

Том 43, номер 11

Ноябрь 2024



ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 43, номер 11, 2024

Строение химических соединений, квантовая химия, спектроскопия

Татиколов А.С., Панова И.Г.

Фотоника билирубина — биологически важной молекулы (*Обзор*) 3

Кинетика и механизм химических реакций, катализ

Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Касаикина О.Т.

Кинетика окисления соевого лецитина при высоких концентрациях. Действие антиоксидантов 10

Потапов И.Д., Мотякин М.В., Подругина Т.А., Некипелова Т.Д.

Спиновые аддукты при фотолизе смешанного бензоильного фосфониево-иодониевого илида в дихлорметане 18

Электрические и магнитные свойства материалов

Атражев В.В., Дмитриев Д.В., Кривнов В.Я, Султанов В.И.

Влияние региодефектов на поляризацию сегнетоэлектрических полимеров при низких температурах 31

Химическая физика биологических процессов

Вассерман Л.А., Гаврилина Е.С., Юрина Л.В., Васильева А.Д., Розенфельд М.А.

Исследование термической денатурации молекулы плазминогена при индуцированном окислении 39

Миль Е.М., Албантова А.А., Матиенко Л.И., Голощапов А.Н., Коровин М.А., Кувыркова В.В.

Определение содержания кофактора FAD и NAD(P)H-оксидазных комплексов в спленоцитах мышей и клетках карциномы Льюис при апоптозе методом конфокальной микроскопии 47

Наумов В.В., Федорова Г.Ф., Вепринцев Т.Л., Яблонская О.И., Трофимов А.В.

Влияние хелата европия на кинетику хемилюминесценции при свободно-радикальном окислении липидных образцов растительного происхождения 54

Семёнова М.Г., Антипова А.С., Мартыросова Е.И., Анохина М.С.,
Зеликина Д.В., Богданова Н.Г., Пальмина Н.П.

Структурные и термодинамические параметры биополимерной пероральной системы доставки липосомальной формы комбинации нутрицевтиков 62

Сорокина О.Н., Константинова Т.С., Воробьёва А.К., Васильева А.Д., Юрина Л.В., Ерёменко А.В., Лыженкова А.В., Минушкина Л.О., Затейщиков Д.А., Курочкин И.Н.	
Определение сердечного тропонина I методом иммуноферментного анализа на магнитных частицах с электрохимическим детектированием	71
Трофимова Н.Н., Храмцова Е.А., Петронюк Ю.С., Антипова К.Г., Крупнин А.Е., Ратновская А.В., Соколова В.В., Медникова Е.И., Гурьева Т.С.	
Влияние спектрального состава света на упруго-механические свойства склеры и развитие близорукости	79
Яковлева М.А., Васин А.А., Донцов А.Е., Гулин А.А., Айбуш А.В., Астафьев А.А., Шахов А.М., Фельдман Т.Б., Островский М.А.	
Физико-химический анализ продуктов фотодеструкции бисретиноидов липофусциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия глаза	88

Химическая физика полимерных материалов

Алиев М.А., Бибииков С.Б.	
Фазовое поведение смеси V-образного жидкого кристалла и полимера	102

Химическая физика наноматериалов

Бычкова А.В., Маркова А.А., Нгуен М.Т., Градова М.А., Горобец М.Г., Мотякин М.В., Абдуллина М.И., Торопцева А.В., Кузьмин В.А.	
Наноразмерная платформа на основе магнитных наночастиц для фотодинамической терапии в онкологии	112

ФОТОНИКА БИЛИРУБИНА – БИОЛОГИЧЕСКИ ВАЖНОЙ МОЛЕКУЛЫ (Обзор)

© 2024 г. А. С. Татиколов^{1*}, И. Г. Панова²¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия²НП Международный научно-практический центр пролиферации тканей, Москва, Россия

*E-mail: tatikolov@mail.ru

Поступила в редакцию 09.04.2024;

после доработки 15.04.2024;

принята в печать 22.04.2024

В организме важную роль играет билирубин – желчный пигмент, обладающий фотохимической активностью. Научный и практический интерес к фотонике билирубина объясняется тем, что его молекула способна к сверхбыстрым процессам фотоизомеризации, содержит два взаимодействующих между собой дипиррометеновых хромофора, а фотохимические реакции билирубина используются в широко распространенном методе фототерапии желтухи новорожденных (неонатальной гипербилирубинемии), проводимой для снижения уровня билирубина в организме. В настоящем обзоре кратко рассматриваются фотоника билирубина, а также его основные фотохимические реакции в фототерапии неонатальной гипербилирубинемии.

Ключевые слова: билирубин, фотоника, фотоизомеризация, фотоциклизация, фотоокисление, фототерапия неонатальной гипербилирубинемии.

DOI: 10.31857/S0207401X24110011

1. ВВЕДЕНИЕ

Среди молекулярных компонентов организма важную роль играет билирубин (БР) – пигмент желчи человека и животных, окрашенный в желтый цвет и проявляющий фотохимическую активность (рис. 1). Билирубин является конечным продуктом метаболизма гем-содержащих белковых молекул – гемоглобина, миоглобина, некоторых ферментов; он практически не растворим в воде. В клетках ретикуло-эндотелиальной системы с участием гемоксигеназы-1 (НО-1) гем расщепляется до СО, Fe²⁺ и биливердина. Под действием биливердин-редуктазы биливердин восстанавливается до БР (так называемый неконъюгированный или прямой БР). Билирубин обладает высокой токсичностью и, поступая в кровеносное русло, образует комплекс с сывороточным альбумином, что делает его нетоксичным. Этот комплекс транспортируется в клетки печени, где БР связывается с глюкуроновой кислотой с образованием растворимого прямого (или конъюгированного) БР. Затем прямой БР из печени поступает в желчные капилляры и через кишечник выводится из организма [1–6].

Особое значение имеет изучение фотоники (фотофизики и фотохимии) БР. Молекула БР

способна участвовать в сверхбыстрых процессах фотоизомеризации и других важных фотопроцессах; кроме того, она содержит два дипиррометеновых хромофора, которые могут взаимодействовать между собой посредством экситонной связи, зависящей от геометрии молекулы [7–10]. Практический интерес к фотохимии БР вызван широким распространением метода фототерапии желтухи новорожденных, основанном на фотохимических реакциях БР при освещении кожных покровов новорожденных, страдающих неонатальной гипербилирубинемией (высоким уровнем БР в организме) [9–11]. В настоящем обзоре рассмотрены элементарные фотофизические и фотохимические процессы с участием БР, а также

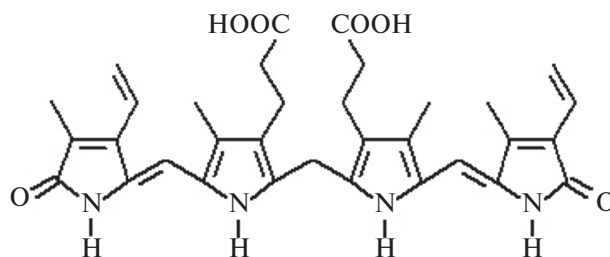


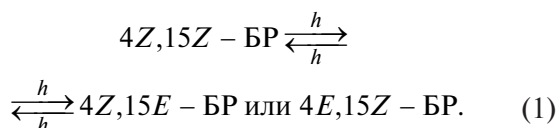
Рис. 1. Структура молекулы БР.

фотохимические реакции БР в фототерапии неонатальной гипербилирубинемии (ФНГ).

2. ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ И ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИЛИРУБИНА

Данные литературы указывают на то, что БР в растворе обладает изогнутой конформацией, имеющей *Z*-конфигурацию относительно двойных связей 4–5 и 15–16 (4*Z*, 15*Z*-изомер, обозначаемый как 4*Z*, 15*Z*-билирубин-IX α), стабилизированную внутримолекулярными водородными связями (рис. 2). Такую конформацию БР имеет и в комплексе с сывороточным альбумином человека (САЧ) [8, 11, 12].

Спектр поглощения БР в комплексе с САЧ представляет собой широкую полосу, простирающуюся от 350 до 530 нм с максимумом около 460 нм; в отсутствие САЧ (в буфере) спектр (с максимумом при 443 нм) несколько уширяется [11–13]. Квантовый выход флуоресценции БР в комплексе с САЧ $\Phi_f = 0.003$; в отсутствие САЧ он резко уменьшается ($\Phi_f < 2 \times 10^{-5}$). Положение максимума флуоресценции комплекса БР–САЧ несколько зависит от длины волны возбуждения и лежит в области 520–526 нм при возбуждении длины волны $\lambda = 420$ –470 нм. Квантовый выход интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние для БР в комплексе с САЧ $\Phi_T < 0.01$ [7]. Низкие выходы флуоресценции указывают на сверхбыструю безызлучательную дезактивацию электронно-возбужденного состояния БР, к которой относится фотоизомеризация в результате поворота относительно одной из двойных связей молекулы БР – 4–5 или 15–16 (*Z* $\rightarrow$ *E*-изомеризация, схема):



При этом САЧ стабилизирует 4*Z*,15*E*-изомер в комплексе с БР. Квантовый выход 4*Z*,15*E*-изомера для комплекса БР–САЧ $\Phi_i = 0.20$ при фотовозбуждении светом с $\lambda = 465$ нм [14] (по более поздним данным, $\Phi_i = 0.10$ при $\lambda = 458$ нм, причем с ростом длины волны света Φ_i уменьшается, а соотношение $[4E,15Z]/[4Z,15E]$ возрастает [10]). Наряду с фотоизомеризацией, происходит быстрая диссипация энергии возбуждения путем безызлучательного перехода (внутренней конвер-

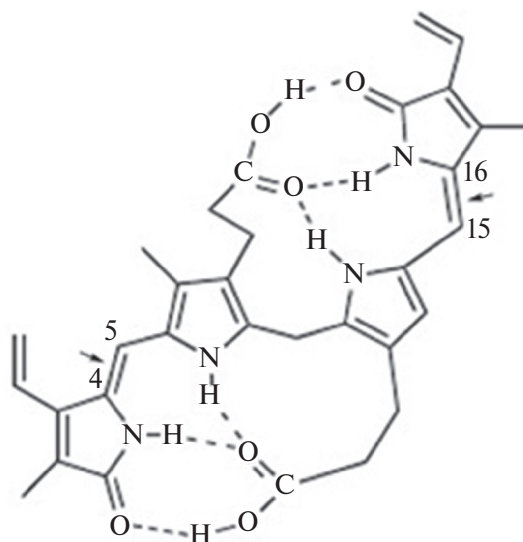


Рис. 2. Структура *Z,Z*-конформации БР – 4*Z*,15*Z*-билирубина-IX α . Штриховыми линиями показаны внутримолекулярные водородные связи, стабилизирующие *Z,Z*-конформацию. Стрелки указывают на двойные связи 4–5 и 15–16, относительно которых происходит фотоизомеризация БР.

сии) в исходный изомер БР [7]. Квантовый выход других продуктов фотопревращения БР – люмирубина (рис. 3), а также продуктов фотоокисления – гораздо ниже, чем 4*Z*,15*E*-изомера (суммарно < 0.008 [7], ~ 0.001 для люмирубина [15]). Хотя ряд конечных фотопродуктов имеют низкие квантовые выходы, их образование может быть существенно при проведении ФНГ [10].

Первичные сверхбыстрые процессы безызлучательной дезактивации энергии электронного возбуждения в молекуле БР изучались методами с фемтосекундным временным разрешением [16–19]. В кинетике затухания флуоресценции было обнаружено наличие быстрого компонента со временем, равным ~ 120 фс, который был отнесен к процессу локализации экситона на одном из хромофоров – половинок молекулы. Более медленные компоненты в несколько сотен фемтосекунд и несколько пикосекунд отнесены к релаксации в “скрученный” промежуточный продукт, который далее переходил за время, равное ~ 15 пс в исходное состояние молекулы [15].

В работе [20] было показано, что дезактивация фотовозбужденного БР происходит через образование нефлуоресцирующего (dark) состояния, переходящего затем в течение 15 пс в исходное состояние. Предполагалось экситонное взаимодействие S_1 -состояний экзо- и эндо-половинок

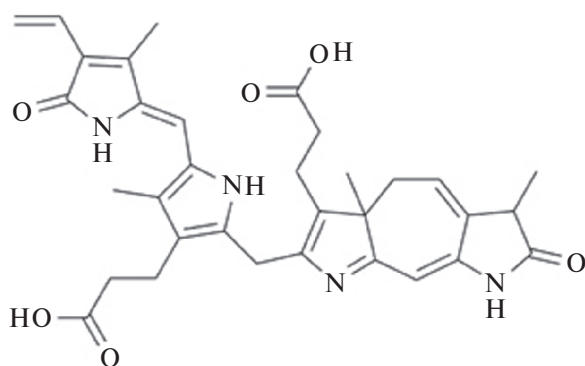


Рис. 3. Структура люмирубина (циклобилирубина).

молекулы БР, приводящее к расщеплению электронных уровней. При этом было обнаружено двухфотонное стимулирование второстепенного канала $Z \rightarrow E$ -изомеризации, которое, возможно, осуществляется через долгоживущий интермедиат.

Различные интермедиаты сверхбыстрой деградации фотовозбужденного БР были охарактеризованы с использованием вычислительных методов. Результаты расчетов хорошо согласуются с экспериментальными данными из литературных источников [21].

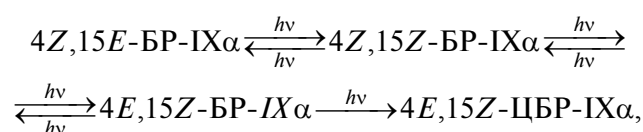
В недавней работе с использованием фемтосекундной спектроскопии комбинационного рассеяния и квантово-химических расчетов была изучена динамика сверхбыстрой фотоизомеризации БР [22]. Результаты исследования показали, что при фотовозбуждении вначале происходит сверхбыстрая конфигурационная изомеризация с сохранением объема (механизм “hula-twist”) за время, равное ~ 300 фс, после чего следует искажение внутримолекулярных водородных связей и крупномасштабный поворот двух дипирриновых половин изомера Z,Z -БР за несколько пикосекунд. После этого большая часть молекул возвращается обратно в Z,Z -БР, и только очень небольшая доля превращается в стабильные изомеры БР путем изомеризации.

Наряду с фотоизомеризацией, БР может также участвовать в реакциях фотосенсибилизированного окисления с участием триплетных молекул БР, сенсибилизирующих образование синглетного кислорода [23]. Реализация этих процессов была доказана экспериментально путем лазерного возбуждения БР и регистрации люминесценции синглетного кислорода [24]. Однако в связи с низким квантовым выходом БР в триплетное со-

стояние выход продуктов фотоокисления БР мал по сравнению с выходом фотоизомеров [25].

