в условиях УЗ-диспергирования смешиваемых компонентов (по схеме-1), а на нижний слой наслаивался верхний слой с большей температурой кипения и меньшей плотностью.

Верхний слой жидкости может включать другие компоненты, которые могут участвовать в процессе смешения. В результате нагрева такой конструкции по третьей схеме происходил выброс смешанного композита на водную поверхность верхнего слоя.

Новым подходом приготовления биокомпозитов с антиоксидантами и лекарственными формами является возможность смешения двух биоразлагаемых полимеров, например, ПГБ и альгината натрия. Введение в состав 3% альгината натрия меланина (в соотношении 1:1) и диспергирование в УЗ - поле раствора ПГБ в хлороформе привело к значительному уменьшению времени кипения композиции и выбросу смешанного композита из реактора по второй схеме смешения компонентов.

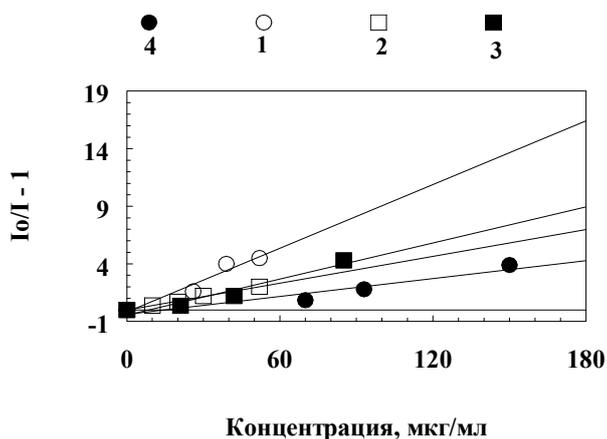


Рис. 4. Ингибирующее действие астромеланина (AM) на хемилюминесценцию люминола, индуцированную пероксидом водорода. Кривые 1–3 – тушение хемилюминесценции астромеланином, вышедшим в раствор после биодегradации: 1- композита с ПЛА (0.77 мг/мл); 2 - композита с ПКЛ (0.3 мг/мл); 3 – композита с ПГБ (1.27 мг/мл); 4 – исходный, не иммобилизованный астромеланин (14 мг/мл).

На основе других полимерных компонентов: полилактид (ПЛА), поликпролактон (ПКЛ), были созданы композиции с меланином. Образцы биокомпозитов с меланином были изготовлены по первой технологической схеме. В работе проведён эксперимент по сравнению активности меланина, поступающего в буферный раствор из биокомпозитов на основе ПГБ, полилактида (ПЛА) и поликапролактона (ПКЛ). Из данных представленных на рис. 4 видно, что после встраивания в биокомпозитные конструкции с различными полимерами и последующего выхода из них при моделировании биодегradации этих композитов в фосфатном буфере при 37°C, астромеланин практически не теряет своей способности ингибировать процесс свободно радикального окисления люминола.

Выводы

Создание биокомпозитов с антиоксидантами и лекарственными формами является перспективным направлением в биологическом материаловедении. Биокомпозиты различных видов и форм: гранулы, волокна, нетканые волокнистые материалы используются для изготовления медицинских изделий. При этом биокомпозиты могут обеспечивать дозированную доставку лекарственных форм в область заболеваний. При обеспечении регулируемой доставки лекарств за счёт диффузии веществ или под действием электрического поля повышается эффективность действия лекарственных форм. Смешением синтетических и природных полимеров с гидрофильными и гидрофобными свойствами можно регулировать прочностные и биоразлагаемые свойства композитов.

Список литературы.

1. Под редакцией К.Е. Гонсалвес, К.Р. Хальберштадт, К.Т. Лоренсин, Наноструктуры в биомедицине. Наир, Москва, БИНОМ, Лаборатория знаний, 2015. 519 с.
2. Lakshmi S., Nair Cato T., Laurencin. Polymers as Biomaterials for Tissue Engineering and Controlled Drug Delivery. Adv Biochem Engin/Biotechnol. 2006. V. 102. P. 47–90. DOI 10.1007/b137240
3. Theresa A. Holland, Antonios G. Mikos, Review: Biodegradable Polymeric Scaffolds. Improvements in Bone Tissue Engineering through Controlled Drug Delivery. Adv Biochem Engin/Biotechnol. 2006. V. 102. P. 161–185. DOI 10.1007/b137205

4. М.И. Штильман. Полимеры медико-биологического назначения. -М: ИКЦ «Академкнига».2006. -400 с.
5. В.Н. Горшенев, А.А. Ольхов, М.А. Яковлева, А.Т. Телешев, В.С. Акатов. Биодegradуемый материал с включением цитостатика для замещения дефектов костной ткани. Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФХ-2017: материалы XII международной научно-технической конференции, г. Севастополь, 2-6 октября 2017 г. – Севастополь: Севастопольский государственный университет. 2017. С. 402-404.
6. В.Н. Горшенев. Смешение растворов биодegradуемых полимеров в условиях ультразвукового диспергирования и микроволнового СВЧ-нагрева, Химическая Физика, 2019. Т. 38 (2). С. 71-75.
7. В.Н. Горшенев. Способы формирования пористых кальций-фосфатных полимерных композитов. Химическая Физика. 2019. Т. 38 (1). С. 1-8.
8. Е.Б. Бурлакова Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности. Российский Химический Журнал. 1999, Т. XLIII (5). С.3-11.
9. Л.А. Блюменфельд. Понятие конструкции в биологической физике. К вопросу о механизме действия сверхмалых доз.. Российский Химический Журнал. 1999. Т. XLIII (5). С.15-20.
10. "Окисление, окислительный стресс, антиоксиданты" Международная конференция молодых ученых и VIII школа им. академика Н.М. Эмануэля Москва , 28-30 октября 2019 г.
11. IV Всероссийская научная конференция с международным участием «Свободные радикалы, антиоксиданты и старение»Астрахань, Россия, 11 Ноября - 12 Ноября 2021 г
12. Г.И. Оксенгендлер. Яды и противоядие. Л. Наука. 1982. С.192.
13. M. Falalyeyeva, O.I. Tsyryuk, N.V. Chyizhanska, V.P. Zharova. The influence of melanin isolated from antarctic yeasts on cortisol blood level of rats in conditions of stress action. Ukrainian Antarctic Journal .2009. V. 8. P. 391-394.
14. I B Mossé , L N Kostrova, B V Dubovik, S I Plotnokova, V P Molofei. Effect of melanin on mutagenic activity of chronic irradiation and adaptive response in mice. Radiats Biol Radioecol. 1999. V. 39(2-3). P. 329-33.
15. Phyu P Aung, Kudakwashe K Mutyambizi, Richard Danialan, Doina Ivan, Victor G Prieto. Differential diagnosis of heavily pigmented melanocytic lesions: challenges and diagnostic approach. J Clin Pathol. 2015. V. 68(12). P. 963-970.
16. N. Ushakova, A. Dontsov, N. Sakina, A. Bastrakov, M. Ostrovsky. Antioxidative Properties of Melanins and Ommochromes from Black Soldier Fly *Hermetia illucens*. Biomolecules, 2019.V. 9 (9). P. 408-408.
17. М.П. Коротеев , А.О. Поздеев , А.М. Коротеев , Г.З. Казиев , А.Т. Телешев , Е.Н. Офицеров. Химическая модификация дигидрохверцетина (таксифолина) и биологическая активность его производных// Бутлеровские сообщения. 2014. Т.39 (10). С. 94-120.
18. M. Porebska-Budny, N.L. Sakina, K. B. Stepien, A.E. Dontsov, T. Wilczok. Antioxidative activity of synthetic melanins. Cardiolipin liposome model. Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1116. P. 11-16. Doi: 10.1016/0304-4165(92)90121-a

Исследование взаимодействия тиосульфатного нитрозильного комплекса железа с цитохромом С



Кусянкулова А.Б.^{1,2}, Покидова О.В.², Санина Н.А.^{1,2,3}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва

²Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, г. Черноголовка

³Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского государственного областного университета, г. Мытищи

Железо-серные нитрозильные комплексы являются относительно стабильной формой существования NO в организме [1]. Их синтетические аналоги, динитрозильные комплексы (ДНКЖ), имеют ряд преимуществ перед другими классами экзогенных доноров NO: они действуют при низких концентрациях, самопроизвольно генерируют NO и имеют два фармакоактивных фрагмента в структуре. В данной работе мы исследовали комплекс $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [2]. Это биядерный комплекс, в состав которого входит 4 NO группы и

два тиосульфатных лиганда. Известно, что этот комплекс проявляет антиметастатическую активность по отношению к меланоме B16 и LL-карциноме (обе опухоли образуют метастазы в легких) [3]. Показано также, что он ингибирует транспортную активность Ca^{2+} -АТФазы, нарушая таким образом внутри- и внеклеточный баланс Ca^{2+} и препятствуя агрегации тромбоцитов и их адгезии к эндотелию сосудов [4]. Важным этапом исследований для дальнейшего использования этого класса соединений является изучение механизмов разложения и трансформации в модельных биологических системах. В качестве объекта исследований был выбран цитохром С. В первую очередь он известен своей функцией в митохондриях в качестве ключевого участника процесса жизнеобеспечения клетки - синтеза АТФ [5]. Другая важная функция Cyt C заключается в его участии в апоптозе [6,7].

Целью данной работы является изучение взаимодействия тиосульфатного нитрозильного комплекса железа с цитохромом С.

В ходе работы было изучено разложение ТНКЖ в водном буферном растворе (при рН 3.0 и 7.0) и в присутствии цитохрома С методами УФ-видимой спектроскопии и реакции Грисса. В системе с ферроцитохромом С в спектре поглощения появляются два максимума при 541 и 565 нм, характерные для нитрозилированного ферроцитохрома С. В системе с феррицитохромом С в спектре поглощения появляются два максимума на 527 и 560 нм, характерные для нитрозилированного феррицитохрома С. В присутствии ферроцитохрома количество образующихся нитрит-ионов в 10 раз меньше, а в присутствии феррицитохрома – в два, чем в их отсутствии, что объясняется нитрозилированием белков.

Работа выполнена по теме Государственного задания, № гос. регистрации № АААА-А19-119071890015-6.

Ссылки

- [1] Vanin, A.F. *FEBS Letters* **1991**, 289, 1–3.
- [2] Sanina N.A., Aldoshin S.M., Rudneva T.N., Golovina N.I., Shilov G.V., Shul'ga Yu.M., Martynenko V.M., Ovanesyan N.S. *Russ. J. Coord. Chem.* **2005**, 31, 323-328.
- [3] Н. А. Санина, Т. Н. Руднева, И. В. Сулименков, Н. П. Коновалова, Т. Е. Сашенкова, С. М. Алдошин. *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева)* **2009**, LIII, No 1, 164-171.
- [4] Л.В. Татьяненко, А.И. Котельников, О.В. Доброхотова. Е.А. Саратовских, Н.А. Санина, Т.Н.Руднева, С.М. Алдошин. *Химико-фармацевтический журнал* **2009**, 43, №9, 45-49.
- [5] Ow Y.-L.P., Green D.R., Hao Z., Mak T.W. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, 9, No 7, 532–542.
- [6] Kagan V.E., Bayır H.A., Belikova N.A., Kapralov O., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A., Jiang J., Stoyanovsky D.A., Wipf P., Kochanek P.M., Greenberger J.S., Pitt B., Shvedova A.A., Borisenko G. *Free Radical Biology and Medicine* **2009**, 46, No 11, 1439–1453.
- [7] Проскурнина Е.В. Свободные радикалы как участники регуляторных и патологических процессов / под ред. В.Ю.А. Григорьев А. И. Москва: Макс Пресс, **2015**, 38–71.

Влияние гемоглобина на NO-донорную активность нитрозильного комплекса железа с тиосульфатными лигандами



Марьина А.В.^{1,2}, Покидова О.В.², Санина Н.А.^{1,2,3}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва

²Федеральный исследовательский центр проблем химической физики
и медицинской химии РАН,
г. Черноголовка

³Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского
государственного областного университета, г. Мытищи

Долгое время монооксид азота (NO) считался токсичным и опасным газом пока в середине прошлого столетия не была доказана его роль в качестве сигнальной молекулы в биорегуляции сердечно-сосудистой системы. Данное открытие способствовало развитию направления по синтезу и исследованию свойств класса экзогенных доноров NO. В современной медицине используются различные препараты, которые в процессе биотрансформации, либо же напрямую в результате диссоциации, приводят к образованию свободного NO в организме.

Объектом наших исследований является биядерный анионный тетранитрозильный тиосульфатный комплекс $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (ТНКЖ), синтезированный в лаборатории

структурной химии ИПХФ РАН [2]. В работе [1] была исследована и показана антиметастатическая активность ТНКЖ к клеткам меланомы В16 и LL-карциноме, а также является ингибитором Ca^{2+} -АТФазы.

Нитрозильные комплексы железа и продукты их распада могут взаимодействовать в условиях *in vivo* с гемсодержащими белками. В настоящей работе было рассмотрено взаимодействие исследуемого комплекса с двумя формами гемоглобина – дезоксигемоглобином (Hb) и оксигемоглобином (HbO_2). Данные белки удобно использовать для анализа NO-донорной активности ТНКЖ: константа равновесия реакции NO с Hb ($\text{Hb} + \text{NO} \leftrightarrow \text{HbNO}$) $K = 3 \cdot 10^{10} \text{ M}^{-1}$ [3], константа скорости взаимодействия HbO_2 с NO ($\text{HbO}_2 + \text{NO} \rightarrow \text{metHb} + \text{NO}_3^-$) $k = 3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [4]. С помощью метода УФ-Вид спектrophотометрии были получены спектры поглощения и проведен анализ кинетических кривых накопления продуктов в присутствии обоих белков. Исследована NO-донорная активность ТНКЖ. Установлено, что в присутствии белков комплекс стабилизируется, и процесс донирования NO становится более пролонгированным. Для системы ТНКЖ с HbO_2 с помощью реакции Савилла рассчитана концентрация образовавшихся S-нитрозотиолов, являющихся одной из форм депонирования NO в клетках.

Исследование выполнено по теме Государственного задания, № гос. регистрации № АААА-А19-119071890015-6.

1. Н.А. Санина. Противоопухолевая активность нитрозильных комплексов железа – новых доноров оксида азота // Российский химический журнал. 2009. Т. LIII. № 1. С. 164-171.
2. N.A. Sanina, S.M. Aldoshin, T.N. Rudneva. Synthesis, structure and solid-phase transformations of Fe nitrosyl complex $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Russ. J. Coord. Chem. 2005. Vol. 31. P. 301-306.
3. E. Antonini. Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands, Amsterdam and London: North-Holland Publishing Company. 1971. Vol. 21. P. 276.
4. M.P. Doyle. Oxidation of oxymyoglobin by nitric oxide through dissociation from cobalt nitrosyls, Journal of Inorganic Biochemistry. 1983. Vol. 19. № 4. P. 329–338.

Биодеградируемые полисахариды медицинского назначения не только основа для терапевтических агентов, но и пролекарства



О.В.Матиев, А.А. Ванюшенкова, А.А. Белов

*Российский химико-технологический университет
имени Д.И. Менделеева, кафедра биотехнологии,
г. Москва*

E-mail: olegmatieff@yandex.ru

В настоящее время все более актуальной становится задача по разработке и исследованию ранозаживляющих перевязочных средств, для лечения гнойно-некротических ран в амбулаторных условиях. Данные перевязочные средства должны обладать комплексным действием на раневую поверхность, способствовать эффективному ранозаживлению, выдерживать стерилизацию и длительное хранение в условиях склада (не менее 3-х лет) [1,2].

Уменьшение вводимых концентраций действующих веществ в раневую поверхность путем создания перевязочных средств на основе полисахаридов, которые могут выступать в роле пролекарств, позволяет как сократить медикаментозную нагрузку на пациента, так и создавать более стабильные и экономически доступные лекарственные препараты без потери эффективности [3].

Перспективные результаты в данном направлении получены при изучении энзиматического метода удаления некротической ткани при лечении гнойно-некротических ран. Сущность метода заключается в способности ряда протеолитических ферментов, выступающих в роли терапевтических агентов (ТА), гидролизовать нежизнеспособные ткани, не воздействуя при этом на новообразовавшихся. Данный метод позволяет не прибегать к хирургическому методу удаления некротизированных тканей, а также упрощать создание лекарственного препарата из-за образования дополнительных количеств лечебного средства, при взаимодействии ТА как с носителем, так и со спейсером [4,5].

В качестве носителя иммобилизованного терапевтического комплекса отлично себя зарекомендовал продукт периодатного окисления целлюлозы - диальдегидцеллюлоза (ДАЦ). Не

токсичность продуктов взаимодействия носителя и ТА, биodeградируемость и способность к модификациям делает данный носитель одним из самых перспективных для изучения при создании высокоэффективного лекарственного препарата (ЛП). Также, из предыдущих исследований, нами были установлены антиоксидантные свойства продуктов гидролитической деструкции ДАЦ [6,7].

В роле спейсера для стабилизации ТА и придания дополнительных фармакологических свойств ЛП, нами исследовались такие полисахариды, как хитозан и альгинат натрия.

Хитозан (Хт), аминополисахарид, получаемый путем деацетилирования хитина. Наличие свободных аминогрупп, способных к протонированию в физиологических значениях рН, обуславливает полиэлектролитные свойства Хт, а также открывает возможности для модификаций [8]. Кроме того, в литературе отображены биологические активности олигохитов, находящие свое приложение при ранозаживлении, а именно противовоспалительные, иммуностимулирующие, антиоксидантные, регенеративные и бактерицидные по отношению к патогенным микроорганизмам [9,10,11].

Альгиновая кислота, кислотный полисахарид, представляет собой линейный сополимер D-маннуроната (М) и L-гулурунрата (G) и состоит из гомополимерных блоков. Одним из свойств альгината натрия является способность образовывать гель. Соотношение D-маннуроната к L-гулурунрату (M/G отношение) в молекуле альгината натрия влияет на свойства образующихся гелей [12]. Известен широкий спектр биологических активностей альгината натрия [13].

В качестве ТА нами исследовался мультиферментный препарат цистеиновой группы – папаин (Пап), получаемый из латекса дынного дерева. Преимуществом энзимов цистеиновой группы является относительная легкость их стабилизации, путем модификации с использованием цистеина [14,15]. Одним из важнейших факторов при выборе фермента в качестве ТА при ранозаживлении, является отсутствие действия на новообразовавшиеся ткани и экономическая доступность. По литературным и ранее полученным данным видно, что папаин отвечает данным требованиям [4].

Результаты и их обсуждения

Ранее нами был установлен активирующий и стабилизирующий эффекты хитозана на Пап, также были установлены возможные типы взаимодействия между Пап и Хт [4,15].

В литературе показана возможность деполимеризации Хт гидролазами [16]. В ходе деструкции макромолекул хитозана, становятся доступны активные группы, которые могут влиять как на активность самого фермента, так и на общие биологические свойства системы в целом.

Методом вискозиметрии (25°C) нами исследовалось влияние папаина на хитозан (рис.1); из полученных данных видно, что при ферментативном гидролизе высокомолекулярного хитозана образуется смесь олигохитов. При добавлении цистеина динамика изменение вязкости не меняется. В свою очередь, вязкость продуктов деструкции полученных путем автоклавирования отличается от продуктов ферментализации на 10-15%.

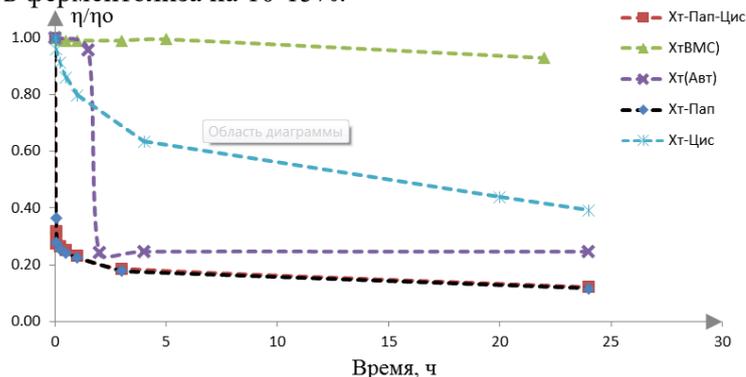


Рис. 1. Изменение вязкости (η/η_0) высокомолекулярного хитозана (Хт-ВМС), хитозана в присутствии папаина (Хт-Пап), хитозана в присутствии цистеина и папаина (Хт-Пап-Цис), хитозана в присутствии цистеина (Хт-Цис), хитозана подвергнутого автоклавированию (Хт-Авт), где η_0 – вязкость в начальный момент времени.

Как было отмечено многими авторами, антимикробные свойства высокомолекулярного хитозана выражены слабее, чем у олигохитов [17]. Данное явление может быть связано с тем, что хитозан не способен проникать через клеточную стенку бактерий и оказывать свое антимикробное действие. Так же антимикробные свойства хитозана определяются степенью деацелирования, которая влияет на плотность положительного заряда, и как следствие, на возможность взаимодействия с отрицательно заряженными компонентами на бактериальной клеточной стенке.

В отношении грамположительных бактерий олигохиты взаимодействуют с отрицательно заряженными протеогликанами на бактериальной клеточной стенке, что приводит к её искажению и гибели клетки от осмотического шока. Также, в мире, ведутся исследования по изучению внутриклеточных механизмов антимикробной активности олигохитов [17].

Для определения ингибирующей активности на рост культуры *St. Aureus* в концентрации 10^7 (к/мл), которая соответствует модели развивающейся гнойной раны, был использован микропланшетный метод [18] (рис 2,3). По результатам исследования видно, что наибольшей ингибирующей активностью обладают продукты деструкции Хт полученные ферментативным методом.

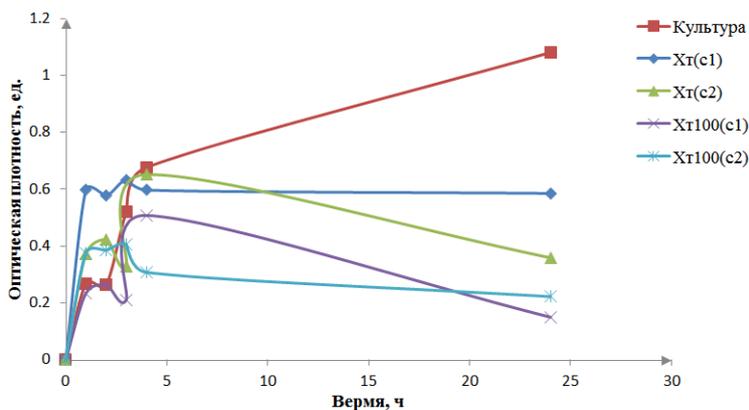


Рис. 2. Кривые роста и ингибирования культуры *St.Aureus* при взаимодействии с исследуемыми веществами, где Хт(с1) – р-р хитозана с концентрацией 0.125%, Хт(с2) – р-р хитозана с концентрацией 0.25%, Хт100(с1) – р-р хитозана термообработанный при 100°С в течение 15мин с концентрацией 0.125%, Хт100(с2) – р-р хитозана термообработанный при 100°С в течение 15мин с концентрацией 0.25%.

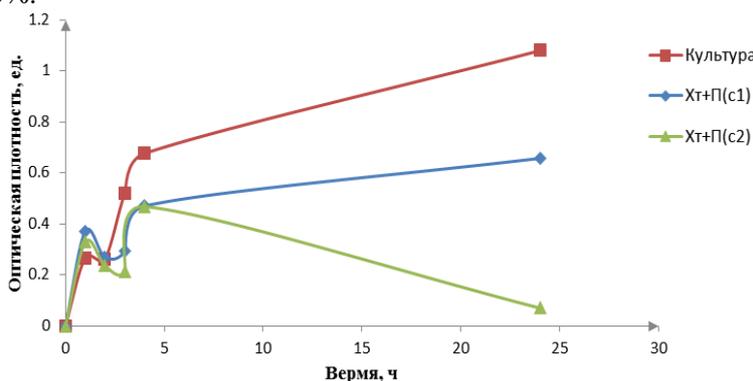


Рис. 3. Кривые роста и ингибирования культуры *St.Aureus* при взаимодействии с исследуемыми веществами., где Хт(с1) – р-р хитозана обработанный папаином при 37°С в течение 24 часов с концентрацией 0.125%, Хт(с2) – р-р хитозана обработанный папаином при 37 °С в течение 24 часов с концентрацией 0.25%.

Также нами исследовались антимикробные свойства 2% Альгината натрия микропланшетным методом на культуру *St. Aureus* аналогично вышеописанному. Заметная антимикробная активность выявлена не была.

Нами были измерены и изучены антиоксидантные свойства, как составных частей, так и терапевтического комплекса, получаемого путем иммобилизации Пап в хитозановом геле в комплексе с цистеином. Было отмечено наличие антиоксидантных свойств полученной системы.

Выводы

При создании ранозаживляющих перевязочного средства, используемые нами полисахариды проявляют свойства пролекарств. По результатам исследования можно сказать, что при взаимодействии высокомолекулярного хитозана с папаином происходит неспецифичный гидролиз 1,4-β-гликозидных связей с образованием олигохитов. Полученные продукты гидролиза хитозана оказывают ингибирующий эффект на культуру *St. aureus* в концентрации 10^7 (к/мл). Наблюдается зависимость между молекулярной массой смеси олигохитов и ингибирующим эффектом на культуру *Staphylococcus aureus*.

Список литературы

- [1] Cutting, K. F. Wound dressings: 21st century performance requirements. // *Journal of Wound Care* – 2010 – P. 4–9.
- [2] Белов А.А. Разработка промышленных технологий получения новых медицинских материалов на основе модифицированных волокнообразующих полимеров, содержащих биологически активные белковые вещества. Дисс. на соис. уч. степ. докт. техн. наук М., РХТУ. 2009. 385с.
- [3] Wang, F., Finnin, J., Tait, C., Quirk, S., Chekhtman, I., Donohue, A. C., Pranker, R. The Hydrolysis of Diclofenac Esters: Synthetic Prodrug Building Blocks for Biodegradable Drug–Polymer Conjugates. // *Journal of Pharmaceutical Sciences* - 2016 – Vol. 105 – Is. 2 - P. 773–785.
- [4] Использование папаина в качестве биодеструктора биополимеров применяемых в биомедицинских материалах. / Матиев О.В., Ванюшенкова А.А., Белов А.А. // Медицина и фармация: прошлое, настоящее, будущее: Сборник научных материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Орехово-Зуево: ГГТУ - 2022. – 89-92 с.
- [5] Иммобилизация папаина на хитозан / Матиев О. В., Белов А. А. // Успехи в химии и химической технологии – 2021 - №12. - Т.247 – С. 117-119.
- [6] Деструкция полисахаридных носителей под действием среды. Антиоксидантная активность продуктов деструкции целлюлозы / Савельева Е. Е., Досадина Э. Э., Белов А.А. // Успехи в химии и химической технологии - 2017. - №9. - Т.190. – С.14-16.
- [7] Антиоксидантная активность целлюлозных перевязочных материалов в модельной среде /Савельева Е. Е., Досадина Э. Э., Белов А.А. // Успехи в химии и химической технологии. – 2016 - №9. – Т. 178. – С.16-18.
- [8] Хитин и хитозан: строение, свойства, применение / Аллам Айман Юнес Фатхи, Долганова Н. В. // Вестник Науки и Творчества. – 2016. - №10 – Т.10. – С. 11-14.
- [9] Aam, B. B., Heggsset, E. B., Norberg, A. L., Sørli, M., Vårum, K. M., Eijsink, V. G. H. Production of Chitooligosaccharides and Their Potential Applications in Medicine. // *Marine Drugs* – 2010. – Vol.8 – Is.5. – P. 1482–1517.
- [10] Toll like receptor 4 (TLR4) mediates the stimulating activities of chitosan oligosaccharide on macrophages. Pei Zhang, Weizhi Liu, Yanfei Peng, Baoqin Han, Yan Yang // *International Immunopharmacology*, Volume 23, Issue 1, November 2014, 254-261.
- [11] Free radical scavenging properties of hetero-chitooligosaccharides using an ESR spectroscopy / Jae-Young Je, Pyo-Jam Park, Se-Kwon Kim. // *Food and Chemical Toxicology* – 2004. -Vol. 42. – P.381–387.
- [12] Kakita H., Kamishima H. Some properties of alginate gels derived from algal sodium alginate // *the Journal of Applied Phycology* – 2009. – Vol. 20. – Is. 5. – P. 93–99.
- [13] Исследования по созданию аппликационной системы для лечения раневых процессов / Петрухина Д.А., Плетнева И.В., Покровская Ю.С. // Здоровье и образование в XXI веке. – 2021. - №2. – С.74-79.
- [14] Cstorer, A., & Ménard, R. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine* // *Peptidases* – 1994. – P. 486–500.
- [15] Влияние хитозана на сохранение ферментативных активностей полиферментных препаратов в процессе получения и эксплуатации. / Матиев О. В. Белов А. А.// Бутлеровские сообщения – 2021. - №6 – Т. 66 – С.76-84.
- [16] Деструкция хитозана ферментным комплексом из *Carica Papaya* / Черкасова Е.И., Алексеева М.Ф., Пастухов М.О., Фролов В.Г., Смирнова Л., Смирнов В.Ф., Александрова И.Ф. // *Биотехнология*. - 2005.- № 2 – С. 73-81.
- [17] Kulikov S. et al. Molecular weight and pH aspects of the efficacy of oligochitosan against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) // *Carbohydrate Polymers*. – 2012. – Vol. 87. – Is. 1. – P. 545-550.
- [18] Изучение биоцидных свойств продуктов гидролитической деструкции целлюлозных материалов для ранозаживления на примере культуры *Staphylococcus aureus* / Ванюшенкова А.А., Зверева В.В., Белов А.А.// Успехи в химии и химической технологии. — Т. 34. — РХТУ им. Д.И.Менделеева Москва, 2020. — С. 24–26.

Сверхтвердые смесевые бориды вольфрама типа WB_{5-x} с примесями переходных металлов

Н.А. Мацокин^{1,2,3*}, А.Г. Квашнин³

¹Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²ООО Кинтех Лаб, Москва, Россия

³Сколковский институт наук и технологий, Москва, Россия

*e-mail: nikita@matsokin.ru

Наиболее развивающимся направлением в области сверхтвердых боридов является изучение боридов вольфрама WB_{5-x}, который был теоретически предсказан и экспериментально синтезирован с подтверждением уникальных механических свойств [1,2].

Наличие научных работ по родственным соединениям карбидов переходных металлов показало наличие эффекта термодинамической стабилизации за счет однородного распределения разных металлов по структуре кристалла [3]. Понимание того, как это скажется на механических свойствах, является также открытым вопросом для высших боридов вольфрама, так как эти соединения остаются не до конца изученными [4]. Следовательно, изучение механических и термодинамических свойств боридов типа WB_{5-x} с примесями различных переходных металлов является актуальным и важным исследованием.

Все расчеты проводились с использованием программы VASP [5] в рамках метода DFT с обменно-корреляционным функционалом Perdew-Burke-Ernzerhof [6]. Для изучения влияния примеси переходного металла на структуру боридов вольфрама была использована структурная модель WB_{4.2} [2]. Из этой модели была построена 1×1×2 суперячейка, в которой часть атомов W была заменена на другой переходный металл. Разупорядоченные по металлу структуры конструировались с использованием специального метода поиска квазислучайных структур [7]. В качестве примеси были рассмотрены 8 переходных металлов: Ti, V, Cr, Zr, Nb, Mo, Hf, Ta. Содержание примеси варьировалось от 10 до 100% с шагом в 10%. Для связывания структуры и её стабильности для каждого состава были рассчитаны энтальпии смешения и изменение параметра решетки по сравнению со структурами чистого боридов переходного металла, как было предложено в работе [3]. Наименьшая энтальпия смешения оказалась для структуры с 30% Ti в структуре, т.е. W_{0.7}Ti_{0.3}W_{4.2}. Для полученной структуры было проведено исследование механических свойств с использованием библиотеки elastool [8] и сравнение с чистым пентаборидом вольфрама.

Таким образом, было показано изменение механических свойств за счет термодинамически выгодного добавления примеси в исходную структуру WB_{4.2}.

1. Q. Gu *et al.*, Adv. Mat. **20(19)**, 3620 (2008).
2. A. G. Kvashnin *et al.*, Adv. Sci. **7(16)**, 2000775 (2020).
3. L. Shi-Yu *et al.*, J. of Appl. Phys. **131(7)**, 075105 (2022).
4. R. Mohammadi *et al.*, Chem. of Mat. **28(2)**, 632 (2016).
5. G. Kresse *et al.*, Phys. rev. **59(3)**, 1758 (1999).
6. J. P. Perdew *et al.*, Phys. rev. **54(23)**, 16533 (1996).
7. A. O. Lyakhov *et al.*, Comp. Phys. Com. **181(9)**, 1623 (2010).
8. Z-L. Liu, *et al.*, Comp. Phys. Com. **270**, 108180 (2022).

Определение кислотного числа жира и сроков хранения гречневой крупы сочетанием ИК-спектроскопии и хеометрики



Метленкин Д.А.¹, Киселев Н.В.^{1,2}, Платов Ю.Т.¹

¹ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», Москва

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

Аннотация: Продемонстрировано применение методов ИК-спектроскопии и хеометрики для разработки калибровочных моделей определения кислотного числа жира и сроков хранения гречневой крупы. Выявлены диапазоны ИК-спектра, соответствующие колебаниям функциональных групп липидов и влаги в гречневой крупе, оптимальные для построения

калибровочных моделей. По итогам моделирования разработаны модели метода проекции на латентные структуры на основе спектральных данных для определения кислотного числа жира и сроков хранения гречневой крупы. Предлагается использование разработанных моделей для быстрого мониторинга качества и безопасности гречневой крупы.

Ключевые слова: гречневая крупа, контроль, инфракрасная спектроскопия, хеометрика

Изменения качества гречневой крупы, как продукта длительного срока хранения, происходят из-за медленно протекающих химических реакций [1]. Согласно [1] в период хранения основные изменения качества гречневой крупы связаны с изменениями в липидной фракции.

Кислотное число жира (КЧЖ) гречневой крупы является стандартным показателем, отражающим изменения состава липидов крупы в течение сроков хранения. Стандартная методика измерения КЧЖ, указанная в ГОСТ 31700-2012, является длительной и трудоемкой. В связи с этим, целесообразна разработка более быстрых методик определения данного показателя.

Сочетание методов оптической спектроскопии и хеометрики применяют для разработки калибровочных моделей прогнозирования показателей качества зерновых культур. Авторы исследования [2] использовали хеометрику и методы машинного обучения по данным ближней инфракрасной спектроскопии для создания моделей прогнозирования содержания аминокислот в семенах сои. В работе [3] продемонстрирована разработка калибровочных моделей определения лейцина и тирозина в составе гречневой крупы на основе данных ближней инфракрасной спектроскопии.

Цель работы – разработка калибровочных моделей определения кислотного числа жира и сроков хранения гречневой крупы с использованием ИК-спектроскопии и хеометрических методов.

В качестве объектов исследования отобран калибровочный набор образцов гречневой крупы ($n=7$), отличающихся по срокам хранения. Образцы гречневой крупы отличались по срокам хранения от 1 до 15 месяцев. В качестве квалитетического показателя (дескриптора) отобрано КЧЖ гречневой крупы, как показатель свободных жирных кислот в продукте, напрямую зависящий от сроков хранения. Этот показатель наиболее интересен с потребительской точки зрения, так как позволяет сделать вывод о пригодности продукта для безопасного употребления.

Определение кислотного числа жира образцов из калибровочного набора проводили по стандартной методике (ГОСТ 31700-2012) с незначительной модификацией: медицинский эфир заменен на изопропиловый спирт. Экстракцию жиров из продукта проводили с помощью *n*-гексана. Определение КЧЖ титриметрическим методом проводили в нормализованном по фенолфталеину изопропиловом спирте и концентрацией титранта КОН 0,01 моль/л. Более низкая концентрация титранта, в отличие от методики, указанной в настоящем ГОСТ, использована для увеличения точности результатов титрования. При этом, отмечена линейная зависимость увеличения значений КЧЖ при увеличении сроков хранения гречневой крупы, что согласуется с ранее опубликованными данными [1]. Результаты измерения КЧЖ образцов гречневой крупы из калибровочного набора представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты измерения КЧЖ образцов гречневой крупы из калибровочного набора

Наименование образца	КЧЖ, мг КОН/г ($\pm\delta$)	Предел повторяемости r, %
«Виол» (длительного хранения)	13,13 \pm 1,57	0,53
«Скайфуд»	6,03 \pm 0,6	2,32
«Скайфуд» (длительного хранения)	10,6 \pm 1,27	4,70
«Бийский элеватор»	14,08 \pm 1,68	1,00
«Бийский элеватор»	12,41 \pm 1,48	5,10
«Зернышко к зернышку»	5,09 \pm 0,51	2,35
«Вкусвилл»	5,6 \pm 0,56	3,57

ИК-спектры в диапазоне 4000-400 см^{-1} измерены спектрометром Alpha (Bruker, Германия) используя встроенное программное обеспечение OPUS ver. 7.3.5. Для дальнейшей обработки создаваемые бинарные файлы спектров с расширением .dpt были экспортированы в Excel 2007 Microsoft Office (Microsoft Corporation, США) и преобразованы в транспонированную таблицу. Для статистической обработки в программе The Unscrambler X 10.4 (CAMO Software, Норвегия) таблица измеренных спектров транспонируется средствами Excel.

Регистрацию ИК-спектров всех образцов проводили с помощью ИК-Фурье спектрометра Bruker Alpha (Германия). Измерение ИК-спектра каждого образца проводили в 10-17 повторениях. Спектральные данные экспортировали из встроенного программного обеспечения Opus 7.3.5. в

Excel, на основе которых создана матрица $X=J \times N$, где где 95 – количество строк, которые соответствуют спектрам образцов, а 1748 – количество столбцов, соответствующих отсчетам на различных длинах волн. Для построения калибровочной модели использовалась база данных, состоящая из двух блоков: первый блок X – матрица ИК-спектров образцов из калибровочного набора, второй блок Y – матрица значений КЧЖ и сроков хранения.

Хеометрика.

В процессе предварительного анализа построения калибровочной модели были поставлены и решены следующие задачи:

-осуществлен выбор оптимального метода многомерной калибровки: проекция на латентные структуры (ПЛС). На этапе предварительного анализа также был использован метод регрессии на главные компоненты (РГК), но были получены неудовлетворительные результаты в связи с высокими значениями среднеквадратичной ошибки прогноза и валидации;

-построены калибровочные модели ПЛС с различающимся спектральным интервалом и количеством факторов (латентных переменных) для увеличения точности итоговой модели. Установлено, что для определения КЧЖ оптимален выбор спектрального диапазона 3700-2800 и 1800-700 cm^{-1} , так как в указанном диапазоне проявляются колебания функциональных групп липидов (CH_2 , CH_3 , $\text{C}=\text{O}$) и ОН-групп [4,5]. Для построения калибровочной модели определения сроков хранения гречневой крупы выбран более узкий спектральный диапазон 3100-2800 и 1800-800 cm^{-1} .

Проверка качества и точности калибровочной и прогностической моделей осуществлялась методом полной перекрестной валидации с использованием статистических показателей: R^2_v , R^2_p (коэффициент детерминации валидации и прогноза соответственно), RMSEV, RMSEP (Root Mean Square Error, среднеквадратичная ошибка валидации и прогноза соответственно). Результаты проведенного моделирования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Проверка качества и точности калибровочных моделей идентификации сливочного масла

Метод	Параметр	Спектральный интервал, cm^{-1}	RMSEC/ RMSEV	R^2_v / R^2_p
ПЛС	КЧЖ	4000-400	1,19/1,57	0,89/0,81
ПЛС	КЧЖ	3700-2800,1800-700	0,48/1,09	0,98/0,91
ПЛС	КЧЖ	3100-2800,1800-800	0,81/1,16	0,94/0,90
ПЛС	Срок хранения	4000-400	0,87/1,94	0,98/0,90
ПЛС	Срок хранения	3700-2800,1800-700	1,32/1,71	0,95/0,92
ПЛС	Срок хранения	3100-2800,1800-800	1,23/1,64	0,96/0,93

Таким образом, использование контрольного анализа совместно с хеометрическими методами калибровки на основе данных ИК-спектроскопии позволяет определять КЧЖ и сроки хранения гречневой крупы. Разработанные модели отличаются высокой точностью и качеством, поэтому могут использоваться для быстрого мониторинга качества гречневой крупы.

Заключение

Показано использование сочетания ИК-спектроскопии и хеометрических методов для разработки калибровочных моделей определения кислотного числа жира и сроков хранения гречневой крупы. Предлагается использование калибровочных моделей в качестве быстрого метода мониторинга качества и безопасности гречневой крупы.

Список использованных источников

1. Гурьева К. Б., Сумелиди Ю. О., Белецкий С. Л., Сидоренко Ю. И. Метод ускоренного тестирования срока годности гречневой крупы //Хлебопродукты. – 2015. – №. 2. – С. 58-61.
2. Kovalenko I. V., Rippke G. R., Hurburgh C. R. Determination of amino acid composition of soybeans (Glycine max) by near-infrared spectroscopy //Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2006. – Т. 54. – №. 10. – С. 3485-3491.
3. Zhu L., Damaris R. N., Lv Y., Du Q., Shi T., Deng, J., Chen, Q. Construction and Application of Detection Model for Leucine and Tyrosine Content in Golden Tartary Buckwheat Based on Near Infrared Spectroscopy //Applied Sciences. – 2022. – Т. 12. – №. 21. – С. 11051.
4. Метленкин Д. А., Платов Ю. Т., Платова Р.А., Рубцов А. Е., Михайлова А. М. Идентификация кофе в зернах методами ИК-спектроскопии и многомерного анализа //Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2021. – №. 5-6. – С. 92-97.
5. Метленкин Д. А., Платов Ю. Т., Рубцов А. Е. Идентификация сливочного масла методами ИК-спектроскопии и многомерного анализа //Пищевая промышленность. – 2020. – №. 3. – С. 58-61.

Оценка синергетического эффекта и оптимизация комбинаций вориностата и доксорубицина для терапии опухолевых заболеваний



**М.Р. Моллаева, Н.Г. Яббаров, М.Б. Сокол, М.В. Чиркина,
Е.Д. Никольская**

*Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук, Москва*

В настоящее время полимихioterapia находит все большее применение в лечении злокачественных новообразований. Данный подход позволяет добиться повышения эффективности терапии за счет синергетического или аддитивного эффекта комбинации препаратов, преодоления устойчивости опухолевых клеток к одному из лекарственных средств в комбинации и снижения дозы этих лекарственных средств. Однако, на сегодняшний день не существует оптимального протокола для подбора соотношений исследуемых препаратов, позволяющего достигнуть эффективности их совместного применения для лечения заболеваний. Возможным решением данной проблемы может стать использование математических моделей для определения синергизма комбинации лекарственных средств.

Одним из наиболее используемых лекарственных препаратов в терапии злокачественных новообразований является доксорубин (DOX), однако, развитие резистентности опухолевых клеток к данному препарату и его кардиотоксичность требуют разработки новых подходов для применения DOX. Так, в литературных источниках появляется все больше данных о совместном использовании вориностата (SAHA) и DOX для лечения солидных опухолей, поскольку показано, что SAHA способен снижать резистентность опухолевых клеток к DOX за счет образования активных форм кислорода и ингибирования транскрипционного фактора NRF2.

Цель данного исследования состояла в разработке эффективной комбинации SAHA и DOX с помощью математических моделей и оценке активности данной комбинации в отношении различных подтипов опухолевых клеток молочной железы.