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ БИЛИРУБИНА ПРИ ФОТОТЕРАПИИ НЕОНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРБИЛИРУБИНЕМИИ

Суть метода ФНГ заключается в воздействии на кожные покровы новорожденных с гипербилирубинемией (окрашивание кожи в желтый цвет из-за высокого уровня БР) светом различных длин волн (обычно синей или сине-зеленой области спектра), приводящим к уменьшению желтизны и выведению БР из организма [26]. Основные фотохимические реакции БР (исходный изомер обозначен как $4Z,15Z$ -БР-IX α), происходящие при ФНГ, показаны ниже:



где ЦБР – цикlobилирубин (люмирубин).

$4E,15Z$ -ЦБР-IX α может также фотоизомеризоваться в $4E,15E$ -ЦБР-IX α [27].

Изомер билирубина $4Z,15E$ -билирубин-IX α является основным продуктом обратимых фотохимических реакций геометрической изомеризации, а $4E,15Z$ -циклобилирубин-IX α ($4E,15Z$ -ЦБР-IX α , или Z -люмирубин, см. рис. 3) – основным продуктом необратимой реакции структурной фотоизомеризации (фотоциклизации). Образующиеся фотоизомеры растворимы в воде и легко выводятся из организма (в основном через печень и желчь). В то же время Z -люмирубин может в некоторых случаях полимеризоваться в темнокоричневое вещество, вызывающее синдром “бронзового ребенка” (повышенное производство бронзовых пигментов) – вредную побочную реакцию при фототерапии [3, 27].

Наряду с продуктами фотоизомеризации, при ФНГ обнаруживается образование продуктов фотоокисления БР (в частности, водорастворимых окисленных моно- и дипирролов, которые выводятся из организма главным образом через почки) [4]. В то же время есть мнение, что фотоокисление БР не вносит существенного вклада в фотопроцессы, происходящие при ФНГ, а продукты окисления БР образуются путем темновых реакций БР с активными формами кислорода, присутству-

ющими в организме (в случае реакции переноса электрона — с образованием биливердина), что обуславливает его антиоксидантную активность [3].

Фототерапии неонатальной гипербилирубинемии посвящено большое число работ, и здесь мы остановимся только на некоторых из них. В ряде работ изучалось влияние параметров источника света (типа источника, длины волн, интенсивности и др.) на фототерапию. В работе [28] проводили сравнение действия фильтрованного солнечного света ($\lambda = 400\text{--}900\text{ нм}$) и интенсивного светодиодного облучения ($\lambda = 420\text{--}530\text{ нм}$) при фототерапии новорожденных с выраженной (от средней до высокой) степенью гипербилирубинемии. Авторами установлено, что не наблюдалось существенных различий в эффектах, вызванных действием солнечного света и светодиодного облучения. В то же время использование светодиодов позволяет, в частности, уменьшить тепловой эффект при достаточно высокой интенсивности облучения.

В некоторых исследованиях показано, что светодиодное излучение с длиной волны $\lambda_{\text{max}} = 410\text{ нм}$ наиболее эффективно для фотоизомеризации $4Z,15Z\text{-БР} \rightarrow 4Z,15E\text{-БР}$. В то же время зеленый свет с $\lambda_{\text{max}} \sim 510\text{ нм}$ производит больше люмирубина и меньше $4Z,15E\text{-БР}$ и идеален для ФНГ, поскольку коротковолновый свет в диапазоне длин волн $350\text{--}450\text{ нм}$ может оказывать вредное воздействие (в частности, иметь мутагенный эффект) [29–31].

В ряде работ сопоставлялась эффективность фототерапии светодиодными источниками синего и сине-зеленого света [32–36]. На животных моделях было обнаружено, что фототерапия смешанным фильтрованным синим ($440\text{--}520\text{ нм}$) и зеленым ($490\text{--}590\text{ нм}$) светом (50% синего и 50% зеленого света) примерно так же эффективна, как и фототерапия синим светом, но вызывает более низкий окислительный стресс [32]. Исследование на новорожденных показало, что светодиодный сине-зеленый свет диапазона $470\text{--}490\text{ нм}$ ($\lambda_{\text{max}} = 478\text{ нм}$) на 31% более эффективен, чем синий свет диапазона $450\text{--}470\text{ нм}$ ($\lambda_{\text{max}} = 459\text{ нм}$) [35]. В настоящее время имеются рекомендации (в частности, в работе [37]), а также указание Американской академии педиатрии [38] использовать в ФНГ именно смешанный сине-зеленый свет.

В недавней работе [27] подробно анализируются результаты перехода от синего к сине-зеле-

ному свету при светодиодной ФНГ. К положительным эффектам авторы относят уменьшение фотоокисления, гено/цитотоксичности, снижение риска развития рака и смертности у новорожденных с низкой массой тела. В то же время в организме под действием сине-зеленого света может снижаться уровень витамина В2 (рибофлавина) за счет фотоокисления. К тому же из-за усиленного образования люмирубина при сине-зеленом освещении может наблюдаться синдром “бронзового” ребенка у предрасположенных к этому новорожденных. Дальнейшее развитие метода ФНГ должно заключаться в оптимизации условий осуществления процесса (длины волны облучения, интенсивности света, времени и периодичности облучения и др.) с целью повышения эффективности выведения БР из организма при минимизации побочных эффектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Билирубин представляет собой биомолекулу, играющую важную роль в процессах жизнедеятельности организма (в частности, являющуюся мощным антиоксидантом). Фотоника БР в настоящее время вызывает значительный научный и практический интерес. Исследование сверхбыстрых маршрутов фотопревращений БР позволяет выявить новые важные закономерности этих процессов, а изучение экситонного взаимодействия двух хромофоров в молекуле БР — его влияние на фотохимические свойства молекулы (в частности, объясняет зависимость флуоресценции от длины волны возбуждения). Фотохимические реакции БР используются в ФНГ, основанной на геометрической и структурной фотоизомеризации БР, а также его фотоокислении. Фототерапия неонатальной гипербилирубинемии дает возможность выведения избытка БР из организма путем воздействия на кожные покровы новорожденных, страдающих гипербилирубинемией. В настоящее время при ФНГ рекомендовано использовать светодиодное облучение сине-зеленого диапазона. Развитие метода ФНГ должно заключаться в дальнейшей оптимизации условий осуществления процесса с целью повышения эффективности выведения БР из организма при минимизации побочных эффектов.

Работа выполнена в рамках госзадания ИБХФ РАН (тема № 001201253314).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kim S.Y., Park S.C. // Front. Pharmacol. 2012. V. 3. P. 45;
<https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00045>
- Sticova E., Jirsa M. // World J. Gastroenterol. 2013. V. 19. № 38. P. 6398;
<https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i38.6398>
- Itoh S., Okada H., Koyano K. et al. // Front. Pediatr. 2023. V. 10. P. 1002408;
<https://doi.org/10.3389/fped.2022.1002408>
- Lightner D.A., McDonagh A.F. // Acc. Chem. Res. 1984. V. 17. № 12. P. 417;
<https://doi.org/10.1021/ar00108a002>
- Soto Conti C.P. // Arch. Argent. Pediatr. 2021. V. 119. № 1. P. e18;
<http://dx.doi.org/10.5546/aap.2021.eng.e18>
- Creeden J.F., Gordon D.M., Stec D.E. et al. // Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2021. V. 320. № 2. P. E191;
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00405.2020>
- Optical Properties and Structure of Terrapyrroles // Eds Blauer G. and Sund H. Berlin: Walter de Gruyter, 1985. P. 311.
- Lightner D.A., Gawronski J.K., Wijekoon W.M.D. // J. Amer. Chem. Soc. 1987. V. 109. № 21. P. 6354;
<https://doi.org/10.1021/ja00255a020>
- McDonagh A.F., Lightner D.A. // Pediatrics. 1985. V. 75. № 3. P. 443;
<https://doi.org/10.1542/peds.75.3.443>
- McDonagh A.F., Lightner D.A. // Semin. Liver Dis. 1988. V. 8. № 3. P. 272;
<https://doi.org/10.1055/s-2008-1040549>
- Ennever J.E. // Pediatr. Clin. N. Amer. 1986. V. 33. № 3. P. 603;
[https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(16\)36045-X](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(16)36045-X)
- Lightner D.A., Reisinger M., Landen G.L. // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. No. 13. P. 6034;
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38489-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38489-2)
- Taniguchi M., Lindsey J.S. // J. Photochem. Photobiol., C. 2023. V. 55. P. 100585;
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2023.100585>
- Lamola A.A., Flores J. // J. Amer. Chem. Soc. 1982. V. 104. № 9. P. 2530;
<https://doi.org/10.1021/ja00373a033>
- Zietz B., Gillbro T. // J. Phys. Chem. B. 2007. V. 111. № 41. P. 11997;
<https://doi.org/10.1021/jp073421c>
- Ветчинкин А.С., Уманский С.Я., Чайкина Ю.А. и др. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 9. С. 72;
<https://doi.org/10.31857/S0207401X22090102>
- Анфимов Д.Р., Голяк И.С., Небритова О.А. и др. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 10. С. 10;
<https://doi.org/10.31857/S0207401X22100028>
- Горохов В.В., Нокс П.П., Корватовский Б.Н. и др. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 6. С. 63;
<https://doi.org/10.31857/S0207401X23060055>
- Черепанов Д.А., Милановский Г.Е., Надточенко В.А. и др. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 6. С. 88;
<https://doi.org/10.31857/S0207401X23060043>
- Carreira-Blanco C., Singer P., Diller R. et al. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2016. V. 18. P. 7148;
doi: 10.1039/c5cp06971h
- Upadhyaya H.P. // J. Phys. Chem. A. 2018. V. 122. № 46. P. 9084;
<https://doi.org/10.1021/acs.jpca.8b09392>
- Pu R., Wang Z., Zhu R. et al. // J. Phys. Chem. Lett. 2023. V. 14. № 3. P. 809;
<https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.2c03535>
- Land E.J. // Photochem. Photobiol. 1976. V. 24. № 5. P. 475;
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1976.tb06857.x>
- Плавский В.Ю., Третьякова А.И., Плавская Л.Г. и др. // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем. Сб. статей в 2 ч. Ч. 2 / Под ред. Вологовский И.Д. и др. Минск: Изд. центр БГУ, 2012. С. 71.
- Sloper R.W., Truscott T.G. // Photochem. Photobiol. 1982. V. 35. № 5. P. 743;
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1982.tb02640.x>
- Tan K.L. // Clin. Perinatol. 1991. V. 18. № 3. P. 423;
[https://doi.org/10.1016/S0095-5108\(18\)30506-2](https://doi.org/10.1016/S0095-5108(18)30506-2)
- Ebbesen F., Vreman H.J., Hansen T.W.R. // Intern. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 1. P. 461;
<https://doi.org/10.3390/ijms24010461>
- Slusher T.M., Vreman H.J., Brearley A.M. et al. // Lancet Glob. Health. 2018. V. 6. № 10. P. e1122;
[http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30373-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30373-5)
- Onishi S., Itoh S., Isobe K. // Biochem. J. 1986. V. 236. № 1. P. 23;
doi: 10.1042/bj2360023
- Itoh S., Onishi S., Isobe K., Manabe M., Yamakawa T. // Biol. Neonate. 1987. V. 51. № 1. P. 10;
<https://doi.org/10.1159/000242625>
- Itoh S., Okada H., Kuboi T. et al. // Pediatr. Intern. 2017. V. 59. № 9. P. 959;
<https://doi.org/10.1111/ped.13332>
- Uchida Y., Morimoto Y., Uchiike T. et al. // Early Hum. Dev. 2015. V. 91. № 7. P. 381;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.04.010>
- Ebbesen F., Madsen P., Støvring S. et al. // Acta Paediatr. 2007. V. 96. № 6. C. 837;
doi: 10.1111/j.1651-2227.2007.00261.x
- Ebbesen F., Vandborg P.K., Donneborg M.L. // Semin. Perinatol. 2021. V. 45. № 1. P. 151358;
<https://doi.org/10.1016/j.semperi.2020.151358>
- Ebbesen F., Rodrigo-Domingo M., Moeller A.M. et al. // Pediatr. Res. 2021. V. 89. № 3. P. 598;
<https://doi.org/10.1038/s41390-020-0911-9>
- Ebbesen F., Madsen P.H., Vandborg P.K. et al. // Ibid. 2016. V. 80. № 4. P. 511;
<https://doi.org/10.1038/pr.2016.115>
- Lamola A.A. // Clin. Perinatol. 2016. V. 43. № 2. P. 259;
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2016.01.004>
- Bhutani V. K. // Pediatrics. 2011. V. 128. № 4. P. e1046;
www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2011-1494

PHOTONICS OF BILIRUBIN – BIOLOGICALLY IMPORTANT MOLECULE (REVIEW)

A. S. Tatikolov^{1*}, I. G. Panova²

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

²*International Scientific and Practical Center of Tissue Proliferation, Moscow, Russia*

*E-mail: tatikolov@mail.ru

Bilirubin, a bile pigment having photochemical activity, plays an important role in the body. Photonics (photo-physics and photochemistry) of bilirubin has attracted scientific and practical interest of researchers up to the present day. This is because its molecule is capable of ultrafast photoisomerization processes, and also contains two interacting dipyrromethenone chromophores. Furthermore, the photochemical reactions of bilirubin are used in the widespread phototherapy of neonatal jaundice (neonatal hyperbilirubinemia), carried out to reduce the level of bilirubin in the body. This review briefly considers photonics of bilirubin, as well as its main photochemical reactions in phototherapy of neonatal hyperbilirubinemia.

Keywords: bilirubin, photonics, photoisomerization, photocyclization, photooxidation, phototherapy of neonatal hyperbilirubinemia.