Первым этапом поиска эффективной комбинации SAHA и DOX стало определение концентраций препаратов (значение IC50), при которых наблюдалась гибель 50% клеток линий MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), MCF-7/ADR (аденокарцинома молочной железы человека, устойчивая к адриамицину и обладающая фенотипом множественной лекарственной устойчивости), HCC-1954 (карцинома молочной железы человека), SKBR-3 (аденокарцинома молочной железы человека) и MDA-MB-231 (аденокарцинома молочной железы человека) (таблица 1). Значения IC50 определялись для каждого препарата, добавленного к клеткам индивидуально, с помощью МТТ метода.

Таблица 1. Значения IC50 для SAHA и DOX в отношении опухолевых клеток молочной железы.

Линия клеток / Значение IC50, μM	MCF-7	MCF-7/R	HCC-1954	SKBR-3	MDA-MB-231
SAHA	430	3.2	370	4.5	1
DOX	0.8	70	0.5	0.1	40

Рассчитанные значения IC50 являлись исходными для составления матрицы зависимости доз, которая состояла из 9 концентраций DOX и 9 концентраций SAHA (таблица 2).

Использование подобной матрицы позволило оценить выживаемость опухолевых клеток молочной железы в условиях инкубации с 64 комбинациями SAHA и DOX с помощью МТТ-теста. Полученные значения выживаемости клеток (в процентах от контроля) вносили в программу SynergyFinder 2.0 и рассчитывали индекс синергизма для 64 исследуемых комбинаций на основе моделей синергизма: HSA, Bliss, ZIP, Loewe.

Таблица 2. Матрица зависимости выживаемости клеток линии HCC-1954 от концентраций DOX и SAHA. Принцип построения матриц сохранялся для всех опухолевых клеток молочной железы (за исключением концентраций).

SAHA, μM / DOX, μM	0	2.89	5.78	11.56	23.13	46.25	92.50	185.00	370.00
0	100	67,68	72,09	63,17	53,21	60,41	59,12	50,53	38,25
0.004	99,35	61,35	86,54	68,14	42,81	38,69	48,19	35,71	28,61
0.008	81,42	60,09	57,56	69,92	41,18	44,74	56,72	39,88	38,15
0.016	111,95	66,80	49,96	53,07	40,71	38,42	42,08	38,46	27,68

0.031	108,78	68,23	48,63	45,01	41,49	33,27	32,99	31,14	24,44
0.063	105,93	47,08	27,02	23,29	22,10	25,37	28,51	25,39	17,83
0.125	82,53	21,93	20,27	22,13	16,64	11,69	15,76	13,22	11,03
0.250	52,264	16,18	14,01	11,84	12,18	9,95	10,81	9,67	9,36
0.500	39,39	13,15	9,77	11,23	8,36	11,66	12,88	10,53	8,74

По результатам оценки синергизма с помощью математических моделей было выявлено, что наибольшим синергизмом комбинация SAHA и DOX обладала в отношении клеток линий HCC-1954, SKBR-3 и MCF-7/R. Стоит отметить, что данные линии опухолевых клеток экспрессируют рецепторы эпидермального фактора роста человека 2-го типа, что может указывать на то, что разработанная комбинация SAHA/DOX может использоваться для лечения HER-2 позитивного подтипа опухолей молочной железы.

Далее, для определения оптимального соотношения SAHA/DOX использовали модель синергизма Loewe: для каждой линии опухолевых клеток молочной железы выделяли наибольший индекс синергизма из 64 исследуемых комбинаций в соответствии с моделью Loewe (в диапазоне от 3 до 35%) и на его основе определяли соответствующие концентрации SAHA и DOX. Из полученных пар для каждой линии опухолевых клеток молочной железы было рассчитано среднее значение концентраций комбинации и определено оптимальное соотношение SAHA:DOX – 30:1, соответственно.

Из литературных данных известно, что как DOX, так и SAHA, способны стимулировать гибель опухолевых клеток посредством апоптоза и ферроптоза. Однако, в условиях синергетического действия комбинации SAHA/DOX, вероятно, возможна преимущественная активация одного из путей программируемой гибели клеток. Известно, что одним из основных маркеров апоптоза является фрагментация ДНК, в то время как снижение уровня глутатиона является одним из маркеров ферроптоза. В данном исследовании выявленное соотношение SAHA/DOX оценивали на способность вызывать разрывы цепей ДНК с помощью TUNEL анализа и снижение уровня глутатиона методом проточной цитофлуориметрии в клетках линии HCC-1954, поскольку данная линия опухолевых клеток проявила наибольшую чувствительность по отношению к комбинации лекарственных препаратов (рис. 1).

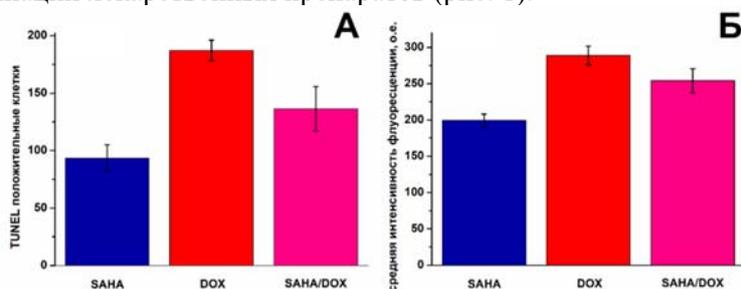


Рисунок 1. Оценка фрагментации ДНК в клетках линии HCC-1954 в условиях инкубации в течение 48 ч с 10 μ M SAHA или 0.3 μ M DOX с помощью TUNEL анализа (А). Измерение уровня глутатиона в клетках линии HCC-1954 при добавлении 10 μ M SAHA или 0.3 μ M DOX, проведенное с использованием 0.1 mM раствора орто-фталового альдегида (Б).

По результатам исследования было выявлено, что DOX стимулировал выраженную фрагментацию ДНК в клетках линии HCC-1954 по сравнению со свободным SAHA и комбинацией SAHA/DOX. В то же время, SAHA способствовала снижению уровня глутатиона, что указывает на преимущественную гибель клеток HCC-1954 в условиях инкубации с SAHA посредством ферроптоза. Для обоих экспериментов показатели комбинации SAHA/DOX оставались между крайними значениями DOX и SAHA, стимулирующих преимущественно апоптоз и ферроптоз, соответственно. Данный эффект, вероятно объясняется активацией апоптоза и ферроптоза в равной степени за счет синергетического эффекта комбинации SAHA/DOX.

Таким образом, с помощью моделей синергизма было выявлено, что SAHA и DOX обладают выраженным синергизмом в отношении клеток линий HCC-1954, SKBR-3 и MCF-7/R и являются перспективной комбинацией для лечения HER2-позитивного рака молочной железы, а также было рассчитано наиболее эффективное соотношение SAHA и DOX для терапии (30:1). С помощью метода проточной цитофлуориметрии и TUNEL анализа было выявлено, что синергетический эффект комбинации SAHA/DOX достигался за счет активации как апоптоза, так и ферроптоза.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00293, <https://rscf.ru/project/22-25-00293/>

Исследование колонизации корневой системы *Cucumis sativus* клетками *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*



**Морозова Е. А., Писаревская В. А., Журавлева А. С.,
Шагаев А. А., Марквичев Н. С.**

*Российский химико-технологический университет
им. Д. И. Менделеева, Москва*

Микробиом растения состоит из большого количества микроорганизмов, которые по-разному влияют на растения [1]. В современных условиях для выращивания растений в основном используются органические и минеральные субстраты. Из субстратов минерального происхождения наибольшее распространение имеет минеральная вата.

В минеральной вате концентрация растворенного кислорода в разных частях субстрата отличается. В верхней части субстрата кислорода больше, чем в нижней, так как есть площадь контакта с внешней средой. В минеральной вате создается градиент всех компонентов питательной среды. В связи с этим важно изучать в каких частях субстрата микроорганизмы активнее развиваются, накапливаются и как взаимодействуют между собой.

При развитии растений на любых субстратах, корневая система растения выделяет экссудаты, которые являются единственным источником углерода для микроорганизмов. В связи с этим колонизация минеральной ваты осуществляется за счет микроорганизмов из внешней среды и не всегда эти микроорганизмы являются положительными для растения. Поэтому важно сформировать положительный биоценоз в субстрате, который бы минимизировал воздействие отрицательной микрофлоры. В связи с этим важной задачей является изучение формирования микробного биоценоза и взаимодействия микроорганизмов между собой на фоне метаболизма экссудатов корневой системы.

Растения проявляют широкий спектр защитных механизмов против различных биотических и абиотических факторов стресса. В условиях стресса растения проявляют немедленную реакцию, активируя защитный механизм, известный как индуцированная резистентность. Они способны защищаться от воздействия фитопатогенных микроорганизмов при помощи выработки антибиотических соединений, которые подавляют рост фитопатогенов [2, 3]. Но не смотря на защитные свойства самого растения, целесообразно вносить полезную микрофлору в качестве профилактики и для повышения эффективности, так как микроорганизмы обладают ростостимулирующими свойствами по отношению к растению, а также проявляют антагонистические свойства к фитопатогенной микрофлоре, метаболизируют экссудаты растения, способны к колонизации поверхности корневой системы. В качестве агентов биологического контроля можно использовать *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*, которые обладают рядом полезных свойств. В связи с этим, можно изучить действие агентов биологического контроля на фитопатогенные микроорганизмы.

Чаще всего для создания бактериальных препаратов используют микроорганизмы – представители рода *Rhizobiaceae*, а также родов *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*. При подборе микроорганизмов в качестве основы препаратов выбирают штаммы, способные продуцировать биологически активные вещества, фиксировать азот из атмосферы, подавлять развитие фитопатогенов и стимулировать развитие растений. А также они должны обладать способностью колонизировать корневую систему растений и сосуществовать в их ризосфере [4].

Широко используется метод предпосевной обработки семян полезными микроорганизмами. Данные агенты биологического контроля должны обладать различными свойствами защиты растения. Так, например, штаммы *Pseudomonas fluorescens* проявляют такие полезные свойства, как образование биопленок, выработка противогрибковых метаболитов, прикрепление к корневой системе растения. Они являются стимуляторами роста растений [5]. Из ранее опубликованных нами исследований *Pseudomonas fluorescens* способна метаболизировать экссудаты растения и колонизировать поверхность корневой системы [6]. *Pseudomonas fluorescens* способствует росту растений и повышает урожайность с помощью таких механизмов, как выработка фитогормонов, образование сидерофоров для усвоения железа. Род *Bacillus* участвуют в биоконтроле патогенов растений и защищают растение от фитопатогенных бактерий, грибов и нематод [7, 8]. На основе того, что данные микроорганизмы используются в качестве агентов биологического контроля и негативно не влияют на растение, а также обладают большим количеством факторов, которые

могут быть использованы для биологической защиты растения. Важно понимать, как они населяют субстрат на начальных этапах развития растений. В связи с этим для исследования были выбраны агент биологического контроля *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*.

Данная работа посвящена исследованию колонизации корневой системы огурца клетками *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* прикорневой зоны огурца при выращивании в минеральной вате. Целью работы является изучение накопления микроорганизмов в минеральной вате на начальных этапах развития растений, а так важно понимать распределение данных микроорганизмов по всему объему субстрата.

Материалы и методики. В качестве объектов исследования были выбраны культуры *Bacillus subtilis* B1018 и *Pseudomonas fluorescens* B1001, предоставленные коллекцией кафедры биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева. Для исследования колонизации прикорневой зоны были использованы семена огурца сорта Атлет гибрида F1. Культуру *Bacillus subtilis* выращивали на богатой питательной среде Л-бульон с составом: глюкоза - 20 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, пептон - 10 г/л, NaCl - 2 г/л. Культуру *Pseudomonas fluorescens* B1001 выращивали на питательной среде Кинг с соответствующим составом: пептон - 20 г/л, K₂SO₄ - 10 г/л, MgSO₄ - 1,4 г/л, глицерин - 10 мл/л. Клетки выращивали глубинным способом в аэробных условиях при температуре 25-26°C в течение суток. Исходные суспензии клеток разбавляли физиологическим раствором, так чтобы концентрация клеток в нем была 10⁴ КОЕ/мл.

Кубики минеральной ваты напитывали 600 мл поливного раствора, содержащий клетки *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* с концентрацией 10⁴ КОЕ/мл. Семена огурца помещали в субстрат, присыпали 2 г вермикулита и ставили в термостатированные условия с постоянной температурой 25-26°C и постоянным освещением, поливали раз в сутки 200 мл стерильного минерального раствора для огурца с составом: Ca(NO₃)₂ - 0,6963 г/л, KNO₃ - 0,5407 г/л, NH₄NO₃ - 0,0492 г/л, K₂SO₄ - 0,1269 г/л, KH₂PO₄ - 0,17 г/л, Mg(NO₃)₂ - 0,2223 г/л, MnSO₄ - 0,0017 г/л, ZnSO₄ - 0,0015 г/л, CuSO₄ - 0,0003 г/л, H₃BO₃ - 0,0028 г/л. Выращивали семена до появления первого настоящего листа в течение 10 дней (рис. 1) и определяли энергию прорастания. После 10 суток культивирования стерильно разрезали минераловатный субстрат, извлекали корень из верхней, средней и нижней части субстрата. Далее эти части качественно выкладывали на агаризованную среду с L-агаром, помещали в термостатированные условия при температуре 28°C. Через 24 часа отслеживали наличие выросшей микрофлоры на корнях и визуально определяли процентное соотношение колоний *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*.



Рис. 1. Растение огурца сорта Атлет гибрида F1 в минераловатном субстрате

Результаты и обсуждения. В результате проведенного исследования на первом этапе оценивали колонизацию корневой системы микроорганизмами *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* на разных участках минеральной ваты. Результаты представлены на рисунке 2.

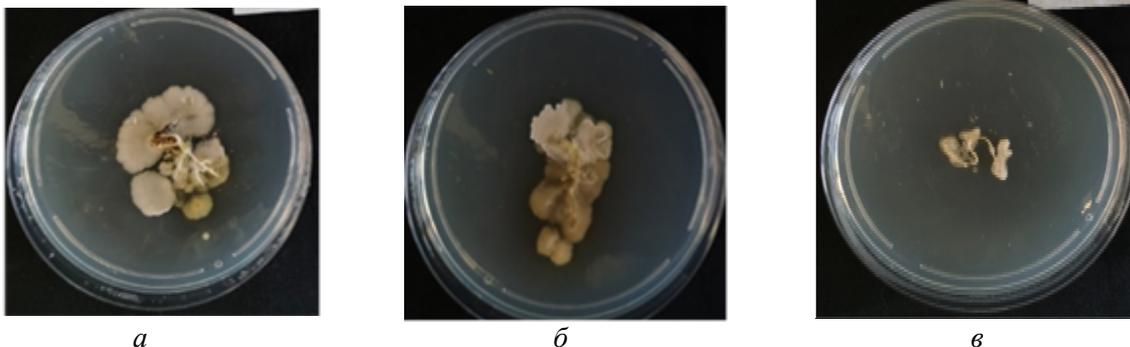


Рис. 2. Колонии *Bacillus subtilis* на поверхности корневой системы: а – участок корня из верхней части субстрата, б – участок корня из средней части субстрата, в – участок корня из нижней части субстрата

На рисунке 2 видно, что на всех частях корневой системы огурца присутствуют клетки *Bacillus subtilis*. На корневой системе в верхней части субстрата находится большее количество клеток, нежели в средней и нижней части субстрата.

На втором этапе исследования оценивали колонизацию корневой системы клетками *Pseudomonas fluorescens* на разных участках минераловатного субстрата. Аналогично предыдущему этапу исследования оценивали колонизацию поверхности корневой системы растения, для этого выкладывали части корневой системы из различных участков субстрата на агаризованную питательную среду и инкубировали. Оценивали количество микроорганизмов на различных участках корневой системы. Результаты представлены на рисунке 3.

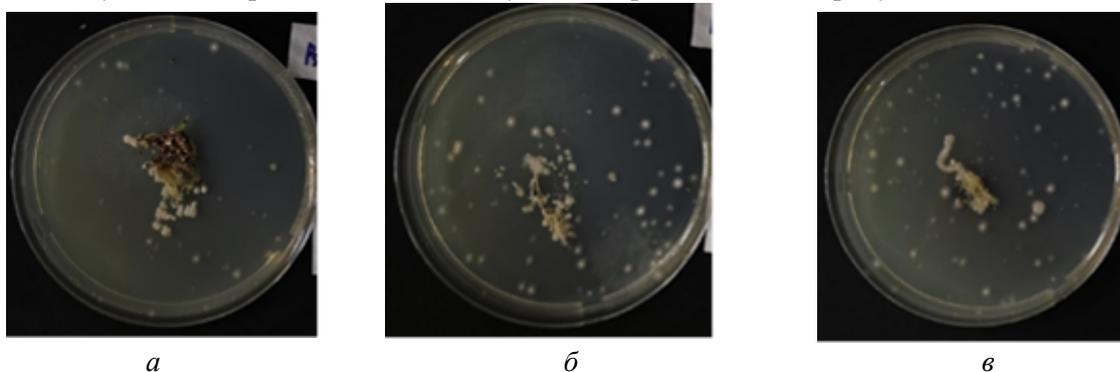


Рис. 3. Колонии *Pseudomonas fluorescens* на поверхности корневой системы: а – участок корня из верхней части субстрата, б – участок корня из средней части субстрата, в – участок корня из нижней части субстрата

Как видно из рисунка 3, на всех частях корневой системы огурца присутствуют клетки *Pseudomonas fluorescens*. На корневой системе в верхней части субстрата находится большее количество клеток *Pseudomonas fluorescens*, чем в средней и в нижней части субстрата.

Оценивая колонизацию, при внесении в прикорневую зону растения на начальных этапах его развития, можно отметить, что клетки *Bacillus subtilis* колонизируют поверхность корневой системы не так однородно, как клетки *Pseudomonas fluorescens*. В верхней части минеральной ваты клетки *Bacillus subtilis* активнее развиваются, чем в нижней части. Можно предположить, что такое распределение микроорганизмов происходит из-за градиента концентрации питательных веществ и растворенного кислорода по всему объему субстрата. При внесении в субстрат только клеток *Pseudomonas fluorescens*, можно наблюдать распространение микроорганизмов по всей поверхности корневой системы огурца. *Pseudomonas fluorescens* активнее растут при более малых концентрациях компонентов питательной среды, чем *Bacillus subtilis*.

Для оценки совместной колонизации микроорганизмов *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* были проведены следующие испытания. При совместном выращивании семена огурца, обработанные клетками *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*, проращивали по аналогичной схеме в течение 10 суток и оценивали колонизацию поверхности корневой системы данными микроорганизмами. Участки корневой системы выкладывали на агаризованную питательную среду и оценивали развитие микроорганизмов на поверхности корневой системы. Результаты совместного культивирования представлены на рисунке 4.

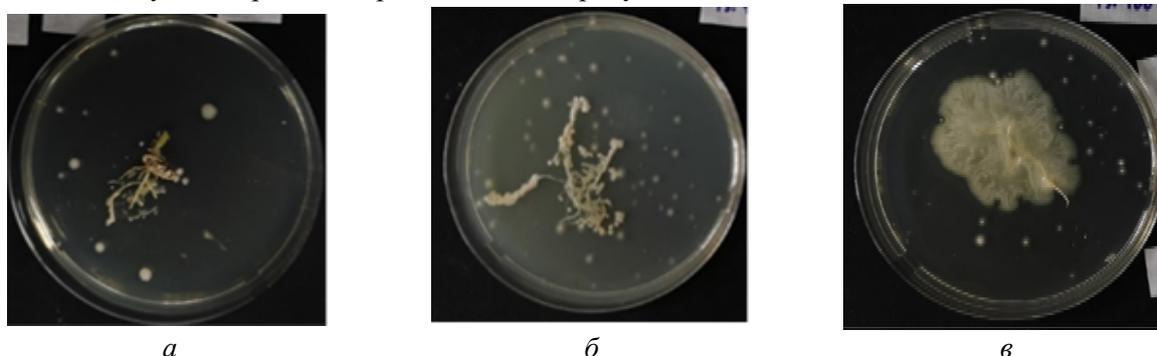


Рис. 4. Клетки *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* на поверхности корневой системы: а – участок корня из верхней части субстрата, б – участок корня из средней части субстрата, в – участок корня из нижней части субстрата

Как видно на рисунке 4, во всех частях корневой системы огурца присутствуют клетки *Pseudomonas fluorescens*. На корневой системе в верхней части субстрата находится большее количество клеток *Bacillus subtilis*, чем в средней и нижней части субстрата.

При совместном культивировании *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* распределяются по-разному по всему объему субстрата. Так *Pseudomonas fluorescens* присутствует во всех частях минеральной ваты, что свидетельствует о полной колонизации поверхности корневой системы огурца. Но в верхней части субстрата клетки *Pseudomonas fluorescens* активнее распространяются, чем в нижней части. Можно предположить, что такое распределение обусловлено разным содержанием растворенного кислорода по всему объему минеральной ваты. Клетки *Bacillus subtilis* распространяются только в верхней части, а в нижней подвергаются элиминированию.

На основе полученных результатов была проведена оценка процентного соотношения распределения микроорганизмов по поверхности корневой системы на различных участках минеральной ваты и построены диаграммы (рис. 5, 6).

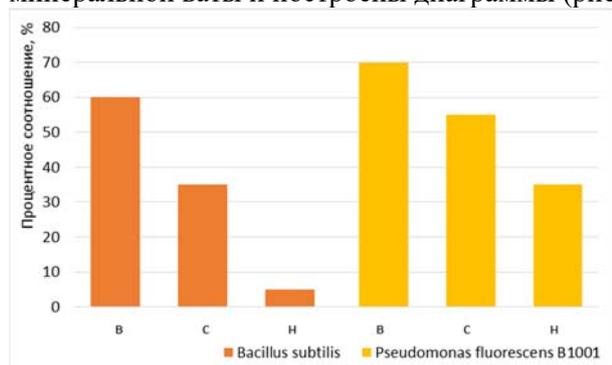


Рис. 5. Содержание *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* при раздельном внесении в субстрат (в – верх, с – середина, н – низ)

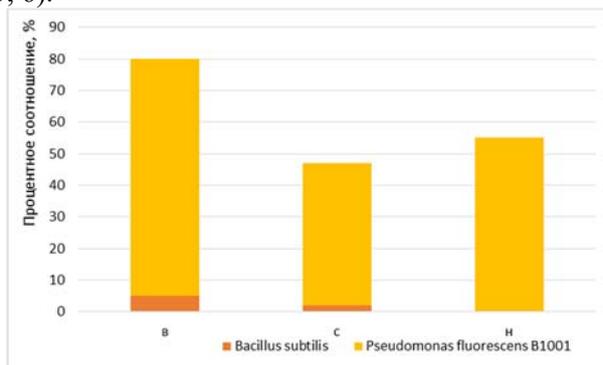


Рис. 6. Содержание *Bacillus subtilis* + *Pseudomonas fluorescens* при совместном внесении в субстрат (в – верх, с – середина, н – низ)

Как видно из рисунка 5, при раздельном внесении клетки *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* присутствуют на всех частях корневой системы огурца. Количество *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* уменьшается с углублением в субстрат. Однако количество клеток *Pseudomonas fluorescens* во всех частях корня больше, чем *Bacillus subtilis*.

На рисунке 6 видно, что при совместном выращивании клетки *Pseudomonas fluorescens* находятся на участках корневой системы из различных частей субстрата, в то время как *Bacillus subtilis* находится в незначительном количестве в верхней и средней части корневой системы.

Из результатов, представленных на рисунках 5 и 6, можно предположить, что при совместном культивировании клетки *Pseudomonas fluorescens* способны колонизировать всю корневую систему огурца. В то время как клетки *Bacillus subtilis* элиминируются на корневой системе в нижней части субстрата.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что микроорганизмы *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens* распределяются по всему объему субстрата и способны колонизировать поверхность корневой системы огурца. Но из-за разных условий в субстрате они колонизируют по-разному. Требуются дальнейшие исследования колонизации корневой системы огурца микроорганизмами в разных частях минеральной ваты и распределения по всему объему субстрата.

Закключение. В данной работе исследована колонизация корневой системы *Cucumis sativus* клетками *Bacillus subtilis* и *Pseudomonas fluorescens*. При изучении распространения агентов биологического контроля по минеральному субстрату было показано, что в разных частях субстрата микроорганизмы по-разному прикрепляются к корневой системе растения. На ранних этапах развития растения *Pseudomonas fluorescens* способна к колонизации корневой системы огурца и заполняет верхнюю, среднюю и нижнюю часть минеральной ваты, что свидетельствует о полной колонизации субстрата. *Bacillus subtilis* также колонизирует корневую систему, но преобладает в верхней части субстрата. Возможно такое распределение обусловлено разной концентрацией растворенного кислорода по всему объему минеральной ваты. При совместном культивировании *Bacillus subtilis* подвергается элиминированию, в то время как *Pseudomonas fluorescens* прикрепляется к корневой системе огурца на всех участках субстрата. Можно предположить, что при совместном культивировании клетки *Pseudomonas fluorescens* образуют

био пленки, могут развиваться при более низких концентрациях субстрата, в том числе кислорода в градиенте концентрации.

Список литературы

1. Ma. del Carmen Orozco-Mosqueda, Ayomide Emmanuel Fadiji, Olubukola Oluranti Babalola, Bernard R. Glick, Gustavo Santoyo. Rhizobiome engineering: Unveiling complex rhizosphere interactions to enhance plant growth and health // *Microbiological Research* – 2022. – Vol. 263.
2. Sherien Bukhat, Asma Imran, Shaista Javaid, Muhammad Shahid, Afshan Majeed, Tahir Naqqash. Communication of plants with microbial world: Exploring the regulatory networks for PGPR mediated defense signaling // *Microbiological Research* – 2020. – Vol. 238.
3. Метлицкий Л. В. Как растения защищаются от болезней / Л. В. Метлицкий, О. Л. Озерецковская. – М: Наука, – 1985. – 192 с.
4. С. С. Муродова, К. Д. Давранов. Комплексные микробные препараты. Применение в сельскохозяйственной практике // *BIOTECHNOLOGIA ACTA* – 2014. – Т. 7 - № 6. – С. 92-101.
5. Stuti Sah , Shweena Krishnani , Rajni Singh. *Pseudomonas* mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security // *Current Research in Microbial Sciences* – 2021 – Vol. 2
6. Шагаев А. А., Журавлева А. С., Дмитриева Е. Н., Белов А. А., Марквичев Н. С. Особенности колонизации корневой системы огурца бактериями *Pseudomonas fluorescens* // *Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. Том XXXII, № 12 (208)*. М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2018. С. 38-40.
7. Rita de Cassia Lima Mazzuchelli, Eduardo Henrique Lima Mazzuchelli, Fabio Fernando de Araujo. Efficiency of *Bacillus subtilis* for root-knot and lesion nematodes management in sugarcane // *Biological Control* – 2020. – Vol. 143.
8. Bedaprana Roy, Debapriya Maitra, Jaydip Ghosh and Arup Kumar Mitra. Unique extremophilic *Bacillus*: their application in plant growth promotion and sustainable agriculture // *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation* – 2022. – P. 287-304.

Использование лапласиана электронной плотности в качестве критерия определения типа механизма ферментативного разрыва Р-О связи в нуклеозидфосфатах



Мулашкина Т.И., Кулакова А.М., Хренова М.Г.

*Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, Москва, Россия
Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук, Институт биохимии
им. А.Н. Баха, Москва, Россия*

Химические реакции, связанные с образованием или разрывом Р-О-связей в эфирах фосфорной кислоты, играют важную роль в ключевых биохимических процессах, таких как формирование костей, трансдукция, хранение генетической информации и др. Кроме того, эфиры фосфорной кислоты используются в качестве пестицидов, гербицидов, пластификаторов и боевых отравляющих веществ. На протяжении нескольких десятилетий обсуждается проблема определения типа механизма, по которому протекает разрыв Р-О связи сложных эфиров фосфорной кислоты как в растворителе, так и в белке. Различают два типа механизма: диссоциативный и ассоциативный. В результате таких процессов уходящая группа (LG) замещается нуклеофильным агентом (Nu). При диссоциативном механизме разрыв Р-OLG связи и образование связи Р-ONu происходит последовательно. Тогда как при ассоциативном механизме эти процессы происходят синхронно. Определение типа механизма экспериментально или вычислительно – трудоемкая задача, поэтому мы предлагаем способ определения механизма реакции основываясь только на анализе электронной плотности в структуре фермент-субстратного комплекса.

В данной работе в качестве объектов исследования были рассмотрены реакции гидролиза гуанозинтрифосфата (GTP) до гуанозиндифосфата (GDP) в активных центрах комплексов Ras-GAP, Ran-GAP и Arl3-RP2, реакции гидролиза аденозинтрифосфата (ATP) в активных центрах комплексов мевалонат дифосфат декарбоксилазы, мевалонат киназы, F₁-ATPase и миозине, реакции гидролиза циклического димерного гуанозинмонофосфата (c-di-GMP) в активном центре EAL домена и превращение аденозинтрифосфата (ATP) до циклического аденозинмонофосфата

(сAMP) в активном центре аденилатциклазы mAC и фоторегулируемой аденилатциклазы bPAC . Первые семь реакций относятся к диссоциативному типу, три других к ассоциативному.

Расчёты электронной плотности фермент-субстратных комплексов проводились с использованием комбинированного метода квантовой и молекулярной механики с помощью программного Tcl интерфейса ChemShell с эффективным оптимизатором DL-FIND и программным пакетом квантовой химии TURBOMOLE. Квантовая подсистема описывалась методом функционала электронной плотности с гибридным функционалом PBE0 и дисперсионной поправкой D3, а также с двухэкспонентным базисом с поляризационными функциями на всех атомах 6-31G**. Лапласиан электронной плотности рассчитывался в программном пакете Multiwfn.

В данной работе в качестве критерия определения типа механизма, мы использовали лапласиан электронной плотности $\nabla^2\rho(r)$. Знак лапласиана электронной плотности указывает на области концентрации электронной плотности ($\nabla^2\rho(r) < 0$) или деконцентрации ($\nabla^2\rho(r) > 0$) вокруг данной точки r . Таким образом, если вдоль линии связи наблюдается плато с $\nabla^2\rho(r) > 0$, это показывает склонность к разрыву связи между атомом фосфора и уходящей группой, что способствует протеканию нуклеофильного замещения по диссоциативному механизму. В случае ассоциативного механизма наблюдается плато с $\nabla^2\rho(r) < 0$.

В связи с этим, мы предлагаем использовать лапласиан электронной плотности вдоль связи фосфора с уходящей группой (P-OLG) в фермент-субстратном комплексе в качестве критерия определения типа механизма ферментативного разрыва P-O связи в нуклеозидфосфатах.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-73-20032).

Разработка технологии совместного инкапсулирования вориностата и доксорубина в полимерные наночастицы



**Е.Д. Никольская¹, М.Б. Сокол¹, М.Р. Моллаева¹, М.В. Чиркина¹,
И.А. Гуляев^{1,2}, М.А. Клименко^{1,2}, Н.Г. Яббаров¹**

¹ Институт Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

² Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

E-mail: elenanikolskaja@gmail.com

В исследовании описывается разработка технологии получения наночастиц из сополимера молочной и гликолевой кислот (ПЛГА), содержащих вориностат и доксорубин, как при моноинкапсулировании препарата, так и при совместном инкапсулировании. Были использованы планы Бокса-Бенкена для оптимизации метода получения наночастиц для получения максимального количественного содержания препарата при минимальном размере частиц.

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) у женщин встречается наиболее часто среди всех видов злокачественных опухолей. Третьи негативный рак молочной (ТНРМЖ) железы является одним из самых агрессивных среди всех подтипов рака молочной железы. Данный подтип РМЖ отличается от остальных отсутствием экспрессии гормональных рецепторов (эстрогена и прогестерона) и HER2 (рецептор эпидермального фактора роста). Учитывая сложную структуру рака молочной железы и множество его подтипов, в процессе лечения следует учитывать множество факторов, включая подтип опухоли, стадию прогрессирования рака, клеточную мишень и т.д.

Создание новых систем доставки лекарственных препаратов, а также применение комбинированной терапии является перспективным подходом для увеличения эффективности химиотерапии. Наночастицы могут избирательно доставлять лекарственные препараты в опухолевые ткани, обладая при этом контролируемой скоростью высвобождения лекарств, поддерживая концентрацию действующего вещества на необходимом терапевтическом уровне. Полимерные наночастицы являются потенциальным перспективным средством доставки для повышения эффективности существующих противоопухолевых препаратов, а также снижении неспецифической токсичности и сокращения побочных эффектов. Наноразмерные системы доставки представляют собой перспективное направление для получения новых препаратов адресного действия с улучшенным профилем безопасности и эффективностью действия.

Вориностат (SANA) – ингибитор гистондеацетилаз (HDACi), обладает низкой растворимостью в воде и плохой абсорбцией, что препятствует его успешному применению в

терапии, особенно при лечении солидных опухолей. В последние годы все больше данных свидетельствует о том, что HDAC являются перспективными мишенями для разработки новых методов лечения онкологических заболеваний.

Комбинации вориностата с другими терапевтическими препаратами могут быть использованы для достижения синергизма и снижения резистентности опухолевых клеток к этим терапевтическим агентам или методам терапии. Последовательность применяемых комбинаций лечения оказывает большое влияние на их эффективность. В частности, предварительная инкубация с вориностатом ослабляет структуру хроматина, увеличивая доступ агентов, повреждающих ДНК, что приводит к повышению эффективности. В связи с чем, в качестве второго агента был выбран доксорубин (DOX) - противоопухолевый антибиотик антрациклинового ряда, оказывающий антимитотическое и антипролиферативное действие. Механизм действия DOX заключается во взаимодействии с ДНК, образовании свободных радикалов и прямом воздействии на мембраны клеток с подавлением синтеза нуклеиновых кислот.

Таким образом, цель данной работы заключалась в разработке наноразмерной системы доставки (наночастиц) с совместным инкапсулированием DOX и SAHA для дальнейшего исследования эффективности комбинированной терапии в отношении клеток рака молочной железы.

Результаты работы. Наночастицы получали методом «двойного эмульгирования» с применением гомогенизатора и последующим выпариванием растворителя: W1/O/W2, где W1 - водный раствор (доксорубин), O - вориностат в смеси растворителей, W2 - раствор ПАВ. W1+O – первичная эмульсия, W1+O+W2 – вторичная эмульсия (рисунок 1).

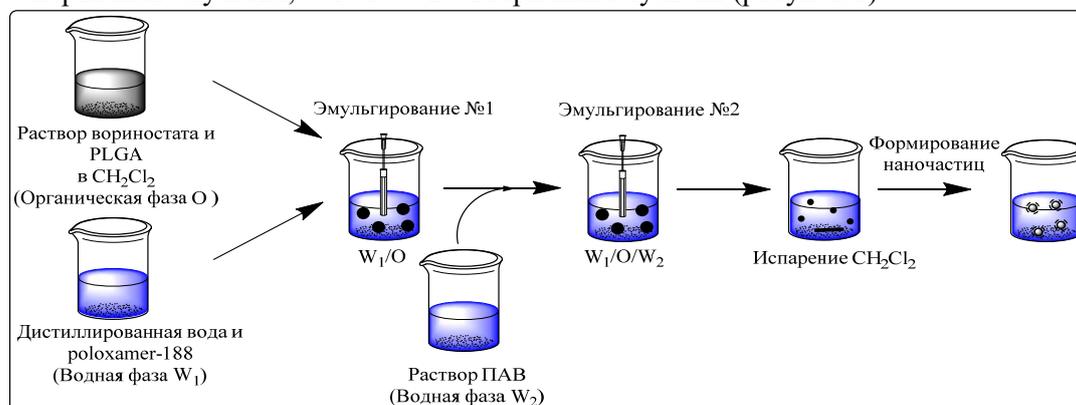


Рисунок 1. Получение полимерных частиц, содержащих вориностат и доксорубин, методом двойного эмульгирования с последующим выпариванием растворителя.

Для разработки и оптимизации технологии получения наночастиц PLGA были применены планы Бокса-Бенкена. Для определения влияния технологических параметров (масса PLGA (X1), соотношение W1/O (X2), концентрация раствора ПВС (X3)) на общее содержание ДВ (Y1), размер частиц (Y2) и оптимизации технологии получения наночастиц PLGA, применялись трехуровневые трехфакторные планы Бокса-Бенкена (таблица 1).

Таблица 1. Технологические параметры получения наночастиц PLGA с применением трехуровневых трехфакторных планов Бокса-Бенкена.

№ партии	m (PLGA), мг	Соотношение W1/O	C (раствор ПВС), %
NP-1	100	17,5	2,3
NP-2	100	2,5	2,3
NP-3	50	10	2,3
NP-4	150	10	2,3
NP-5	150	17,5	1,5
NP-6	50	2,5	1,5
NP-7	150	2,5	1,5
NP-8	50	17,5	1,5
NP-9	150	10	0,7
NP-10	100	2,5	0,7
NP-11	50	10	0,7
NP-12	100	17,5	0,7

Синтезированные наночастицы анализировали для определения общего содержания вещества (DL), среднего диаметра и дзета-потенциала, а полученные данные использовали для

построения матрицы планов Бокса-Бенкена (рисунок 2), используя программное обеспечение Design Expert (версия 7.0.0, Stat-Ease Inc., США).

На основании полученных данных были выбраны условия, позволяющие получать наночастицы с минимальным размером и максимальным содержанием препаратов. Полученные наночастицы обладали средним диаметром не больше 250 нм и дзета-потенциалом -17 мВ.

Синтезированные наночастицы с помощью оптимизированной методики далее будут исследованы в экспериментах *in vitro* для определения комбинационного индекса и подбора оптимального соотношения препаратов в наночастицах, позволяющего проводить эффективную комбинированную терапию злокачественных новообразований молочной железы.

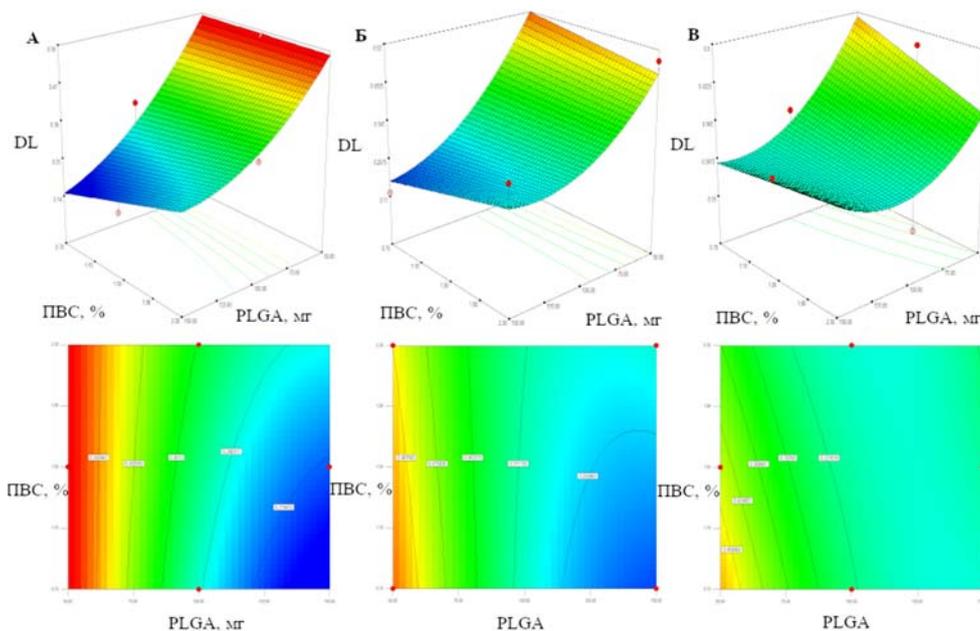


Рисунок 2. Графики поверхности отклика общего содержания (DL) в зависимости от массы PLGA и концентрации раствора ПВС.

Таким образом, был разработан и оптимизирован метод получения полимерных наночастиц, содержащих доксорубицин и вориностат. Были использованы планы Бокса-Бенкена для подбора наиболее подходящих условий получения наночастиц с оптимальными параметрами.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00293, <https://rscf.ru/project/22-25-00293/>

Распад нитрозильного комплекса железа с 3,4-дихлортиофенольными лигандами в модельной системе с глутатионом и муцином



Новикова В.О.¹, Покидова О.В.¹, Санина Н.А.^{1,2,3}

¹Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, г. Черноголовка

²Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва

³Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского государственного областного университета, г. Мытищи

В данной работе было исследовано влияние восстановленного глутатиона (GSH) и муцина на процесс трансформации нитрозильного комплекса железа (НКЖ) состава $[\text{Fe}_2(\text{SC}_6\text{H}_3\text{Cl}_2)_2(\text{NO})_4]$ (комплекс 1). НКЖ обладают широким спектром реакционной способности, обусловленной наличием в структуре двух функциональных фрагментов (NO-групп и лигандов различного строения) [1]. В комплексе 1 качестве тиолигандов выступают производные тиофенола, которые, согласно литературным данным, проявляют цитотоксическую активность, показанную в экспериментах на модели лейкемии [2]. Кроме того, тиофенол и некоторые его производные играют важную роль в защитной функции организма предотвращая развитие патологий печени

разной этиологии (алкогольной и неалкогольной природы) [3]. Это происходит за счет ингибирования белка СУР2Е1 — активного участника метаболизма ксенобиотиков.

Рассматриваемые в нашем исследовании муцин и GSH способны вступать во взаимодействие с НКЖ и его продуктами распада с образованием S-нитрозотиолов, также возможна замена исходных тиолигандов НКЖ на новые тиолатные лиганды [4]. Прежде чем железодинитрозильный фрагмент проникнет в кровь при пероральном введении, вероятно, он будет связан с богатым цистеинами фрагментом муцина — основного белка слизи желудочно-кишечного тракта.

Согласно данным УФ-вид-спектроскопии в исходном спектре комплекса 1 имеется максимум на 419 нм, который за первые полчаса смещается более чем на 20 нм в длинноволновую область спектра, далее максимум уширяется и появляется плечо на 500 нм.

В системе исследуемого комплекса с 3,4-дихлортиофенольными лигандами с GSH спектры кардинально меняются: появляются широкая полоса в районе 310 нм и на 360 нм, что характерно для биядерных НКЖ с алифатическими лигандами. Интенсивность поглощения уменьшается со временем, что указывает на постепенный распад образующегося НКЖ, кинетическая кривая выходит на плато за 16 ч.

Исходный спектр системы муцин-комплекс 1 имеет полосу на 409 нм, отличную от максимума в буферном растворе. При этом в процессе распада не происходит смещения полос, как мы ранее наблюдали для спектра в буфере. Комплекс начинает распадаться спустя полчаса от начала растворения и через 19 ч выходит на плато.

Используя реакцию Грисса для определения концентрации нитритов, которые накапливаются как продукты взаимодействия NO с кислородом в аэробных условиях, было определено, что при растворении комплекса 1 в присутствии глутатиона и без него уровень нитритов не отличается. В присутствии муцина нитритов накапливалось в 6-7 раз больше [5].

Таким образом, показано, что при распаде исследуемого комплекса играет важную роль биологическая среда. При включении муцина и глутатиона в биотрансформацию комплекса 1 они будут влиять на его процесс распада, в том числе на NO –донорную активность.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-73-10049, <https://rscf.ru/project/22-73-10049/>.

[1] Алдошин С. М., Санина Н. А, *Фундаментальные науки-медицине. Биофизические медицинские технологии*, 2015.