REFERENCES

1. S.Y. Kim and S.C. Park, *Front. Pharmacol.* **3**, 45 (2012).
<https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00045>
2. E. Sticova and M. Jirsa, *World J. Gastroenterol.* **19**, 6398 (2013).
<https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i38.6398>
3. S. Itoh, H. Okada, K. Koyano, S. Nakamura, Y. Konishi, T. Iwase, and T. Kusaka, *Front. Pediatr.* **10**, 1002408 (2023).
<https://doi.org/10.3389/fped.2022.1002408>
4. D.A. Lightner and A.F. McDonagh, *Acc. Chem. Res.* **17**, 417 (1984).
<https://doi.org/10.1021/ar00108a002>
5. C.P. Soto Conti, *Arch. Argent. Pediatr.* **119**, No. 1, e18 (2021).
<http://dx.doi.org/10.5546/aap.2021.eng.e18>
6. J.F. Creeden, D.M. Gordon, D.E. Stec, and T.D. Hinds Jr, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **320**, E191 (2021).
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00405.2020>
7. A.A. Lamola, Effects of environment on photophysical processes of bilirubin. In: *Optical Properties and Structure of Terrapyrroles*. Edited by G. Blauer and H. Sund. Walter de Gruyter, Berlin, 1985, p. 311–326.
8. D.A. Lightner, J.K. Gawronski, and W.M.D. Wijekoon, *J. Am. Chem. Soc.* **109**, No. 21, 6354 (1987).
<https://doi.org/10.1021/ja00255a020>
9. A.F. McDonagh and D.A. Lightner, *Pediatrics* **75**, 443 (1985).
<https://doi.org/10.1542/peds.75.3.443>
10. A.F. McDonagh and D.A. Lightner, *Semin. Liver Dis.* **8**, 272 (1988).
<https://doi.org/10.1055/s-2008-1040549>
11. J.E. Ennever, *Pediatr. Clin. North Am.* **33**, 603 (1986).
[https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(16\)36045-X](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(16)36045-X)
12. D.A. Lightner, M. Reisinger, and G.L. Landen, *J. Biol. Chem.* **261**, No. 13, 6034 (1986).
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38489-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38489-2)
13. M. Taniguchi and J.S. Lindsey, *J. Photochem. Photobiol. C* **55**, 100585 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2023.100585>
14. A.A. Lamola and J. Flores, *J. Am. Chem. Soc.* **104**, No. 9, 2530 (1982).
<https://doi.org/10.1021/ja00373a033>
15. B. Zietz and T. Gillbro, *J. Phys. Chem. B* **111**, 11997 (2007).
<https://doi.org/10.1021/jp073421c>
16. A.S. Vetchinkin, S.Ya. Umanskii, Yu.A. Chaikina, and A.I. Shushin, *Russ. J. Phys. Chem. B* **16**, No. 5, 945 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122050104>
17. D.R. Anfimov, I.S. Golyak, O.A. Nebritova, and I.L. Fufurin, *Russ. J. Phys. Chem. B* **16**, No. 5, 834 (2022).
<https://doi.org/10.1134/s1990793122050165>
18. V. Gorokhov, P. Knox, B. Korvatovskiy, N.Kh. Seifullina, S.N. Goryachev, N.P. Grishanova, V.Z. Paschenko, and A. B. Rubin, *Russ. J. Phys. Chem. B* **17**, No. 3, 571 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S199079312303020X>
19. D.A. Cherepanov, G.E. Milanovsky, V.A. Nadtochenko, and A.Yu. Semenov, *Russ. J. Phys. Chem. B* **17**, No. 3, 594 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123030193>
20. C. Carreira-Blanco, P. Singer, R. Diller, and J.L.P. Lustres, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 7148 (2016).
<https://doi.org/10.1039/c5cp06971h>
21. H.P. Upadhyaya, *J. Phys. Chem. A* **122**, No. 46, 9084 (2018).
<https://doi.org/10.1021/acs.jpca.8b09392>
22. R. Pu, Z. Wang, R. Zhu, J. Jiang, T.-C. Weng, Y. Huang, and W. Liu, *J. Phys. Chem. Lett.* **14**, 809 (2023).
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcllett.2c03535>

23. E.J. Land, *Photochem. Photobiol.* **24**, 475 (1976).
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1976.tb06857.x>
24. V.Yu. Plavskii, A.I. Tretyakova, L.G. Plavskaya, A.V. Mikulich, A.S. Stashevskii, A.S. Grabchikov, I.A. Khodasevich, and V.A. Orlovich, *Molecular, membrane and cellular basis of the functioning of biosystems: Int. Scientific Conf. Tenth Congress of the Belarusian Public Association of Photobiologists and Biophysicists*, June 19–21, 2012, Minsk, Belarus: Books of Art. in 2 books. Book 2. Editorial board: I.D. Volotovskii, S.N. Cherenkevich, et al. Minsk: Publishing house Center of BSU, 2012. P. 71, ISBN 978-985-553-356-7.
25. R.W. Sloper and T.G. Truscott, *Photochem. Photobiol.* **35**, 743 (1982).
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1982.tb02640.x>
26. K.L. Tan, *Clin. Perinatol.* **18**, No. 3, 423 (1991).
[https://doi.org/10.1016/S0095-5108\(18\)30506-2](https://doi.org/10.1016/S0095-5108(18)30506-2)
27. F. Ebbesen, H.J. Vreman, and T.W.R. Hansen, *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 461 (2023).
<https://doi.org/10.3390/ijms24010461>
28. T.M. Slusher, H.J. Vreman, A.M. Brearley, Y.E. Vau-cher, R.J. Wong, D.K. Stevenson, O.T. Adeleke, I.P. Ojo, G. Edowhorhu, T.C. Lund, and D.A. Gbadero, *Lancet Glob. Health* **6**, e1122 (2018).
[http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30373-5](http://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30373-5)
29. S. Onishi, S. Itoh, and K. Isobe, *Biochem. J.* **236**, 23 (1986).
<https://doi.org/10.1042/bj2360023>
30. S. Itoh, S. Onishi, K. Isobe, M. Manabe, and T. Yamakawa, *Biol. Neonate* **51**, 10 (1987).
<https://doi.org/10.1159/000242625>
31. S. Itoh, H. Okada, T. Kuboi, and T. Kusaka, *Pediatr. Intern.* **59**, 959 (2017).
<https://doi.org/10.1111/ped.13332>
32. Y. Uchida, Y. Morimoto, T. Uchiike, T. Kamamoto, T. Hayashi, I. Arai, T. Nishikubo, and Y. Takahashi, *Early Human Dev.* **91**, 381 (2015).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.04.010>
33. F. Ebbesen, P. Madsen, S. Støvring, H. Hundborg, and G. Agati, *Acta Pædiatr.* **96**, 837 (2007).
<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2007.00261.x>
34. F. Ebbesen, P.K. Vandborg, and M.L. Donneborg, *Seminars in Perinatol.* **45**, 151358 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.semperi.2020.151358>
35. F. Ebbesen, M. Rodrigo-Domingo, A.M. Moeller, H.J. Vreman, and M.L. Donneborg, *Pediatr. Res.* **89**, 598 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41390-020-0911-9>
36. F. Ebbesen, P.H. Madsen, P.K. Vandborg, L.H. Jakobsen, T. Trydal, and H.J. Vreman, *Pediatr. Res.* **80**, 511 (2016).
<https://doi.org/10.1038/pr.2016.115>
37. A.A. Lamola, *Clin. Perinatol.* **43**, No. 2, 259 (2016).
<http://dx.doi.org/10.1016/j.clp.2016.01.004>
38. V.K. Bhutani, *Pediatrics.* **128**, e1046 (2011).
www.pediatrics.org/cgi/doi/10.1542/peds.2011-1494

УДК 541.127:577.3

КИНЕТИКА ОКИСЛЕНИЯ СОЕВОГО ЛЕЦИТИНА ПРИ ВЫСОКИХ КОНЦЕНТРАЦИЯХ. ДЕЙСТВИЕ АНТИОКСИДАНТОВ

© 2024 г. Л. И. Мазалецкая^{1*}, Н. И. Шелудченко¹, О. Т. Касаикина²¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия²Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова, Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: lim@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024;

после доработки 24.04.2024;

принята в печать 20.05.2024

Изучено инициированное азобисизобутиронитрилом (АИБН) окисление соевого лецитина (РН) в широком диапазоне концентраций РН (0.027–0.4 моль/л) и АИБН (0.01–0.043 моль/л). Установлено, что при высоких концентрациях лецитина в несколько раз снижается параметр окисляемости $a = k_p/(2k_t)^{0.5}$, где k_p и k_t – константы скорости продолжения и обрыва цепей, при этом независимо от концентрации лецитина сохраняется линейная зависимость от скорости инициирования $(W_i)^{0.5}$. Проведена оценка антирадикальной активности антиоксидантов (АО) разных классов при $[RH] = 0.4$ моль/л, показавшая, что антирадикальная активность фенолов в лецитине значительно ниже, чем в углеводородах. Антирадикальная активность и эффекты торможения при окислении лецитина уменьшаются в следующем ряду: α -токоферол > 3,6-ди-трет-бутил-1,2-бензохинон > кверцетин > 2,4,6-три-трет-бутилфенол.

Ключевые слова: соевый лецитин, окисление, антиоксиданты, кверцетин, α -токоферол, 2,4,6-три-трет-бутилфенол, 3,6-ди-трет-бутил-1,2-бензохинон.

DOI: 10.31857/S0207401X24110025

1. ВВЕДЕНИЕ

Фосфолипиды, основные липидные компоненты клеточных мембран, являются природными поверхностно-активными веществами (ПАВ), которые широко используются в производстве пищевых продуктов, лекарственных и косметических средств. Фосфатидилхолины (РС) и лецитины имеют структуру цвиттер-ионов в широком диапазоне рН [1, 2]. Лецитины, как и неполярные ненасыщенные липиды, относительно легко окисляются кислородом воздуха. Окислению подвергаются ненасыщенные остатки жирных кислот, входящие в состав лецитинов. Первичными продуктами окисления лецитинов кислородом воздуха являются главным образом изомерные гидропероксиды [3–5].

Лецитины чаще всего получают из яичных желтков и сои. Яичный и соевый лецитины имеют схожую поверхностную активность и критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ). В работах [6, 7] показано, что соевый лецитин по сравнению с яичным образует более стабильные

эмульсии и имеет более высокую окисляемость, обусловленную высоким содержанием линолевой кислоты. В работе [8] проведен сравнительный анализ свойств разных видов импортных соевых лецитинов с широко используемыми отечественными аналогами, который показал, что содержание линолевой кислоты имеет близкие значения, равные $(60 \pm 3)\%$.

Исходные пищевые растительные масла представляют собой микрогетерогенную систему, содержащую многочисленные минорные компоненты – амфифильные, такие как фосфолипиды, свободные жирные кислоты, а также полярные кислородсодержащие продукты, получающиеся в результате окисления – гидропероксиды, альдегиды, кетоны и эпоксиды [9, 10]. Существует значительное количество свидетельств того, что коллоидные ассоциаты, мицеллы и ламеллярные структуры являются центрами окисления в объеме масел [9], поскольку именно в них концентрируются полярные соединения металлов, инициирующих окисление.

Тем не менее имеется значительное количество работ, в которых описывается ингибирующее действие лецитинов на процессы окисления. Еще в 1935 году было показано [11], что соевый лецитин замедляет окисление хлопкового масла, катализируемое солями олеата кобальта. Антиоксидантные свойства фосфолипидов сои исследованы на примере окисления липидов рыб, растительных жиров и масел [12–14]. Отмечается, что добавки соевого лецитина влияют на эффекты торможения масел такими ингибиторами, как α -токоферол (ТФ) [15] и флавоноиды [16].

В данной работе изучены кинетические закономерности инициированного окисления соевого лецитина в инертном растворителе — хлорбензоле в широком диапазоне концентраций и скоростей инициирования, а также исследованы особенности ингибирующего действия антиоксидантов различной природы в процессе окисления относительно высоких концентраций лецитина.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Окисление соевого лецитина, инициированное азобисизобутиро-нитрилом (АИБН), проводили в инертном растворителе — хлорбензоле при 333 К и различных начальных концентрациях лецитина (0.027–0.4 моль/л) и инициатора АИБН (0.01–0.043 моль/л). Поглощение кислорода в ходе окисления измеряли с использованием волюмометрической установки [14–16].

В работе использовали соевый лецитин производства фирмы “БИОЛЕК”, а в качестве антиоксидантов исследовали кверцетин (Q) и α -токоферол фирмы “Sigma-Adrich” (USA) без дополнительной очистки, а также 2,4,6-три-трет-бутил-фенол (ТТБФ) и 3,6-ди-трет-бутил-1,2-бензохинон (ДТБХ), которые очищали методом возгонки.

Согласно теории [17, 18] скорость жидкофазного окисления (W) линейно зависит от концентрации субстрата окисления и связана со скоростью инициирования (W_i) следующим уравнением:

$$W = a[RH]W_i^{0.5}, \quad (1)$$

где RH — субстрат окисления, a — параметр, характеризующий окисляемость RH и равный отношению констант скоростей продолжения (k_p) и обрыва (k_t) цепи, $a = k_p/(2k_t)^{0.5}$. Скорость инициирования равна $W_i = ek_0[AIBN]$, где e — выход

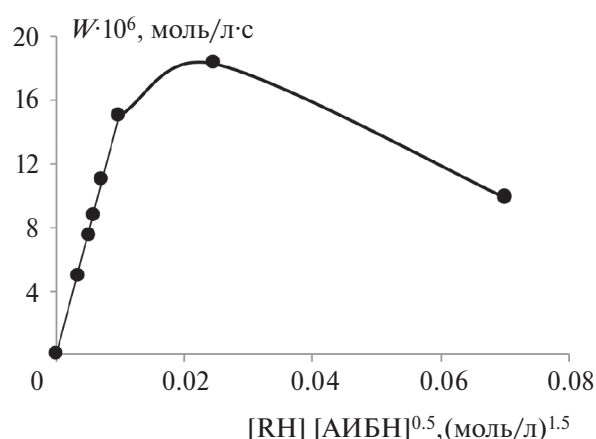


Рис. 1. Зависимость скорости окисления лецитина в растворе хлорбензола от начальных концентраций лецитина и инициатора; температура — 333 К.

радикалов из клетки, k_0 — константа скорости распада инициатора.

На рис. 1 представлена зависимость скорости окисления лецитина в растворе хлорбензола от начальных концентраций лецитина и инициатора. При окислении углеводов и масел зависимость скорости окисления в координатах из уравнения (1) обычно представляет собой прямую линию [17, 18]. Однако из представленных на рис. 1 данных видно, что в диапазоне изученных концентраций зависимость более сложная: на начальном участке скорость окисления линейно зависит от начальной концентрации лецитина при $[RH]_0 = 0.027–0.034$ моль/л, но при дальнейшем увеличении $[RH]_0$ она оказывается ниже ожидаемой.

Ранее в работе [19] на примере окисления яичного фосфатидилхолина в органической среде было показано, что РС образует наноразмерные обращенные мицеллы ($r \sim 6$ нм), что существенно влияет на скорость окисления, измеряемую по поглощению кислорода. При небольших концентрациях РС и постоянной скорости инициирования радикалов W_i имеет место линейная зависимость W от $[PC]$, но при концентрациях выше 5 мг/мл наблюдается отклонение от линейности, и дальнейшее увеличение $[PC]$ не приводит к увеличению скорости окисления. При этом в рамках одной и той же концентрации РС, как ниже, так и выше ККМ, скорость W пропорциональна $W_i^{0.5}$.