[2] R. P. Verma et al., *Chem Res Toxicol*, vol. 16, no. 3, pp. 276–284, Mar. 2003, doi: 10.1021/TX020103Q.

[3] R. Harjumäki et al., *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 8221, vol. 22, no. 15, p. 8221, Jul. 2021, doi: 10.3390/IJMS22158221.

[4] O. v. Pokidova et al., *J Inorg Biochem*, vol. 235, p. 111926, Oct. 2022, doi:10.1016/J.JINORGBIO.2022.111926.

[5] L. J. Ignarro, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol.90, pp.8103-8107, September 1993.

Получение наночастиц селена, стабилизированных фосфатом декстрана



**Огородников В.Э.^{1,2}, Пристромова Ю. И.¹, Едчик А. В.²,
Соломевич С.О.¹, Бычковский П.М.^{1,2}, Юркштович Т.Л.^{1,2}**

¹НИИ физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск

²Учебно-научно-производственное республиканское унитарное предприятие УНИТЕХПРОМ БГУ, Минск

Селен является незаменимым микроэлементом, суточная потребность в котором для человека составляет 70-100 мкг. Селен в организме взаимодействует с витаминами, ферментами и биологическими мембранами, участвует в регуляции обмена веществ, в обмене жиров, белков и углеводов, а также в окислительно-восстановительных процессах. Считается, что селен может играть определенную роль в профилактике онкологических заболеваний благодаря его антиоксидантным свойствам, влиянию на репарацию ДНК, апоптоз, эндокринную и иммунную системы [1]. Соединения селена защищают клеточные мембраны от воздействия свободных радикалов и предотвращают генерирование, снижая риск возникновения опухолей и развития болезней сердца и кровеносных сосудов [2].

Одной из наиболее перспективных форм селена для применения в медицине является наноразмерный селен, проявляющий по сравнению с другими формами гораздо более низкую токсичность, что позволяет применять его в дозах, значительно превышающих суточную потребность. Кроме того, наноселен обладает размерным эффектом: частицы меньших размеров биологически активнее и лучше накапливаются в тканях [3]. В работе [4] показано, что наноразмерный селен не только предотвращает, но и приостанавливает развитие злокачественных опухолей.

Таким образом, учитывая низкую токсичность и противоопухолевую активность, наноразмерные частицы селена имеют большие перспективы для создания на их основе систем адресной доставки противоопухолевых препаратов в организм, где их действие может потенцироваться свойствами самого селена [5].

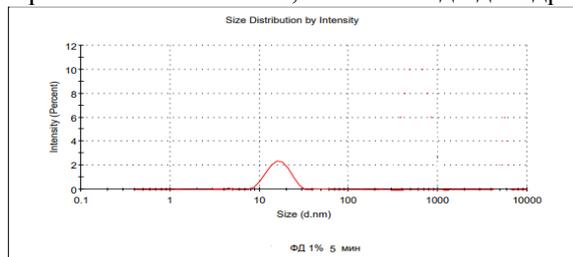
В многочисленных научных публикациях отмечается низкая стабильность чистых наночастиц (НЧ) селена, их склонность к агрегации. Было показано, что для получения стабильных частиц селена необходимо добавление стабилизирующих агентов на биологической основе, например, ПАВ полисахаридов, белков [6]. Полисахариды имеют сложную разветвленную структуру и активные гидроксильные группы, которые могут служить мягкими матрицами для синтеза НЧ селена и помогать контролировать размер генерируемых наноматериалов. Доказано, что размер НЧ играет важную роль в их полезной биологической активности [7,8].

Следовательно, очень важно изучить влияние различных полисахаридов на размер и морфологию НЧ селена, чтобы далее разрабатывать системы доставки лекарств и самого селена на их основе для улучшения здоровья человека. В доступной литературе приводятся результаты исследований по стабилизации наноразмерных частиц селена с использованием природных полисахаридов - хитозана, карбоксиметилцеллюлозы, ряда простых эфиров целлюлозы. Однако эти исследования являются эпизодическими и не позволяют использовать их результаты для создания противоопухолевых препаратов на основе полимер-стабилизированных наноразмерных частиц селена.

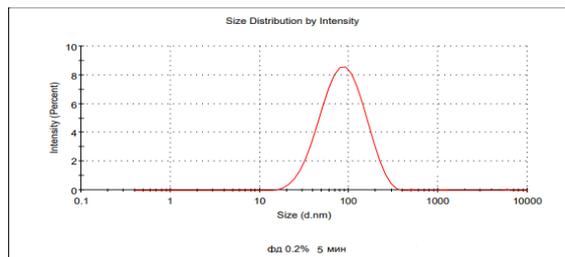
Для получения НЧ селена широко используемым способом является химическое восстановление селенистой кислоты в полимерных матрицах, позволяющих управлять размерами нанокластеров и НЧ. Для регулирования размеров НЧ применяют обработку растворов ультразвуком, облучение рентгеновским излучением, ультрафиолетовое облучение и использованием токов высокой частоты и т.д.

В данной работе в качестве стабилизирующей полимерной подложки при получении НЧ селена использовали водорастворимые фосфаты декстрана (ФД), полученные нами ранее [5]. Это обусловлено физико-химическими и медико-биологическими свойствами модифицированного полимера. Стоит отметить, что, в доступной литературе отсутствуют данные об использовании фосфатов полисахаридов для стабилизации наночастиц селена.

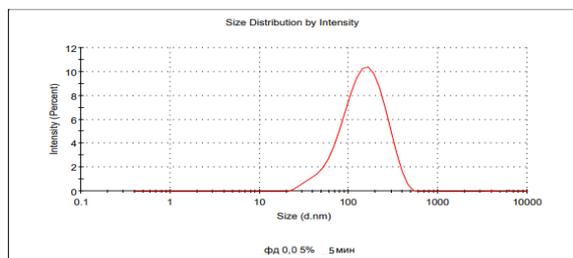
Селеносодержащие наноструктуры получали восстановлением 0,002 М селенистой кислоты 0,004 М аскорбиновой кислотой в растворах ФД. Восстановление селенистой кислоты аскорбиновой кислотой в водных растворах ФД приводит к образованию нуль-валентного селена и дегидроаскорбиновой кислоты. При формировании НЧ селена аскорбиновая кислота выступает в роли восстановителя, окисляясь до дегидроаскорбиновой кислоты.



а



б



в

Рисунок 1 – Размер НЧ селена через 5 минут после начала реакции, стабилизированных а) 1% ФД-4; б) 0,2% ФД-4; в) 0,05% ФД-4

В отсутствие стабилизаторов при восстановлении селенистой кислоты наблюдается изменение окраски коллоидного раствора от желтовато-оранжевой до красной. Образующийся при этом коллоидный раствор Se^0 нестабилен, и через 60 минут происходит агрегация частиц до микронных величин с образованием осадка красного селена.

При восстановлении селенистой кислоты в водных растворах ФД наблюдалось изменение окраски коллоидного раствора от желтовато-оранжевой до красной в зависимости от размеров формирующихся НЧ селена. Однородность формирующихся НЧ по размерам достигается благодаря тому, что макромолекулы ФД, обволакивая НЧ селена, создают вокруг них заряженную оболочку, препятствующую их агрегации за счет сил электростатического отталкивания.

Исследовано влияние молекулярной массы, степени замещения по фосфорнокислым группам, концентрации раствора ФД на процесс образования и размер НЧ селена через 5 минут после начала реакции при комнатной температуре. Установлено, что концентрация раствора ФД значительно влияет на размер образующихся НЧ селена (рисунок 1).

Как следует из рисунка 1, увеличение концентрации раствора ФД от 0,05 до 1% приводит к уменьшению среднего размер формирующихся НЧ селена от 150 до 17 нм.

Для изучения влияния молекулярной массы и содержания фосфорнокислых групп образцов ФД на формирование наночастиц селена использовались водорастворимые образцы ФД с характеристиками, представленными в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики образцов ФД.

Шифр образца фосфата декстрана	Mw, Da	Mn, Da	Содержание фосфора, ммоль/г
ФД-6	110000	51000	1.29
ФД-4	183000	68000	2.13

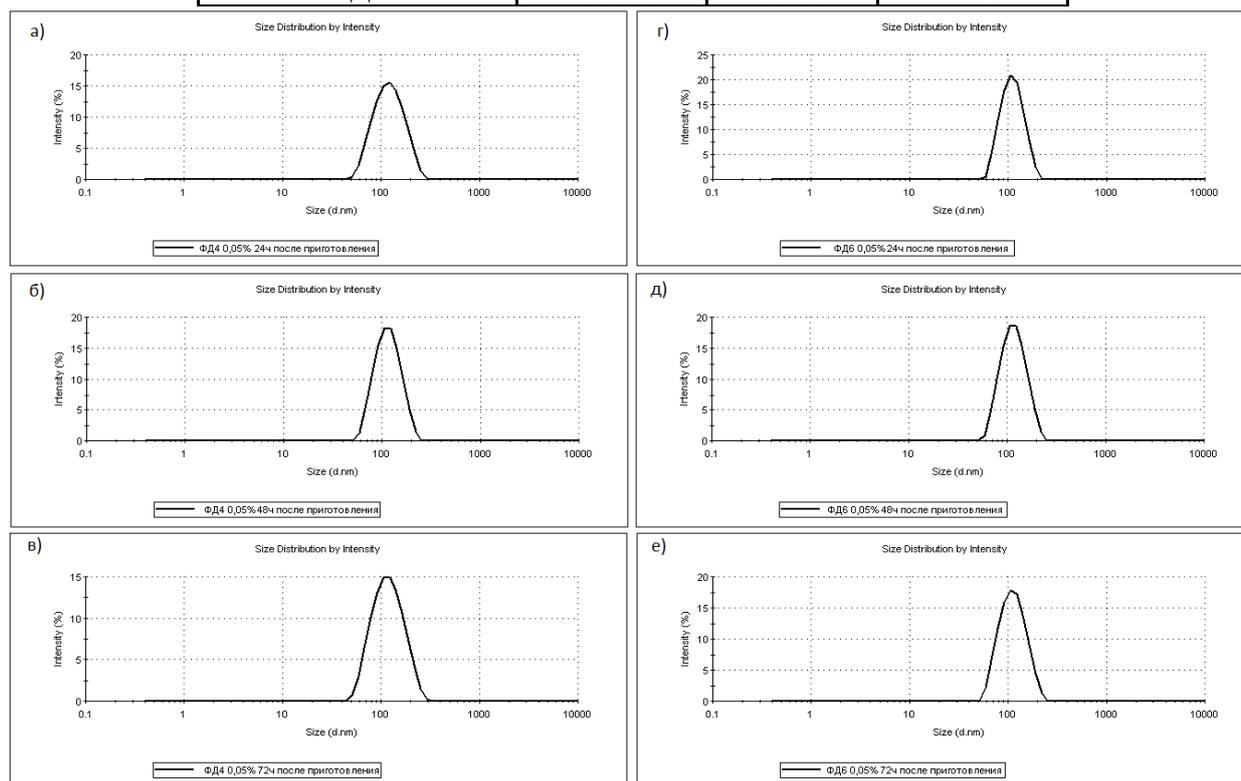


Рисунок 2 – Изменение размера НЧ селена в 0,05% растворе ФД-4 и ФД-6

Из рисунка 2 видно, что при проведении реакции восстановления селенистой кислоты аскорбиновой кислотой в 0,05% растворе ФД-4 и ФД-6 размер наночастиц практически не отличался и составил через 24, 48 и 72 часа – 126, 118 и 124 нм для ФД-4 и 113, 120 и 115 нм для ФД-6, соответственно.

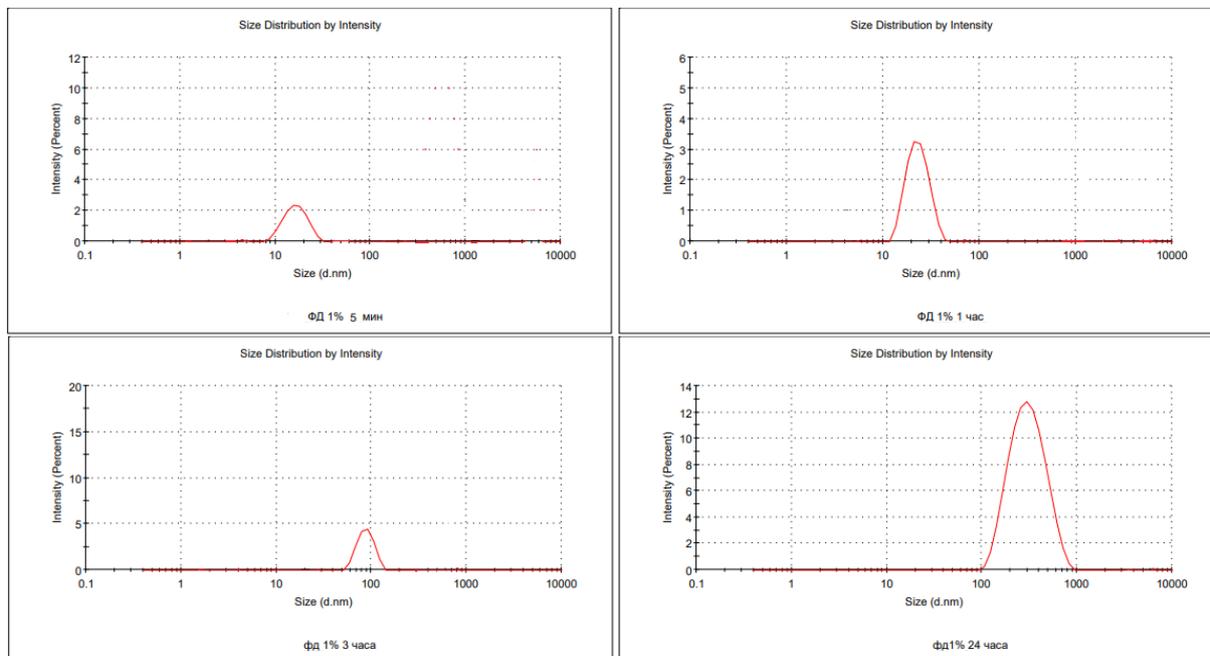


Рисунок 3 – Изменение размера НЧ селена в 1% растворе ФД-4

Стабильность НЧ селена во времени была изучена в зависимости от молекулярной массы, содержания фосфорнокислых групп и концентрации используемых в качестве стабилизаторов ФД.

Из рисунка 3 видно, что при проведении реакции восстановления селенистой кислоты аскорбиновой кислотой в 1% растворе ФД образующиеся в первые 5 минут от начала реакции частицы со средним размером 17 нм увеличиваются в размерах до 23 нм через 1 час, до 88 нм через 3 часа и до 323 нм через 24 часа.

При проведении реакции восстановления селенистой кислоты аскорбиновой кислотой в 0,2% растворе ФД средний размер начально формирующихся частиц (96 нм) оставался постоянным в течение 3-х часов и через 24 увеличился до 117 нм (рисунок 4).

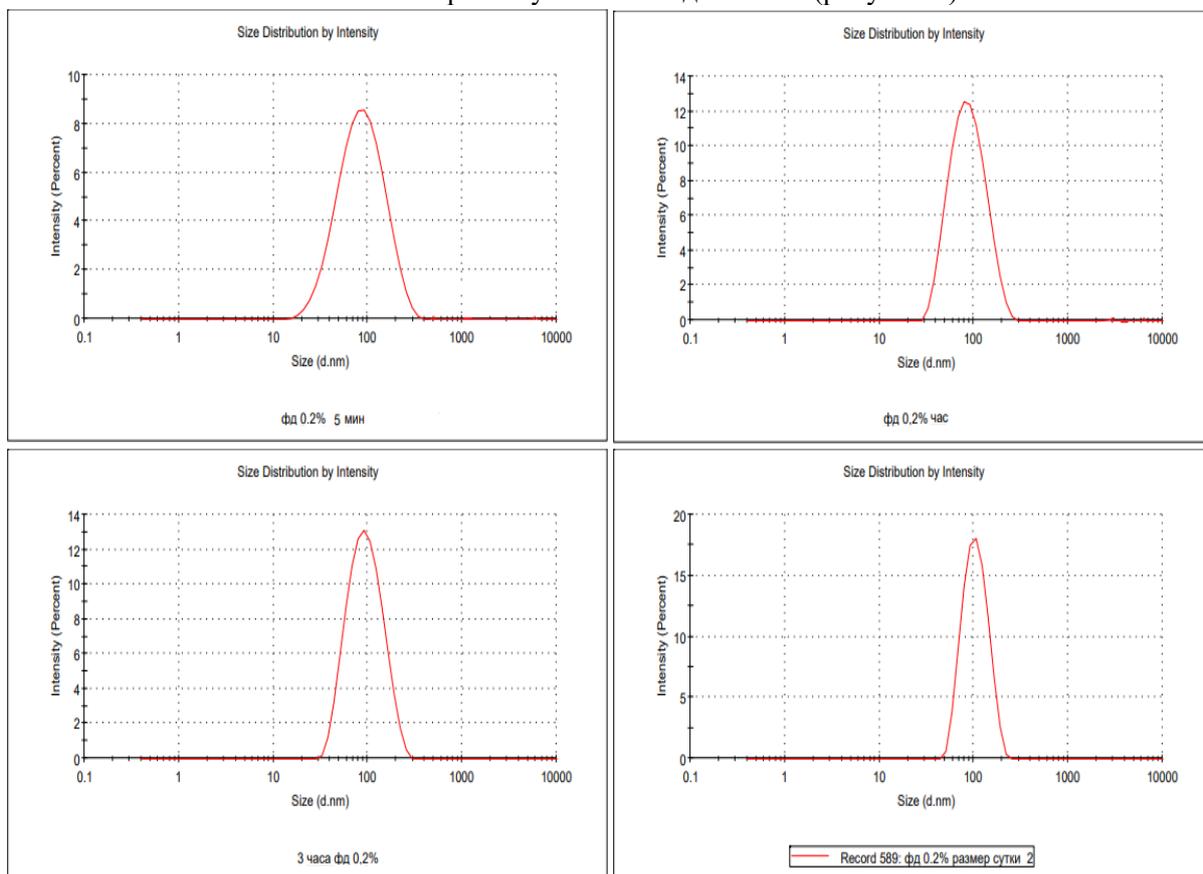


Рисунок 4 – Изменение размера НЧ селена в 0,2% растворе ФД-4

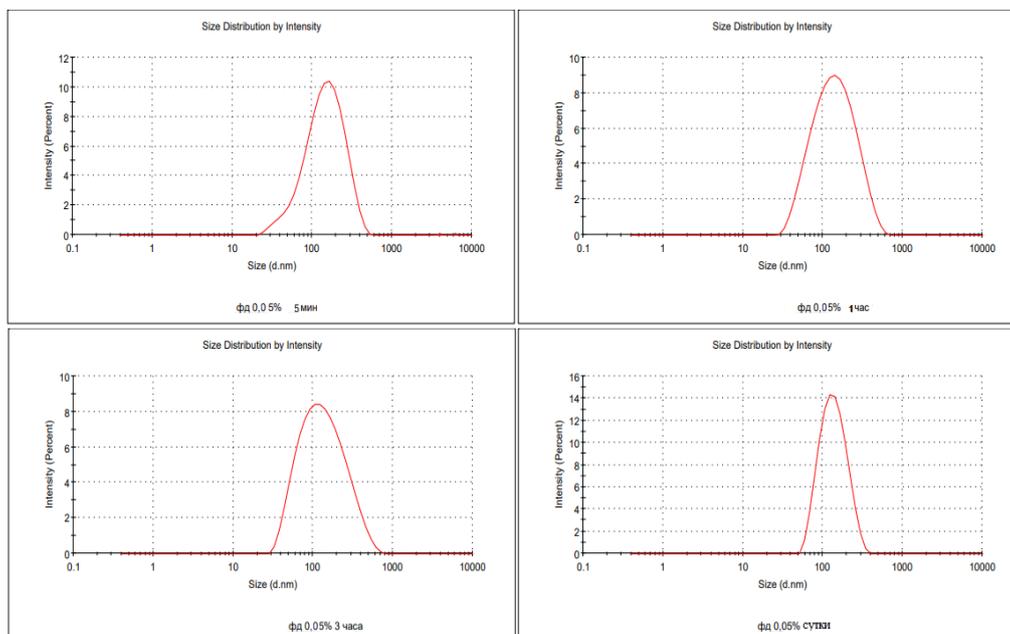


Рисунок 5 – Изменение размера НЧ селена в 0,05% растворе ФД-4

Размер формирующиеся в 0,05% растворе ФД частиц селена практически не изменился в течение всего периода наблюдения (рисунок 5) и составил через 5 минут 161 нм, через 1, 3 и 24 час – 160, 156 и 158 нм, соответственно.

Таким образом осуществлен синтез стабилизированных наночастиц селена путем химического восстановления катионов селена аскорбиновой кислотой в растворах полисахаридов. На основании результатов экспериментальных исследований можно заключить, что в зависимости от соотношений исходных компонентов и условий реакции возможно изменение размеров и форм стабилизированных наночастиц селена, формирующихся в водных растворах при химическом восстановлении Se^{4+} . Наиболее стабильные частицы формируются при использовании в качестве стабилизатора 0,05% раствор ФД. Молекулярная масса и содержание фосфорнокислых групп в образцах ФД не оказывает влияния на формирование наночастиц селена.

Результаты данной работы – первый шаг для дальнейшего изучения физико-химических свойств и потенциального использования полученных образцов в качестве основы для создания противоопухолевых препаратов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ibrahim, O. M., El-Deeb, N. M., Abbas, H., Elmasry, S. M., & El-Aassar, M. R. Alginate based tamoxifen/metal dual core-folate decorated shell: Nanocomposite targeted therapy for breast cancer via ROS-driven NF- κ B pathway modulation // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2020. – Vol. 146. – P. 119-131.
2. Ganipineni, L. P., Danhier, F., & Pr at, V. Drug delivery challenges and future of chemotherapeutic nanomedicine for glioblastoma treatment // *Journal of Controlled Release*. -2018. - Vol. 281. - P. 42-57.
3. Lan X., She J., Lin D., Xu Y., Li X., Yang W., Lui V.W.Y., Jin L., Xie X., Su Y. Microneedle-Mediated Delivery of Lipid-Coated Cisplatin Nanoparticles for Efficient and Safe Cancer Therapy // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. -2018. – Vol. 10. – P. 33060-33069.
4. Chen J.X., Liang Y., Liu X, Huang J., Chen J.H. Fabrication of doxorubicin and heparin co-loaded microcapsules for synergistic cancer therapy // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2014. – Vol. 69. - P. 554-560.
5. Solomevich S.O., Bychkovsky P.M., Yurkshtovich T.L., Golub N.V., Mirchuk P.Yu., Revtovich M.Yu., Shmak A.I. Biodegradable pH-sensitive prospidine-loaded dextran phosphate based hydrogels for local tumor therapy, *Carbohydrate Polymers*, Volume 226, 2019, 115308.
6. Rezaei S.J.T., Sarijloo E., Rashidzadeh H., Zamani S., Ramazani A., Hesami A., Mohammadi E. pH-triggered prodrug micelles for cisplatin delivery: Preparation and In Vitro/Vivo evaluation // *React. Funct. Polym.* – 2020. – Vol. 146. - 104399.
7. Wu H., Li X., Liu W., Chen T., Li Y. Surface decoration of selenium nanoparticles by mushroom polysaccharides–protein complexes to achieve enhanced cellular uptake and antiproliferative activity // *Journal of Materials Chemistry*. – 2012. – Vol. 22. - P. 9602-9610.
8. Li S., Bian F., Yue L., Jin H., Hong Z., Shu G. Selenium-dependent antitumor immunomodulating activity of polysaccharides from roots of *A. membranaceus* // *International Journal of Biological Macromolecules*. - 2014. – Vol. 69. – P. 64-72.

Моделирование реакций сопряженного переноса электрона и протона во флавин-связывающих ферментах

К. В. Одинцов, Т. М. Домрачева

Химический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

В работе проведены квантово-химические расчеты реакций сопряженного переноса электрона и протона, протекающие в двух флавин-связывающих ферментах – фотолиазе и монооксигеназе EncM. Для проведения квантово-химических расчетов использовали программу Firefly (<http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>). В обоих изучаемых реакциях восстановленный флавин рассмотрен как донор электрона. Сравнение полученных энергетических характеристик позволяет сделать выводы о влиянии типа донора протона, которым в рассмотренных реакциях выступают аминокислотный остаток или флавин на скорость реакций сопряженного переноса электрона и протона. Ускорение реакции ожидается в случае протонированного остатка гистидина (His365) – донора протона в реакции, протекающей в ферменте фотолиазе (Рис. 1). В случае, когда флавин выступает донором электрона и протона в реакции активации молекулярного кислорода оксигеназами и монооксигеназами (Рис. 2), процесс приводит к существенному повышению энергии молекулярного комплекса. Результаты работы будут использованы для разработки многомасштабных моделей реакций, катализируемых флавин-связывающими ферментами.

Работа выполнена при поддержке РФФ 22-23-00418 и РФФ 22-13-00012.

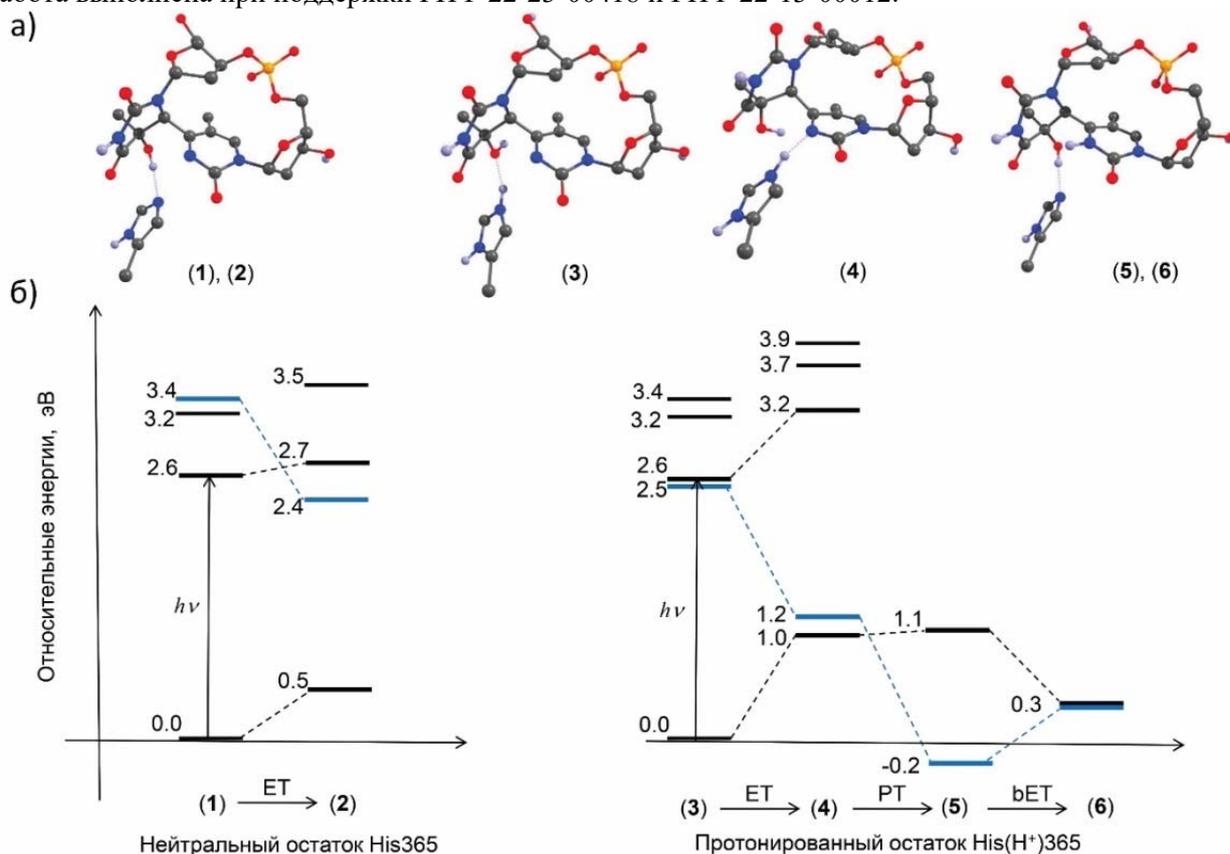


Рис 1. Перенос электрона и протона в модели активного центра фотолиазы. а) Изменение взаимодействия фотодимера ДНК и боковой цепи His365 в оптимизированных геометриях (1)-(6). Геометрии (1), (3), (6) оптимизировали в состоянии восстановленного флавина, геометрии (2), (4), и (5) оптимизировали в состоянии радикальной пары. Оптимизацию геометрии проводили методом теории функционала плотности B3LYP(D3) /cc-pVDZ. б) Энергии основного и возбужденных электронных состояний в оптимизированных геометриях, рассчитанные методом ХМCQDPT2/cc-pVDZ. Энергии, выделенные синим цветом, соответствуют переносу электрона от восстановленного флавина к фотодимеру ДНК. Энергия фотовозбужденного флавина указана вертикальной стрелкой.

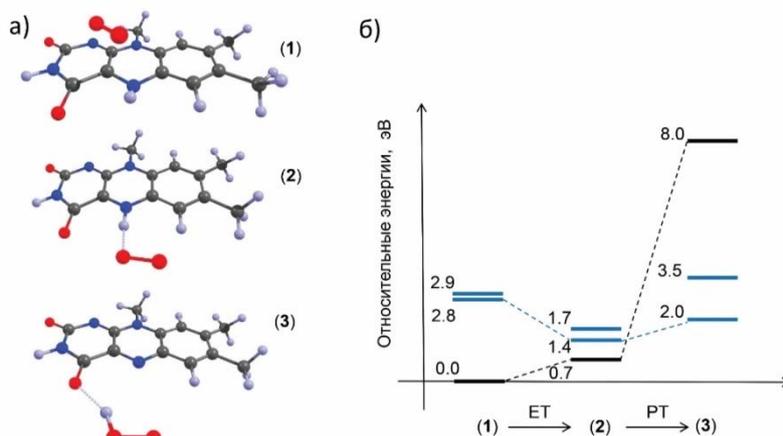


Рис. 2. Энергии переноса электрона и протона от восстановленного флавина к молекуле O_2 . Рассмотрена минимальная модель, для которой в дальнейшей планируется провести сравнения с моделями активных центров ферментов монооксигеназ. а) взаимное расположение флавина и O_2 (O_2H) в оптимизированных геометриях. Геометрия (1) оптимизирована в восстановленного флавина, геометрии (2) и (3) оптимизированы в состоянии радикальной пары. Оптимизацию геометрии проводили методом CASSCF(2e, 3mo)/6-31+G**. б) Энергии основного и возбужденных электронных состояний в оптимизированных геометриях, рассчитанные методом ХМCQDPT2/6-31+G**. Энергии, выделенные синим цветом, соответствуют переносу электрона от восстановленного флавина к молекуле кислорода. Оценки энергии сопряженного переноса электрона и протона между флавином и молекулой кислорода существенно зависят от выбранного квантово-химического метода. Так, результаты, полученный методом теории функционала плотности PBE0(D3) (не представлены на рисунке), указывают на понижение энергии комплекса при переносе атома водорода от флавина к O_2 .

Создание высокоэффективных перовскитных солнечных элементов путем модификации светопоглощающего слоя биополимерами



**Петрова В.И., Козлов С.С., Алексеева О.В.,
Никольская А. Б., Шевалеевский О.И.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской Академии наук, г. Москва*

Гибридные перовскитные солнечные элементы (ПСЭ) являются солнечными фотопреобразователями нового поколения на основе органо-неорганических галогенпльмбатов $APbI_3$ (где А – катионы $CH_3NH_3^+$, $HC(NH_2)_2^+$, Cs^+), которые характеризуются выдающимися оптоэлектронными свойствами и простыми методами изготовления, основанными на нанесении растворов на стеклянную/полимерную подложку [1]. Однако, по мере образования светопоглощающего поликристаллического перовскитного слоя, в нем неизбежно образуются дефекты (некоординированные атомы Pb, катионные вакансии, межузельные атомы), которые драматическим образом влияют на оптоэлектронные характеристики перовскитного материала, его стабильность и эффективность работы ПСЭ. Решение этих проблем возможно с помощью различных методов пассивации дефектов, что позволит увеличить эффективность и стабильность ПСЭ на основе органо-неорганических галогенпльмбатов.

Подходы, направленные на снижение числа дефектов в ПСЭ, включают в себя в том числе такие способы, как включение в архитектуру СЭ дополнительных буферных слоев или допирование самого перовскитного слоя молекулами разных классов веществ [2]. В последнее время, чтобы стабилизировать перовскитную структуру, пассивировать поверхностные дефекты и увеличить влаго- и термостойкость ПСЭ в условиях внешней среды, стали использовать различные синтетические полимеры [3,4]. Такой подход позволяет получить перовскитную пленку с более плотной кристаллической упаковкой и укрупненными кристаллитами, что благоприятно сказывается на эффективности и стабильности перовскитных солнечных элементов.

В данной работе была исследована модификация ПСЭ путем введения в светопоглощающий перовскитный слой молекул «зеленых» полимеров - полисукцинимида (ПСИ) и полиаспартата калия (ПАСК). Эти полимеры были получены простым методом термической поликонденсации L-аспарагиновой кислоты при 240 °С (см. Рис. 1) и дальнейшей обработкой водным раствором КОН.

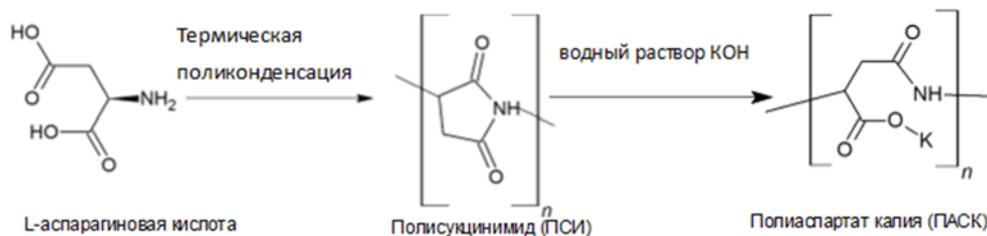


Рис. 1. Схема синтеза полисукцинимида (ПСИ) и полиаспартата калия (ПАСК).

Нанесение перовскитных пленок и создание ПСЭ проводилось на открытом воздухе при относительной влажности около 30%. Раствор $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{I}$ и PbI_2 в смеси диметилформамида и N-метилпиrolлидона (4:1 v/v) с добавлением ~1% воды наносился на поверхность фотоэлектрода FTO-стекло/ $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ методом центрифугирования (spin-coating) с последующим отжигом при 60°C в течение 5 минут и 120°C в течение 10 мин. Далее поверх перовскитного слоя наносился слой с дырочной проводимостью (Spiro-MeOTAD). Формирование задних токосъёмных контактов толщиной около 50 нм проводилось методом термического испарения золота в вакууме. Методика изготовления модифицированных образцов ПСЭ отличалась добавлением полимеров (ПСИ, ПАСК) в раствор перовскита в количестве 0.01% от массы сухого вещества. Всего для каждой из трех серий (Ref, PSI, PASP) было изготовлено по 10 образцов ПСЭ. Измерения фотоэлектрических параметров ПСЭ проводились с использованием установки на основе имитатора солнечного излучения и универсального анализатора Keithley 4200-SCS. Были проведены измерения фотоэлектрических параметров ПСЭ (ток короткого замыкания J_{SC} , напряжение холостого хода V_{OC} , фактор заполнения FF, КПД) для созданных ПСЭ при стандартных условиях освещения AM1.5 (1000 Вт/м²) и в диапазоне освещенностей 10 – 1000 Вт/м². Микроструктуру перовскитных слоев изучали методом сканирующей электронной микроскопии (микроскоп Hitachi SU8000), оптоэлектронные свойства перовскитных слоев были изучены методом ИК-спектроскопии (Perkin-Elmer Spectrum Two).

На ИК-спектрах перовскитных пленок контрольных образцов (Ref) и образцов, модифицированных ПСИ (PSI) можно видеть главные пики, которые относятся к колебательным модам органического катиона (Рис. 2). В интервале 3300 - 2900 cm^{-1} наблюдаются валентные колебания связи N-H, связанных с NH_3^+ -группой катиона метиламмония. Другие пики относятся к следующим колебательным модам MAPbI_3 : асимметричный изгиб NH_3^+ (1582 cm^{-1}), симметричный изгиб NH_3^+ (1468 cm^{-1}), асимметричный изгиб CH_3 (1422 cm^{-1}), деформационные колебания групп $\text{CH}_3\text{-NH}_3^+$ (1250 и 910 cm^{-1}) и C-N (960 cm^{-1}). Введение ПСИ в перовскитный слой не приводит к смещению основных вибрационных полос, характерных для MAPbI_3 .

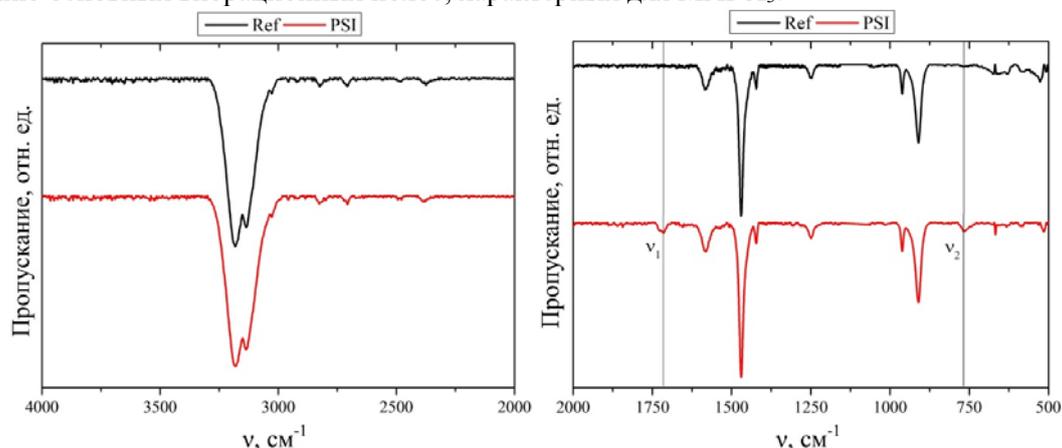


Рис. 2. ИК-спектры с преобразованием Фурье для контрольных (Ref) и модифицированных полисукцинимидом (PSI) перовскитных пленок.

Характеристические колебания ПСИ обычно проявляются на 1791 и 1727 cm^{-1} (сукцинимидный фрагмент, имидный цикл), 1393 (растяжение связи C-N) и 1163 cm^{-1} (C-C). Добавление полисукцинимида к перовскитному материалу привело к появлению полосы на 1716

cm^{-1} (ν_1), являющейся характерической для валентных колебаний $\text{C}=\text{O}$, что свидетельствует об успешном внедрении ПСИ в перовскитную пленку. Кроме того, отсутствие полосы на 1791 cm^{-1} в ИК-спектре модифицированной полисукцинимидом перовскитной пленки может служить доказательством частичного раскрытия имидного цикла. Можно предположить, что добавление ПСИ инициирует химическое взаимодействие между полимером и перовскитом, обеспечивая пассивацию дефектов на границах раздела между кристаллитами.

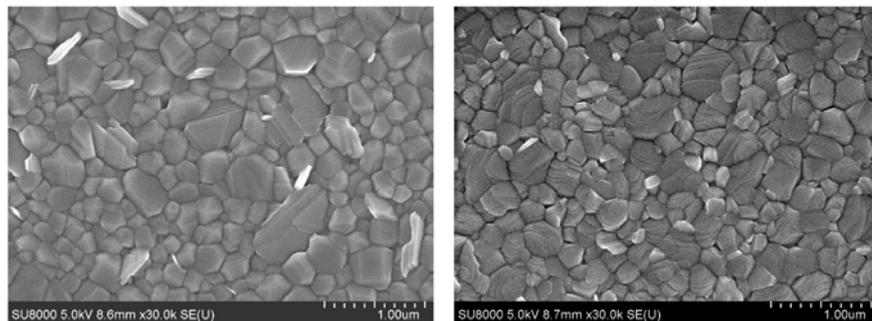


Рис. 3. Электронные микрофотографии для контрольных (слева) и модифицированных полисукцинимидом (справа) перовскитных пленок.

На рисунке 3 приведены электронные микрофотографии, полученные для контрольных и модифицированных ПСИ перовскитных пленок. Видно, что модифицированная ПСИ перовскитная пленка характеризуется более плотной упаковкой кристаллитов и меньшим количеством дефектов по сравнению с контрольной.

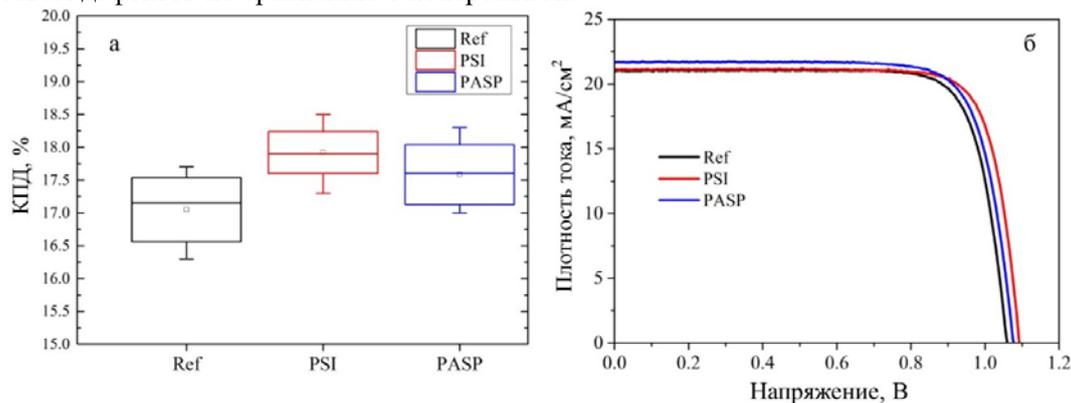


Рис. 4. а) Статистические данные по КПД для исследованных серий ПСЭ; б) Вольтамперметрические характеристики для лучших образцов ПСЭ из каждой серии.

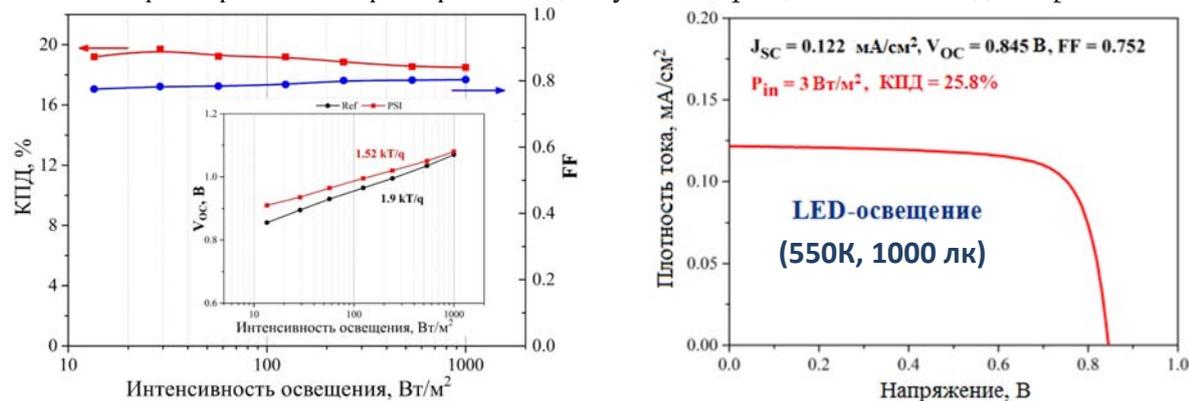


Рис. 5. Зависимость КПД и фактора заполнения (FF) от интенсивности освещения для ПСЭ, модифицированного ПСИ. Встроенный график: зависимость напряжения холостого хода (V_{OC}) от интенсивности освещения для ПСЭ контрольной серии (Ref) и модифицированного ПСИ (PSI).

Рис. 6. Вольтамперметрическая характеристика и значения основных фотоэлектрических параметров для ПСЭ, модифицированного ПСИ, полученные в условиях искусственного светодиодного освещения.

Добавление как ПСИ, так и ПАСК в перовскитный слой приводит к увеличению средних значений КПД (17.9% и 17.6%, соответственно) по сравнению с соответствующим значением для серии контрольных образцов (17.1%). Лучшие значения КПД для перовскитных солнечных

элементов, модифицированных ПСИ (18.5%) и ПАСК (18.2%), были выше по сравнению с данными, полученными для контрольных образцов (17.7%). Кроме того, первые характеризуются большей квантовой эффективностью по сравнению со вторыми, чем объясняется повышение тока короткого замыкания по сравнению с контрольными образцами (Рис. 4б).

Для ПСЭ, модифицированных полисукцинимидом, в условиях низкой освещенности (менее 100 Вт/м²) наблюдалось увеличение значений КПД до 20% по сравнению с данными, полученными при стандартных условиях AM1.5G (Рис. 5). Кроме того, график зависимости напряжения холостого хода (V_{oc}) от логарифма интенсивности освещения характеризуется меньшим углом наклона (1.52 кТ/л) по сравнению с аналогичной зависимостью для стандартных образцов ПСЭ (1.9 кТ/л). Полученные результаты свидетельствуют об эффективном подавлении рекомбинации, связанной с поверхностными дефектами на границах раздела между кристаллитами, что обеспечивается пассивирующим действием ПСИ [4].

Кроме того, модифицированные полисукцинимидом ПСЭ демонстрируют высокую эффективность работы в условиях искусственного LED-освещения (5500 К, 1000 лк) со значениями КПД, превышающими 25% (Рис. 6). Такой эффект, обнаруженный для образцов ПСЭ, модифицированных полисукцинимидом, свидетельствует, что пассивация дефектов играет ключевую роль в достижении высокой эффективности преобразования световой энергии в условиях низкой освещенности и искусственного светодиодного освещения.

В результате проделанной работы установлена возможность координационного взаимодействия гибридного перовскитного материала ($CH_3NH_3PbI_3$) с такими полимерами как ПСИ и ПАСК, что приводит к улучшению фотовольтаических параметров перовскитных солнечных элементов. Максимальное значение КПД (18.5%) было получено для перовскитных СЭ, модифицированных ПСИ. Пассивация поверхностных дефектов перовскитных пленок с помощью полисукцинимидов обеспечивает эффективную работу ПСЭ в условиях низкой освещенности и при искусственном светодиодном освещении (5500К, 1000 лк). В условиях LED-освещения максимальная эффективность ПСЭ составила 25.8%.

Список литературы

1. Nayak P. K., Mahesh S., Snaith H. J., Cahen D. Photovoltaic solar cell technologies: analyzing the state of the art// Nature Rev. Mater. 2019. V.4. P. 269. DOI: 10.1038/s41578-019-0097-0
2. Zhang F., Zhu K. Additive engineering for efficient and stable perovskite solar cells // Adv. Energy Mater. 2020. V.10., 1902579. DOI: 10.1002/aenm.201902579
3. Zuo L., Guo H., deQuilettes D. W., Jariwala S., De Marco N., Dong S., DeBlock R., Ginger D. S., Dunn B., Wang M., Yang Y. Polymer-modified halide perovskite films for efficient and stable planar heterojunction solar cells// Sci. Adv. 2017. V.3., e1700106. DOI: 10.1126/sciadv.1700106
4. Han T.-H., Lee J.-W., Choi Ch., Tan S., Lee Ch., Zhao Y., Dai Zh., De Marco N., Lee S.-J., Bae S.-H., Yuan Y., Lee H. M., Huang Y. & Yang Y. Perovskite-polymer composite cross-linker approach for highly-stable and efficient perovskite solar cells// Nature Communications, 2019. V.10., 520. DOI: 10.1038/s41467-019-08455-z

Влияние нитрозильных комплексов железа с ароматическими тиолигандами на активность Ca^{2+} -АТФазы и фосфодиэстеразы



**Покидова О.В.¹, Татьяненко Л.В.¹, Горячев Н.С.^{1,2}, Козуб Г.И.¹,
Кондратьева Т.А.¹, Санина Н.А.^{1,2,3}**

¹Федеральный исследовательский центр проблем химической физики
и медицинской химии РАН, г. Черноголовка

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, г. Москва

³Научно-образовательный центр «Медицинская химия» Московского
государственного областного университета, г. Мытищи

Монооксид азота (NO) является важной сигнальной молекулой, регулирующей различные физиологические процессы [1]. При его недостаточной выработке эндотелиальными клетками используются экзогенные доноры NO. Среди известных в настоящее время доноров NO особое место занимают нитрозильные комплексы железа с функциональными серосодержащими лигандами (НКЖ) [2]. В условиях *in vivo* НКЖ и продукты их распада будут реагировать со множеством мишеней, в том числе с низкомолекулярными тиолами, SH- и гемсодержащими белками и т.д. С этой точки зрения целью настоящей работы является анализ влияния НКЖ на

ключевые ферментативные системы живых организмов - фосфодиэстеразу (ФДЭ) и Ca^{2+} -АТФазу саркоплазматического ретикулула (СР). Исследования проводились с перспективными представителями данного класса соединений: моноядерными нитрозильными комплексами $(\text{CH}_3)_4\text{N}[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]\cdot\text{CH}_2\text{Cl}_2$, где R= 4-нитрофенил (комплекс 1) [3], и $(\text{N}_2\text{H}_5)^+[\text{Fe}(\text{SR})_2(\text{NO})_2]^-$, где R= 2-меркапто-5-нитропиридинил (комплекс 2) [4], а также биядерным нитрозильным комплексом $[\text{Fe}_2(\text{SR})_2(\text{NO})_4]$, где R=m-гидроксифенил (комплекс 3) [5]. Данные НКЖ эффективно генерируют NO в водных растворах, а также обладают цитотоксической (линия глиомы человека A-172 высокочувствительна к комплексу 1, а комплекс 2 активен на клеточных линиях рака толстой кишки LS174T, рака яичников SKOV3 и немелкоклеточного рака легкого A549) и антибактериальной активностью (комплекс 3).

Установлено, что данные соединения, в отличие от тиолигандов, входящих в их состав, эффективно ингибируют функции ФДЭ и Ca^{2+} -АТФазы СР в диапазоне концентраций 0.1 мМ-0.01 мМ. Показано, что комплексы конкурентно тормозят активность ФДЭ и неконкурентно ингибируют гидролитическую функцию Ca^{2+} -АТФазы СР, рассчитаны константы ингибирования. Наиболее сильное ингибирующее действие среди данных НКЖ на активность ФДЭ во всех исследуемых концентрациях показал комплекс 1 (константа ингибирования равна $2.3 \cdot 10^{-6}$ М); на Ca^{2+} -АТФазу СР - комплекс 3 (константа ингибирования равна $1.1 \cdot 10^{-5}$ М). Кроме того, установлено, что все исследуемые НКЖ разобщают гидролитическую и транспортную функции Ca^{2+} -АТФазы СР в концентрациях 0.01 и 0.001 мМ. Наиболее выражено этот эффект наблюдается для комплекса 2.

Таким образом, полученные данные позволяют рекомендовать исследуемые НКЖ для дальнейшего изучения в качестве потенциальных лекарственных препаратов, обладающих антигипертензивной, антиагрегационной и вазодилаторной активностью.

Работа выполнена по теме Государственного задания, № гос. регистрации № АААА-А19-119071890015-6.

Литература

- [1] L. J. Ignarro, *J. Physiol. Pharmacol.*, 2002, 53, P. 503.
 [2]] A. F. Vanin, *Dinitrosyl Iron Complexes as a "Working Form" of Nitric Oxide in Living Organisms*, Cambridge Scholars Publishing, UK, 2019, 265 pp.
 [3] N. A. Sanina, G. I. Kozub, T. A. Kondrat'eva, D. V. Korchagin, G. V. Shilov, R. B. Morgunov, N. S. Ovanesyan, A. V. Kulikov, T. S. Stupina, A. A. Terent'ev, S. M. Aldoshin, *J. Mol. Struct.*, 2022, 1266, P. 133506
 [4] N. A. Sanina, G. I. Kozub, O. S. Zhukova, D. V. Korchagin, T. A. Kondrat'eva, R. B. Morgunov, A. D. Talantsev, N. S. Ovanesyan, A. V. Kulikov, S. M. Aldoshin, *J. Mol. Struct.*, 2019, 1181, P. 321
 [5] G. I. Kozub, N. A. Sanina, N. S. Emel'yanova, A. N. Utenishev, T. A. Kondrat'eva, V. N. Khrustalev, N. S. Ovanesyan, N. E. Kupchinskaya, S. M. Aldoshin, *Inorganica Chim. Acta.*, 2018, 480, P. 132

Моделирование взаимодействия флавина, урацила и молекулярного кислорода в активном сайте белка RutA с помощью молекулярной динамики с квантовыми потенциалами



**И.В. Поляков^{1,2}, А.В. Немухин^{1,2}, Т.М. Домрачева¹,
А.М. Кулакова¹, Б.Л. Григоренко^{1,2}**

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва

Белок RutA – флавиновая монооксигеназа, которая катализирует первую стадию (Рис. 1Б) деградации урацила в аммиак, диоксид углерода и гидроксипропионовую кислоту (Рис.1А). Катализируемая RutA стадия включает синтез 3-уреидоакрилата из пириимидина [1].

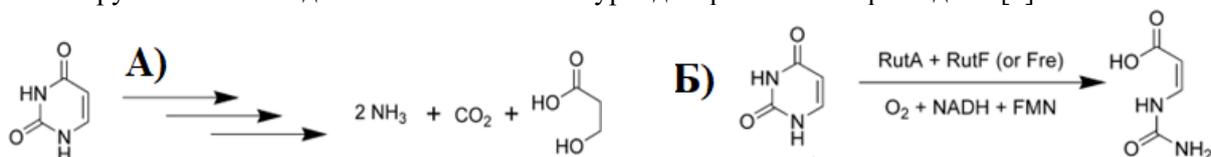


Рис. 1 Схема реакционного пути ферментативного окисления урацила.

Моделирование взаимодействия белков с различными низкомолекулярными соединениями чаще всего необходимо в задачах предсказания новых лекарственных препаратов, и обычно описывается в рамках классических силовых полей, тогда как применение квантовых методов пока крайне ограничено [2]. Наша задача состояла в моделировании трёхмерной полноатомной структуры комплекса белка RutA с восстановленным флавином (FL^{red}) в форме флавинмононуклеотида (FMN), а также молекулярным кислородом и урацилом, при этом начальные координаты тяжёлых атомов были взяты из кристаллографической структуры PDB ID: 6TEG [3]. В данной работе, наряду с методом классической молекулярной динамики, мы также рассчитываем молекулярно-динамические траектории с квантовыми потенциалами (ω 97X-D3/6-31+G**), поскольку рассматриваемые реагенты включают молекулярный кислород в триплетном состоянии (изначально), а сама реакция подразумевает перенос заряда с восстановленной формы флавина на кислород, что невозможно описать в рамках классических потенциалов силовых полей. Расчёты проводились с помощью программ NAMD [4] и TeraChem [5], используя исправленную версию интерфейса [6] между ними.

Полученные результаты показали 5 возможных полостей для локализации молекулярного кислорода - из них две находятся в непосредственной близости от флавинового кольца и урацила. Одна из них совпадает с полостью, положение кислорода в которой полагается в рамках структуры 6TEG[3] сбоку от FMN рядом с Asn134 и Thr105, однако, при этом кислород в модели находится на расстоянии более 3Å (N5-O) от флавинового кольца, что значительно отличается от предполагаемых в экспериментальной интерпретации 2.1Å; при этом в рассмотренных нами структурах как N5-OOH пероксида, так и N5-O оксида, расстояние N5-O значительно короче (~1.5Å). Можно предположить, что если наблюдаемая в эксперименте плотность и относится к кислороду рядом с N5 атомом флавина, то она соответствует смеси рефлексов от свободного кислорода и ковалентного соединения. При этом в рамках динамики в триплетном электронном состоянии, используя неограниченный метод теории функционала плотности, мы не заметили структур со значительным переносом заряда на молекулу O_2 . Отдельной проблемой также является удалённость кислорода от урацила в первой полости, что делает реакцию флавин-кислородного интермедиата с урацилом затруднительной стерически. При этом, в случае рассмотрения закрытой синглетной оболочки, система приходила не к N5-O продукту, а к C6-пероксиду.

В противоположность этому результату, при рассмотрении динамики системы во второй полости, когда молекулярный кислород располагается непосредственно над флавиновым фрагментом, легко прийти к такой конфигурации, когда в триплетном состоянии заряд переносится с FMN на O_2 . Этому явно крайне способствует стоящая рядом положительно заряженная боковая цепь остатка Lys69, которая в рамках 110пс траектории с квантовыми потенциалами может то создавать контакт с атомом O_2 (FMN), то с атомами молекулы O_2 , регулируя таким образом перемещение заряда в системе между FL^{red} и молекулярным кислородом (Рис. 2). При переходе из триплетной открытой оболочки в синглетную систему с закрытыми оболочками, получаемый интермедиат является хорошо известным [7] C4a-пероксидом.

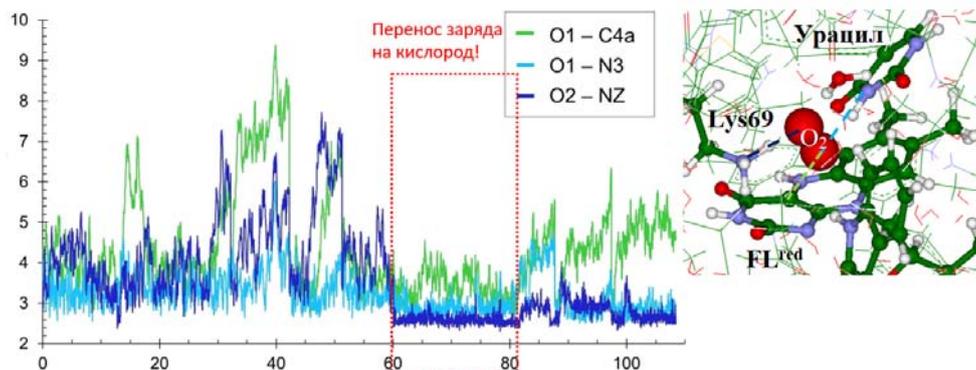


Рис. 2. Слева- изменение ключевых расстояний в динамике (ось абсцисс- время в пикосекундах, ординат- расстояние в Å), справа- демонстрация рассматриваемых остатков в виде шаростержневой модели с указанием ключевых расстояний O1-C4a, O1-N3, O2-NZ.

Работа выполнена с использованием ресурсов ЦКП МГУ имени М.В. Ломоносова [8] при поддержке фонда РФФ проект №22–13-00012.

Список литературы

1. T. Mukherjee, Y. Zhang, S. Abdelwahed, S. E. Ealick, T. P. Begley, *J. Am. Chem.Soc.* **2010**, 132, 5550–5551.

2. O.A. Arodola, M.E. Soliman, *Drug Des. Devel. Ther.* **2017**, 11, 2551–2564.
3. A. Matthews et al., *Nat. Chem. Biol.* **2020**, 16, 556–563.
4. M.C.R. Melo et al., *Nat. Methods* 2018, 15, 351–354.
5. S. Seritan et al., *WIREs Comput. Mol. Sci.* 2021, 11, e1494.
6. М.Г. Хренова, И.В. Поляков, А.В. Немухин, *Химическая физика* 2022, 41(6), 66-72.
7. P. Chaiyen, M.W. Fraaije, A. Mattevi, *Trends Biochem. Sci.* **2012**, 37, 373–380.
8. V.V. Voevodin et al., *Supercomput. Front. Innov.* **2019**, 6(2), 4–11.

Новые двумерные металл-углеродные структуры

Попов З. И.¹, Чичеватов Г. Д.^{1,2}, Суханова Е. В.¹

¹*Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва*

²*Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный*

Zipcool@bk.ru

Двумерные наноматериалы привлекают к себе особый интерес исследователей из-за возникающих новых свойств в двумерных структурах и множества возможных применений. Наиболее известным представителем таких материалов является графен [1], экспериментальное получение которого в 2004 году привело к исследованию наноматериалов различного состава. Для расширения областей возможного применения графена необходимо разработать методы и подходы, позволяющие контролируемо изменять его свойства согласно заданным целям. Управлять свойствами графена можно, например, искусственно создавая стабильные дефекты в структуре материала [2], применяя молекулярную функционализацию [3] или комбинируя данные подходы. Известно, что на поверхности графена могут образовываться различные дефекты, многие из которых приводят к появлению пятичленных углеродных колец в структуре наноматериала, например, вакансии, дивакансии, дефекты Стоуна-Уэйлса. Это позволяет предположить существование двумерных аллотропных форм углерода, состоящих из комбинации 5, 6 и 8 членных колец, в вершинах которых будут находиться атомы углерода. Изменение свойств предполагается путем создания сэндвичевых структур, где между слоями углерода будет находиться атом переходного металла. Ранее были предложены новые динамически стабильные двумерные металлоценоподобные структуры, названные *m*-M₂Cp₂ и *t*-M₂Cp₂ [4], содержащие атомы переходных металлов (M = Fe, Co), основанные на графеновых аллотропах Octite M1 [5] и New 17 [6]. Особенность данных двумерных наноматериалов заключается в том, что их структурным элементом являются ионы молекул металлоценов без атомов водорода. В представленной работе проведено исследование свойств ферроценоподобных структур (*m*-M₂Cp₂ и *t*-M₂Cp₂) с атомами переходных металлов. Все квантово-механические расчеты были выполнены с помощью метода функционала электронной плотности (DFT) [7,8], реализованного в программном пакете VASP [9–11]. Для исследования динамической стабильности исследуемых структур были рассчитаны спектры фононных колебаний с использованием программного пакета PHONOPY [12], показавшие, что из всех рассмотренных структур только *m*-VCp₂, *t*-CrCp₂, *t*-NiCp₂, *m*-NiCp₂ не обладают динамической стабильностью, о чем свидетельствует наличие мнимых частот колебаний в фононном спектре. Остальные рассмотренные металлоценоподобные структуры, а именно *m*-CrCp₂, *t*-VCp₂, *t*-FeCp₂, *m*-FeCp₂, *t*-CoCp₂, *m*-CoCp₂ являются динамически стабильными.

Структуры с атомами V, Cr, Co проявляют магнитные свойства, поэтому для исследования их электронных и магнитных свойств были проведены дополнительные расчеты с использованием метода GGA+U [14,15]. Были использованы различные значения параметра $U_{\text{eff}} \in [0,6]$ с интервалом в 1 эВ в рамках подхода Дударева [15]. Для каждой структуры было рассмотрено несколько возможных упорядочений магнитных моментов: ферромагнитное (FM) и два антиферромагнитных (AFM1, AFM2) состояний системы. В случае атомов ванадия для всех структур при рассмотренных значениях параметра U_{eff} было обнаружено, что основным состоянием является одна из антиферромагнитных конфигураций, в то время как для структур с кобальтом основным является ферромагнитное упорядочение магнитных моментов. В случае структуры *m*-CrCp₂ в зависимости от выбранного значения величины параметра U_{eff} основным состоянием системы может являться ферромагнитное (при $U_{\text{eff}} \in [0,1]$) или антиферромагнитное (при $U_{\text{eff}} \in [2,6]$) упорядочения магнитных моментов на атомах хрома. Экстремумы наблюдаются при U_{eff} равном 2

эВ, 1 эВ, 2 эВ для структур, содержащих атомы Cr, V и Co, соответственно, поэтому именно эти значения параметра U_{eff} были использованы для анализа электронных свойств данных структур.

Анализ электронных свойств показал, что при оптимальных значениях величины параметра U_{eff} кобальтосодержащие структуры проявляют свойства полуметаллических ферромагнетиков: для электронов с одним направлением спинов структура проявляет металлические свойства, в то время как для электронов с противоположным спином – полупроводниковые свойства с шириной запрещенной зоны 0.9 и 0.84 эВ для структур t-CoCr₂ и m-CoCr₂. Атомы ванадия в структуре t-MCr₂ обладают магнитным моментом, равным по модулю 1.5 и 2.5 μB , а структура проявляет полупроводниковые свойства с шириной запрещенной зоны 0.6 эВ. Структура m-CrCr₂ проявляет металлические свойства. Кроме того, для структур t-CoCr₂ и m-CoCr₂ были произведены расчеты по определению эффективного параметра U_{eff} для d-оболочек атомов кобальта в рамках подхода Дударева из первых принципов [13] для ферромагнитного основного состояния. Найденные значения составили 5.26 и 5.29 эВ соответственно, что свидетельствует о сильной корреляции d-электронов в обеих структурах, а близость этих значений согласуется со сходством окружений атомов кобальта в них. Ферромагнитная конфигурация t-CoCr₂ по-прежнему обладала наименьшей энергией при расчете с заново найденным параметром $U_{\text{eff}} = 5.26$ эВ.

Моделирование оптических свойств показало, что для всех рассмотренных стабильных структур в случае облучения светом, поляризованным перпендикулярно плоскости структуры, наблюдается появление пиков экстинкции в области видимого света (200–500 нм).

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФ № 21-73-20183.

Список использованных источников

1. Novoselov K.S. Nobel lecture: Graphene: Materials in the flatland // *Reviews of Modern Physics*. APS, 2011. Vol. 83, № 3. P. 837–849.
2. Dyck O. et al. Doping transition-metal atoms in graphene for atomic-scale tailoring of electronic, magnetic, and quantum topological properties // *Carbon*. Elsevier, 2021. Vol. 173. P. 205–214.
3. Mao H.Y. et al. Manipulating the electronic and chemical properties of graphene via molecular functionalization // *Progress in Surface Science*. Elsevier, 2013. Vol. 88, № 2. P. 132–159.
4. Popov Z.I., Sukhanova E.V., Kvashnin D.G. Metallocene inspired 2D metal intercalated carbon allotropes: Stability and properties via DFT calculations // *Carbon*. 2021. Vol. 184. P. 714–720.
5. Appelhans D.J., Carr L.D., Lusk M.T. Embedded ribbons of graphene allotropes: an extended defect perspective // *New Journal of Physics*. IOP Publishing, 2010. Vol. 12, № 12. P. 125006.
6. Yin H. et al. Stone-Wales graphene: A two-dimensional carbon semimetal with magic stability // *Physical Review B*. APS, 2019. Vol. 99, № 4. P. 041405.
7. Hohenberg P., Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas // *Physical Review*. 1964. Vol. 136, № 3B. P. B864–B871.
8. Kohn W., Sham L.J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects // *Phys. Rev.* 1965. Vol. 140, № 4A. P. A1133–A1138.
9. Kresse G., Furthmüller J. Efficient iterative schemes for ab initio total-energy calculations using a plane-wave basis set // *Physical Review B*. 1996. Vol. 54, № 16. P. 11169–11186.
10. Kresse G., Furthmüller J. Efficiency of ab-initio total energy calculations for metals and semiconductors using a plane-wave basis set // *Computational Materials Science*. 1996. Vol. 6, № 1. P. 15–50.
11. Kresse G., Hafner J. Ab initio molecular-dynamics simulation of the liquid-metal-amorphous-semiconductor transition in germanium // *Physical Review B*. 1994. Vol. 49, № 20. P. 14251–14269.
12. Togo A., Tanaka I. First principles phonon calculations in materials science // *Scripta Materialia*. Elsevier, 2015. Vol. 108. P. 1–5.
13. Cococcioni M., de Gironcoli S. Linear response approach to the calculation of the effective interaction parameters in the $\text{LDA}+\text{U}$ method // *Phys. Rev. B*. American Physical Society, 2005. Vol. 71, № 3. P. 035105.

Молекулярно-динамическое моделирование восстановления оксида графена под действием сверхбыстрого лазерного нагрева

Потапов Д.О., Евлашин С.А., Орехов Н.Д.

«Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Москва, РФ

При температурах выше $T = 800\text{—}1000$ К в углероде начинается процесс горения в присутствии кислорода. Тем не менее недавние экспериментальные результаты по наносекундному лазерному

облучению оксида графена показывают, что после нагревания до 3000—3300 К этот материал превращается в графен с высоким локальным порядком [1]. Для того чтобы изучить механизмы, лежащие в основе этого необычного эффекта, в данной работе было проведено молекулярно-динамическое моделирование восстановления плёнки оксида графена при воздействии высоких температур. Расчеты выполнены с использованием пакета программ LAMMPS [2] с реакционным межатомным потенциалом ReaxFF CHO-2017 [3].

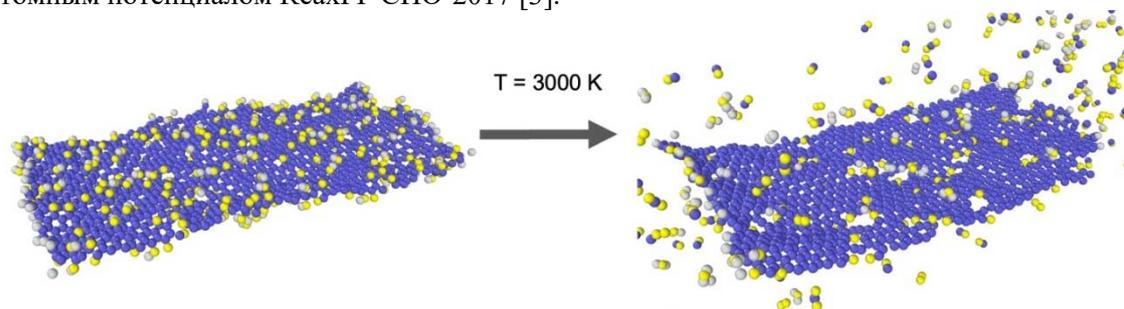


Рис.1. Изображение расчетной ячейки до (слева) и после (справа) высокотемпературного нагрева пленки оксида графена.

Наши результаты показывают, что сверхбыстрый нагрев, производимый наносекундным лазером, в сочетании с быстрым охлаждением (результат чрезвычайной теплопроводности графена) приводит к режиму почти бескислородного восстановления оксида графена в присутствии атмосферного кислорода при $T=2500\text{—}3300$ К. На краях материала при таких температурах наблюдается процесс горения, который захватывает атмосферный кислород в молекулы CO и CO₂, при этом в центральной области пленки наблюдается быстрое восстановление и отжиг дефектов практически в отсутствие реакций окисления. В результате после небольшой потери массы (прежде всего с краёв пленки) оксид графена превращается в графен с высокой локальной упорядоченностью.

Список литературы:

1. S.A.Evlashin, S.E.Svyakhovskiy, F.S.Fedorov, Y.A.Mankelevich, P.V.Dyakov, N.V.Minaev, S.A. Dagesyan, K.I. Maslakov, R.A. Khmelnskiy, N.V. Suetin, I.S. Akhatov, and A.G. Nasibulin, *Adv. Mater. Interfaces* (2018) 5, 1800737.
2. S.Plimpton, *J. Comput. Phys.* (1995) 117, 1.
3. C.Ashraf, and A.C.Van Duin, *J. Phys. Chem. A* (2017) 121, 1051.

Разработка магнитных сорбентов для выделения макромолекул из биологических жидкостей

Садыкова Э. З.^{1,2}, Гришко Н. Е.², Бычкова А. В.¹, Сыксин С. В.²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, г. Москва

² Лаборатория молекулярной патологии “Геномед”, г. Москва

Введение. Магнитные частицы нашли широкое применение в различных областях биологии и медицины. Основные направления — это адресная доставка лекарств, гипертермия, магнитно-резонансные исследования и магнитная сепарация. Для использования магнитных частиц *in vitro* в качестве твердофазных магнитных сорбентов необходимо, в первую очередь, синтезировать магнитные ядра и модифицировать их поверхность для обеспечения устойчивости и стабильности коллоидного раствора. Наиболее перспективным покрытием является покрытие из оксида кремния, так как оно подходит для выделения нуклеиновых кислот и для последующей модификации частиц функциональными группами, например аминогруппами для экстракции белков.

Цель работы. Создание функциональных систем на основе магнитных наночастиц для извлечения тотальной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) путем магнитной сепарации из биологических жидкостей, проведение качественной и количественной оценки эффективности извлечения аналита.

Материалы и методы. Синтез магнитных частиц проводился методом химического соосаждения солей железа Fe²⁺ и Fe³⁺ в присутствии NH₄(OH). Неорганическое покрытие SiO₂ на

поверхности частиц было получено двумя разными способами: с использованием Na_2SiO_3 и тетраэтоксисилана (ТЭОС) по методу Штобера. Метод Штобера основан на гидролизе алкоксидов кремния в водно-спиртовой среде в присутствии гидроксида аммония в качестве катализатора (Рис.1). Также была исследована возможность модификации частиц поливиниловым спиртом (ПВС) для создания полимерной матрицы на поверхности магнитных частиц.

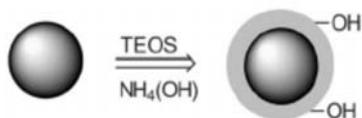


Рисунок 1. Покрытие магнитных частиц методом Штобера.

В работе применялись следующие методы: метод спектрофотометрии УФ/видимой области, метод динамического светорассеяния, метод определения концентрации ДНК с помощью флуориметра Qubit, электрофорез в агарозном геле, капиллярный электрофорез.

Результаты и обсуждение. Были синтезированы магнитные частицы магнетита с покрытием из оксида кремния с концентрацией 25 мг/мл. Для сравнения в качестве контроля была использована магнитная суспензия из коммерческого набора для выделения ДНК. Разработанные магнитные системы оценивали по способности выделения ДНК из крови. В сравнении с контролем наиболее близкими по значениям были частицы покрытые ТЭОС, средними характеристиками извлечения обладали частицы, покрытые с использованием метасиликата натрия и наименее эффективными оказались частицы последовательно покрытые ПВС и ТЭОС (Рис.2).

Эффективность выделения ДНК из крови также оценивали по параметру соотношения A_{260}/A_{280} , который указывает на чистоту выделяемого образца (Табл.1). Полученные значения коррелируют с полученными данными на Рис.2.

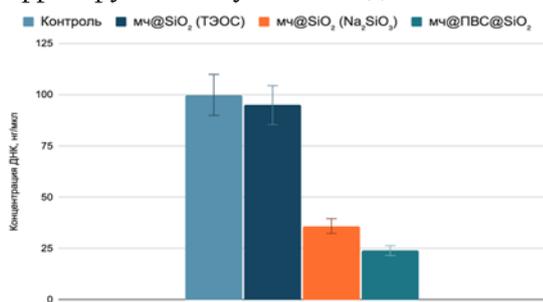


Рисунок 2. Сравнение концентраций ДНК, полученных с помощью разных образцов разработанных магнитных частиц в сравнении с коммерческим аналогом.

Таблица 1. Сравнение полученных образцов с аналогом по соотношению A_{260}/A_{280} .

Образцы	Контроль	мч@ SiO_2 (ТЭОС)	мч@ SiO_2 (Na_2SiO_3)	мч@ПВС@ SiO_2 (ТЭОС)
Соотношение A_{260}/A_{280}	1,8	1,75-1,8	1,6	1,5-1,55

После выявления наиболее подходящего пути синтеза и покрытия магнитных систем, была проведена работа по варьированию количества прекурсора вводимого в систему при покрытии (Рис.3).

Выделение ДНК в зависимости от количества вводимого в систему тетраэтоксисилана (TEOS)

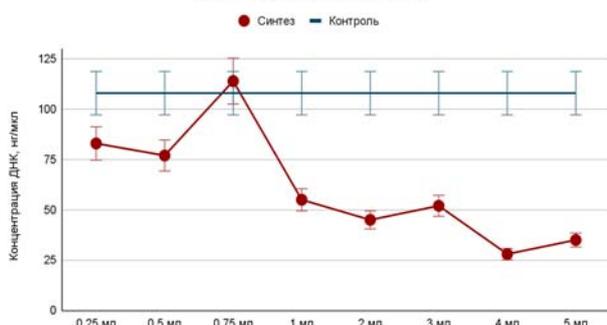


Рисунок 3. График зависимости количества ДНК после экстракции на магнитных частицах от вводимого в систему ТЭОС.

Были проведены эксперименты по хранению магнитных частиц в диапазоне pH 6.2–8.0 и при разных температурных режимах. Магнитные частицы сохраняют свою способность к экстракции ДНК после двух недель хранения в исследованном диапазоне pH при +4°C, +37°C и +55°C.

Выводы. Был проведен синтез магнитных частиц, были осуществлены разработки метода модификации поверхности частиц гидроксильными группами и получение магнитной суспензии с концентрацией 25 мг/мл; были исследованы параметры покрытия на магнитных частицах и свойства магнитных частиц, варьированием прекурсоров для покрытия, а также варьированием концентрации ТЭОС, было показано что наилучшими свойствами в сравнении с коммерческими частицами обладают частицы, покрытые ТЭОС в соотношении 7,5 частей ТЭОС к 1 части частиц; наиболее подходящим буфером для хранения частиц является буфер Трис-НСI, рН 8.0.

Синтез и оптические свойства юлолидинового аналога ретиналя



**А. Я. Сафинова^{1,3}, Н. Е. Беликов¹, Л. Е. Петровская², А. Ю. Лукин³,
О. В. Демина¹, С. Д. Варфоломеев¹, А. А. Ходонов¹**

¹ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,
Москва, Россия

²ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³ФГБОУ ВО МИРЕА – Российский технологический университет,
Москва, Россия

Для реализации исследований в перспективном направлении бионанофотоники - оптогенетики необходимо создание технологий получения фотопереключаемых компонентов с заданными и/или прогнозируемыми спектрально-кинетическими параметрами на основе новых модифицированных представителей микробных родопсинов. Направленные изменения фотохимических свойств микробных родопсинов могут быть достигнуты путем использования следующих подходов: 1) замещением одного или нескольких аминокислотных остатков в определенных положениях молекулы белка методами сайт-специфичного мутагенеза; 2) замещением остатка природного ретиналя на его различные аналоги; 3) сочетанием вышеперечисленных методов. Как было показано ранее, процедура направленной модификации хромофора позволяет варьировать в широких пределах как положение максимума поглощения основного состояния пигмента, так и другие важные фотохимические параметры.

Цель настоящей работы заключалась в получении аналога ретиналя – (2E,4E,6E,8E)-3,7-диметил-9-(2,3,6,7-тетрагидро-1H,5H-пиrido[3,2,1-ij]хинолин-9-ил)нона-2,4,6,8-тетраенала (1), в изучении его спектральных характеристик. Замена фрагмента триметилциклогексенового кольца молекулы природного ретиналя на мощный электроно-донорный юлолидиновый заместитель должно оказать сильное влияние на оптические параметры и спектральные свойства целевого альдегида (1), и его модельных альдиминов с *n*-бутиламином. Ключевые стадии синтеза юлолидинового аналога ретиналя (1) представлены на схеме 1. На первой стадии нами было осуществлено олефинирование по Хорнеру–Эммонсу исходного 9-формил-юлолидина (2) анионом C₅-фосфонатного синтона с нитрильной терминальной полярной группой (3a, b). В качестве основания при генерировании аниона C₅-фосфоната использовали LiOH в THF, при этом было показано, что в результате реакции Хорнера–Эммонса вновь образующаяся C=C связь в продукте (4) имела *E*-конфигурацию, что подтверждалось значениями констант спин-спинового взаимодействия (16.2 Гц). Затем следовала стадия восстановления нитрильной функции DIBAL при температуре от –70° до –80°C. Повторение указанной последовательности операций – олефинирования альдегида (5) по Хорнеру–Эммонсу и последующего восстановления нитрильной функции у соединения (6) – приводила к получению целевого ретиноида (1) с общим выходом 19% на исходный альдегид (2). Индивидуальный *all-E*-изомер ретиноида (1) был выделен с чистотой 98–99% при помощи препаративной ВЭЖХ. Его структура была подтверждена набором физико-химических методов анализа (УФ-, ¹H-ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрией).

Хорошо известно, что хромофорной группой микробных родопсинов является протонированный альдимин ретиналя с ϵ -аминогруппой определенного остатка Lys полипептидной цепи белка, то при определении степени влияния природы белкового микроокружения в сайте связывания молекулы ретиналя часто проводят сравнение оптических параметров исходного белка мишени с параметрами его моделей - протонированных альдиминов ретиналя или его аналогов с простейшими аминами (чаще с *n*-бутиламином в органических растворителях). В данной работе было получено модельное основание Шиффа (альдимин) целевого соединения с *n*-бутиламином. При образовании альдимина из полиеналя (1) и *n*-бутиламина в электронных спектрах поглощения наблюдался гипсохромный сдвиг на 30 нм.

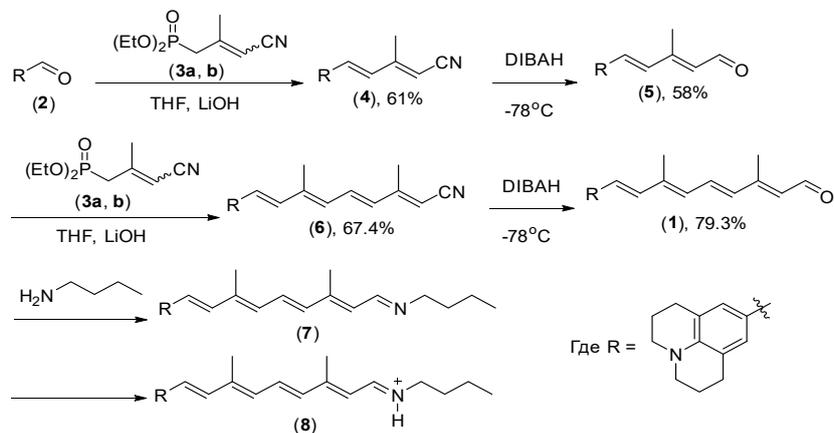


Схема 1.

Спектры поглощения полученных препаратов альдегида (1) и альдими́на (7) были получены при помощи стационарной электронной спектроскопии в диапазоне 250–700 нм в абсолютизированном метаноле. Последующее протонирование альдими́на (7) растворами HCl в диоксане или TFA в метаноле сопровождается батохромным сдвигом от 430 нм до 592(597) нм, величина которого зависит как от особенностей структуры аналога ретиналя, так и от природы протонирующего агента и растворителя. Обнаружены выраженные различия в спектральном поведении препаратов альдегида (1) и альдими́на (7) с соответствующими производными природного ретиналя (см. табл. 1 и рис. 1-4).

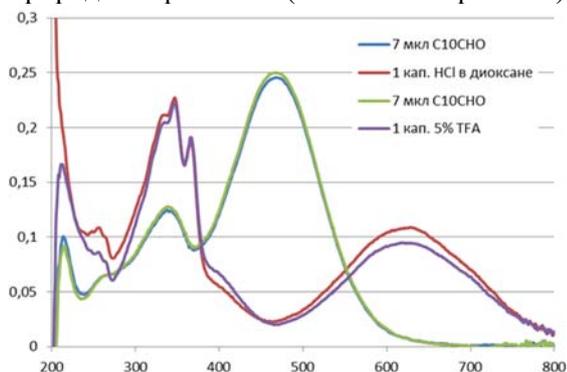


Рис. 1. Электронные спектры поглощения аналога ретиналя (1) в метаноле. Протонирование HCl в диоксане и TFA 5% в метаноле.

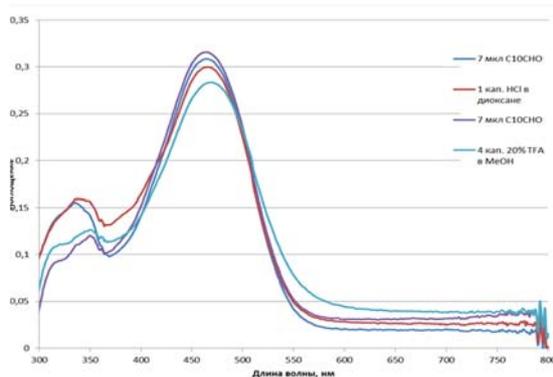


Рис. 2. Электронные спектры поглощения аналога ретиналя (1) в толуоле. Протонирование HCl в диоксане и TFA 20% в метаноле.

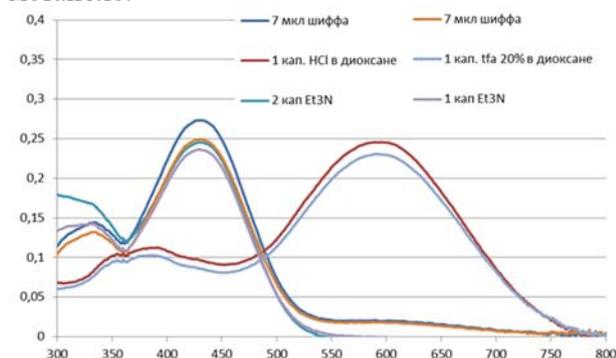


Рис. 3. Электронные спектры поглощения альдими́на аналога ретиналя (1) с н-бутиламином (7, 8) в метаноле. Протонирование HCl в диоксане и TFA 20% в метаноле.

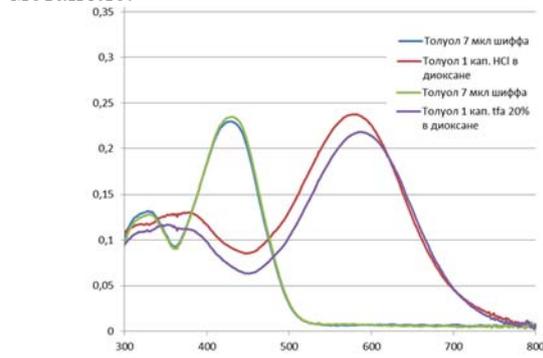
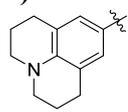
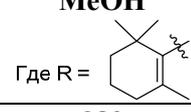
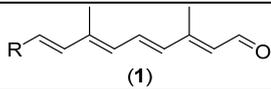
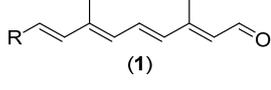
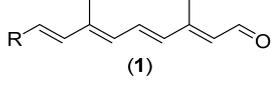
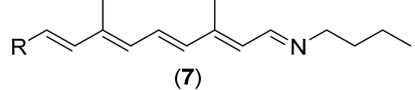
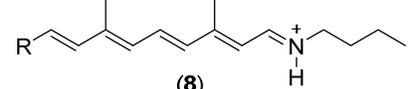
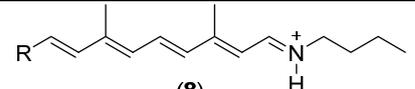


Рис. 4. Электронные спектры поглощения альдими́на аналога ретиналя (1) с н-бутиламином (7, 8) в толуоле. Протонирование HCl в диоксане и TFA 20% в метаноле

Таким образом, нами была создана модель влияния природы белкового микроокружения в сайте связывания молекулы ретиналя в микробных родопсинах с использованием юлолидинового аналога ретиналя (1) и его альдими́нов (7,8). Результаты введения мощного электроно-донорного юлолидинового заместителя вместо триметилциклогексенового кольца природного хромофора демонстрируют такое же увеличение величины максимума основной полосы поглощения протонированного альдими́на юлолидинового аналога ретиналя (8) и его (батохромного сдвига) до

λ 592-597 нм ($\Delta\lambda$ 162–167 нм), превышающее значение $\Delta\lambda$ в различных представителях микробных родопсинов (110-130 нм), при образовании протонированной альдиминной связи из природного ретиналя и апобелка. Интересно также отметить, что протонирование атома азота в самом юлолидиновом аналоге (1) растворами HCl/в диоксане или TFA/в метаноле наоборот сопровождается гипсохромным сдвигом (- 115 нм).