На рис. 2 показано, что и при окислении соевого лецитина в области его высоких концентраций, как и в случае РС, сохраняется линейная

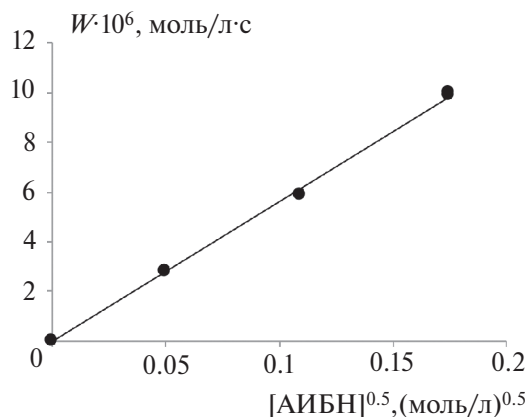


Рис. 2. Зависимость скорости окисления соевого лецитина в растворе хлорбензола от концентрации инициатора; $[RH] = 0.4$ моль/л, температура – 333 К.

зависимость W от $W_i^{0.5}$. Величина параметра a , вычисленная по тангенсу угла наклона (рис. 2) с учетом уравнения (1), равна $a = 0.042$ (л/моль · с)^{0.5}. Оценка параметра a при малых концентрациях лецитина ($[RH]_0 = 0.028$ – 0.034 моль/л) в области линейной зависимости W от $[RH]_0[АИБН]^{0.5}$ (рис. 1) дает на порядок более высокое значение: $a = 0.43$ (л/моль · с)^{0.5}.

В случае РС параметр окисляемости также в несколько раз уменьшается при концентрациях РС выше ККМ по сравнению с областью малых концентраций и линейной зависимости W от $[РС]$, согласно [19]. Снижение окисляемости лецитина при высоких концентрациях может быть связано с рядом причин. Ассоциация молекул лецитина в мицеллы уменьшает число активных столкновений с радикалами инициатора и, возможно, приводит к изменению реакционной способности лецитина в отношении продолжения и обрыва цепей. С увеличением концентрации лецитина возрастает вязкость раствора, что может неоднозначно влиять на скорость цепного процесса. С одной стороны, повышение вязкости уменьшает выход радикалов из клетки (e) и, следовательно, скорость инициирования. С другой стороны, при повышении вязкости уменьшается скорость квадратичного обрыва цепей (известный в радикальной полимеризации гель-эффект).

Снижение реакционной способности с увеличением концентрации лецитина наблюдали в процессе автоокисления метилолеата [15]: после достижения определенной концентрации лецитина, последующее ее увеличение не изменяет течение процесса.

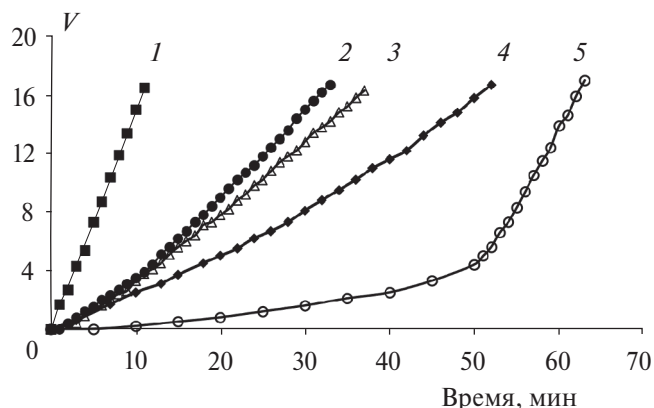


Рис. 3. Кинетические кривые поглощения кислорода (V – объем поглощенного кислорода в отн. ед.) при окислении соевого лецитина в отсутствие (1) и в присутствии $7 \cdot 10^{-4}$ моль/л антиоксидантов: 2 – ТТБФ, 3 – Q, 4 – ДТБХ, 5 – ТФ; $[АИБН]_0 = 0.03$ моль/л, $[RH]_0 = 0.4$ моль/л; температура – 333 К.

Поскольку окисление соевого лецитина развивается по цепному свободно-радикальному механизму, были протестированы АО, обрывающие цепи по реакции с пероксирадикалами (фенолы – флавоноид кверцетин, пространственно затрудненный 2,4,6-три-трет-бутилфенол и сильный, неэкранированный природный фенол α -токоферол), а также 3,6-ди-трет-бутил-1,2-бензохинон, который относится к АО, обрывающим цепи по реакции с алкильными радикалами [17, 18, 20]. Влияние АО на окислительный процесс рассматривали при относительно высокой концентрации лецитина, равной $[RH]_0 = 0.4$ моль/л. Эффективность действия АО оценивали по отношению W/W_{inh} , где W_{inh} – скорость окисления в присутствии добавок антиоксиданта (табл. 1).

Из представленных на рис. 3 кинетических кривых поглощения кислорода в отсутствие (кривая 1) и в присутствии добавок АО (кривые 2–5) следует, что наибольшую активность проявляет ТФ (рис. 3, кривая 5), для которого наблюдается четко выраженный период индукции τ , равный 50 мин, по окончании которого скорость поглощения кислорода практически не отличается от скорости неингибированной реакции (рис. 3, кривая 1). Из кинетических кривых поглощения кислорода был рассчитан стехиометрический коэффициент ингибирования $f = \tau W_i / [ТФ] = 1.54$.

Наиболее слабое действие оказывает пространственно затрудненный фенол ТТБФ, который

Таблица 1. Кинетические характеристики ингибирующего действия антиоксидантов разной природы в процессе окисления лецитина в хлорбензоле (температура 333 К, $[RH]_0 = 0.4$ моль/л, $[AO]_0 = 7 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $[АИБН]_0 = 0.03$ моль/л)

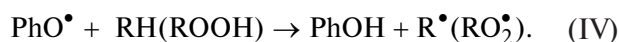
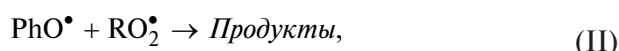
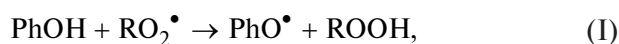
Параметры	Кверцетин	2,4,6-Три-трет-бутилфенол	α -Токоферол	3,6-Ди-трет-бутил-1,2-бензохинон
W/W_{inh}	2.8	4	63	5.4
fk_{inh} , л/(моль·с)	$3.3 \cdot 10^3$	$4.8 \cdot 10^3$	$7.6 \cdot 10^4$	$6.5 \cdot 10^3$ *

*Эффективное значение fk_{inh} .

характеризуется самым низким значением величины k_7 (рис. 3, кривая 2, табл. 1).

Использование кверцетина, для которого величина k_7 в реакции с $RO_2^{\cdot}$ -радикалами метиллинолеата существенно выше, чем для пространственно затрудненных фенолов [21], приводит лишь к незначительному увеличению эффективности ингибирования по сравнению с ТТБФ (рис. 3, кривая 3).