Таблица 1. Параметры спектров поглощения модельных: альдегида (1) и альдиминов с *n*-бутиламином (7,8).

Соединение	λ_{\max} (нм) в MeOH Где R = 	λ_{\max} (нм) в MeOH Где R = 
 (1)	460 (345)	380
 (1)	345 (334; 345; 615) протонирование HCl в диоксане	-
 (1)	345 (335; 345; 625) протонирование TFA в MeOH	-
 (7)	430 (329; плечо 620)	350
 (8)	592 (387; плечо 358) протонирование HCl в диоксане	440
 (8)	597 (386; плечо 364) протонирование TFA в MeOH	460

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-03-00139а).

Влияние факторов окружающей среды на структуру и свойства смесей полилактида (ПЛА) и полибутиленадипинаттерефталата (ПБАТ)



Селезнева Л.Д.^{1,2}, Попов А.А.^{1,2}, Аншин С.М.²

¹Институт Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля РАН 119334, Москва

²Российский Экономический Университет им. Г.В. Плеханова, Москва
seleznyova.ludmila@yandex.ru

Работа направлена на решение экологической проблемы загрязнения окружающей среды. Материалы на основе представленных в работе полимеров предполагаются как биоразлагаемые и благодаря своим физико-механическим свойствам могут иметь широкий спектр применения: от гибких пленок до жесткой упаковки. Смесей ПЛА/ПБАТ можно применять в разных областях: в качестве упаковки пищевых продуктов, укрывных и мульчирующих пленок в сельском хозяйстве [1-2], филаментов для 3D-печати [3], для изготовления скаффолдов костной ткани [4] и других.

В процессе биоразложения материалы подвергаются действию почвенных микроорганизмов, протекает гидролиз. Влияют также другие факторы окружающей среды, в частности, окисление и фотодеструкция. В работе изучена способность пленок составов ПЛА/ПБАТ 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40, 50/50, 40/60, 30/70, 20/80, 10/90, 0/100 к самопроизвольному разложению в почве.

Характеристики исходных образцов были исследованы методами ИК-спектроскопии, дифференциальной сканирующей калориметрии, оптической микроскопии и сканирующей электронной микроскопии.

Показано, что температура плавления полилактида в смесях равна $145 \pm 2^\circ\text{C}$, а степень кристалличности с добавлением ПБАТ снижается с 25 (ПЛА) до 7 (ПЛА20/ПБАТ80) %. Изменения тепло-физических свойств объясняются перестройкой структуры (Рисунок 1) материалов при добавлении второго компонента и увеличении его содержания.

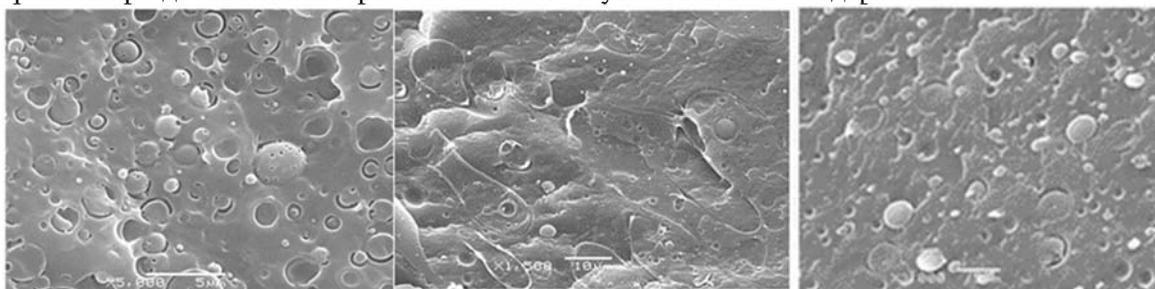


Рисунок 1 – Микрофотографии СЭМ составов ПЛА/ПБАТ: а) 80/20, б) 50/50, в) 20/80.

В литературе описана способность смесей ПЛА/ПБАТ к биоразложению в разных условиях: в пресной воде с осадком [5], в почве [6-8]. В данной работе образцы испытывали, выдерживая в грунте (ГОСТ 9.060-75) в естественных условиях на полигоне. После выдержки в почве заметны визуальные изменения и потеря массы всех составов за исключением чистого полилактида через 2,5 месяца и всех образцов спустя 6 месяцев (Таблица 1). Толщина пленок всех исследуемых составов составляет 150-200 мкм. Нижнее значение «0т» соответствует пленки толщиной 50 мкм. Потеря массы образцом ПБАТ с $h = 50$ мкм в 4,6 раза больше, чем у образца ПБАТ $h = 150 - 200$ мкм.

Таблица 1. Потеря массы пленочных образцов смесей ПЛА/ПБАТ после натуральных испытаний 2,5 и 6 месяцев

Содержание ПЛА, масс. %	Потеря массы через 2,5 мес, % ($\Delta \pm 0,5\%$)	Потеря массы через 6 мес, % ($\Delta \pm 0,5\%$)
100	0,0	2,2
90	1,1	2,5
80	1,2	3,4
70	1,4	2,0
60	2,3	4,0
50	1,9	4,4
40	2,4	3,3
30	2,9	3,8
20	2,4	2,7
10	3,7	4,1
0	6,8	7,4
0т	32,2	33,7

Изменения теплофизических характеристик образцов до и после выдержки в почве исследовались методом ДСК (Таблица 2). Температура плавления и степень кристалличности образцов после их нахождения в грунте практически не меняются.

Таблица 2. Теплофизические свойства смесей ПЛА/ПБАТ до и после выдержки в почве 2,5 месяца

ПЛА в матрице, масс. %	Температура Плавления исх, $^\circ\text{C}$ ($\Delta \pm 0,5^\circ\text{C}$)	Температура Плавления 2,5 мес, $^\circ\text{C}$ ($\Delta \pm 0,5^\circ\text{C}$)	Степень кристалличности ПЛА в исходных образцах, % ($\Delta \pm 1\%$)	Степень кристалличности ПЛА в образцах после 2,5 в почве, % ($\Delta \pm 1\%$)
100	146,5	143,3	25	24
90	146,6 (155,3)	145,3	24	25
80	147,8 (156,3)	145,3	22	24
70	145,3 (155,2)	145,4	23	24
60	147,7	147,2	19	20
50	143,6	149,0	17	14
40	142,9	145,8	9	12
30	145,4	145,3	8	9

20	145,7	145,7	7	7
10	144,5	-	-	-
0	-	-	-	-

Изменения после выдержки в почве обнаружены также методом ИК-спектроскопии (Рисунок 2).

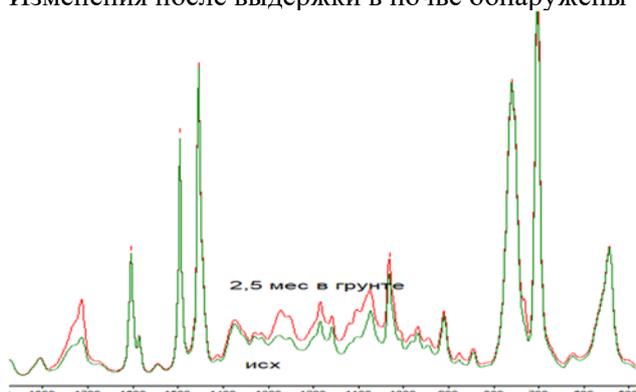


Рисунок 2 – ИК-спектр ПЛА/ПБАТ 50/50 до и после 2,5 месяцев выдержки в грунте на полигоне

Согласно ИК-спектрам, в плёнках, состоящих из чистых полимеров (ПЛА и ПБАТ) изменений в структуре, а, следовательно, и интенсивности или появления новых полос, соответствующих колебаниям новых связей между атомами, не произошло. В то время как, в смесевых композициях через 2,5 месяца выдержки в почве увеличились интенсивности полос колебаний карбонильных C=O и C-O -связей, что свидетельствует о том, что произошли деструктивные процессы, в частности, окисление.

Таким образом, выявлено, что присутствие ПБАТ в композиции влияет на формирование кристаллитов ПЛА, с добавлением ПБАТ степень кристалличности снижается в 3,5 раза (с 25 в исходном ПЛА до 7 % в композиции ПЛА/ПБАТ 20/80). Исследована фазовая структура исходных композиций ПЛА/ПБАТ: до 30% ПБАТ, последний образует фазу включения, с 30 до 60% – каждый отдельную протяженную фазу, свыше 60% ПБАТ фазой включения является ПЛА.

Установлено, что даже при небольшом сроке выдержки в почве (2,5 месяца) протекает деструкция образцов ПБАТ, смесевых композиций и меньшие изменения для ПЛА.

Список литературы:

1. M. Dinu, R. Soare, K. Poulianiti, I. Karageorgou, E. Bozinou, D.P. Makris, S. Lalas, M. Botu // Horticulturæ. – 2022. – V.8. – №3. – P. 271.
2. X. Gao, D. Xie, C. Yang // Agricultural Water Management. – 2021. – №. 255. – P. 107053.
3. W. Prasong, P. Muanchan, A. Ishigami, S. Thumsorn, T. Kurose, H. Ito // Hindawi Journal of Nanomaterials. – 2020. – V. 2020. – 8040517
4. L.M.R. Vasconcellos, G.F. Santana-Melo, E. Silva, V.F. Pereira, J.S.R. Araújo, A.D.R. Silva; A.S.A. Furtado, C.M.V. Elias, B.C. Viana, F.R. Marciano, A.O. Lobo // J. Funct. Biomater. – 2021. – V.12. – №1. – P. 11
5. Y. Fu, G. Wu, X. Bian, J. Zeng, Y. Weng // Molecules. – 2020. – V. 25 – No 17. – P. 3946.
6. R.C.B.C. Lamparelli, L. S. Montagna, A.P. Silva, T.L.A. Montanheiro, A.P. Lemes // Biointerface Research in Applied Chemistry 2022. – V. 12. – № 1. – P. 833.
7. P.A. Palsikowski, C.N. Kuchnier, I.F. Pinheiro, A.R. Morales // Journal of Polymers and the Environment. – 2018. – V. 26. – P. 330.
8. Y-X. Weng, Y-J. Jin, Q.-Y. Meng, L. Wang, M. Zhang, Y.Z. Wang // Polymer Testing. – 2013. – V. 32. – P. 918.

О причинах различия биоактивности энантиомеров хиральных лекарств



Семенова Е.В., Белова Е.В.

*Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»,
физический факультет, г. Москва*

Живые организмы по существу асимметричны, так как состоят из энантиомерно чистых хиральных веществ: все аминокислоты, входящие в состав белков, имеют L-конфигурацию, а

сахара рибозы и дезоксирибозы в нуклеиновых кислотах – D-конфигурацию. То есть хиральность является неотъемлемым свойством так называемых «строительных блоков жизни», таких как белки, ДНК и РНК [1]. Именно в хиральном окружении проявляются различные свойства энантиомеров. В результате основные физиологические процессы являются стереоселективными и используют только один из всех потенциальных энантиомеров. В связи с этим реакция человеческого организма на определенные хиральные соединения может резко меняться в зависимости от энантиомера: один энантиомер в лекарстве может обладать терапевтическим действием, в то время как другой может вызвать побочный эффект. Таким образом, значение стереохимии в фармакологии возросло за последние годы и оказало существенное влияние на разработку лекарств.

Крупные фармацевтические компании стремятся синтезировать препараты, которые способны быстро бороться с заболеваниями с наименьшим количеством побочных эффектов [1]. В связи с этим в настоящее время при разработке лекарств большое внимание уделяют хиральности соединений, входящих в состав лекарственных средств.

Лекарственные препараты можно разделить на три группы: энантиомерно чистые, рацемические и ахиральные средства. Известно, что за период с 2010 по 2020 гг. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило около 300 лекарственных средств [2]. Одобрённые ахиральные лекарства ежегодно составляли меньше половины от общего числа одобренных лекарств за год. Кроме того, среди одобренных за десятилетний период препаратов лишь 9 лекарств являются рацемическими. Ежегодно большую часть одобренных препаратов составляли энантиомерно чистые лекарства. Это объясняется тем, что в настоящее время регулирующие органы все чаще требуют клинического контроля и коммерциализации чистых энантиомеров.

Ранее нами была составлена подборка из сотни хиральных лекарственных средств и проведена ее классификация по биоактивности энантиомеров препаратов [3]. В результате было установлено, что для большинства лекарственных средств подборки (55 препаратов из 100) биоактивным является S-энантиомер. Среди энантиомеров, вызывающих побочные действия, в нашей подборке чаще встречаются R-формы лекарственных средств (12 препаратов, у которых R-энантиомер отвечает за побочные действия, и 4 препарата, у которых S-энантиомер отвечает за побочные действия).

Биоактивность энантиомеров, их фармакодинамика и фармакокинетика интенсивно исследуются в настоящее время, но физическая природа различий в терапевтическом воздействии энантиомеров до сих пор не установлена. В настоящей работе мы планируем использовать ранее составленную подборку из сотни хиральных лекарств в качестве базы для выявления возможных причин наблюдаемых соответствий между знаком хиральности энантиомеров препаратов и их биоактивностью.

Чтобы приблизиться к поставленной цели работы, планируется воспользоваться методом молекулярного докинга и провести расчет энергии связывания противоположных энантиомеров некоторых лекарственных средств подборки.

На данный момент с помощью программы SOL [4] проводится докинг для некоторых препаратов подборки. Важно отметить, что программа SOL позволяет отличить неактивные соединения, т.е. не ингибиторы, от активных соединений, т.е. ингибиторов, но программа имеет недостаточно высокую точность предсказания энергии связывания белок-лиганд, чтобы отличить плохой ингибитор от хорошего, а хороший – от очень хорошего.

Для решения этой проблемы можно воспользоваться программой MOPAC [5] – это полуэмпирический квантово-химический метод вычисления энергии связывания, с помощью которого можно рассчитать энтальпию связывания комплекса белок-лиганд. Данный метод превосходит по точности классические силовые поля, которые используются в программе SOL.

В дальнейшем планируется продолжить проводить докинг хиральных лекарств подборки. А также планируется рассмотреть пути метаболизма некоторых хиральных препаратов подборки, так как в некоторых случаях именно белки метаболизма могут быть причиной разной биоактивности энантиомеров [6].

Список литературы:

1. Santos R., Pontes K.V., Nogueira I.B.R. Enantiomers and Their Resolution. Encyclopedia. 2022; 2:151.
2. Hancu G, Modroiu A. Chiral Switch: Between Therapeutical Benefit and Marketing Strategy. Pharmaceuticals. 2022; 15(2):240.
3. Belova, E.V., Semenova, E.V., Tverdislov, V.A. On the Chirality of Drugs and the Structures of Biomacromolecules. Biophysics. 2022; 67(3): 374-385.

- Романов А.Н., Кондакова О.А., Григорьев Ф.В., Сулимов А.В., Лушекина С.В., Мартынов Я.Б., Сулимов В.Б. Компьютерный дизайн лекарственных средств: программа докинга SOL. Вычислительные методы и программирование. 2008; 9:213–233.
- Stewart J.J.P. MOPAC2016, Stewart Computational Chemistry. Available online: <http://openmopac.net>
- Andersson T., Weidolf L. Stereoselective disposition of proton pump inhibitors. Clinical drug investigation. 2008; 28(5): 263-279.

Совместный анализ доксорубина и вориностата в полимерных наночастицах с помощью планов Бокса-Бенкена



**М.Б. Сокол¹, И.А. Гуляев^{1,2}, М.Р. Моллаева¹, С.Л. Кузнецов³,
В.А. Зенин⁴, М.А. Клименко^{1,2}, Н.Г. Яббаров¹, М.В. Чиркина¹,
Е.Д. Никольская¹**

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва

² Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

⁴ Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», Москва

Объектами данного исследования являются наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), нагруженные противоопухолевым препаратом доксорубином (DOX-NP) и ингибитором гистоновых деацетилаз - вориностатом (SAHA-NP), разработанные для лечения рака молочной железы. PLGA является биосовместимым и биоразлагаемым полимером, разрешенным регуляторными органами США и Европы для медицинских применений. Инкапсулирование лекарственных средств в матрицу PLGA и получение наночастиц на его основе позволяет улучшить профиль безопасности препаратов и преодолеть множественную лекарственную устойчивость. В настоящем исследовании была проведена разработка методики высокоэффективной жидкостной хроматографии совместного определения DOX-NP и SAHA-NP с помощью планов Бокса-Бенкена, валидация методики и определение стабильности наночастиц после стерилизационной обработки гамма-излучением.

Хроматографирование проводили с использованием колонки Nucleodur C-18 Gravity (250 мм × 4.6 мм × 5 км), в качестве подвижной фазы использовали 10 мМ дигидрофосфат калия pH 3.9 : ацетонитрил (90:10 v/v). Детекцию обеих субстанций проводили на длине волны 240 нм. Предварительную пробоподготовку образцов проводили, осаждая PLGA с помощью противорастворителя - диметилсульфоксида (ДМСО). С целью определения наиболее оптимальных условий хроматографирования были проанализированы три независимые переменные: концентрация метанола (%), $X1$, 0-20%), pH ($X2$, 2.5-4.5) и скорость потока подвижной фазы (мл/мин, $X3$, 0.8 -1.2 мл/мин). С помощью планов Бокса-Бенкена оценивали вклад данных переменных в значения разрешения пиков (R_s , $Y1$) и времени удерживания последнего пика аналита (RT SAHA, $Y2$). Математическая взаимосвязь модели и переменных была оценена с помощью программы Stat-Ease design expert (V 7.0.0) и изображена на рисунке 1 (представлены закодированные значения, где -1 = минимальное значение, 1 = максимальное значение). Все переменные оказывали значительное влияние на разрешение пиков и время удерживания вориностата.

Далее с помощью функции желательности, предложенной Деррингером и Суичем, была проведена одновременная оптимизация всех зависимых переменных. Функция желательности находится в диапазоне от 0 до 1, при этом значение 1 указывает на достижение целевого значения зависимой переменной. Определение значения желательности проводили с помощью программного обеспечения Stat-Ease design expert (V 7.0.0). Максимальная желательность 0.954 соответствовала условиям 0% MeOH, скорость потока = 1.2 мл/мин и pH = 3.9 и значениям зависимых переменных: разрешение = 2.8 и время удерживания пика вориностата = 7.0 мин. При использовании оптимизированных условий экспериментальные значения R_s ($Y1$) и RT of SAHA ($Y2$) составили 2.6 ± 0.02 и 7.2 ± 0.02 мин, соответственно, что схоже с предсказанными

значениями. Оптимизированные условия позволили получить хорошо разрешенные пики доксорубина и вориностата на хроматограмме, рисунок 2.

Оптимизированная методика была валидирована по параметрам точность, сходимость и внутрилабораторная прецизионность. Подтверждена линейность методики в диапазоне 4.2-52.0 мкг/мл для обеих субстанций ($R^2 = 0.9999$ для вориностата и $R^2 = 0.9988$ для доксорубина).

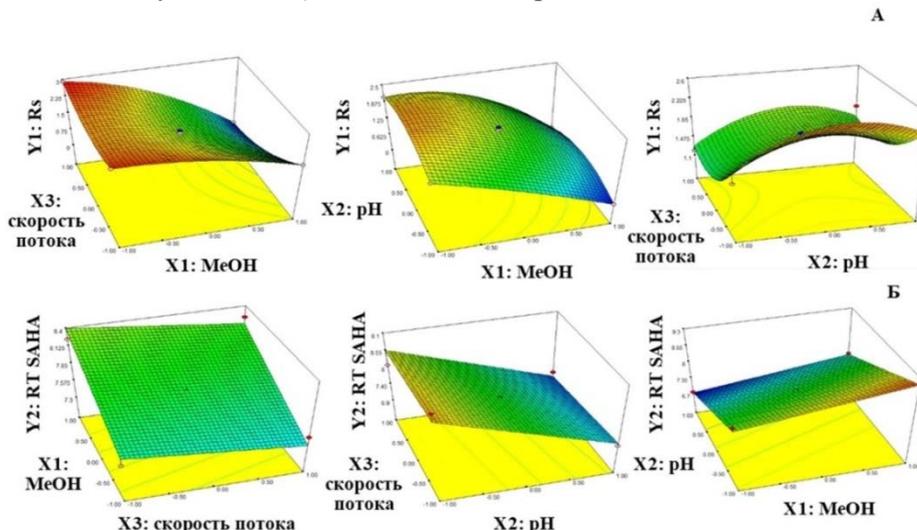


Рисунок 1 - Графики поверхности отклика, показывающие влияние переменных на разрешение пиков (Y1) и время удерживания вориностата (Y2).

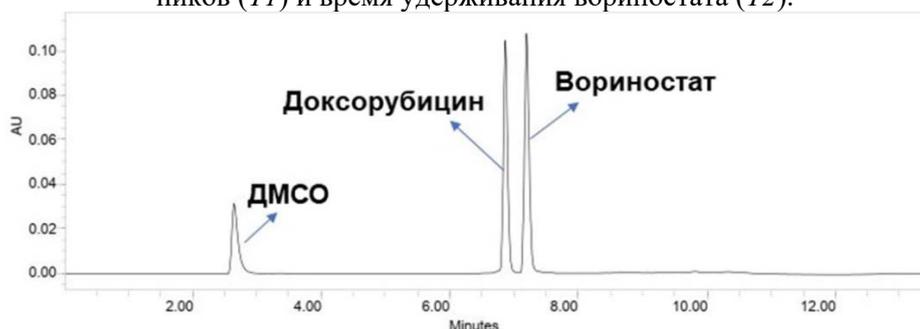


Рисунок 2 – Хроматограмма стандартного образца смеси, содержащей 25 мкг/мл доксорубина и 25 мкг/мл вориностата.

В данной работе было изучено влияние стерилизующего гамма-облучения на стабильность субстанций и наночастиц. При облучении дозой 25 кГр суммарное количество примесей DOX-NP не превышало 5%, в то время как количество примесей SAHA-NP составило 88%. Полученные результаты свидетельствуют о нестабильности SAHA-NP после облучения в дозе 25 кГр. DOX-NP и SAHA-NP до облучения обладали удовлетворительными размерами (<300 нм) и полидисперсностью (<0.2; PDI), обеспечивающими высокую вероятность накопления наночастиц в клетках-мишенях. Значение дзета-потенциала (ζ) DOX-NP было низким (<|15|), однако наночастицы продемонстрировали хорошую коллоидную стабильность в водном растворе в течение 15 мин, что было достаточно для проведения экспериментов. Значение дзета-потенциала (ζ) DOX-NP было низким (<|15|), однако наночастицы продемонстрировали хорошую коллоидную стабильность в водном растворе в течение 15 мин, что было достаточно для проведения экспериментов. Несмотря на то, что гамма-облучение привело к значительному ($p < 0.05$) увеличению размеров и PDI DOX-NP, эти параметры по-прежнему соответствовали требуемым критериям. В случае SAHA-NP значения размера и PDI, хоть и имели тенденцию к увеличению, не претерпели существенных изменений. Оба нанопрепарата продемонстрировали значительное ($p < 0.05$) увеличение значения ζ . Поскольку облучение SAHA-NP приводило к значительной деградации вориностата данный метод стерилизации не пригоден для дальнейшего использования и должен быть заменен на альтернативный. В случае DOX-NP стерилизация гамма-излучением не вызывала значительной деградации субстанции и может быть использована в дальнейшем.

Таким образом, разработанная методика совместного определения доксорубина и вориностата пригодна для количественного анализа как смеси препаратов в свободном виде, так и для полного количественного анализа в полимерных наночастицах, в том числе, и для анализа примесей.

Роль спектрального состава повседневного освещения в провоцировании близорукости при биомоделировании на птенцах японского перепела



**Соколова В.В.¹, Трофимова Н.Н.¹, Петрониюк Ю.С.¹,
Гурьева Т.С.², Медникова Е.И.²**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки *Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва*

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки *Государственный научный центр Российской Федерации - Институт Медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва*

Аннотация. Целью данной работы является исследование структурных изменений глаза в процессе его развития при селективном повседневном освещении на живой модели Японского перепела (*Coturnix japonica*). Измерения проводились в двух группах птиц: содержащихся при лампе накаливания и при светодиодном светильнике с желтым светофильтром. Предполагалось показать, что условия освещения могут оказать влияние на развитие детской близорукости. Данные, полученные в результате эксперимента, позволяют оценить важность выбора спектрального состава повседневного освещения для формирования зрительного анализатора растущего организма.

Проблема детской близорукости становится массовой. Ее решение имеет приоритетный характер мирового уровня. Все дольше ребенок в самом активном возрасте своего развития находится при искусственном свете. По ряду причин дети теряют возможность проводить время, выделенное для отдыха, на свежем воздухе и при естественном дневном освещении. В этих условиях формирующийся глаз ребенка, подстраивается под эти условия и претерпевает изменения приводящие, в частности, к детской близорукости. Не всегда являются физиологически комфортными условия повседневного освещения в образовательных учреждениях [1]. В связи с этим наша работа была направлена на экспериментальную проверку теоретических представлений о влиянии спектрального состава освещения на динамику развития глаза и возможном провоцировании детской близорукости.

Предлагаемая биологическая модель – птенцы домашнего Японского перепела, имеет ряд преимуществ по сравнению с другими лабораторными животными. Данные, полученные на перепелах, в большей степени могут быть отнесены к человеку, так как, в отличие от лабораторных грызунов, сетчатка перепела содержит те же три основных вида колбочек: сине-, зелено- и красночувствительные и имеет сходную с человеком фотопротекторную оксикаротиноидную защиту. Кроме того перепела имеют относительно короткий инкубационный период, период полового созревания и продолжительность жизни, по сравнению с человеком, поэтому представляют собой стабильную и эффективную модель для исследований.

Выбор источников света осуществлялся по их спектральным характеристикам. Восприятие оптикой глаза отдельных частей видимого спектра различается; в зависимости от длины волны принимаемый свет формирует точку фокуса в разных положениях вблизи сетчатки, возникает так называемая хроматическая аберрация. Используя в эксперименте свет лампы накаливания (группа №1), с весомой красной компонентой в спектре, как повседневный, мы предположили, что в этом случае глаза птенцов будут развиваться в сторону близорукости. В этом случае на протяжении всего времени формирования зрительный анализатор будет вынужденно подстраиваться к длинному фокусу, сформированному волнами красной части видимого спектра. Контрольная группа №2, ежедневно находящаяся при освещении светодиодной лампой с желтым светофильтром развивалась в условиях приближенных к естественным для эволюции глаза, т.е. при дневном свете.

Конкретными задачами настоящего исследования являлась оценка структурных изменений глаза птенцов при повседневном освещении, селективном для красночувствительных колбочек или же при освещении комфортном для центральных фоторецепторов сетчатки.

На Рис.1. показаны спектр дневного света, спектральные характеристики центральных колбочек сетчатки человека и спектральные характеристики источников света, которые мы использовали в эксперименте. Дневной свет является самым комфортным для глаза. Чувствительность центральных колбочек сетчатки человека сформировалась эволюционно в

условиях дневного освещения. Можно видеть, что наиболее чувствительным наш глаз является к излучению в желтой области в диапазоне от 500 до 600 нм. Поэтому, как контрольное освещение, нами был выбран светильник, чей спектр максимально подходит под эти характеристики – светодиодный с желтым пленочным светофильтром. В то время как спектр лампы накаливания представлен, в значительной мере, красной компонентой.

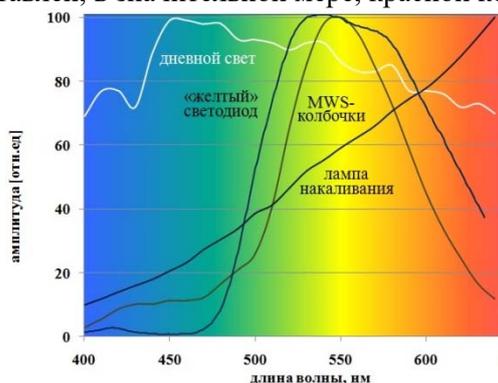


Рис.1. Сопоставление спектральной чувствительности центральных колбочек сетчатки человека со спектрами разных источников света.

Условия эксперимента и методы. С помощью ультразвуковой акустической биомикроскопии и оптической когерентной томографии мы оценивали геометрические параметры глаз птенцов, которые с суточного возраста были разделены на группы с соблюдением режима освещения – 9 часов (ночь) и 15 часов (день). Необходимый обогрев осуществлялся инфракрасными обогревателями мощностью 50 Вт. Использовался стандартный корм ПК 5-41 для перепелов.

Источники освещения были откалиброваны. Для группы №1 источником была лампа накаливания Philips, 40 Вт, матовая с освещенностью 130 лк, для группы №2 – светодиодный светильник Меридиан с двойным слоем желтого пленочного светофильтра Rosco E101, IP40, 10 Вт, освещенность 125 лк.

Длительность эксперимента была обусловлена особенностями полового созревания птиц – от 10 до 45 дней, а также в соответствии с ранее полученными данными о возрастных изменениях в глазу перепела [2, 3].

Для повышения достоверности результатов птенцы калибровались по весу с точностью до 1 г. Содержание птиц и их вывод из эксперимента декапитацией выполнялся согласно «Правилам надлежащей лабораторной практики», утвержденным Приказом Министерства Здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 года N 199н.

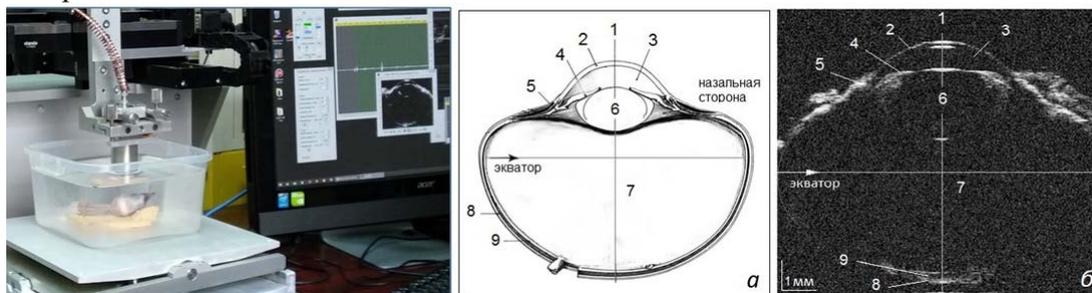


Рис.2. Ультразвуковая биомикроскопия энуклеированного глаза зрелой особи перепела *Coturnix japonica*: (а) – схематичное изображение; (б) – акустическое ВД сечение глаза со стороны роговицы; 1 – оптическая ось, 2 – роговица, 3 – передняя камера, 4 – радужка, 5 – соединительнотканное образование между ресничным краем радужки и роговицей, 6 – хрусталик, 7 – стекловидное тело, 8 – склера, 9 – хориоретинальный комплекс.

Ультразвуковая биомикроскопия достаточно давно применяется для диагностики патологий в офтальмологии [4]. Особенностью применения в нашем случае является то, что объект исследования – перепелиный глаз, небольшой (до 10 мм) по сравнению с человеческим (около 24 мм), и традиционные промышленные медицинские ультразвуковые приборы не рассчитаны для подобного случая и погрешность их измерений не позволяет различать тонкие структуры. В нашем институте ИБХФ РАН разработан исследовательский акустический микроскоп, который позволяет наблюдать тонкую структуру, в том числе биологических объектов с высоким разрешением (± 15 мкм). Акустические изображения в виде В и ВД сканов позволяют позиционировать акустический датчик вдоль оптической оси глаза для повышения достоверности измерений (Рис.2).

Метод оптической когерентной томографии использовался дополнительно для верификации измерений. В данном случае применялись аппараты Topcon и SPECTRALIS в рамках договора о научном сотрудничестве с институтом МОНИКИ.

Результаты. Для птиц возрастом 10, 20, 30, 45 суток были измерены переднезадняя ось глаза, толщина роговицы, передняя камера, хрусталик, стекловидное тело и склера.

Эксперименты показывают, что глаза птиц из группы, содержащейся при лампе накаливания, имели более высокие значения длины переднезадней оси глаза по сравнению с птицами, содержащимися при желтом светодиодном светильнике для всех возрастов (рис. 2). Так же была выявлена тенденция к утолщению роговицы в группе лампы накаливания по сравнению с группой желтого светильника. Обнаружено, что передняя камера глаза увеличивалась с возрастом для обеих групп, однако в условиях желтого светильника этот процесс идет медленнее.

Исследование хрусталика показывает увеличение его толщины с возрастом, однако для птиц, развивающихся при освещении лампой накаливания, этот процесс развивается быстрее.

Измерения для стекловидного тела свидетельствуют о том, что оно увеличивается вдоль оптической оси с возрастом. Различие между группами животных наблюдается в раннем возрасте 10-30 суток – для группы лампы накаливания этот показатель выше на 5% по сравнению с группой желтого светильника. Подобные результаты получены и для склеры, толщина которой растет при лампе накаливания. Эта разница оказывается более заметной в раннем возрасте; к зрелости значения параметра начинают выравниваться.

На Рис.3. приведены сводные данные по всем выполненным измерениям. Показатели усреднены по всему диапазону возрастов, их численные значения для разных структурных элементов глаза свидетельствуют об изменениях оптической системы глаза в сторону удлинения и формирования условной (модельной) близорукости в случае повседневного освещения с преимущественно красным спектром (лампа накаливания, серые столбики).

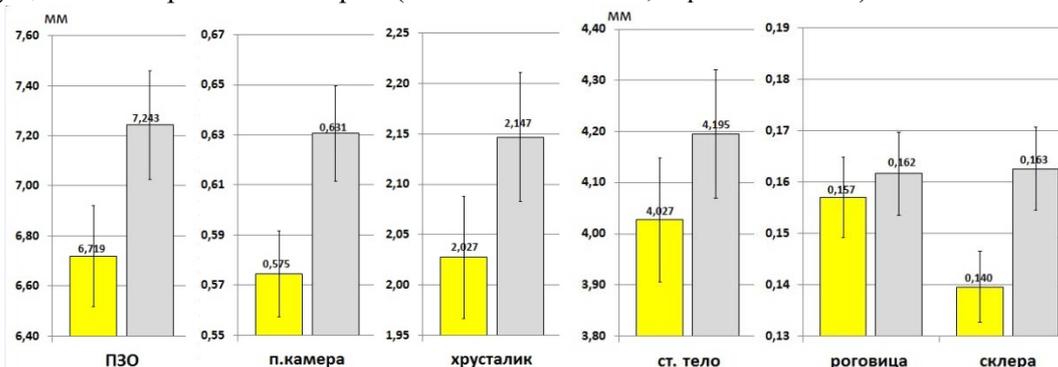


Рис.3. Структурные изменения глаза перепела, полученные методом ультразвуковой микроскопии и усредненные во всем диапазоне возрастов (10-45 суток).

Выводы. Основываясь на полученных данных можно предположить, что при ежедневном использовании лампы накаливания наблюдается устойчивая тенденция к развитию глаза в сторону близорукости. Нами было показано, что наличие в спектре лампы накаливания весомой красной составляющей приводит к росту переднезадней оси глаза, увеличению толщины хрусталика и склеры, стекловидного тела, особенно в первой половине жизни птиц (10-30 суток).

Модель японского перепела позволила нам внутри приемлемых временных рамок исследовать роль красной (в случае лампы накаливания) и желтой компонент спектра повседневного освещения в развитии структур глаза, выявить закономерности в динамике развития этих структур, подтвердить предположение о провоцировании близорукости в раннем возрасте при наличии неблагоприятных условий повседневной освещенности.

Литература

1. Зак П.П. Основания ограничения цветовой температуры светодиодного освещения в образовательных, дошкольных и лечебных учреждениях. М.: ООО "Мессе Франкфурт РУС" В кн.: Материалы IX Международного Форума по светодиодным технологиям 9-11 ноября 2015. 2015. С. 28-32.
2. Зак П.П., Петронюк Ю.С., Храмова Е.А., Трофимова Н.Н., Мисяков А.Н., Гурьева Т.С., Дадашева О.А., Левин В.М. Акустико-микроскопическое исследование возрастных изменений структур глаза японского перепела *Coturnix japonica*. Актуальные вопросы биологической физики и химии. 2019. Т. 4. № 2. С. 233-236.
3. Петронюк Ю.С., Трофимова Н.Н., Зак П.П., Храмова Е.А., Андрюхина О.М., Андрюхина А.С., Рябцева А.А., Гурьева Т.С., Медникова Е.И., Титов С.А., Левин В.М. Исследование глазных

патологий на биомодели японского перепела *Coturnix japonica*. Химическая физика. Т. 41. № 2. 2022. С. 27-33.

4. Синг А.Д., Хейден Б.К. Ультразвуковая диагностика в офтальмологии. Москва, «МЕДпресс-информ», 2015.

Молекулярное моделирование взаимодействия производных спирохромено[3,4-с]-пирролидинов с белком MDM2

Степанюк Р.А., Маджидов Т.И.¹, Коротаев В.Ю.²

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, кафедра физической химии, Россия, 119991,
г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 3 Тел.: (495)939-48-40,
E-mail: RomanStepanyuk@outlook.com*

*¹Химический институт им. А. М. Бутлерова Казанского федерального
университета, ул. Кремлевская, 29/1, Казань 420008, Россия;
e-mail: timur.madzhidov@kpfu.ru*

*²Институт естественных наук и математики
Уральского федерального университета им. первого Президента России
Б. Н. Ельцина, пр. Ленина, 51, Екатеринбург 620000, Россия;
e-mail: korotaev.vladislav@urfu.ru*

Существуют различные подходы к лечению раковых заболеваний, отличающиеся механизмом воздействия на организм. Одним из путей является стратегия, основанная на известной регуляторной функции белка MDM2 по отношению к опухолевому супрессору – белку p53, который выполняет ключевую роль в запуске апоптоза при наличии серьезных нарушений в ДНК. Также известно, что в 40% раковых клеток наблюдается сверхэкспрессия белка MDM2, что увеличивает негативное влияние на активность белка p53. Перспективным решением проблемы является создание молекул-ингибиторов, вступающих в связывание с MDM2 и высвобождающих p53, в частности производных спиро[пирролидиноксиндолов], некоторые из которых уже зарекомендовали себя в качестве эффективных ингибиторов MDM2.

Данная работа посвящена молекулярному моделированию связывания производных спирохромено[3,4-с]-пирролидинов с активным сайтом белка MDM2. Проведено *in silico* моделирование для 10 комплексов белок-лиганд, включающее докинг, моделирование молекулярной динамики и количественную оценку свободной энергии связывания по методу MM/GBSA. Докинг проводился с использованием программного обеспечения AutodockVina со скоринг функцией AD4. Моделирование молекулярной динамики проводилось в программном пакете GROMACS с силовым полем AMBER99SB в NPT ансамбле при T = 300 K и p = 1 бар в течение 200-300 нс с шагом интегрирования 2 фс. Для расчета MM/GBSA использовались модель Борна с параметрами $igb = 5$ при T = 300 K в программном пакете `gmx_MMPBSA` и кадры с конечного промежутка траектории МД, описывающие не менее 50 нс траектории, характеризующейся выходом на плато RMSD белка и лиганда.

Показано, что в рядах лигандов замена спирооксиндольного фрагмента на спироинденохиноксалиновый ведет к уменьшению специфичности связывания с белком MDM2. Выявлены два наиболее вероятных ингибитора белка MDM2.

Новые 2D Янус структуры для производства водорода в фотокаталитической реакции расщепления воды

**Суханова Е.В.¹, Сагатов Н.², Орешонков А.С.¹,
Гаврюшкин П.Н.¹, Попов З.И.¹**

*¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской
академии наук, г. Москва*

*²Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН,
г. Новосибирск
yekaterina.sukhanova@phystech.edu*

Сегодня особенно остро стоит проблема разработки новых и усовершенствование уже существующих способов получения экологически чистых видов топлива, поскольку с каждым

годом мировое потребление электроэнергии только увеличивается (по оценкам достигнет более 30 ТВт к 2050 [1]), как и растет число выбросов парниковых газов в атмосферу [2]. Поскольку и солнечный свет, и вода находятся в изобилии и являются доступными ресурсами, перспективным направлением исследований является изучение процесса получения экологически чистого водородного топлива с использованием реакции фотокаталитического расщепления воды, в которой не используются ископаемые виды топлива, а сама реакция не сопровождается выбросами парниковых газов в атмосферу. Для проведения реакции необходимы полупроводниковые материалы, выступающие в роли катализаторов, которые поглощают солнечный свет и инициируют процесс расщепления воды. Первым примененным материалом стал диоксид титана, который однако не способен поглощать излучение в видимом диапазоне света, содержащем около половины мощности падающего солнечного излучения, а также характеризуется низкой квантовой эффективностью в ~10% [3]. Недавно были предложены материалы, которые позволили достичь квантовой эффективности в 96% [4], однако эффективности в 100% достичь пока не удалось, поэтому поиск новых возможных катализаторов является актуальным направлением исследований.

Для решения поставленной проблемы особенно перспективными кажется использование двумерных наноматериалов из-за большой площади поверхности, малым путем миграции фотогенерированных носителей заряда, а также из-за “настраиваемых” свойств, например, при помощи приложения деформации, изменения толщины материалов, приложения электрического поля или контролируемого создания дефектов в структуре [5]. В частности, интерес привлекают двумерные структуры типа “Янус”, которые обладают двумя неэквивалентными поверхностями, преимущество которых заключается в наличии дополнительного дипольного момента в поперечном направлении, что может улучшить разделение фотогенерированных носителей заряда [6] и снять ограничение на величину ширины запрещенной зоны для материала-катализатора (более 1,23 эВ [7]) из-за разного значения работы выхода электрона на противоположных сторонах структуры, позволяя на одной структуре одновременно катализировать процесс генерации кислорода и водорода.

В работе с использованием метода случайного поиска [8] был проведен теоретический поиск новых возможных монослойных “Янус”-структур в системе дихалькогенидов молибдена, в результате которого впервые была предложена новая фаза: A'-XMoY (X/Y = O, S, Se, Te). С использованием квантомеханических расчетов в рамках теории функционала электронной плотности (DFT) [9,10] было проведено теоретическое исследование динамической и термодинамической стабильности предложенных структур, в результате которого было установлено, что только структура A'-OMoTe не является стабильной. Для стабильных структур были рассчитаны спектры комбинационного рассеяния, которые облегчат экспериментальный поиск предложенных фаз. Анализ электронных и оптических свойств структур показал, что все рассмотренные монослои проявляют полупроводниковые свойства и характеризуются высоким поглощением света в видимой и ультрафиолетовых областях солнечного спектра. Было показано, что среди всех рассмотренных структур A'-SMoTe является наиболее перспективным кандидатом для производства водорода в реакции каталитического расщепления воды как в нейтральной, так и в кислой средах, в отличие от A'-SMoSe, SMoO, SeMoO, пригодных только в кислых средах, и A'-SeMoTe. – только в нейтральной среде. Кроме того, A'-SMoTe демонстрирует высокие значения квантовой эффективности.

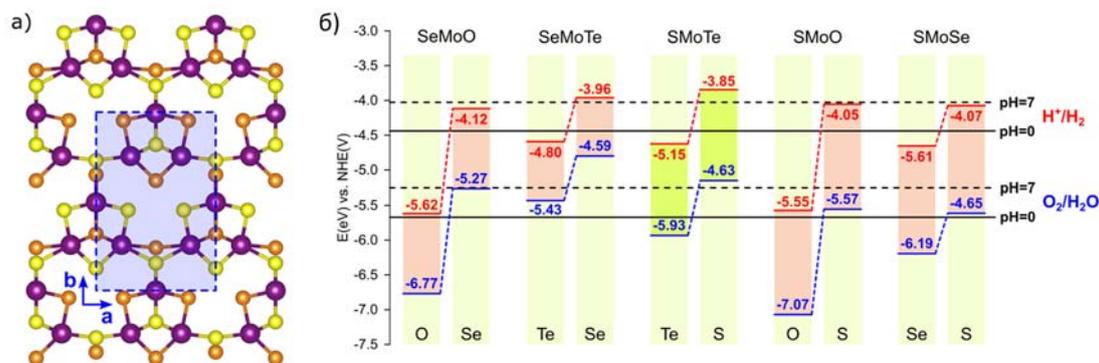


Рисунок 4. а) Атомная структура фазы A'-XMoY (X/Y = O, S, Se, Te). Фиолетовым, желтым (оранжевым) цветами обозначены атомы молибдена и халькогена X(Y), соответственно. б) Положения краев валентной зоны и зоны проводимости относительно уровня вакуума и редокс потенциала воды.

Полученные результаты показали, что семейство дихалькогенидов переходных металлов все еще может содержать некоторые новые динамически устойчивые структуры с важными выдающимися свойствами для практического применения, а также открывают перспективы к экспериментальному синтезу предложенных структур для последующего внедрения в фотокаталитические ячейки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 21-73-20183.

Литература

1. Jafari T. et al. Photocatalytic Water Splitting—The Untamed Dream: A Review of Recent Advances: 7 // *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2016. Vol. 21, № 7. P. 900.
2. WATER W.C. WMO greenhouse gas bulletin. 2019.
3. FUJISHIMA A., HONDA K. Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode // *Nature*. 1972. Vol. 238, № 5358. P. 37–38.
4. Takata T. et al. Photocatalytic water splitting with a quantum efficiency of almost unity: 7809 // *Nature*. Nature Publishing Group, 2020. Vol. 581, № 7809. P. 411–414.
5. Lin K. et al. An emerging bidirectional auxetic post-phosphorene ϵ -SnO monolayer: A promising Janus semiconductor with photocatalytic activity for solar-driven water splitting reaction // *Int. J. Hydrog. Energy*. 2022. Vol. 47, № 59. P. 24761–24776.
6. Li X., Li Z., Yang J. Proposed photosynthesis method for producing hydrogen from dissociated water molecules using incident near-infrared light // *Phys. Rev. Lett. APS*, 2014. Vol. 112, № 1. P. 018301.
7. Ni M. et al. A review and recent developments in photocatalytic water-splitting using TiO_2 for hydrogen production // *Renew. Sustain. Energy Rev. Elsevier*, 2007. Vol. 11, № 3. P. 401–425.
8. Pickard C.J., Needs R.J. High-Pressure Phases of Silane // *Phys. Rev. Lett. American Physical Society*, 2006. Vol. 97, № 4. P. 045504.
9. Hohenberg P., Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas // *Phys. Rev.* 1964. Vol. 136, № 3B. P. B864–B871.
10. Kohn W., Sham L.J. Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects // *Phys. Rev.* 1965. Vol. 140, № 4A. P. A1133–A1138.

Модификация фолиевой кислотой наносистем на основе магнитных наночастиц и человеческого сывороточного альбумина

**А.В. Торопцева^{1,*}, Д.С. Хачатрян^{1,2}, М.Г. Горобец¹, П.Г. Пронкин¹,
М.А. Градова³, Э.З. Садыкова¹, М.И. Абдуллина¹, М.Л. Лопухова¹,
А.В. Колотаев², А.В. Бычкова¹**

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», г. Москва

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН», г. Москва

* E-mail: toroptsevaanna@gmail.com

Активное нацеливание лекарств для лечения рака различных органов может быть осуществлено посредством наносистем, которые накапливаются в определенной области благодаря биовекторам (агентам, направляющим наночастицы к мишени) на их поверхности, обеспечивающим их связь с целью, а также с помощью концентрирования лекарств в целевой области с применением магнитного поля. В качестве таких биовекторов используются антитела, пептиды или фолиевая кислота [1].

В данной работе в качестве функционализирующего агента выбрана модифицированная фолиевая кислота (мФК), рецепторы к остаткам фолиевой кислоты экспрессируются несколькими видами опухолей – опухоли эпителия молочной железы мыши, опухоли носоглотки [2], рак молочной железы, рак яичников [3], что создает возможность с помощью нацеливания фолиевой кислотой на раковую опухоль обеспечить накопление лекарства в опухоли и его контролируемое высвобождение. Также следует отметить, что данный биовектор прост в производстве, обладает низкой стоимостью и биосовместим. Модифицированные фолиевой кислотой МНЧ используются

в качестве био вектора для лечения FR-положительной клеточной линии рака молочной железы MCF-7 человека и клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549 [4]), рака печени [5], колоректальной аденокарциномы человека HT-29 [6], рака яичников и меланомы.

За транспорт различных субстанций в организме отвечает сывороточный альбумин. Данный белок способен обратимо связываться с лекарственными веществами (ЛВ), предотвращая их деградацию. Также альбумин обладает биосовместимостью, биоразлагаемостью и нетоксичностью. Благодаря данным характеристикам, он довольно широко распространён в качестве биосовместимого покрытия для наночастиц, является зачастую компонентом гибридных наносистем и обеспечивает транспорт ЛВ к опухолевым мишеням [7].

Цель данной работы – модификация фолиевой кислотой (мФК) наносистем на основе магнитных наночастиц (МНЧ) и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА).

В настоящей работе были использованы МНЧ магнетита (Fe_3O_4), синтезированные методом химического соосаждения из растворов солей железа [8]. Для формирования устойчивого покрытия из сывороточного альбумина использовали человеческий сывороточный альбумин (A1653, Sigma-Aldrich, USA). Фолиевая кислота для связывания с поверхностью функциональных систем была предоставлена НИЦ «Курчатовский институт» — ИРЕА. Концентрацию альбумина, фолиевой кислоты и МНЧ, агрегирование частиц в растворе оценивали методом спектрофотометрии УФ/видимой области на спектрофотометре SPECTROstarNano (BMG Labtech, Germany). Для проведения осаждения образцов методом центрифугирования (ЦФ) использовали центрифугу (Eppendorf, 14500 об/мин, 15 мин). Устойчивость белкового покрытия подтверждали с применением "иммуноглобулинового теста", основанного на способности иммуноглобулина G вытеснять с поверхности наночастиц неустойчивые покрытия из сывороточного альбумина [9]. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Флюорат-02-Панорама («Люмекс», Россия) в диапазоне длин волн 300-500 нм (длина волны возбуждения составляла 295 нм).

Показано, что добавление мФК к ЧСА приводит к тушению пика флуоресценции триптофана ЧСА (на 340 нм), что может свидетельствовать о модификации индольного кольца триптофана (рис. 1) [10]. Данный эффект был также продемонстрирован другими исследователями, показавшими снижение флуоресценции триптофана ЧСА при добавлении мФК в различных соотношениях (рис. 2) [11].

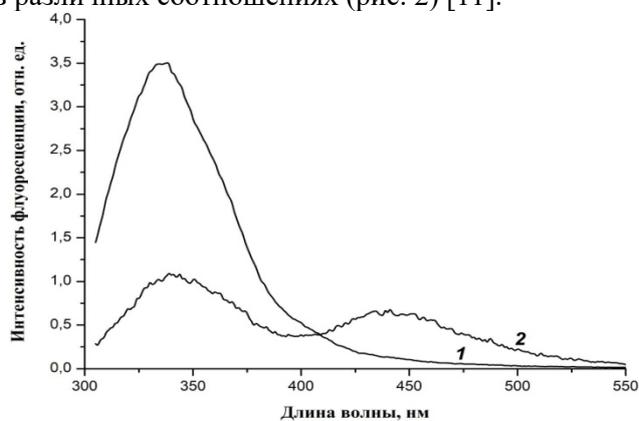


Рис. 1. Спектры флуоресценции (длина волны возбуждения 295 нм) ЧСА 1 мг/мл (1) и смеси ЧСА и мФК (0,083 мг/мл) после инкубации в течение 30 минут.

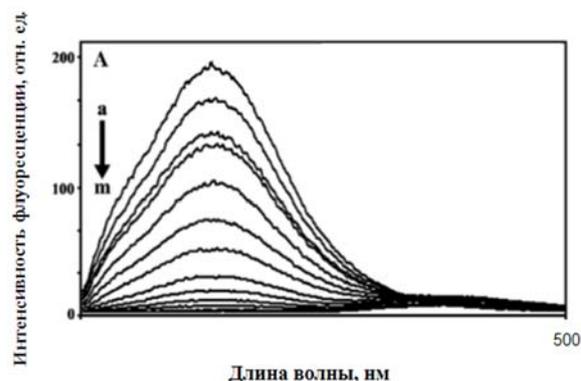


Рис. 2. Спектры флуоресценции систем ФК+ЧСА в 10 мМТрис–HCl буфере pH 7,4 при 25 °С для ФК+ЧСА: (а) свободный ЧСА (3,75 мкМ), (b-m) ЧСА 3,75 мкМ с 2, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80 и 100 мкМ ФК.

Нами был проведен ряд экспериментальных работ с использованием различных соотношений мФК/ЧСА(моль/моль): 7/1; 4/1; 1/1. При проведении «иммуноглобулинового теста» было доказано наличие устойчивого покрытия в образцах состава (МНЧ+ЧСА+7мФК), (МНЧ+ЧСА+4мФК)и (МНЧ+ЧСА+1мФК). При соотношении 1/1 спектры ЧСА и ЧСА+мФК были достаточно слабо различимыми, вследствие чего в большинстве экспериментов использовали более высокие соотношения мФК/ЧСА. Соотношение 4/1 в водной среде привело к сильному осаждению после ЦФ-я образца мФК в отличие от образца мФК+ЧСА, однако в среде, содержащей ДМСО, наблюдалось более слабое осаждение. Исходя из полученных результатов, водную среду выбирали для разбавления образцов, создавая менее предпочтительные условия для стабильности несвязанной мФК. Соотношение 7/1 было выбрано для последующих экспериментов

в связи с большей наглядностью при анализе систем методом спектрофотометрии УФ/видимой области.

Путем ЦФ образцов состава ЧСА+мФК после их инкубации в течение 30 мин и 24 ч было доказано, что:

1. В присутствии ЧСА наблюдается большая стабильность мФК при инкубации 24 часа, чем без ЧСА (в отсутствие ЧСА происходит значительное оседание мФК при ЦФ, что является признаком агрегации мФК в течение 24 ч) (рис. 3);
2. Спектр системы ЧСА+мФК после 30 минут инкубации отличается от суперпозиции спектров ЧСА и мФК. Полученные эффекты являются свидетельствами связывания мФК с ЧСА уже через 30 минут (рис. 4)

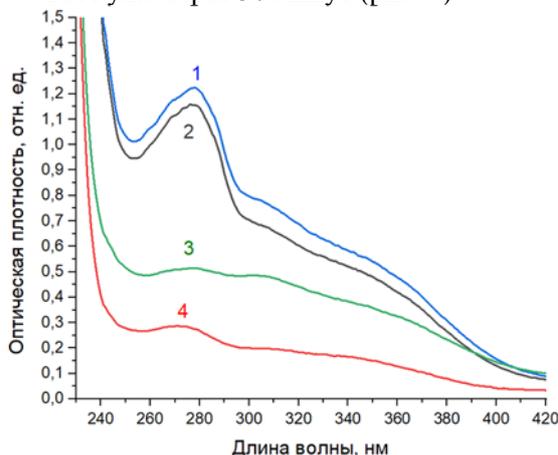


Рис. 3. Спектры поглощения в системах, инкубированных 24 ч и разбавленных в 24 раза водой: (1) и (2) - ЧСА+мФК; (3) и (4) - мФК; (2) и (4) - надосадочные растворы, полученные после ЦФ.

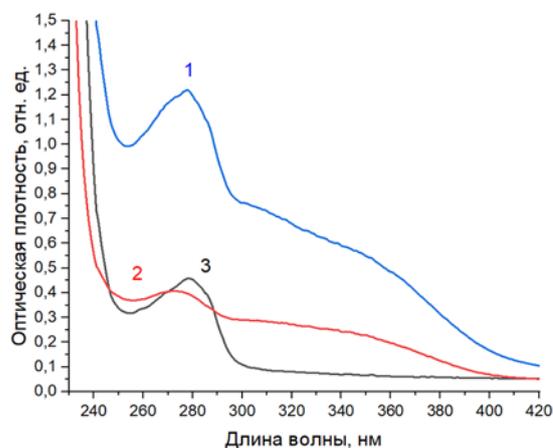


Рис. 4. Спектры поглощения в системах, инкубированных 30 мин, разбавленных в 24 раза водой и повторно инкубированных 24 ч: (1) ЧСА+мФК; (2) мФК; (3) ЧСА.

В результате проведенных нами исследований были получены стабильные золи МНЧ, покрытых устойчивым покрытием из человеческого сывороточного альбумина, связанного с модифицированной фолиевой кислотой. В дальнейших исследованиях планируется осуществить количественную оценку связывания фолиевой кислоты с наночастицами и введение полученных функциональных систем в опухоли животных для оценки эффективности полученных систем. На дальнейших этапах работы предполагается оценка связывания лекарственных веществ с покрытиями из сывороточного альбумина.

Работы выполнены за счет гранта Российского научного фонда № 22-75-10150, <https://rscf.ru/project/22-75-10150/>

Список литературы:

- [1] DeeraGeethakumari, AnoopBhaskaranSathyabhama, KrishnapriyaRajiSathyan, Dhaneesha Mohandas, Jisha V. Somasekharan, SajeevanThavaroolPuthiyedathu, Folate functionalized chitosan nanoparticles as targeted delivery systems for improved anticancer efficiency of cytarabine in MCF-7 human breast cancer cell lines, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 199, 2022, Pages 150-161.
- [2] Fathima Zahra Nawaz, Edward T. Kipreos, Emerging roles for folate receptor FOLR1 in signaling and cancer, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, Volume 33, Issue 3, 2022, Pages 159-174
- [3] Olivia Noe, Nealie Ngo, Leslie Lin, Laura Stanbery, Justin Fortune Creeden, DanaeHamouda, John Nemunaitis, Folate Receptor as a Biomarker and Therapeutic Target in Solid Tumors, *Current Problems in Cancer*, 2022, 100917
- [4] CodinaMovileanu, Maria Anghelache, MihaelaTurtoi, GeaninaVoicu, IonelaAndreeaNeacsu, DenisaFicai, Roxana Trusca, OvidiuOprea, Anton Ficai, EcaterinaAndronescu, Manuela Calin, Folic acid-decorated PEGylated magnetite nanoparticles as efficient drug carriers to tumor cells overexpressing folic acid receptor, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 625, 2022, 122064.
- [5] Wenbo Fan, YuediXu, Zheng Li &Qiang Li (2019) Folic acid-modified β -cyclodextrin nanoparticles as drug delivery to load DOX for liver cancer therapeutics, *Soft Materials*, 17:4, Pages 437-447.

- [6] MohadeseAlirezaei, Maryam Ghobeh, Ali Es-haghi, Poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA)-based nanoparticles modified with chitosan-folic acid to delivery of Artemisia vulgaris L. essential oil to HT-29 cancer cells, *Process Biochemistry*, Volume 121, 2022, Pages 207-215.
- [7] Chubarov, A.S. Serum Albumin for Magnetic Nanoparticles Coating. *Magnetochemistry* 2022, 8(2):13.
- [8] В.Е. Прусаков, Ю.В. Максимов, К.Н. Нищев, А.В. Голубьев, В.А. Беглов, Ю.Ф. Крупянский, А.В. Бычкова, А.Л. Иорданский, А.А. Берлин. Гибридные, биодegradуемые нанокomпозиты на основе биополиэфирной матрицы и магнитных наночастиц оксида железа: структурные, магнитные и электронные характеристики. *Химическая физика*. 2018, том 37, № 1, с. 83–90.
- [9] Bychkova A.V., Lopukhova M.V., Wasserman L.A., Degtyarev Y.N., Kovarski A.L., Chakraborti S., Mitkevich V.A. The influence of pH and ionic strength on the interactions between human serum albumin and magnetic iron oxide nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022 Jan 1;194:654-665.
- [10] Vivian J.T., Callis P.R., 2001. Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins // *Biophys. J.* V. 80. Issue 5. Pages 2093–2109.
- [11] P. Bourassa, I. Hasni, H.A. Tajmir-Riahi, Folic acid complexes with human and bovine serum albumins, *Food Chemistry*, Volume 129, Issue 3, 2011, Pages 1148-1155.

Увеличение эффективности инкапсуляции производных Pt в полимерные наночастицы путем их структурной модификации

**М.В. Чиркина¹, М.Б. Сокол¹, Н.Г. Яббаров¹, М.Р. Моллаева¹,
Т.А. Подругина², А.С. Павлова², В.В. Темнов², Е.Д. Никольская¹**

¹ Институт Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: fom.marg@mail.ru

В работе описывается комбинация подходов in silico и in vitro, направленных на оптимизацию подходов получения полимерных наночастиц. Был использован онлайн-сервис PASS для прогнозирования биологической активности новых производных Pt. Последующее моделирование молекулярной динамики выявило корреляцию между энергией связывания действующего вещества и полимера, а также эффективностью инкапсуляции, профилем высвобождения лекарственного средства и химической структурой производных. Мы применили анализ ICP-MS, МТТ-тест и анализ гемолитической активности для оценки эффективности инкапсуляции, цитотоксической активности и гемосовместимости полученных наночастиц.

Введение. Препараты на основе платины (Pt) широко применяются в терапии злокачественных новообразований человека. Среди них карбоплатин (Крт), одобренный во всем мире цитостатический препарат алкилирующего действия, по праву занимает ведущее положение. Известно, что опухолевые клетки и ткани, подвергшиеся химиотерапии, приобретают фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), выражающийся, в снижении интенсивности накопления препаратов в трансформированных тканях и, как следствие, в уменьшении эффективности их действия. Актуальная задача на сегодняшний день заключается в создании новых аналогов противоопухолевых препаратов для преодоления МЛУ и увеличении их эффективности. Создание таких аналогов препаратов платины, обладающих улучшенными характеристиками, представляется востребованным и актуальным направлением исследований. Так же, для преодоления МЛУ и улучшения профиля безопасности цитостатиков активно используется стратегия доставки с помощью наночастиц. Инкапсуляция препаратов в матрицу наночастиц направлена на увеличение селективности накопления и улучшения фармакокинетического профиля, а также биодоступности инкапсулированного препарата. Среди многочисленных матриц для дизайна доставки лекарств можно выделить сополимер полимолочной и гликолевой кислот (PLGA) благодаря его свойствам биоразлагаемости и биосовместимости.

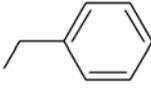
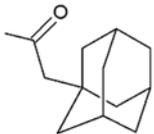
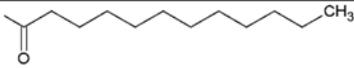
Компьютерное моделирование широко используется для оценки взаимодействия препаратов с различными матрицами. Дизайн фармацевтических препаратов *in silico* в настоящее время всё чаще используется в современных исследованиях в области доставки лекарств, поскольку позволяет, основываясь на молекулярных взаимодействиях, как лекарственного вещества, так и

матрицы, выбрать оптимальный носитель для поставленных задач. Скрининг спектров биологической активности органических соединений на основе их двумерной структурной формулы, в режиме реального времени с помощью вычислительного инструмента PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) значительно упрощает процесс их разработки.

Материалы и методы. Был использован *in silico* метод молекулярного моделирования для оценки влияния различных лигандов карбоплатина на его эффективность инкапсуляции и сродство к PLGA. Применён онлайн-сервис PASS для прогнозирования противоопухолевой активности производных карбоплатина. Используя полученные данные, были синтезированы и инкапсулированы в PLGA производные карбоплатина. Для сравнения результатов, полученных *in silico* с экспериментальными данными были проведены исследования полученных наночастиц, для анализа применения методов *in silico* и *in vitro* для дизайна наночастиц PLGA с предсказанием их свойств и биологической активности. В частности, полученные наночастицы были охарактеризованы (по размеру, zeta-потенциалу и индексу полидисперсности (PDI)), была изучена морфология, общее содержание производных (OC), была изучена кинетика высвобождения, а также гемолитическая и цитотоксическая активность *in vitro*.

Результаты. Были выбраны несколько типов лигандов с различными структурными особенностями (таблица 1): два линейных алкильных лиганда (Kpt4 и Kpt3), бензильный (Kpt1) и адамантильный (Kpt2) лиганды.

Таблица 1. Структуры и свойства лигандов производных карбоплатина.

Соединение	Лиганд	Молекулярный вес	Липофильность (logP)
Kpt1	 R' = PhCH ₂	121.16	1.89
Kpt2	 R' = AdCH ₂ C(O)	209.27	3.06
Kpt3	 R' = n-C ₁₁ H ₂₃ C(O)	213.34	5.35
Kpt4	 R' = n-C ₄ H ₉ C(O)	101.13	1.50

Было проведено молекулярное моделирование взаимодействия новых производных карбоплатина с PLGA, чтобы определить влияние радикала на сродство к полимерной матрице по сравнению с карбоплатином. Молекулярный докинг исследованных молекул показал наименьшее значение энергии связи (лучшее взаимодействие с полимерной матрицей) в случае соединения Kpt3. Это соответствует рассчитанным показателям: максимальные значения logP, молекулярной массы и гибкости, при минимальной глобулярности (таблица 2). Таким образом, было показано, что энергия связи всех производных была ниже, чем у карбоплатина, что указывает на улучшенное сродство новых производных к полимеру. Оценка противоопухолевой активности предлагаемых химических структур с помощью онлайн-сервиса PASS показала, что модифицированный лигандами из таблицы 1 карбоплатин будет сохранять противоопухолевую активность оригинального соединения.

Таблица 2. Основные физико-химические дескрипторы исследуемых молекул.

Compound	Total polar surface area	Number of H-bond acceptors	Number of H-bond donors	Molecular Globularity	Molecular Flexibility	logP (o/w)	Molecular weight
Kpt	80.18	2	0	0.17	2.72	-1.80	370.25
Kpt1	32.03	3	0	0.07	4.23	0.74	479.38
Kpt2	48.53	3	0	0.10	4.72	1.52	565.51

Крт3	65.63	3	0	0.02	9.89	3.38	571.56
Крт4	63.05	3	0	0.07	5.43	0.29	473.37

Основываясь на данных, спрогнозированных методами *in silico*, был проведён синтез новых производных карбоплатина, которые в дальнейшем использовали для получения полимерных наночастиц (NP).

Частицы PLGA были получены методом одинарного эмульгирования. Морфологию анализировали с помощью ПЭМ (просвечивающей электронной микроскопии), которая показала, что частицы имеют сферическую форму. Размер наночастиц находился в диапазоне 180-300 нм (таблица 3), что способствует пассивному транспорту и накоплению в опухоли за счет EPR-эффекта (Enhanced Permeability Retention). Все образцы имели значения ζ -потенциала от -12,8 мВ до -28,0 мВ, которые свидетельствуют о достаточной коллоидной стабильности систем.

Таблица 3. Средний диаметр, индекс полидисперсности (PDI), ζ -потенциал, общее содержание (ОС) и степень включения (СВ) полученных полимерных частиц.

Наночастицы	Средний диаметр, нм	PDI	ζ -потенциал, мВ	ОС, %масс.	СВ, %
Крт-NP	215±38	0.243±14	-28.0±3.2	0.16±0.04	54±3
Крт1-NP	303±26	0.204±13	-17.0±2.1	0.21±0.03	60±2
Крт2-NP	247±45	0.277±11	-12.8±1.7	0.39±0.03	62±3
Крт3-NP	180±37	0.127±8	-22.0±2.3	1.07±0.02*	92±2*
Крт4-NP	245±51	0.245±9	-13.7±1.9	0.30±0.03	60±1

* $p < 0,05$ по сравнению с Крт-NP, Крт1-NP, Крт2-NP и Крт4-NP

Наблюдалось значительное увеличение ($p < 0,05$) эффективности инкапсуляции Крт3-NP по сравнению с другими препаратами, что соответствует результатам оценки энергии связывания *in silico*. Крт1-NP, Крт2-NP и Крт4-NP показали незначительный рост степени включения при инкапсуляции по сравнению с Крт-NP. Результаты измерения общего содержания вещества внутри частиц имеют сходную картину: значения Крт1-NP, Крт2-NP и Крт4-NP немного увеличились в отличие от резкого увеличения содержания Крт3-NP. Вероятно, именно сочетание высокой гибкости, logP и молекулярной массы обеспечивает значительное увеличение концентрации лекарственного средства в наночастицах PLGA.

Изучение релиза карбоплатина и его производных из наночастиц выявило двухфазный характер профиля высвобождения. Первоначальный всплеск высвобождения наблюдался в течение первых 5 часов, за которым следовала пролонгированная фаза релиза в течение 80 часов.

Поскольку полученные наночастицы предназначены для парентерального введения, они будут взаимодействовать с эритроцитами. Отсюда возникает потребность исследовать их гемосовместимость путем анализа гемолиза эритроцитов, вызванного воздействием наночастиц. Все наночастицы в максимальной концентрации, кроме Крт4-NP, проявляли слабое гемолитическое действие (от 3 до 4%). Крт4-NP в максимальной концентрации проявлял небольшую гемолитическую активность (6,1%). Полученные результаты доказывают безопасность внутривенного введения разработанных наночастиц в дозах, предполагаемых для применения *in vivo*.

С помощью МТТ теста было проведено исследование цитотоксической активности, чтобы определить влияние структуры лиганда на цитотоксичность соединений. В качестве модельной системы использовалась клеточная линия немелкоклеточной карциномы легкого линии А549, поскольку одним из основных показаний к применению карбоплатина является лечение рака легкого. В результате было установлено, что длинноцепочечный алкильный радикал способствовал значительному ($p < 0,05$) увеличению активности (IC50 для Крт и Крт3 составили 39,70 мкМ и 7,32 мкМ соответственно). Крт1 и Крт4 существенно не влияли на изменение цитотоксичности по сравнению с карбоплатином (IC50 для Крт1 и Крт4 составляли 34,20 мкМ и 37,30 мкМ соответственно). Адамантильный лиганд (Крт2) достоверно ($p < 0,05$) снижал цитотоксичность по сравнению с карбоплатином (IC50 для Крт2 составила 79,30 мкМ).

Для изучения апоптотической активности, вызванной Кртами и Крт-NP, применяли метод двойного окрашивания Annexin V-FITC/PI. Наблюдалось индуцированное Кртами и его производными повреждение клеток линии А549 с образованием поздних и ранних апоптотических популяций. Среди всех образцов Крт3 (клетки с поздним апоптозом составляли 19,1 % от всей популяции) и Крт3-NPs (22,6 %) показали наиболее выраженную токсичность в отличие от контроля - Крт (12,7 %) и Крт-NPs (16,4 %), когда Крт4 (9,2 %) и Крт4-NP (14,8 %) проявляли более низкий токсический эффект по сравнению с контролем. В целом, поздние и ранние

апоптотические популяции после инкубации с наночастицами были выше, чем со свободными соединениями, что можно объяснить низкой устойчивостью производных Pt в водных средах и изменением путей интернализации.

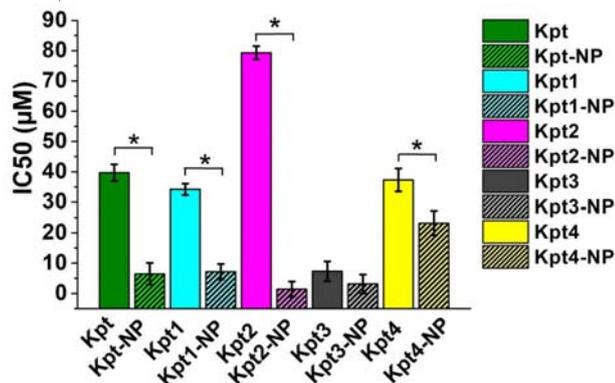


Рисунок 1. Выживаемость клеток линии A549 после инкубации в течение 72 ч. Сравнение пар Kpts/NPs

Выводы. Была установлена взаимосвязь между структурами производных карбоплатина и их аффинностью связывания с матрицей PLGA для обеспечения максимальной эффективности инкапсуляции. Молекулярное моделирование показало, что лиганд с длинной алкильной цепью (C14) обладает самой высокой липофильностью, молекулярной массой и гибкостью по сравнению с другими используемыми лигандами, давая минимальную (т.е. благоприятную) энергию связывания с PLGA 50:50. Наблюдалась взаимосвязь между рассчитанной энергией связывания и значениями эффективности инкапсуляции наряду с кинетикой высвобождения. Прогноз программы PASS показал, что производные карбоплатина проявляют аналогичную ему противоопухолевую активность. Дальнейшие эксперименты *in vitro* подтвердили, что инкапсулированные соединения сохраняют цитотоксичность даже после включения их в наночастицы. В целом, производные карбоплатина проявляли сходный с карбоплатином уровень цитотоксичности, за исключением Kpt3, характеризующегося более высокой активностью, и Kpt2, характеризующегося меньшей активностью. Стоит отметить, что наночастицы в целом проявляли более высокий уровень активности в обоих случаях - после длительной (72 ч) и кратковременной (1 ч) инкубации, что можно объяснить двумя факторами - альтернативными путями интернализации и более высокой стабильностью производных внутри наночастиц. Результаты показывают, что комбинированный подход *in silico* и *in vitro* является успешной стратегией разработки наночастиц PLGA. Описанный подход может быть применен для дизайна систем доставки лекарственных средств с низкой загрузкой и эффективностью инкапсуляции для увеличения этих параметров.

Comparison of data mining approaches and USPEX for predicting phase equilibria

I.V. Chepkasov, A.P. Maltsev

Skolkovo Institute of Science and Technology, Bolshoy Boulevard 30,
bld. 1, Moscow 121205, Russian Federation
e-mail: I.Chepkasov@skotech.ru

The number and content of databases of crystalline substances is growing every year [1]. Despite the growing availability of data, databases are often contradictory and inconsistent, information still needs to be systematized. We aim to compare two most popular databases - Materials Project [1] and OQMD [2]. Materials Project database was established in 2011 with an emphasis on battery research, but now in this database, there are more than 140,000 inorganic compounds. OQMD database has more than 1 million structures.

For comparison, we conducted an extensive search for crystal structures in the ternary systems Li-P-S, Na-P-S, K-P-S using the USPEX evolutionary algorithm and density functional theory (DFT). Figure 1 (a, b, c) shows an example of such predictions of phase diagrams from Materials Project and OQMD databases for Li-P-S, Na-P-S and K-P-S systems. Both databases give a similar result, but with several exceptions.

First of all, the difference between databases is manifested in binary compounds. In the MP database we see LiS_4 , K_2S , NaP_7 , KP_{15} , K_4P_3 compounds to be stable, while in the OQMD they are not stable. On the contrary, in the OQMD database phases P_4S_5 , Li_3P_{11} , NaP_5 , Na_4P_3 , KP_5 , K_5P_4 are stable, while in the MP are not. In three-component systems there are also differences, so phases Na_2PS_3 and K_2PS_3 are stable in the MP database and not stable in the OQMD.

USPEX calculations demonstrate that neither of the popular data mining approaches, Materials Project and OQMD, gives correct and complete phase diagram. Nevertheless, mostly USPEX calculations are similar with the MP database, in particular results of ternary compound predictions of Na-P-S and K-P-S are in the accordance with the MP, however, Li_2PS_3 is stable, while is unstable in both databases. Mostly, USPEX and DFT calculations of binary compounds are in a good agreement with the Materials Project database results, with the only one exception: P_2S_7 becomes unstable in our DFT calculations.

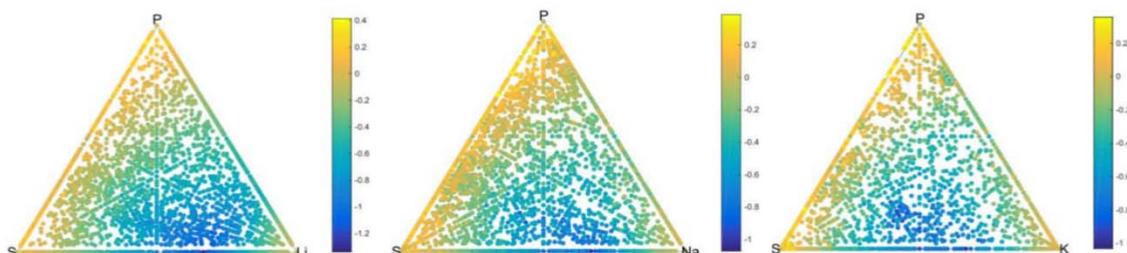


Fig. 1. Formation energy diagrams of Li-P-S, Na-P-S and K-P-S, calculated with the use of USPEX and DFT.

Neither of the popular data mining approaches, Materials Project and OQMD, gives correct and complete phase diagram. The use of USPEX allows you to find a large number of phases, both already known and completely new. While for stable phases the combination of databases seems to give a nearly complete picture, for metastable phases the use of USPEX gives numerous low-energy phases.

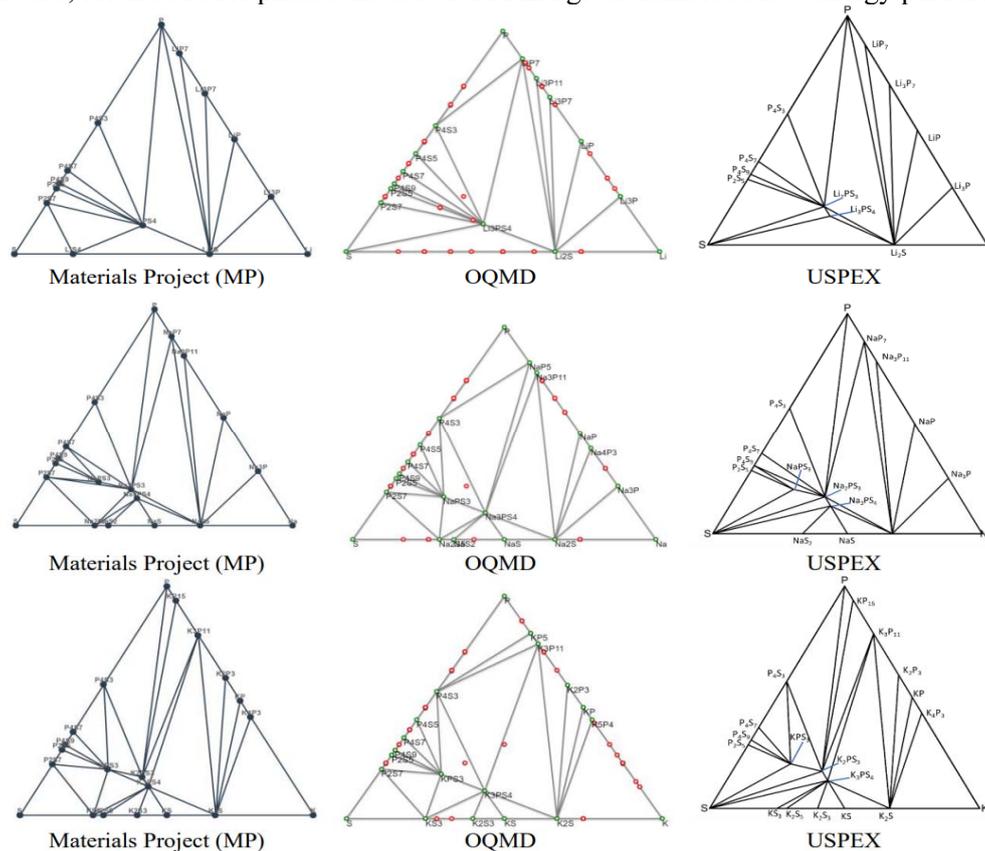


Fig. 2 (a, b, c). Phase diagrams of Li-P-S, Na-P-S and K-P-S systems from Materials Project, OQMD and USPEX.

Reference:

1. <https://materialsproject.org/>
2. <https://oqmd.org/>

Acknowledgements

The study was supported by the Russian Science Foundation grant (No. 22-73-00219)



Чернышов С.В., Люсова Л.Р.

*ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет»,
ИТХТ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия*

Аннотация: Работа посвящена разработке эластомерных материалов на основе синтетического изопренового каучука (СКИ-3), не уступающих по свойствам эластомерным материалам на основе натурального каучука, путем совмещения с когезионнопрочным полимером. В качестве полимера с высокой когезионной прочностью был выбран бутадиеновый каучук с 77,7 % содержанием 1,2 структуры. Установлено, что совмещение СКИ-3 с СКД-777 приводит к значительному повышению когезионной прочности (на 60 % при содержании СКД-777 20 масс%).

Ключевые слова: импортозамещение, натуральный каучук, синтетический изопреновый каучук, модификация каучуков, когезионная прочность, смеси полимеров.

Отечественный синтетический изопреновый каучук (марки СКИ-3) является незаменимым полимером для производства большого количества таких изделий из эластомеров, как шины, шины, медицинские изделия, изделия оборонного и стратегического назначения. Он является аналогом натурального каучука (НК), но по структуре полимера, а не по свойствам. Одним из основных недостатков промышленного синтетического изопренового каучука по сравнению с НК является низкая когезионная прочность резиновых смесей на его основе, которая важна при заготовительно-сборочных операциях в производстве шин или других резиновых изделий. Поэтому разработка отечественного материала, способного заменить импортный натуральный каучук в резиновых изделиях, является своевременной и актуальной задачей [1-2].

Целью работы является получение повышенных когезионных характеристик путем совмещения СКИ-3 с СКД-777, а также изучение влияния способов и технологических параметров смешения на данный показатель.

Анализ научно-технической литературы [1,3] показал существования двух путей повышения когезионной прочности синтетического полиизопрена:

- 1) Химическая модификация
- 2) Физическая модификация

За последние 50 лет для получения полного синтетического аналога НК было проведено множество исследовательских работ по первому пути, то есть химической модификации синтетического изопренового каучука. Большая часть исследовательских работ была проведена ФГУП «НИИСК» и его Воронежским филиалом [1]. Многие типы химической модификации СКИ-3 дали возможность повысить в значительной степени когезионную прочность, но не получили дальнейшего развития по разным причинам: канцерогенности, токсичности, а также неудовлетворительной технологичности [2]. Физическая модификация, то есть совмещение с высококогезионным полимером, является перспективным способом для производства резиновых изделий, так как не требует дополнительных технологических операций.

В ходе работы проводили совмещение НК и СКИ-3 с каучуком СКД-777 и изучали ненаполненные и наполненные техническим углеродом N330 смеси на основе этих каучуков. Из анализа литературы [4] известно, что использование полибутадиена с повышенным содержанием 1,2 звеньев в смесях с каучуком СКИ-3 крайне перспективно, так как он повышает межмолекулярное взаимодействие и устойчивость к тепловому старению и вальцеванию резиновых смесей. В литературе [5-6] указывается, что полибутадиены с повышенным содержанием 1,2 структуры частично взаиморастворимы с цис-1,4-полиизопреном, что делает такую смесь достаточно уникальной.

Нами было исследовано влияние на когезионную прочность способа и технологических параметров изготовления смесей каучуков. Результаты полученных исследований представлены на рис. 1-2.

Пластикацию и совмещение каучуков проводили на лабораторных вальцах при температуре валков 50°C, а также в лабораторном резиносмесителе при температуре 107°C и 125°C в течение 3 минут (частота вращения роторов 43 об./мин.).

Во всех проведенных исследованиях было выбрано соотношение СКИ-3 и СКД-777 80/20, которое, как показано в [4,7] и проведенными нами экспериментами по определению упруго-прочностных испытаний резин, является наиболее оптимальным.

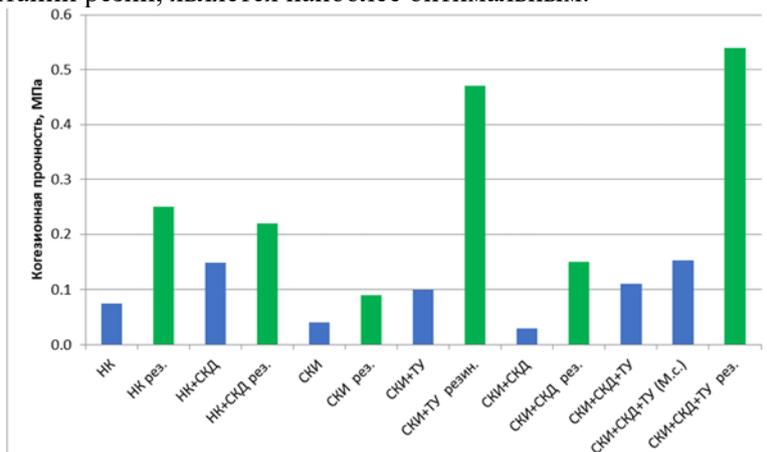


Рисунок 1 – Когезионная прочность индивидуальных каучуков и их смесей, полученных на вальцах и в резиносмесителе (рез. – резиносмеситель, ТУ – технический углерод N330, СКИ – каучук СКИ-3, СКД – каучук СКД-777, М.с. – маточная смесь).

Как можно наблюдать (рис. 1), что почти во всех случаях добавление 20 масс.ч. СКД-777 повышает когезионную прочность. Так, например, повышение когезионной прочности наполненной смеси СКИ-3 при добавлении СКД-777 на вальцах составило 60 %. При изготовлении наполненной смеси СКИ-3 с СКД-777 на вальцах путем создания маточных смесей отдельных каучуков когезионная прочность повышается до уровня (0,15 МПа) наполненного пластиката натурального каучука, полученного на вальцах. Повышение когезионной прочности, вероятно, связано с повышением межмолекулярного взаимодействия из-за наличия в СКД-777 винильных боковых групп, и химическим взаимодействием СКИ-3 с СКД-777 в результате механического смешения.

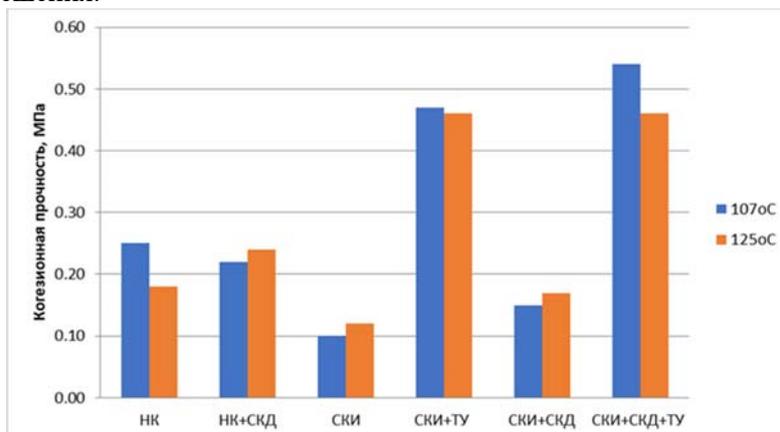


Рисунок 2 - Когезионная прочность индивидуальных каучуков и их смесей, полученных в резиносмесителе при температуре 107°C и 125 °C (ТУ – технический углерод N330, СКИ – каучук СКИ-3, СКД – каучук СКД-777).

Как видно из рис. 2, при повышении температуры смешения когезионная прочность натурального каучука падает более чем на 28%, в то время, как для синтетического изопренового каучука, его смеси с СКД-777 и смеси НК с СКД-777 повышение температуры приводит к повышению когезионной прочности. Повышение когезионной прочности можно объяснить более значительно выраженным процессом рекомбинации макрорадикалов (в результате перехода макрорадикалов среднемoleкулярной фракции в высокомолекулярные и сверхмолекулярные фракции) и ростом молекулярной массы каучука. Для наполненных техуглеродом смесей эффект был скромнее. Можно предположить, что технический углеродом в какой-то степени является инициатором деструкции и его введение приводит к повышению температуры смеси, что в сумме приводит к снижению когезионной прочности.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1. При совмещении СКИ-3 и СКД-777 в соотношении 80/20 когезионная прочность наполненных смесей возрастает на 15-60 % в зависимости от способа изготовления.

2. Наиболее эффективным способом изготовления смесей каучуков является смешение в резиносмесителе (когезионная прочность смесей с СКД-777, полученных в резиносмесителе, выше практически в 5 раз, чем на вальцах).

3. При совмещении на вальцах когезионная прочность наполненной и ненаполненной смеси каучуков возрастает на 30-109 %.

4. При повышении температуры смешения в резиносмесителе с 107°C до 125°C увеличивается когезионная прочность каучука СКИ-3 и смеси СКИ-3 с СКД-777 на 13-29 %. Это может свидетельствовать о повышении молекулярной массы СКИ-3 в результате рекомбинации макрорадикалов.

Список литературы:

1. Борейко, Н.П. Предпосылки для разработки государственной программы создания искусственного аналога натурального каучука / Н.П. Борейко, В.Н. Папков, Е.В. Комаров // Каучук и резина. — 2019. — Т. 78, № 6. — С. 380–383.
2. Люсова, Л.Р. Изучение возможности модификации синтетического полиизопрена путем совмещения с высококогезионным полимером / Л.Р. Люсова, С.В. Чернышов // Промышленное производство и использование эластомеров. - 2022. - № 1. - С. 40-44.
3. Куперман, Ф. Е. Новые каучуки для шин: натуральный каучук, синтетические стереорегулярные изопреновые и бутадиеновые каучуки, структура, свойства, применение / Ф. Е. Куперман. – Москва.: Научно-технический центр "НИИШП", 2009. - 606 с.
4. Куперман, Ф.Е. Новые каучуки для шин: растворные каучуки с повышенным содержанием винильных звеньев, альтернативные эмульсионному БСК: транс-полимеры и сополимеры изопрена и бутадиена / Ф. Е. Куперман. – Москва.: Научно-технический центр "НИИШП", 2011. - 367 с.
5. Giller, C.B. Heterogeneous networks of miscible rubber blends / C.B. Giller, C.M. Roland // International SAMPE Technical Conference. – Baltimore: SAMPE Baltimore 2015 Conference and Exhibition. 2015
6. The Science and Technology of Rubber. 4 ed. / ed. B. Erman, J. E. Mark, C. M. Roland – Oxford: Academic Press, 2013. - 801 p.
7. Тройнина, Н. В. Модификация СКИ-3 1,2-полибутадиенами с целью улучшения его технических свойств: диссертация кандидата технических наук: 05.17.06 / Н. В. Тройнина; Воронежская государственная технологическая академия; Ю.Ф. Шутилин. - Воронеж, 2000. - 190 с.

Теоретическое исследование двумерных халькогенидов платины

Чичеватов Г.Д.^{1,2}, Суханова Е.В.², Попов З.И.²

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская область

²Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН, Москва
chichevatov.gd@phystech.edu

Двумерные (2D) дихалькогениды платины PtX₂ (X = S, Se, Te) согласно теоретическим расчетам и экспериментальным данным могут быть стабильны в форме монослоя [1]. Благодаря высоким значениям подвижностей носителей зарядов и низкими значениями теплопроводности, дихалькогениды платины рассматриваются как перспективные материалы для термоэлектриков и электронных устройств, более того, их применение возможно в высокочувствительных и селективных сенсорах, например NO₂, а также в качестве катализаторов реакции фотоиндуцированного расщепления воды [2]. Динамически стабильные монослои дихалькогенидов платины обладают структурой типа CdI₂ [3], в которой атомы платины находятся в октаэдрическом окружении атомов халькогена, являются непрямозонными полупроводниками с постепенно уменьшающейся шириной запрещенной зоны от 1.7 до 0.4 эВ при переходе от дисульфида к теллуриду [4,5].

Помимо дихалькогенидов, известны структуры с другим стехиометрическим составом: например, слоистый Pt₃Te₄, известный как митрофановит [6], состоит из чередующихся монослоев PtTe₂ и Pt₂Te₂, является металлом и обладает самыми низкими наклоном Тафеля и перенапряжением для реакции получения водорода среди всех халькогенидов благородных металлов, практически совпадая с платиной на активированном угле по этим характеристикам [7].

Проведенный ранее поиск эффективных материалов для электрокаталитического расщепления воды или кислорода в классе двумерных халькогенидов платины привел к обнаружению некоторых монослоев с иной стехиометрией, нежели 1:2. Так, теоретически были предсказаны стабильность и возможность экслоиации монослоев Pt₂Te₂ [8] и Pt₅Se₄ [9].

Стоит отметить, что 2D соединения с нетипичной симметрией существуют среди халькогенидов палладия [10]. Кроме того, монослой дисульфида и диселенида палладия обладают наименьшей энергией формирования не в фазе CdI₂-типа, а в несвойственной дихалькогенидам переходных металлов фазе, состоящей из квадратно-плоскостных элементов (PtX₄)²⁻ [11]. Наконец, в классе 2D дихалькогенидов вольфрама и молибдена ранее уже был произведен успешный теоретический поиск новых материалов [12,13], а монослой Mo₅Te₈ [14] и некоторые M₂X₃ (M = Mo, W, X = S, Se) [15] были получены экспериментально. Таким образом, интересным представляется поиск дихалькогенидов платины с нестехиометрическим составом.

В данной работе с помощью эволюционного алгоритма USPEX [16–18] был произведен непредвзятый поиск новых двумерных халькогенидов платины. Оптимизация структур для нахождения их энергии основного состояния производилась при помощи метода функционала электронной плотности, реализованного в программе VASP [19–21], в рамках обобщенного градиентного приближения (GGA) с функционалом PBE [22] и PAW-псевдопотенциалами [23]. Расчет фоновых спектров для изучения стабильности предложенных структур производился с помощью библиотеки PHONOPY [24], а скорректированные силовые константы получены с помощью библиотеки HIPHIVE [25].

Было обнаружено, что для всех составов наиболее термодинамически стабильны монослой PtX₂, в точности соответствующие монослоям упомянутых выше CdI₂-фаза дихалькогенидов. Фазы с большим процентным содержанием атомов халькогенов отсутствуют на выпуклых оболочках. В ходе проведенного поиска найдены новые металлические фазы: у сульфидов - Pt₆S₂, Pt₈S₂, у селенидов - Pt₄Se₂, Pt₈Se₂, у теллуридов - Pt₃Te₂, Pt₈Te₄. Все они содержат один или два слоя платины, покрытые немногочисленными атомами халькогена. Исследованный ранее монослой Pt₅Se₄ является метастабильным. Также на выпуклых оболочках найдены фазы Pt₂S₂ и Pt₂Se₂ со структурой исследованного ранее монослоя Pt₂Te₂, которые являются динамически стабильными и проявляют металлические свойства. В отличие от монотеллурида платины трехмерные аналоги для таких монослоев неизвестны. Таким образом, по результатам работы были построены наиболее полные на настоящий момент карты двумерных соединений состава Pt-S, Pt-Se, Pt-Te.

Список литературы

1. Pi L. et al. Recent Progress on 2D Noble-Transition-Metal Dichalcogenides // *Adv. Funct. Mater.* 2019. Vol. 29, № 51. P. 1904932.
2. Chen E. et al. 2D layered noble metal dichalcogenides (Pt, Pd, Se, S) for electronics and energy applications // *Mater. Today Adv.* 2020. Vol. 7. P. 100076.
3. Yang H. et al. Structural and quantum-state phase transitions in van der Waals layered materials: 10 // *Nat. Phys.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 13, № 10. P. 931–937.
4. Du J. et al. Elastic, electronic and optical properties of the two-dimensional PtX₂ (X = S, Se, and Te) monolayer // *Appl. Surf. Sci.* 2018. Vol. 435. P. 476–482.
5. Villaos R.A.B. et al. Thickness dependent electronic properties of Pt dichalcogenides: 1 // *Npj 2D Mater. Appl.* Nature Publishing Group, 2019. Vol. 3, № 1. P. 1–8.
6. Subbotin, V., Vymazalová, A., Laufek, F., Savchenko, Y., Stanley, C., Gabov, D., and Plášil, J. Mitrofanovite, Pt₃Te₄, a new mineral from the East Chuarvy deposit, Fedorovo–Pana intrusion, Kola Peninsula, Russia // *Mineralogical Magazine.* 2019. Vol. 83, № 4. P. 523–530.
7. Bae D. et al. Mitrofanovite, Layered Platinum Telluride, for Active Hydrogen Evolution // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* American Chemical Society, 2021. Vol. 13, № 2. P. 2437–2446.
8. Wang Y., Li Y., Heine T. PtTe Monolayer: Two-Dimensional Electrocatalyst with High Basal Plane Activity toward Oxygen Reduction Reaction // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 2018. Vol. 140, № 40. P. 12732–12735.
9. Yuan J.-H. et al. Pt₅Se₄ Monolayer: A Highly Efficient Electrocatalyst toward Hydrogen and Oxygen Electrode Reactions // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* American Chemical Society, 2020. Vol. 12, № 12. P. 13896–13903.
10. Lin J. et al. Novel Pd₂Se₃ Two-Dimensional Phase Driven by Interlayer Fusion in Layered PdSe₂ // *Phys. Rev. Lett.* American Physical Society, 2017. Vol. 119, № 1. P. 016101.
11. Kempt R., Kuc A., Heine T. Two-Dimensional Noble-Metal Chalcogenides and Phosphochalcogenides // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020. Vol. 59, № 24. P. 9242–9254.
12. Sukhanova E.V. et al. 2D-Mo₃S₄ phase as promising contact for MoS₂ // *Appl. Surf. Sci.* 2022. Vol.

589. P. 152971.
13. Е. В. Суханова, А. Г. Квашнин, М. А. Агамалян, А. А. Захарян, З. И. Попов. Карта двумерных соединений халькогенидов вольфрама (W-S, W-Se, W-Te) на основе эволюционного поиска USPEX // Письма в ЖЭТФ. 2022. Vol. 115, № 5. P. 322–327.
 14. Zhang J. et al. Single-layer Mo₅Te₈ — A new polymorph of layered transition-metal chalcogenide // 2D Mater. IOP Publishing, 2020. Vol. 8, № 1. P. 015006.
 15. Wang X. et al. Deriving 2D M₂X₃ (M = Mo, W, X = S, Se) by periodic assembly of chalcogen vacancy lines in their MX₂ counterparts // Nanoscale. The Royal Society of Chemistry, 2020. Vol. 12, № 15. P. 8285–8293.
 16. Oganov A.R., Glass C.W. Crystal structure prediction using ab initio evolutionary techniques: Principles and applications // J. Chem. Phys. American Institute of Physics, 2006. Vol. 124, № 24. P. 244704.
 17. Oganov A.R., Lyakhov A.O., Valle M. How Evolutionary Crystal Structure Prediction Works—and Why // Acc. Chem. Res. American Chemical Society, 2011. Vol. 44, № 3. P. 227–237.
 18. Lyakhov A.O. et al. New developments in evolutionary structure prediction algorithm USPEX // Comput. Phys. Commun. 2013. Vol. 184, № 4. P. 1172–1182.
 19. Kresse G., Hafner J. Ab initio molecular-dynamics simulation of the liquid-metal–amorphous-semiconductor transition in germanium // Phys. Rev. B. American Physical Society, 1994. Vol. 49, № 20. P. 14251–14269.
 20. Kresse G., Furthmüller J. Efficiency of ab-initio total energy calculations for metals and semiconductors using a plane-wave basis set // Comput. Mater. Sci. 1996. Vol. 6, № 1. P. 15–50.
 21. Kresse G., Furthmüller J. Efficient iterative schemes for ab initio total-energy calculations using a plane-wave basis set // Phys. Rev. B. American Physical Society, 1996. Vol. 54, № 16. P. 11169–11186.
 22. Perdew J.P., Burke K., Ernzerhof M. Generalized Gradient Approximation Made Simple // Phys. Rev. Lett. American Physical Society, 1996. Vol. 77, № 18. P. 3865–3868.
 23. Blöchl P.E. Projector augmented-wave method // Phys. Rev. B. American Physical Society, 1994. Vol. 50, № 24. P. 17953–17979.
 24. Togo A., Tanaka I. First principles phonon calculations in materials science // Scr. Mater. 2015. Vol. 108. P. 1–5.
 25. Eriksson F., Fransson E., Erhart P. The Hiphive Package for the Extraction of High-Order Force Constants by Machine Learning // Adv. Theory Simul. 2019. Vol. 2, № 5. P. 1800184.

Структура и свойства тройных композиций полиэтилен низкой плотности (ПЭНП)/сополимер этилена с винилацетатом (СЭВА)/природный полимерный наполнитель



Шеленков П.Г.¹, Попов А.А.^{1,2}, Пантюхов П.В.^{1,2}
ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук, г. Москва, ул. Косыгина, д. 4

Аннотация: На сегодняшний день в мире широко известны композиции полиэтилена, наполненные природными полимерными наполнителями (крахмал, целлюлоза, древесная мука, и т.п.). В данной работе проведено исследование влияния структуры полимерной матрицы смесей ПЭ/СЭВА/природный полимерный наполнитель, на свойства данных композиций.

Введение

Наиболее важное направление в современной науке занимает исследование полимерных композиций с целью придания им заранее установленных свойств. В научной среде давно известны биоразлагаемые композиции на основе полиэтилена и природных полимерных наполнителей, например таких, как древесная мука [1]. Но основной проблемой данных композиций является то, что природные полимерные наполнители плохо совместимы с полиэтиленовой матрицей, для улучшения совместимости полиэтиленовой матрицы с природным наполнителем в данные композиции вводят различные добавки (компатибилизаторы). Было установлено, что добавка сополимера этилена с винилацетатом в смесях полиэтилена и

природного наполнителя улучшает механические свойства данных композиций [2]. Но до конца остается не ясным, как влияет количественное содержание добавки данного сополимера на структуру и свойства биоразлагаемых полиэтиленовых композиций с природным полимерным наполнителем.

Исследуемые материалы.

Для приготовления композиций были взяты полиэтилен низкой плотности (ПЭНП) марки 10803-020 производства Уфаоргсинтез (Россия), сополимер этилена с винилацетатом компании LG, марки EVA EA 28025 (Корея). В качестве наполнителей были использованы микрокристаллическая целлюлоза производства ПО «Прогресс» (Россия) и древесная мука, представляющая собой смесь хвойных и лиственных деревьев. Для приготовления тройных композиций ПЭ/СЭВА/природный наполнитель, вначале на смесительных обогреваемых вальцах UBL6175BL (Китай), были приготовлены высоконаполненные композиции на основе СЭВА и природного полимерного наполнителя, в одном случае в качестве наполнителя использовали древесную муку, в другом микрокристаллическую целлюлозу. Высоконаполненные композиции (СЭВА/ природный наполнитель) разбавлялись полиэтиленом низкой плотности на смесительных обогреваемых вальцах UBL6175BL, до содержания наполнителя 30% по массе, у всех композиций. Температура валков на вальцах при этом составляла 130 и 150 °С, скорость вращения 8 об/мин. Таким образом, были получены тройные композиции (ПЭНП/СЭВА/природный полимерный наполнитель) в которых массовое содержание наполнителя одинаковое, но разное соотношение ПЭНП и СЭВА в полимерной матрице. Затем, данные композиции измельчались при помощи ножевой мельницы РМ 120 (Россия). Измельченные композиции подвергались прессованию на гидравлическом прессе Gotech марки *GT-7014-H* (Тайвань), при температуре 140°С, при усилии смыкания плит 15 тонн, в течение 2 мин. Материал прессовался в металлической рамке толщиной 0,55 мм размерами 150 *150 мм., а для получения тонких пленок использовали рамку из алюминиевой фольги толщиной 200-250 мкм с вырезанным в ней отверстием диаметром 100мм. Охлаждение, как в первом, так и во втором случае происходило на воздухе в течении 2 мин. В результате были получены плоские листы толщиной от 0,5-0,6 мм (для исследования физико-механических свойств и кинетики водопоглощения) и пленки толщиной 200-300 мкм (для исследования степени биоразложения).

Методы исследования.

- 1) Исследование физико-механических свойств композиций методом растяжения при разрыве.** Механические характеристики образцов определяли на универсальной испытательной машине GOTESHA1-7000M (Тайвань). При скорости раздвижения зажимов равной 100 мм/мин. Испытания проводили в соответствии со стандартом ГОСТ 11262-2017 [3].
- 2) Исследование кинетики водопоглощения.** Водопоглощение измеряли согласно ГОСТ 4650-2014 [4] при комнатной температуре (23±2°С).
- 3) Исследование кинетики биодеструкции при воздействии микробиоты почвы.**

Для комплексной оценки биодеструкции образцов использовали почвенный тест на восстановленном грунте. Восстановленный грунт моделирует реальную почву, таким образом, условия испытания в лабораторных условиях оптимально приближены к реальным. Оценку биодеструкции образцов проводили по ГОСТ 9.060-75 «Единая система защиты от коррозии и старения. Ткани. Метод лабораторных испытаний на устойчивость к микробиологическому разрушению» [5]. Грунт подготавливали исходя из требований стандарта. Сам грунт помещали в пластиковый контейнер толщиной слоя 25±5 см. Влажность поддерживалась на уровне 60±5 %.

Экспериментальная часть

Для оценки деформационных и прочностных характеристик композиций применяли методику оценки прочности и деформации при растяжении по ГОСТ 11262. Вместе с наполненными композициями (ПЭ/СЭВА/природный наполнитель), испытывали двойные композиции (ПЭ/СЭВА) в том же массовом соотношении ПЭ и СЭВА в полимерной матрице, что и в тройных смесях. Ниже представлены графики зависимости прочности при разрыве, предела текучести и относительного удлинения при растяжении от содержания сополимера в полимерной матрице данных композиций.

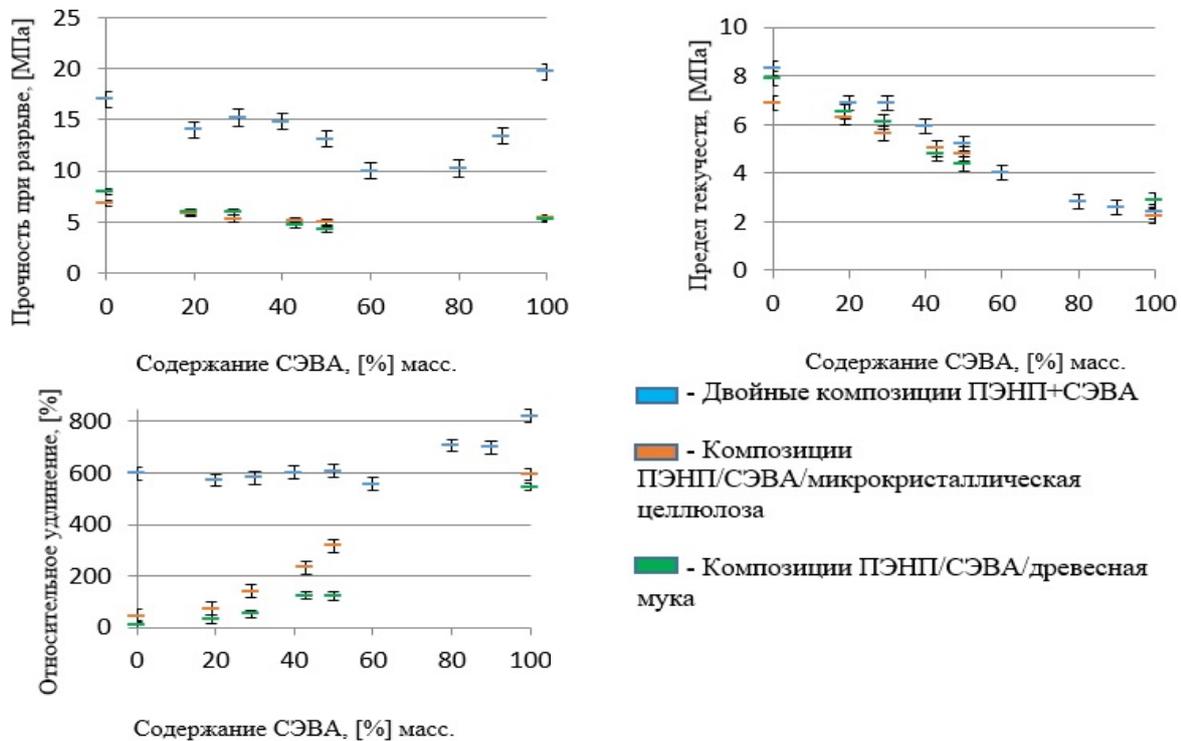


Рис. 3. Испытание двойных (ПЭНП/СЭВА) и тройных (ПЭНП/СЭВА/природный полимерный наполнитель) композиций при растяжении. Измерение деформационно-прочностных характеристик в зависимости от содержания добавки сополимера в полимерной матрице.

Как мы видим из графиков, при наполнении чистого полиэтилена природным наполнителем до 30% по массе, его прочность падает практически в 2 раза, а относительное удлинение уменьшилось при этом на порядок (с 600% до 40% при наполнении МКЦ и до 10% при наполнении ДМ). Но при увеличении содержания добавки сополимера, наблюдается значительное увеличение относительного удлинения при растяжении для наполненных композиций (до 300% для МКЦ и 120% для ДМ, при содержании СЭВА в матрице 50%). При этом мы можем заметить, что предел текучести остается практически без изменения при добавлении наполнителя. При этом наблюдается аддитивное снижение предела текучести при увеличении содержания добавки сополимера в матрице композиций.

По результатам исследования влияния добавки сополимера на водопоглощение тройных композиций получены следующие данные (см. Рис.4 и Рис.5.). Как мы видим, водопоглощение композиций увеличивается с увеличением содержания добавки СЭВА в композиции. Причем, можно заметить, что при содержании СЭВА от 0 до 20 масс. % практически все значения лежат в одной области, а вот уже при 30 масс. % происходит заметное увеличение водопоглощения.

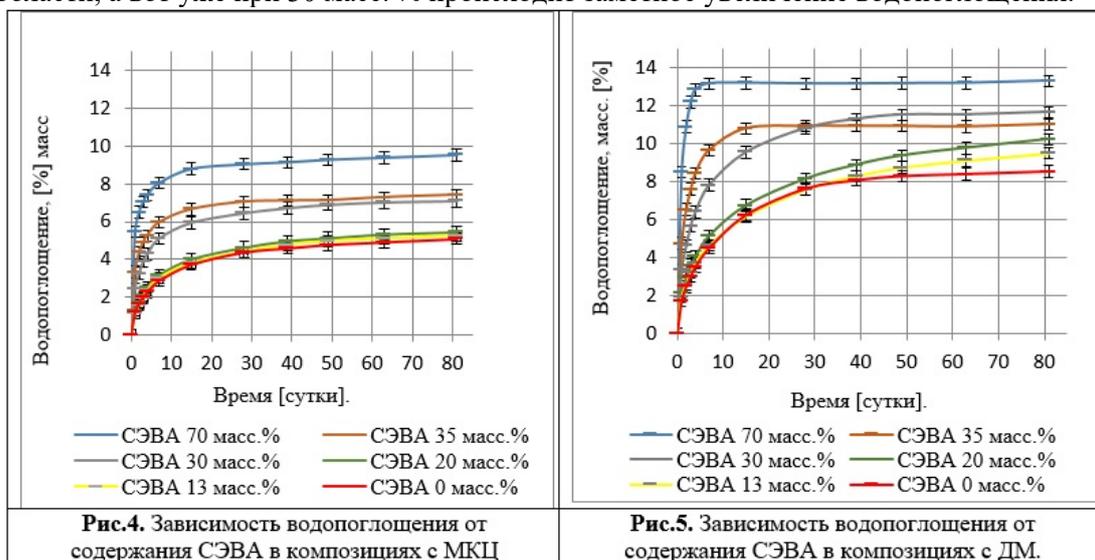


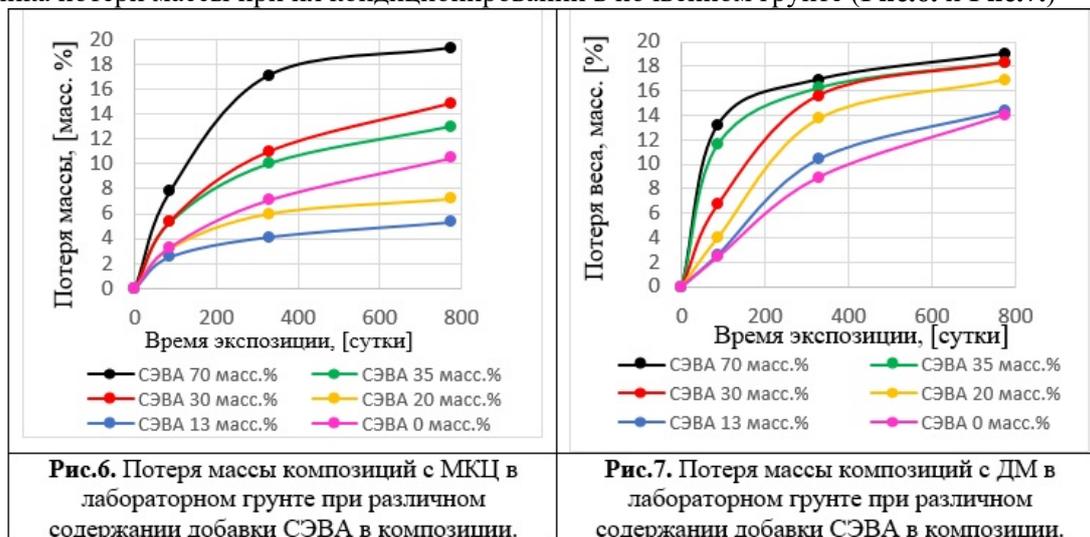
Рис.4. Зависимость водопоглощения от содержания СЭВА в композициях с МКЦ

Рис.5. Зависимость водопоглощения от содержания СЭВА в композициях с ДМ.

Можно также заметить, что композиции с древесной мукой имеют более высокое водопоглощение, чем композиции с микрокристаллической целлюлозой. Это связано с тем, что

древесная мука сама по себе имеет большее водопоглощение, чем МКЦ, в связи с тем, что она имеет менее плотную структуру.

С целью анализа влияния структуры полимерной матрицы на скорость потери массы под воздействием микробиоты почвы, для образцов с природным наполнителем, исследована динамика потери массы при их кондиционировании в почвенном грунте (**Рис.6.** и **Рис.7.**)



Как видно из графиков, с увеличением содержания добавки сополимера, увеличивается и потеря массы композиций. Лишь в случае наполнения МКЦ при содержании добавки СЭВА 13 и 20% по массе, потеря массы меньше чем у композиции без содержания сополимера. Это можно объяснить следующим, при введении СЭВА до 20% по массе в композицию он образует в ней фазу включения, и тем самым наполнитель, который распределен главным образом в СЭВА, оказывается закапсулированным в матрице полиэтилена. А уже при содержании СЭВА 30 % по массе, оба полимера образуют продолженную фазу, тем самым упрощая доступ микроорганизмов к наполнителю. Но, т.к. частицы ДМ имеют значительно большее соотношение L/D (длины к диаметру), то они образуют более дефектные структуры и их капсуляция в полиэтилене, при содержании СЭВА от 0 до 20% по массе, не заметна.

Заключение

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы: из данных измерения водопоглощения наполненных композиций видно, что при содержании добавки сополимера в смеси от 0 до 20 масс. %, СЭВА представляет собой фазу включения в матрице полиэтилена. А при увеличении содержания СЭВА до 30 масс. %, происходит изменение фазовой структуры композиции, при которой каждый полимер образует свою продолженную фазу (структура «сетка в сетке»). В данном диапазоне содержания добавки сополимера наблюдается заметный рост водопоглощения. А значит, природный наполнитель становится более доступным для воды и микроорганизмов. Это же подтверждается данными потери массы при экспозиции образцов в грунте. При данном содержании СЭВА (30 масс. %), также образуется наиболее прочная структура для 2-х композиций ПЭНП/СЭВА.

Список литературы

1. Н.Н. Колесникова, А.В. Королева, А.Н. Лихачев, Ю.К. Луканина, П.В. Пантюхов, А.А. Попов, А.В. Хватов, О.В. Стоянов, Г.Е. Заиков, Х.С. Абзальдинов. «Биоразлагаемые композиционные материалы на основе полиэтилена и древесной муки» Вестник Казанского технологического университета, 2013г.
2. Е.А. Дудочкина, Д.И. Лямкин «Влияние сополимеров этилена на структурно-механические свойства высоконаполненных полиэтиленовых композиций» Успехи в химии и химической технологии. Том XXIX, 2015г., №8.
3. ГОСТ 11262-2017. «Пластмассы. Метод испытания на растяжение», 2017г. 13с.
4. ГОСТ 4650-2014. «Пластмассы. Методы определения водопоглощения». М., 2014г. 3 с.
5. ГОСТ 9.060-75. Единая система защиты от коррозии и старения. Ткани. Метод лабораторных испытаний на устойчивость к микробиологическому разрушению. М., 1976. 10 с.

Сорбционные свойства полимерных пленок, модифицированных двухосновными кислотами

Шуршина А.С., Афанасьева М.А., Кулиш Е.И.
Башкирский государственный университет, г. Уфа

В последнее время появилось значительное число работ, посвященных созданию систем с контролируемой доставкой лекарственных препаратов на основе полимеров. Например, это могут быть мягкие лекарственные формы, представляющие собой пленочные полимерные покрытия, которые выполняют роль материалов для защиты ожоговых, хирургических и долго не заживающих ран. Наиболее перспективными полимерами, пригодными для создания подобного рода лекарственных форм, являются полисахариды, в частности хитозан, биосовместимый, физиологически активный, биodeградируемый полимер, обладающий массой достоинств. К сожалению, получаемые из раствора пленочные покрытия на основе хитозана в солевой форме, являются растворимыми в воде. В этом случае говорить о пролонгированном выходе лекарственного вещества из пленки не представляется возможным – лекарственный препарат выходит не в процессе диффузии, а в процессе растворения пленки, которое происходит достаточно быстро. В связи с этим, полимерная хитозановая матрица нуждается в модификации. Например, хитозановая пленка становится нерастворимой в воде вследствие термического отжига, перевода из солевой в основную форму или обработки поверхностно-активными веществами. В ряде случаев лекарственное вещество само по себе способно играть роль агента, модифицирующего полимерную матрицу, и, как следствие, приводить к изменению некоторых ее свойств, в том числе и к пролонгированию выхода лекарственного вещества. Ранее, нами были рассмотрены особенности транспортных свойств лекарственных хитозановых пленок с антибиотиками аминогликозидного (амикацин, гентамицин) и цефалоспоринового ряда (цефтазидим). Модификация хитозана лекарственными веществами в этих случаях сопровождалась потерей растворимости и соответственным уменьшением скорости десорбции лекарственного вещества из полимерной матрицы. Было высказано предположение, что потеря растворимости пленок хитозана в воде происходит в том случае, когда лекарственное вещество представляет собой соль двухосновной кислоты, способную «сшивать» цепи хитозана и вызывать структурные изменения в полимерной матрице. Вполне логично предположить, что перевести хитозановую пленку в нерастворимую форму и этим добиться пролонгированного выхода лекарственного препарата можно, если добавить в раствор хитозана модификаторы, представляющие собой многоосновные кислоты или их соли. В связи с этим, целью данной работы стало рассмотрение возможности модифицирования хитозановой пленки сульфатом натрия, фосфорной, янтарной и щавелевой кислотами.

Кинетическая кривая сорбции паров воды исходной пленкой хитозана имеет типичный для неограниченно набухающих полимеров вид. Процесс поглощения паров воды в этом случае заканчивается растворением пленки.

При добавлении к раствору хитозана в процессе приготовления пленки сульфата натрия и фосфорной кислоты в мольном соотношении $\geq 1:0.2$ вид сорбционной кривой изменяется - она приобретает вид характерный для ограниченно набухающих полимеров. Аналогичного вида зависимости наблюдаются и при введении щавелевой кислоты.

Напротив, при введении в хитозановую пленку янтарной кислоты для всех изученных составов форма сорбционной кривой принципиально не изменяется и сохраняет вид, характерный для неограниченно набухающих систем.

Обращает на себя внимание тот факт, что в случае использования в качестве модификаторов сульфата натрия, фосфорной и щавелевой кислоты с увеличением содержания модифицирующей добавки в пленке происходит существенное уменьшение количества сорбированной воды и уменьшение скорости сорбции. При использовании в качестве модификатора янтарной кислоты уменьшение скорости и степени сорбции тоже имеет место, но в гораздо меньшей степени.

Представление сорбционных данных в координатах m_t/m_∞ и их логарифмирование позволяет вычислить параметр n , характеризующий режим процесса диффузии. Параметр n , определенный для пленки индивидуального хитозана, равен 0.63 (т.е. >0.5), что свидетельствует о том, что диффузия происходит по аномальному режиму. Аномальный режим диффузии часто наблюдается для полимеров, находящихся ниже температуры стеклования, и связан с замедленностью релаксационных процессов в стеклообразных полимерах. Использование в

качестве модификаторов сульфата натрия, фосфорной и щавелевой кислоты приводит к смене режима сорбции с аномального (значение показателя n больше 0.5) на псевдонормальный (значение показателя n меньше 0.5). Именно в этом случае (при смене режима сорбции) происходит резкое уменьшение значений коэффициентов диффузии паров воды на начальном и конечном участке сорбции, рассчитанных по методу Кранка.

Отметим то, что значения коэффициентов диффузии на начальном и конечном участке не совпадают. Напомним, что при подчинении диффузии закону Фика, зависимость сорбции паров воды пленочными образцами в координатах $m_t/m_\infty - t^{0.5}$ должна спрямляться при всех временах эксперимента и в этом случае значения коэффициентов диффузии, рассчитанные как на начальном (условие $m_t/m_\infty \leq 0.5$), так и на конечном этапе диффузии (условие $m_t/m_\infty > 0.5$), должны совпадать. Именно выполнение равенства $D_a^s = D_b^s$ свидетельствует об отсутствии каких-либо осложнений в диффузионной системе полимер – низкомолекулярное вещество. Однако, как видно из представленных в табл. 1 данных, для анализируемых случаев при использовании в качестве модификаторов сульфата натрия, фосфорной кислоты и щавелевой кислоты, значения коэффициентов диффузии, рассчитанные на начальном и конечном этапе диффузии не совпадают и $D_a^s > D_b^s$. Только при использовании янтарной кислоты не происходит ни смены режима сорбции, ни принципиального уменьшения коэффициентов диффузии, ни потери пленками растворимости в воде.

Таким образом, в ходе выполнения исследования было показано, что процесс сорбции паров воды пленкой хитозана подчиняется аномальному диффузионному режиму. Введение в качестве модификатора слабой двухосновной янтарной кислоты не приводит к изменению режима сорбции и потере растворимости пленки в воде. Смена режима сорбции паров воды с аномального на псевдонормальный происходит только в том случае, когда в качестве модификатора используется достаточно сильная многоосновная кислота или ее соль. Именно в этом случае (при смене режима сорбции) происходит резкое уменьшение значений коэффициентов диффузии паров воды на начальном и конечном участке сорбции, рассчитанные по методу Кранка.

Антиоксидантные свойства наночастиц с липоевой кислотой и её эфирами



В.А. Шелконогов^{1,2,3}, **А.В. Шипелова**¹, **А.М. Иншакова**¹,
Е.С. Дарнотук¹, **О.А. Баранова**^{2,3}, **А.В. Чеканов**^{2,3},
К.Д. Казаринов³, **Н.С. Шастина**¹, **Э.Ю. Соловьева**², **А.И. Федин**²

¹МИРЭА-Российский технологический университет
(ИТХТ имени М.В. Ломоносова), РФ, Москва, 119571, пр. Вернадского, д.86,
e-mail: vasily9999@yandex.ru

²ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России. ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, РФ, 117997.

³Институт радиотехники и электроники (Фрязинский филиал) имени В.А. Котельникова РАН, г. Фрязино, пл. Введенского, 1.

Абстракт

Оценено влияние наночастиц (НЧ) с липоевой кислотой (ЛК) и её конъюгатами на активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и на окислительные процессы в активированных нейтрофилах и тромбоцитах. Было установлено, что нанодисперсии с данными антиоксидантами уменьшают в 1.5-2 раза активность ЛДГ в нейтрофилах (НФ) и тромбоцитах (Тц), что свидетельствует об отсутствии их цитотоксичности в исследуемых модельных системах. Было показано, что наноконструкции с ЛК и её производными подавляют свободнорадикальные процессы в активированных нейтрофилах и тромбоцитах, в том числе снижают в 2-16 раз концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в тромбоцитах, тем самым проявляя антиоксидантные свойства в исследуемых клетках.

Ключевые слова: липоевая кислота, нанодисперсии тромбоциты, нейтрофилы, активные формы кислорода.

Сосудистые заболевания головного мозга относятся к числу наиболее распространенных форм патологии ЦНС с высоким показателем летальных исходов [1]. К основным патогенетическим механизмам ишемического инсульта относят: возникновение и прогрессирование окислительного стресса, нарушения сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостазов, повреждения ГЭБ и др [2]. Терапия данной патологии включает

применение препаратов, проявляющих антиоксидантное действие, препятствующих агрегации тромбоцитов. Одним из наиболее универсальных и перспективных антиоксидантов в комплексной терапии ишемии головного мозга является липоевая кислота (ЛК). Существенными недостатками ЛК являются низкая растворимость в воде, быстрое связывание с различными белками и биодegradация в плазме крови [3], что приводит к уменьшению антиоксидантного и терапевтического действия. В результате препараты, содержащие ЛК, вводят в больших дозах и в течение длительного времени, для достижения её терапевтического эффекта. Для устранения вышеперечисленных недостатков ранее в работе нами были получены различные нанодисперсии с липоевой кислотой и её эфирами с узким распределением по размеру частиц, характеризующиеся высоким содержанием активных субстанций и дисперсионной стабильностью при хранении при комнатной температуре в течение 2 лет. Также было оценено влияние полученных наноконструкций на агрегацию тромбоцитов и на «кислородный взрыв» нейтрофилов [4,5]. Однако данные про токсичность и детальные антиоксидантные свойства полученных ранее наночастиц с ЛК и её конъюгатами отсутствуют.

Поэтому **целью данной работы** является исследование влияния нанодисперсий с ЛК и её производными на активность ЛДГ (цитотоксичность) и на окислительные процессы в нейтрофилах и тромбоцитах.

Известно, что при клеточном разрушении происходит высвобождение лактата и ЛДГ в кровоток. Повышенное содержание ЛДГ в сыворотке крови в результате тканевой деструкции происходит из-за значительной гибели клеток. Причинами повреждения тканей могут быть такие заболевания, как острый инфаркт миокарда, анемия, тромбоэмболия легочной артерии, гепатит, острая почечная недостаточность и т.д. Поэтому, для изучения цитотоксического действия лактата, исследовали влияние наночастиц с ЛК и её конъюгатами на активность ЛДГ в активированных с помощью фторбол-12-мирилат-13-ацетата (ФМА) нейтрофилах и в тромбоцитах, индуцированных арахидоновой кислотой. В качестве контролей использовали активированные клетки, раствор ЛК в фосфатном буферном растворе (ФБР) и наноконструкции без антиоксидантов. Активность ЛДГ определяли по скорости восстановления никотинамидадениндинуклеотида НАД⁺. В данном анализе ЛДГ преобразует лактат в пируват и, при этом образующийся в сопряженной реакции НАДН вступает в реакцию с флуоресцентным зондом с образованием интенсивного флуоресцентного свечения ($E_{x}/E_{m} = 535/587$ нм).

В результате проведенных исследований было показано, что при добавлении ФМА к НФ и арахидоновой кислоты к Тц происходило повышение активности ЛДГ (увеличение количества лактата). Наночастицы с ЛК (3.8-4.0 мМ) и её производными (0.2-0.4 мМ) в 1.5-2 раза снижали активность данного фермента в активированных нейтрофилах и тромбоцитах. В свою очередь ЛК в ФБР (0.8 мМ) и нанодисперсии без антиоксидантов практически не оказали влияния на активность ЛДГ. Известно, что ЛК восстанавливается до дигидролипоевой кислоты в клетках разными ферментами (глутатионредуктазой, тиоредоксинредуктазой) в присутствии НАДН и НАДФН, тем самым повышая антиоксидантный статус клеток и подавляя окислительные процессы [6]. Поэтому можно предположить, что, проникая в нейтрофилы или тромбоциты, липоевая кислота или её конъюгаты могут восстанавливаться при взаимодействии с НАДН, при этом образовавшиеся восстановленные формы данных антиоксидантов при взаимодействии с НАД⁺ снижают активность лактатдегидрогеназы.

Далее оценивали влияние наночастиц с ЛК и её производными на концентрацию активных форм кислорода и азота в активированных нейтрофилах и тромбоцитах с использованием 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (DCFH-DA). DCFH-DA зонд проникает через клеточную мембрану, в цитоплазме гидролизует эстеразами с образованием 2,7-дихлордигидрофлуоресцеина и при взаимодействии с пероксидом водорода, пероксинитритом, алкоксильным, пероксильным гидроксильным, супероксид анион радикалами происходит его окисление до флуоресцентного вещества – 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF) [7].

Добавление активаторов к нейтрофилам и тромбоцитам (ФМА / АК) приводило к увеличению интенсивности флуоресценции DCF вследствие образования избыточного количества АФК. В свою очередь наноконструкции с ЛК (3.8-4.0 мМ) и её производные (0.2-0.4 мМ) в 2-3 раза снижали концентрацию о-центрированных радикалов в активированных нейтрофилах и тромбоцитах, что сопровождалось тушением флуоресценции данного зонда. Раствор ЛК в ФБР (0.8 мМ) и наночастицы, не содержащие антиоксидантов, не проявляли антиоксидантные свойства на выбранных нами клеточных моделях. По-видимому, полученные результаты можно объяснить плохим проникновением в клетки водорастворимой формы ЛК и низкой концентрацией действующего вещества.

На завершающем этапе работы исследовали влияние наночастиц с ЛК и её конъюгатами на концентрацию продуктов перекисидации липидов в тромбоцитах, активированных АК. При активации тромбоцитов АК подвергается метаболизму под действием циклооксигеназы и липоксигеназы. При этом конечными метаболитами являются продукты ПОЛ.

В результате проведенных исследований было показано, что в процессе активации Тц арахидоновой кислотой происходит окисление липидов. Нанодисперсии с ЛК (3.8-4.0 мМ) и её конъюгатами (0.2-0.4 мМ) в 2-16 раз уменьшали концентрацию продуктов перекисидации липидов в активированных Тц. Наночастицы без антиоксидантов и раствор ЛК в ФБР (0.8 мМ) практически не проявляли антиоксидантных свойств в исследуемой модельной системе.

Таким образом, наночастицы с ЛК и её конъюгатами не токсичны и обладают значительным антиоксидантным действием по сравнению с водным раствором ЛК и нанодисперсиями без антиоксидантов и являются перспективными препаратами для дальнейших исследований *in vivo*.

Работа выполнена в рамках выполнения в рамках гос. задания (№ гос. регистрации 122051600109-5) и при поддержке Фонда развития теоретической физики и математики "Базис" (№ гранта 22-1-1-28-1).

Литература

1. Benjamin E.J., Virani S.S., Callaway C.W., Chamberlain A.M., Chang A.R., Cheng S., Chiuve S.E., Cushman M., Delling F.N., Deo R., et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American Heart Association. // *Circulation*. – 2018. – V. 137, № 12. – 67-492.
2. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. // М.: "Медицина", 2001, 328 с.
3. S. Akiba, S. Matsugo, L. Packer, T. Konishi. Assay of protein-bound lipoic acid in tissues by a new enzymatic method // *Anal Biochem*. – 1998. – V. 258, № 2. – P. 299-304.
4. Щелконогов В.А., Шипелова А.В., Синебрюхова А.М., Дарнотук Е.С., Шастина Н.С., Жигалова К.С., Баранова О.А., Чеканов А.В., Казаринов К.Д., Соловьева Э.Ю., Федин А.И. Антиагрегационная эффективность наноэмульсий α -липоевой кислоты // Тезисы доклада в сборнике: «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Материалы международного конгресса. – Москва. – 2019. – С. 199-201.
5. Щелконогов В.А., Шипелова А.В., Синебрюхова А.М., Шастина Н.С., Баранова О.А., Чеканов А.В., Соловьева Э.Ю., Федин А.И. Наноэмульсии на основе производных липоевой кислоты с различными спиртами: получение и влияние на функциональную активность тромбоцитов // Тезисы доклада в сборнике: «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Материалы международного конгресса. – Москва. – 2020. – С. 461-464.
6. Jones W. Uptake, recycling, and antioxidant actions of alpha-lipoic acid in endothelial cells / W. Jones, X. Li, Z. Qu, L. Perriott, R. R. Whitesell, J. M. May. // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2002. – V. 33, № 1. – P. 83-93.
7. Gomes A. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species / A. Gomes, E. Fernandes, J. C. Lima // *J. Biochem. Biophys*. – 2005. – V. 65, № 2. – P. 48-80.

Исследование влияния окисления на структуру фибринового сгустка



**Л.В. Юрина¹, А.Д. Васильева¹, Е.Г. Евтушенко², Е.С. Гаврилина¹,
С.И. Обьденный³, М.И. Индейкина¹, И.А. Чабин³, М.А. Розенфельд¹**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

«Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской Академии наук», Москва, Россия

²Химический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва, Россия

Фибриноген (ФГ), гликопротеин с молекулярной массой 340 кДа, играет ключевую роль в формировании фибриновой сети и агрегации тромбоцитов. Недавние данные указывают на то, что при некоторых патологических состояниях окислительный стресс способствует образованию сгустков с аномальной структурой. Окисление ФГ способствует образованию плотного тромбогенного сгустка, устойчивого к плазминовому гидролизу [1]. Эта модифицированная фибриновая сеть может в значительной степени способствовать развитию тромбов.

Хлорноватистая кислота (НОСl) является сильным окислителем, обладающим мощными антибактериальными свойствами, и продуцируется *in vivo* активированными лейкоцитами как часть системы иммунной защиты млекопитающих [2]. С другой стороны, НОСl задействована в процессах повреждения тканей, которые наблюдаются при широком спектре воспалительных заболеваний, включая атеросклероз, муковисцидоз, болезнь почек и нейродегенеративные заболевания. Обычно при окислении белковых молекул под действием НОСl наблюдается модификации аминокислотных остатков (АКО) Met, Cys, боковых цепей ароматических АКО (преимущественно Trp) и хлорирование боковых цепей Tyr [3].

В ранее проведенных работах нами были выявлены участки окислительных модификаций молекулы фибриногена при индуцированном окислении. Был проанализирован вклад этих модификаций в нарушение структуры и функции исследуемого белка [4,5]. Полученные данные демонстрировали способность молекулы ФГ сохранять структурную целостность функционально важных АКО при окислении. Это позволило нам сделать вывод о том, что структура ФГ адаптирована к действию АФК, и предположить, что некоторые АКО выполняют функцию внутримолекулярных перехватчиков АФК, не влияющих на биологическую функцию белка. Целью данной работы является выявление таких сайтов модификации с использованием низких концентраций окислителя. Также в рамках данной работы с помощью методов турбидиметрии и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) была исследована кинетика формирования и статичная структура фибринового сгустка, кинетика плазминового гидролиза гелей в норме и при окислении.

Методом масс-спектрометрии были проанализированы образцы нативного ФГ и обработанного 10, 25, 50 и 100 мкМ НОСl. Дозозависимый прирост окисления продемонстрировали 15 детектированных АКО: AαMet91, AαMet207, AαMet240, AαMet476, AαMet517, AαMet584, BβMet190, BβMet305, BβMet361, BβMet367, BβMet426, γMet78, γMet94, γMet89, γMet264. Среди модификаций, обнаруженных в этих АКО, имеются случаи образования метионин сульфоксида и метионин сульфона вследствие присоединения одного (+15.99) или двух (+31.99) атомов кислорода к боковой цепи, и отщепления метантиола от боковой цепи Met (-48.00) (Табл. 1). Модифицированные в результате индуцированного окисления АКО были обнаружены во всех трех полипептидных цепях и всех структурных областях молекулы ФГ (Рис. 1), за исключением E области.

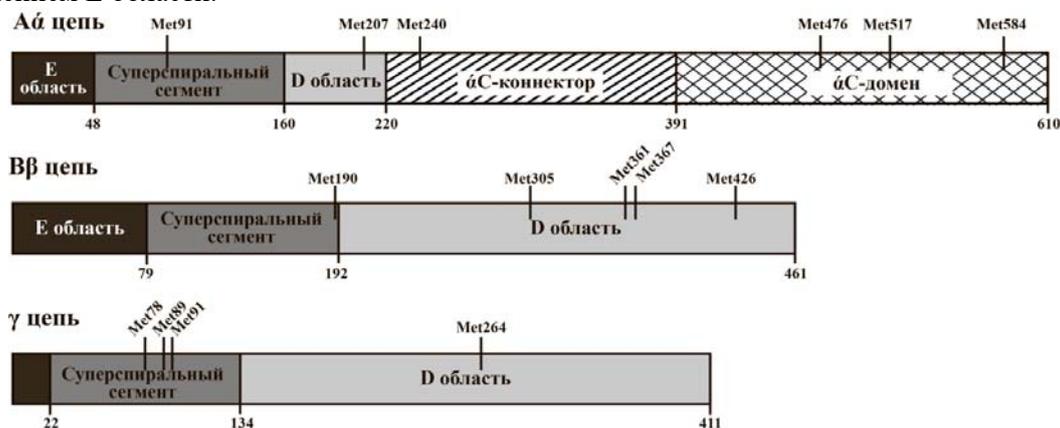


Рис. 1. Схематическое изображение полипептидных цепей фибриногена, с отмеченными сайтами модификаций

Скорость полимеризации фибрина оценивали по изменению мутности при 350 нм. (Рис. 2А и Табл. 2). При повышении концентрации окислителя НОСl наблюдается отсроченное время начала полимеризации, уменьшение максимального наклона полимеризационной кривой, что свидетельствует о замедлении процесса гелеобразования. Также значительно снижается значение максимальной оптической плотности (на 9% при концентрации НОСl 25 мкМ, 46% - при 50 мкМ, и на 92% при 100 мкМ НОСl), т.е. гель становится более прозрачным, что указывает на изменение структуры геля.

При измерении мутности при гидролизе сгустка (Рис. 2Б и Табл. 3), начиная с концентрации 25 мкМ НОСl, в образцах наблюдается снижение максимальной оптической плотности, при 50 мкМ окислителя происходит значительный сдвиг максимума оптической плотности кривой во времени в сторону увеличения. При 25 мкМ окислителя скорость снижается в 1.2 раза по сравнению с контролем, а при обработке 100 мкМ – в 3.2 раза.

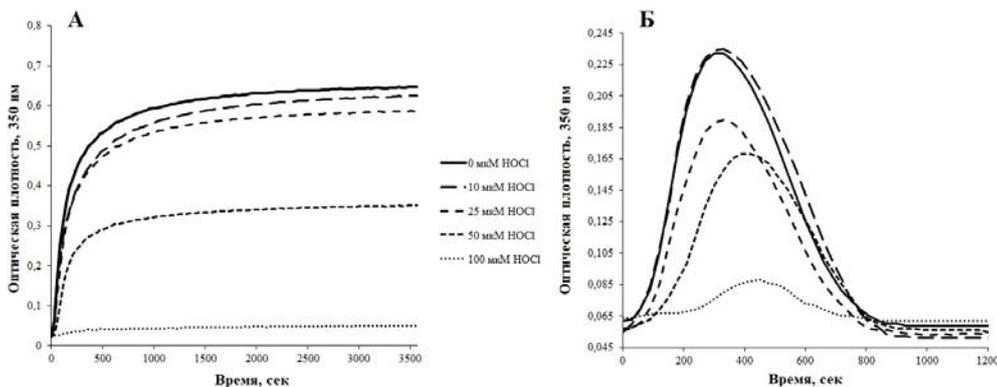


Рис. 2. Репрезентативные кривые катализируемой тромбином полимеризации фибрина (А) и фибринолиза (Б).

Полученные методом КЛСМ изображения фибринового геля из ФИТЦ-меченного фибриногена позволяют визуализировать изменения в статической структуре сгустка (Рис. 3, левый столбец). Образцы гелей, полученных из нативного и обработанного 10 мкМ гипохлорита, не показали значительных различий в структуре. При концентрациях НОСІ 25 и 50 мкМ отчетливо видно уплотнение геля и меньший размер гелевых пор по сравнению с нативным образцом. При повышении концентрации НОСІ до 100 мкМ не удалось получить фибриновые гели с выраженной структурой.

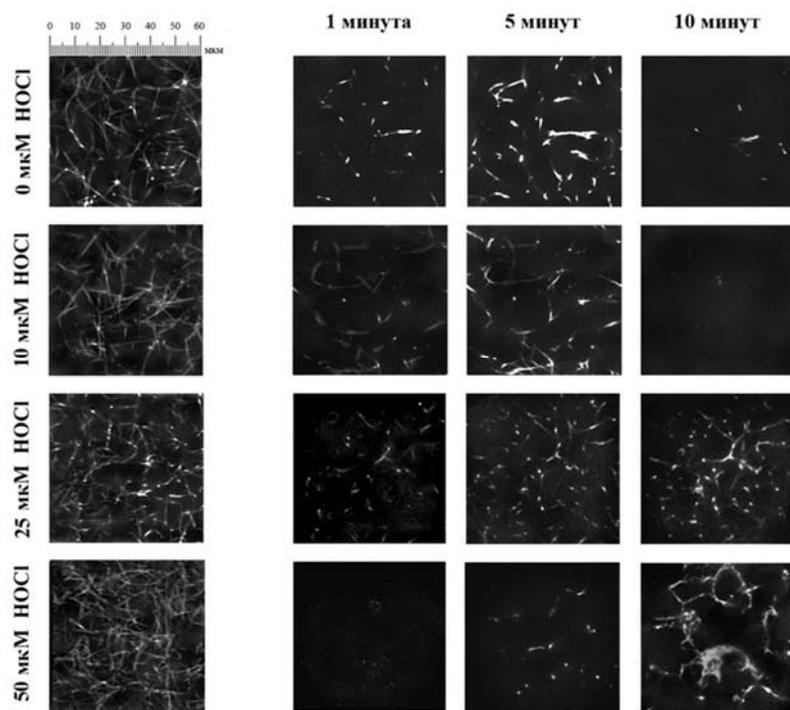


Рис. 3. Изменение архитектуры фибринового сгустка (левый столбец) и перераспределение плазмин(оген)а при лизисе сгустка

Для исследования методом КЛСМ кинетики гидролиза фибринового геля и распределения в нем плазмينا гель получали из не меченого ФГ. На первом этапе ФИТЦ-меченный плазмин(оген) связывается с волокнами фибрина, визуализируя структуру сети. С течением времени происходит гидролиз геля (Рис. 3, столбцы 2-4). Нативный ФГ и обработанный 10 мкМ НОСІ демонстрируют схожую динамику: визуализация фибриновой сети начинается уже с конца первой минуты, к 5 минутам сеть визуализирована полностью, и к 10 минутам наблюдается почти полный ее гидролиз. Для ФГ, обработанного 25 и 50 мкМ окислителя, процессы визуализации геля и его гидролиза в существенной мере замедлены.

При исследовании молекулы фибриногена методом ВЭЖХ-МС/МС дозозависимую чувствительность к воздействию окислителя продемонстрировали 15 АКО. Ранее сообщалось, что метионины АαMet476, ВβMet367 и γMet78 наиболее склонны к воздействию НОСІ [1]. 10 из детектированных АКО, модифицированных ОСІ-, наблюдали ранее при обработке гипохлоритом:

$\alpha\alpha$ Met91, $\alpha\alpha$ Met207, $\alpha\alpha$ Met476, $\alpha\alpha$ Met517, $\beta\beta$ Met367, $\beta\beta$ Met426, γ Met78, γ Met94, γ Met89, γ Met264 [4].

Методом турбидиметрии было зафиксировано снижение значения максимальной оптической плотности сгустка и замедление процесса фибринолиза при 25 – 100 мкМ окислителя. Уменьшение мутности фибринового геля свидетельствует о повышении плотности сети за счет образования более тонких фибрилл. Известно, что фибриновые гели с приобретенной в результате окисления уплотненной структурой проявляют повышенную резистентность к плазминовому гидролизу [1]. Полученные данные были визуализированы и подтверждены методом КЛСМ. Все детектированные АКО, принадлежащие функционально значимым областям фибриногена [6-8], оставались не затронуты окислением. На основе чего можно предположить, что изменения структуры фибринового сгустка, нарушения в процессе полимеризации и фибринолиза при окислении обусловлены конформационными перестройками в окисленном белке, а не являются следствием прямого повреждения функциональных участков молекулы.

Описанные выше функциональные нарушения не были обнаружены при обработке ФГ 10 мкМ НОСl. Однако при анализе ВЭЖХ-МС/МС были детектированы 13 окислительных модификаций, среди которых $\alpha\alpha$ Met476, $\alpha\alpha$ Met517, $\alpha\alpha$ Met584, $\beta\beta$ Met367, γ Met94, γ Met264 были уже значительно модифицированы (прирост на 9, 16, 10, 17, 29 и 12% по сравнению с контролем, соответственно). Мы предполагаем, что этот набор АКО может выполнять роль перехватчиков АФК, предотвращая нарушения функции молекулы ФГ в результате окисления.

Исследование было проведено при поддержке гранта Российского научного фонда № 21-74-00146. В работе использовали оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

Список литературы:

1. Weigandt K.M., White N., Chung D., et al. Fibrin Clot Structure and Mechanics Associated with Specific Oxidation of Methionine Residues in Fibrinogen // *Biophysical Journal*. 2012. Vol. 103, № 11. P. 2399–2407. doi: 10.1016/j.bpj.2012.10.036
2. Klebanoff S.J. Myeloperoxidase: friend and foe // *Journal of Leukocyte Biology*. 2005. Vol. 77, № 5. P. 598–625. doi: 10.1189/jlb.1204697
3. Hawkins C.L., Pattison D.I., Davies M.J. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins // *Amino Acids*. 2003. Vol. 25, № 3–4. P. 259–274. doi: 10.1007/s00726-003-0016-x
4. Yurina L.V., Vasilyeva, A.D., Bugrova, A.E., et al. Hypochlorite-Induced Oxidative Modification of Fibrinogen // *DoklBiochemBiophys*. 2019. Vol. 484, № 1. P. 37–41. doi: 10.1134/S1607672919010101
5. Yurina L.V., Vasilyeva, A.D., Indeykina M.I., et al. Ozone-induced damage of fibrinogen molecules: identification of oxidation sites by high-resolution mass spectrometry // *Free Radical Research*. 2019. Vol. 53, № 4. P. 430–455. doi: 10.1080/10715762.2019.1600686
6. Pechik I., Madrazo J., Mosesson M.W., et al. Crystal structure of the complex between thrombin and the central “E” region of fibrin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004. Vol. 101, № 9. P. 2718–2723. doi: 10.1073/pnas.0303440101
7. Weisel J.W., Litvinov R.I. Fibrin Formation, Structure and Properties // *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms* / ed. Parry D.A.D., Squire J.M. Cham: Springer International Publishing, 2017. Vol. 82. P. 405–456. 10.1007/978-3-319-49674-0_13
8. Medved L., Weisel J.W. The Story of the Fibrin(ogen) α C-Domains: Evolution of Our View on Their Structure and Interactions // *ThrombHaemost*. 2022. Vol. 122, № 08. P. 1265–1278. doi: 10.1055/a-1719-5584

Разработка мультинаправленных систем доставки лекарственных препаратов в опухолевые клетки



**Н.Г. Яббаров¹, М.Б. Сокол¹, М.Р. Моллаева¹,
М.В. Чиркина¹, Е.Д. Никольская¹**

¹ *Институт Биохимической Физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия*
E-mail: marvint@inbox.ru

В исследовании описывается получение наноразмерной транспортной системы на основе дендритных полимеров, содержащей конъюгированный с поверхностными химическими группами

Gd в хелатированной форме, в качестве диагностического лекарственного препарата. В качестве векторных молекул были использованы два пептида являющиеся лигандами маркера воспаления эндотелия и рецептора онкофетального белка альфа-фетопротейна.

Введение. Направленный транспорт рассматривают как перспективный подход для разработки препаратов направленного действия, в том числе, содержащих в качестве цитотоксические агенты. Некоторые противоопухолевые агенты при системном введении сами по себе могут накапливаться в месте локализации опухоли из-за особенностей гистологической структуры и кровотока в опухолевой ткани. Избирательность многократно усиливается, если противоопухолевый агент связывается с векторной молекулой, способной взаимодействовать с опухолеассоциированными антигенами. Дополнительным фактором избирательности воздействия на опухоль является возможность введения второго или более векторного агента к другому онкомаркеру в той же опухолевой ткани, что делает возможным создание противоопухолевого препарата со специфичностью на порядки превышающей монотаргентированные векторные системы, что не только повысит специфичность накопления, но и снизит риск клональной селекции и возникновения лекарственной устойчивости. Таким образом, транспортная система в подобном мультитаргетном исполнении может оказаться самым избирательным цитотоксическим агентом для направленной элиминации опухолевых клеточных популяций.

Существенное ограничение связано подбором оптимального набора онкомаркеров и соответствующих векторных молекул может быть преодолено использованием полноразмерных, противоопухолевых, хорошо зарекомендовавших себя антител, широкий ряд которых доступен на рынке, в отличие от "экзотических" векторов получаемых в одной лаборатории. Кроме того, существуют разработки позволяющие с помощью простых шагов иммобилизовать такие антитела на поверхностях практически любых носителей, что делает их синтез очень простым и зависит только от профиля онкомаркеров пациента. Таким образом, создание новых мультитаргетных систем доставки с улучшенными характеристиками, позволит получить новый класс препаратов для проведения эффективной противоопухолевой терапии.

В случае использования в качестве векторных молекул антител, во первых, следует учитывать специфику онкомаркера с которым они взаимодействуют, во вторых, желательно использовать легко-доступные молекулы. Так, одним из перспективных кандидатов является пептид KQEFLLIN – лиганд рецептора альфа-фетопротейна (онкофетального белка), экспрессия которого в значительной степени повышена на поверхности опухолевых клеток. Вторым кандидатом является пептид IELLQAR – синтетических лиганд селективных (P или E), экспрессия которых повышена при воспалительных процессах, а именно в сосудистой ткани опухоли. Помимо упомянутых пептидов возможно также использовать широкий ряд антител к другим онкомаркерам (например EpCam, опухоль ассоциированные протеазы, опухоль-специфичные белки межклеточного матрикса, маркеры опухоль-ассоциированных иммунных клеток и ряд других) и что более важно - их различные комбинации. Иммобилизация пары векторов взаимодействующих с разными онкомаркерами и противоопухолевого препарата на полимерном носителе потенциально позволит улучшить растворимость препарата в физиологических условиях, улучшит биораспределение и значительно усилит селективность его накопления.

Таким образом, получение мультитаргетных адресных систем доставки потенциально позволит создать универсальную адаптивную платформу для высокоэффективной терапии многих онкологических заболеваний.

Результаты работы. Препараты содержащие векторные молекулы получали на основе полиамидаминовых дендримеров 4-го поколения (G4). Для блокировки высокого положительного заряда аминогрупп на поверхности дендримеров и снижения неспецифического взаимодействия с клетками и тканями использовали амино-реактивный метиловый эфир полиэтиленгликоля (NHS-PEG-OCH₃). В качестве диагностического лекарственного препарата был использован амино-реактивный хелатор p-SCN-Bn-DTPA, который стабилизировал ионы Gd на поверхности G4. Направленную иммобилизацию векторных пептидов (KQEFLLINCR, IELLQARCR) проводили с использованием малеимид-содержащего производного полиэтиленгликоля (NHS-PEG-Mal) на поверхности G4 и введенных при синтезе остатков цитеина в пептидах. В качестве флуоресцентной метки были использован изотиоцианат флуоресцеина (FITC). В качестве контрольных были использованы: производное не содержащее векторов (G4-DTPA-PEG) и монопроизводные (G4-DTPA-PEG-IEL и G4-DTPA-PEG-KQ), названные в соответствии с первыми остатками аминокислот в иммобилизованных пептидах. В качестве основного был исследован конъюгат несущий на поверхности два пептида (G4-DTPA-PEG-Pep).

Исследование накопления конъюгатов в опухолевых клетках линии SKOV-3 (экспрессирующих рецепторы АФП) с помощью лазерной конфокальной сканирующей микроскопии (ЛКСМ) выявило преимущественное накопление конъюгатов G4-DTPA-PEG-Pep и G4-DTPA-PEG-KQ, в то время как конъюгаты G4-DTPA-PEG-IEL и контрольный G4-DTPA-PEG накапливались на одинаковом уровне и значительно хуже (рисунок 1 А). Аналогичная картина была характерна при исследовании образцов с помощью проточной цитометрии – хорошо накапливался G4-DTPA-PEG-Pep, а G4-DTPA-PEG-IEL и контрольный G4-DTPA-PEG накапливались хуже (рисунок 1 Б). Эти данные свидетельствовали и специфичности накопления G4-DTPA-PEG-Pep и G4-DTPA-PEG-KQ объяснимую присутствием лиганда пептида KQEFLIN на поверхности клеток SKOV-3 в отличие от G4-DTPA-PEG и G4-DTPA-PEG-IEL, лиганд которого экспрессируется эндотелиальными клетками в очаге воспаления.

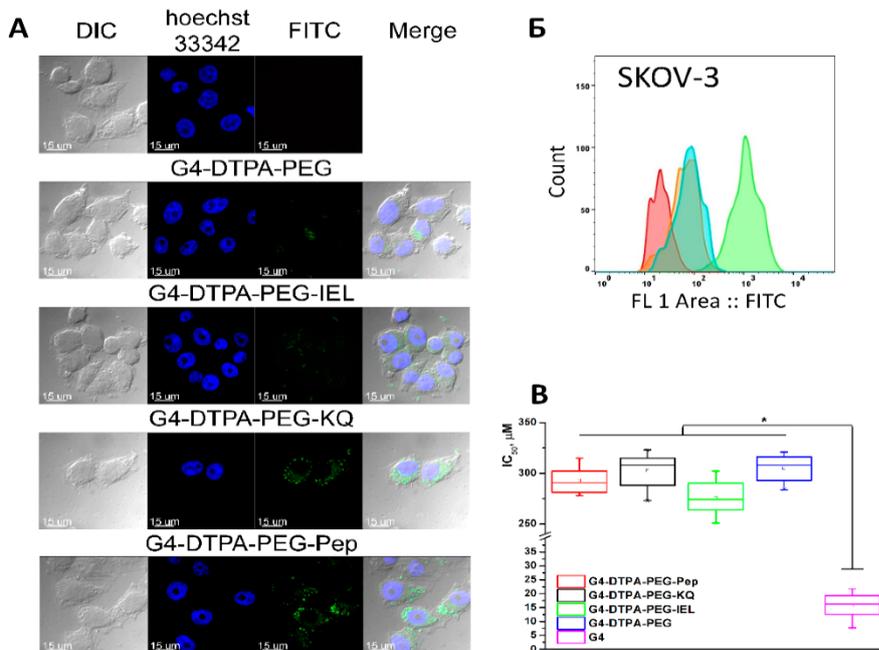


Рисунок 1. (А) Микрофотографии ЛКСМ конъюгатов в клетках линии SKOV-3. (Б) Результаты проточной цитофлуорометрии конъюгатов в клетках SKOV-3 (красный – необработанный контроль, голубой - G4-DTPA-PEG, оранжевый - G4-DTPA-PEG-IEL, зеленый - G4-DTPA-PEG-Pep). (В) Результаты цитотоксической активности конъюгатов в отношении клеток SKOV-3.

Цитотоксическая активность всех конъюгатов была в значительной степени снижена в сравнении с немодифицированными дендримерами, вследствие блокировки высокого положительного заряда поверхности (рисунок 1 В).

Исследование релаксивности растворов G4-DTPA-PEG-Pep и Magnevist в одинаковых по Gd концентрациях выявило незначительные различия (рисунок 2 А).

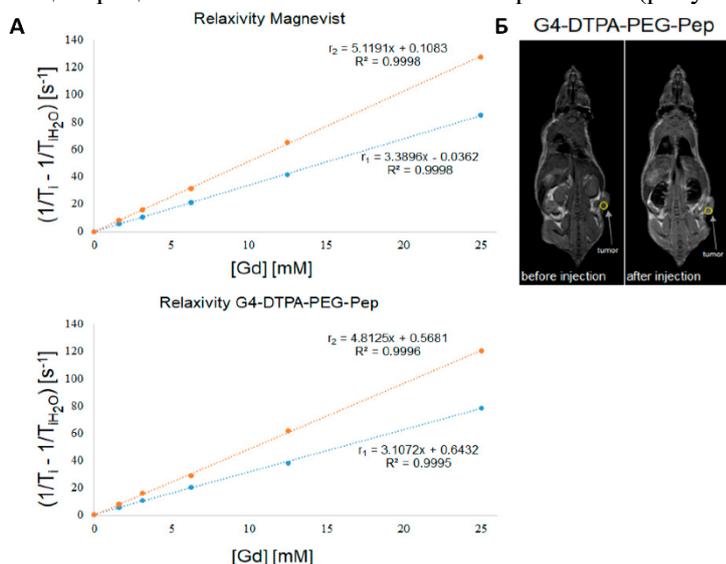


Рисунок 2. (А) Релаксивность G4-DTPA-PEG-Pep и контрольного препарата Magnevist. (Б) МРТ изображения мышей несущих опухоль (SKOV-3) до и после введения G4-DTPA-PEG-Pep.

Исследование накопления G4-DTPA-PEG-Pep in vivo на модели SKOV-3 выявило его способность аккумулироваться опухолевой тканью (рисунок 2 Б).

Таким образом, была разработана система направленного транспорта содержащая две векторные молекулы и получены первичные данные по эффективности ее накопления в опухолевых клетках и тканях.

Исследование поддержано стипендией президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам 2022-2023 года 2022-2023 (№ СП-3848.2022.4).

Анализ структуры полиэфиров методом рентгеновской дифракции

**Якубова Л.Ю.¹, Подзорова М.В.^{1,2}, Дмитриенко А.О.^{1,3},
Тертышная Ю.В.^{1,2}**

¹ *Российский экономический университет имени Г.В. Плеханова, г. Москва*

² *Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва*

³ *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
г. Москва*

Биоразлагаемые полимеры, которые могут разрушаться без негативного воздействия на окружающую среду, являются многообещающей альтернативой нефтеполимерам для некоторых применений, например, в упаковочной промышленности, сельском хозяйстве, медицине [1-3].

Среди биоразлагаемых материалов полимолочная кислота (ПЛА), также известная как полилактид, является одним из наиболее перспективных полимеров. ПЛА – это алифатический полиэфир, который способен распадаться на фрагменты с меньшей молекулярной массой, которые в итоге образуют диоксид углерода и воду. Процесс биодеструкции протекает под действием влаги и определенных микроорганизмов, распространенных в почвенной среде. В целом, ПЛА обладает хорошими механическими свойствами. Его жесткость и прочность сравнимы с обычными синтетическими полимерами на нефтяной основе, такими как полиэтилентерефталат и полистирол, что делает ПЛА перспективным материалом, однако у ПЛА есть свои недостатки. Во-первых, он имеет более высокую себестоимость производства по сравнению с аналогами, полученными из нефти и не поддающимися биологическому разложению. Во-вторых, ПЛА по своей природе хрупок, несмотря на его микроструктуру и механические свойства. Эти недостатки препятствуют использованию ПЛА в широком спектре применений. Для того чтобы ПЛА стал более привлекательным для замены традиционным полимерам на нефтяной основе, его можно смешивать с другим компонентами, которые являются более экономичными [4-7].

Полимерные смеси в основном представляют собой гетерогенные материалы и демонстрируют очень сложное поведение при кристаллизации и плавлении, что приводит к таким явлениям, как многократное плавление и фракционная кристаллизация.

Природа и молекулярно-массовые характеристики смешивающихся полимеров определяют тип фазовой структуры. Необходимо учитывать, что равновесная форма частиц не возникает в системах, где один или оба компонента стеклуются или кристаллизуются. Температуры плавления и стеклования, снижение степени кристалличности кристаллизующегося полимера, все эти показатели могут свидетельствовать о наличии межфазной границы или межфазного слоя в полимерных смесях.

Говоря о структуре пленочного образца ПЛА можно отметить, что под микроскопом структура может быть представлена гладкой поверхностью, без пор и углублений. Следует отметить, что отсутствие выраженных сферолитов в структуре ПЛА, может быть характерно для образцов, полученных из расплава. Так в работе [8] исследовались гранулы и пленочные образцы ПЛА методом рентгеноструктурной дифракции. Было показано, что на дифрактограммах образцов гранул ПЛА наблюдаются два узких интенсивных и два слабых дифракционных максимума, которые соответствуют α -формам кристаллитов (угол дифракции $2\theta = 16,8$ град). На дифрактограммах пленок, полученных из расплава, отсутствуют четкие рефлексии кристаллической фазы, и наблюдается широкий дифракционный максимум, соответствующий, по-видимому, метастабильному состоянию кристаллитов ПЛА. Также в этой работе [8] проводили отжиг пленок при 90 °С в течение 60 минут. После отжига отмечается появление интенсивных рефлексив – усовершенствование кристаллической фазы. Таким образом зафиксировать

кристаллическую структуру ПЛА возможно или в исходном виде (гранулы), или после отжига пленочного образца из расплава, или при получении пленки из раствора (рисунок 1).

Стоит отметить, что один из методов изучения структуры и свойств является метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), но из-за интегрального характера эксперимента ДСК различные экзотермические или эндотермические пики не могут быть отнесены к различным фазам образца. В отличие от ДСК, рентгеновская дифракция является фазово-селективным методом и может быть выгодно использована для исследования явления фазового перехода. Качественный фазовый анализ методом рентгеновской дифракции основан на законе Брэгга, который связывает угол дифракции с расстоянием в плоскости кристаллической решетки [9].

Под влиянием температуры при получении пленок и последующем охлаждении меняется подвижность макромолекул полимера, возникают некоторые напряжения, которые не позволяют образоваться изначальной кристаллической структуре. Дифрактограммы пленок (рисунок 2а) характеризуются отсутствием четких рефлексов кристаллической фазы, и наблюдается широкий дифракционный максимум, соответствующий, по-видимому, метастабильному состоянию кристаллитов ПЛА.

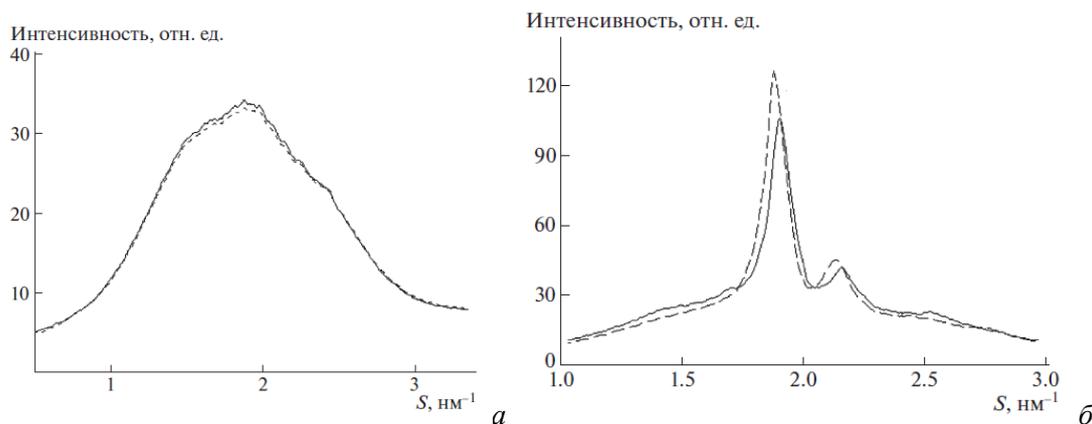


Рисунок 1. Дифрактограммы пленок до (а) и после отжига при $T=90$ °С в течение 60 минут (б) ПЛА (фирмы Hisun Biomaterials (Китай)) – пунктирная кривая и ПЛА (марка 4032D фирмы «Nature Works» (США))– сплошная.

Говоря о биоразлагаемых полимерах, стоит отметить и полигидроксибутират (ПГБ), который активно применяется в медицине. ПГБ также представляет собой биополиэфир, получаемый путем биосинтеза через бактериальную ферментацию, главным образом за счет бактерий *Alcaligenes*, *Azobacter*, *Bacillus* и *Pseudomonas*. ПГБ также характеризуется хрупкостью и термической нестабильностью при обычной обработке расплава и подходит только для обработки в узком температурном диапазоне [10-12]

В работах [13, 14] методом рентгеновской дифракции было показано, что ПГБ характеризуется пластинчатой формой кристаллитов, в которых полимерные цепи ориентированы вдоль оси перпендикулярно плоскости кристаллитов [15]. Положение дифракционных максимумов на дифрактограммах нетканых материалов ПГБ, как исходных, так и пленочных образцов ПГБ, соответствует кристаллической решетке этого полимера с орторомбической элементарной ячейкой ($a = 0.576$ нм, $b = 1.320$ нм, $c = 0.596$ нм).

Полимеры являются паракристаллическими веществами и ширина дифракционных линий у них зависит не только от размеров кристаллитов, но и от величины искажений кристаллической решетки [16]. Также отмечается изменение дифрактограмм волокнистого материала из ПГБ после отжига (рисунок 2).

При отжиге образцов при 140°C наблюдаются значительные изменения структуры: растет степень кристалличности (с 47 до 58%), размеры кристаллитов и большой период.

Важно отметить, что для полимеров, которые имеют в своей структуре как кристаллическую, так и аморфную составляющую наблюдаются малоугловые рефлексы, которые связывают с укладкой кристаллитов, разделенных аморфной фазой. Как раз эти большие периоды дают физико-химические свойства, свойственные полимерам. А также, влияние может оказывать способ получения образцов.

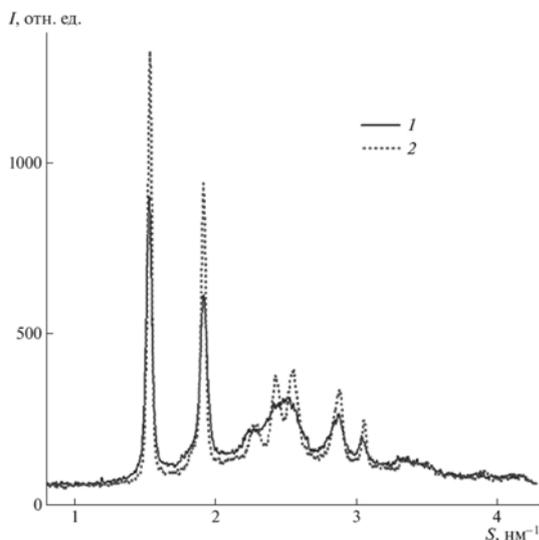


Рисунок 2. Дифрактограммы волокнистого материала на основе ПГБ до (1) -сплошная и после отжига при $T=140\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 180 минут.

Одним из важнейших структурных параметров, определяющих физико-химические свойства полимерной композиции на основе кристаллизующихся полимеров, является структура кристаллических областей. Поэтому важным вопросом, связанным с созданием биodeградируемых композиционных материалов с прогнозируемыми свойствами, является вопрос о том, какие факторы позволяют управлять формированием структурных параметров.

Исследование кристаллической фазы и ее свойств может осуществляться методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). В данной работе степень кристалличности, температуру стеклования и температуру плавления образцов исследовали на дифференциальном сканирующем калориметре DSC 214 Polyma (Netzsch, Германия) при скорости нагрева 10 град/мин и массе образца $(10\pm 0,1)\text{ мг}$. Величину степени кристалличности $\chi_{кр}$ рассчитывали по формуле (1): $\chi_{кр} (\%) = 100 \times \Delta H_{пл} / \Delta H_{пл}^*$, где $\chi_{кр}$ - степень кристалличности, теплота плавления идеального кристалла ПЛА $\Delta H_{пл}^* = 93,1\text{ Дж/г}$.

Исследование проводилось на основе пленок ПЛА (4032D, NatureWorks, США), полученных из раствора (в хлороформе) и расплава. С помощью дифференциального сканирующего калориметра NETZSCH POLYMA 214 были определены теплофизические параметры полилактида (рисунок 3).

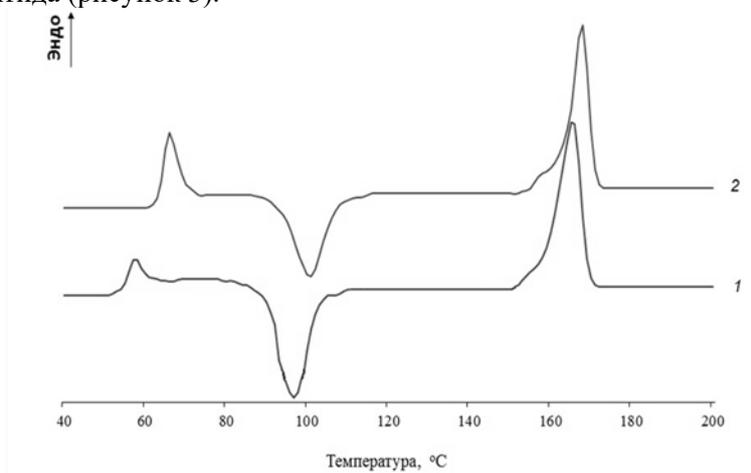


Рисунок 3. Термограммы плавления ПЛА из расплава (1) и раствора (2).

Из рисунка видно, что температура плавления полилактида находится в пределах $163\text{--}166\text{ }^{\circ}\text{C}$, при этом температура стеклования ПЛА в образце, полученном из раствора смещается в область высоких температур и составляет $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, а из расплава составляет $56\text{ }^{\circ}\text{C}$, степень кристалличности ПЛА из раствора чуть больше и составляет 46% , а из расплава 44% . Анализируя эти данные и сравнивая их с результатами рентгеновской дифракции, возможно подтвердить зависимость изменений в кристаллической решётке от способа получения образцов.

Таким образом, с помощью рентгенографии возможно получить корреляцию с данными ДСК с переходом определенных кристаллических фаз. Другим преимуществом является возможность фазово-селективного измерения всех интересных параметров структуры, ценных из рентгеновских данных, таких как анизотропное тепловое расширение или морфология кристаллов.

Благодарность

Результаты исследования получены в рамках гранта Президента Российской Федерации на государственную поддержку молодых российских ученых – кандидатов наук № МК-3240.2022.1.3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Yu. V. Tertyshnaya, M. V. Podzorova, A. A. Popov // *Ecology and Industry of Russia*. – 2016. – V.20. – № 7. – P. 22-25.
2. L. S. Shibryaeva, Yu. V. Tertyshnaya, D. D. Pal'Mina, N. S. Levina // *Agricultural machines and technologies*. – 2015. – № 6. – P. 14-18.
3. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed, S. Ahmed // *Biotechnology Advances*. – 2008. – № 26. – P. 246-265.
4. Ю.В. Тертышная, М.В. Подзорова, Т.В. Монахова, А.А. Попов // *Химическая физика*. – 2019. – Т. 38. – № 3. – С. 80-87.
5. S. M. Bhasney, P. Bhagabati, A. Kumar, V. Katiyar // *Composites Science and Technology*. – 2019. – V.171. – P. 54-61.
6. N. Graupner, J. Müssig // *Composites: Part A*. – 2011. – V. 42. – pp. 2010-2019.
7. X. Dai, Z. Xiong, S. Ma, C. Li, J. Wang, H. Na, J. Zhu // *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. – 2015. – № 54. – P. 3806-3812.5.
8. Ю.В. Тертышная, С.Г. Карпова, О.В. Шаталова, А.В. Кривандин, Л.С. Шибряева // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. – 2016. – Т. 58 – № 1. – С. 54–60.
9. R. Androsch, M. Stolp, H.-J. Radusch // *Thermochemica Acta*. – 1996. – V. 271.
10. М.Р. Arrieta, J. López, D. López, J.M. Kenny, L. Peponi // *Industrial Crops and Products*. – 2016. – V 93. – P. 290-301.
11. J.S. Lim, Ku-il Park, G.S. Chung, J.H. Kim // *Materials Science and Engineering C*. – 2013. – V. 33 – P. 2131-2137.
12. Трегер Ю.А., Морозов К.А., Дасаева Г.С., Фролкова А.К. // *Тонкие химические технологии*. – 2018. – Т. 13. – № 4. – С. 26.
13. Шибряева Л.С., Шаталова О.В., Кривандин А.В., Тертышная Ю.В., Соловова Ю.В. // *Журнал прикладной химии*. – 2017. – Т. 90. – № 9. – С. 1187-1198.
14. Карпова С.Г., Ольхов А.А., Кривандин А.В., Шаталова О.В., Лобанов А.В., Попов А.А., Иорданский А.Л. // *Высокомолекулярные соединения. Серия А*. – 2019. – Т. 61. – № 1. – С. 67-81.
15. Кривандин А. В., Шаталова О. В., Иорданский А. Л. // *Высокомолекуляр. соединения*. – 1997. – Т. 39Б. – № 3. – С. 543–544.
16. Hosemann R., Hindeleh A. M. // *J. Macromol. Sci. Part B*. – 1995. – V. 34. – № 4. – P. 327–356.

Научное издание

БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА

Издание подготовлено в авторской редакции

Технический редактор *Н.А. Ясько*

Подписано в печать 10.07.2023 г. Формат 60×84/8. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 21,39. Тираж 100 экз. Заказ 1144.

Российский университет дружбы народов
115419, ГСП-1, г. Москва, ул. Орджоникидзе, д. 3

Типография РУДН
115419, ГСП-1, г. Москва, ул. Орджоникидзе, д. 3.
Тел.: 8 (495) 955-08-74. E-mail: publishing@rudn.ru