Согласно теории, изложенной в [17, 18, 20, 22], ингибирование фенольными антиоксидантами (PhOH) можно представить следующими реакциями:



Квазистационарная концентрация пероксильных радикалов при достаточно высокой концентрации АО, обеспечивающей преимущественный обрыв цепей при участии ингибитора, равна: $[RO_2^{\cdot}] = W_i/(fk_{inh}[PhOH])$, а скорость ингибированного окисления описывается уравнением

$$W_{inh} = k_p[RH]W_i/(fk_{inh}[PhOH]), \quad (2)$$

где k_{inh} — константа скорости реакции АО с $RO_2^{\cdot}$; f — стехиометрический коэффициент ингибирования, величина которого зависит от соотношения скоростей реакций I–IV ($f \leq 2$). Учитывая уравнение (1), получаем

$$W/W_{inh} = fk_{inh}[PhOH]/(2k_tW_i)^{0.5}. \quad (3)$$

Принимая $2k_t = 2 \cdot 10^6$ л/моль·с [23], по аналогии с ненасыщенными жирными кислотами, оценили величины параметра fk_{inh} (табл. 1), которые при окислении соевого лецитина оказались заметно ниже, чем в случае углеводов и эфиров ненасыщенных жирных кислот [21–24]. Так,

в этилбензоле величины k_{inh} , для ТТБФ и ТФ составляют $4.2 \cdot 10^4$ л/моль·13с [22, 23] и $4.5 \cdot 10^6$ л/моль·с [22, 23], соответственно, а для кверцетина в реакции с радикалами $RO_2^{\cdot}$ метиллинолеата $k_{inh} = 4.3 \cdot 10^5$ л/(моль·с) [21]. Сравнение показывает, что наиболее значительное снижение k_{inh} наблюдается для кверцетина.

Резкое падение k_{inh} в реакции Q с радикалами, образующимися при распаде 2,2'-азобис(2-метилпропион-амидин)дигидрохлорида, наблюдалось при снижении pH водного раствора: $k_{inh} = 5.6 \cdot 10^5$ л/(моль·с) (pH = 7.4) и $4 \cdot 10^3$ л/(моль·с) (pH = 2.1) [25].

Из полученных данных можно заключить, что лецитин, возможно, путем сольбилизации и молекулярного взаимодействия с АО снижает их ингибирующую активность. Так, при торможении инициированного и автоокисления метилолеата наблюдается снижение эффективности действия кверцетина в присутствии лецитина [14], обусловленное их взаимодействием [14–16]. Действительно, при фиксированной длине волны $\lambda = 208$ нм интенсивность полосы поглощения смеси Q в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л и RH в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л оказывается на 22% меньше рассчитанной. Согласно изложенному в работах [14, 26–28], при взаимодействии лецитина с биологически активными веществами и АО наблюдается образование комплексов, которое протекает, как это показано на примере флавоноида — генистеина с участием азот- и фосфорсодержащих группировок фосфолипидов [26].

Весьма интересным представляется результат ингибирующего действия ДТБХ — акцептора алкильных радикалов, который по эффективности уступает только ТФ (рис. 2, кривые 4, 5). Известно, что акцепторы алкильных радикалов практически не тормозят процесс в условиях инициированного окисления углеводов. Однако при переходе в режим автоокисления хиноны по эффективности становятся сопоставимы с традиционными АО, взаимодействующими с пероксильными радика-

лами [29]. В режиме автоокисления скорость окисления зависит от концентрации O_2 в окисляющем газе, что оказывает влияние как на скорость зарождения свободных радикалов, так и на стационарную концентрацию алкильных радикалов. Благодаря значительному увеличению длины цепи $\nu = W/W_i$ в процессе автоокисления, по сравнению с инициированной реакцией, акцепторы алкильных радикалов, к которым относятся хиноны, могут успешно конкурировать с O_2 в реакции с алкильными радикалами. Возможность тормозить окисление лецитина добавками ДТБХ, по-видимому, связана с тем, что даже в режиме инициированного окисления концентрация алкильных радикалов заметно выше, чем в углеводородах, о чем свидетельствует изменение скорости окисления в зависимости от содержания кислорода в окисляющем газе [29]. Так, в атмосфере кислорода, по сравнению с окислением воздухом, скорость окисления W увеличивается на 4.5–5% и 12.7% при $[RH]_0$, равной 0.034 и 0.12 моль/л соответственно.

В последние годы появились работы, в которых показано, что гидросильный радикал $HO_2^{\cdot}$ играет важную роль в механизме окисления полиненасыщенных жирных кислот [30–33]. Радикалы $HO_2^{\cdot}$ обладают двойственной природой и способны проявлять как окислительные, так и восстановительные свойства. Двойственная природа этих радикалов может проявляться в многократном обрыве цепей окисления соединениями металлов, стабильными нитроксильными радикалами и хинонами [18].

В случае ДТБХ за время окисления, равное 90 мин, $W/W_{inh} = 1.73$, т. е. по сравнению с начальной скоростью эффективность ингибирования уменьшилась в 3.1 раза, что, по-видимому, свидетельствует о незначительном вкладе многократного обрыва цепей в механизм ингибирования окисления соевого лецитина добавками ДТБХ.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Скорость окисления лецитина нелинейно зависит от его начальной концентрации, а она оказывается ниже ожидаемой при высоких значениях $[RH]_0$. Добавки фенольных АО тормозят окисление лецитина и в области высоких концентраций. Однако реакционная способность АО в реакциях обрыва цепей при взаимодействии с пероксильными радикалами лецитина (fk_{inh}) снижается по

сравнению с fk_{inh} в углеводородах, так же как и при ингибированном окислении триглицеридов масел [34], за счет образования водородных связей фенольных гидроксильных с молекулами субстрата. Напротив, нетипичный для окисления углеводородов АО — 3,6-ди-трет-бутил-1,2-бензохинон превосходит по эффектам торможения такие фенолы, как ТТБФ и Q.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках госзадания по теме 44.4 (регистрационный номер 122041300205-8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cevc G. Phospholipids Handbook. New York: Marvel Dekker Inc., 1993.
2. Gupta R., Muralidhara H.S., Davis H.T. // *Langmuir*. 2001. V. 17. № 17, P. 5176; <http://doi.org/10.1021/la0103721>
3. Barclay L.R.C., MacNeil J. M., VanKessel J.A., et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* 1984. V. 106. P. 6740.
4. Roschek B.J., Tallman K. A., Rector C.L., et al. // *J. Org. Chem.* 2006. V. 71. № 9. P. 3527. <http://doi.org/10.1021/jo0601462>
5. Xu L., Davis T.A., Porter N.A. // *J. Amer. Chem. Soc.* 2009. V. 131. P. 13037; <http://doi.org/10.1021/ja9029076>
6. Wu Y., Wang T. // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 80, 319 (2003).
7. Palacios L.E., Wang T. // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 2005. V. 82. № 8. P. 571; <http://doi.org/10.1007/s11746-005-1111-4>
8. Войченко О.Н., Шабанова И.А., Герасименко Е.О. и др. // Новые технологии. 2011. № 2. С. 18.
9. Chaiyasit W., Elias R.J., McClements D.J. et al. // *Critical Rev. Food Sci. Nutrition*. 2007. V. 47. P. 299; <http://doi.org/10.1080/10408390600754248>
10. Kasaikina O.T., Krugovov D.A., Mengele E.A. // *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2017. V. 119. 1600286; <http://doi.org/10.1002/ejlt.201600286>
11. Evans E.I. // *Ind. Engin. Chem.* 1935. V. 27. № 3. P. 329; <https://doi.org/10.1021/ie50303a019>
12. King M.F., Boyd L.C., Sheldon B.W. // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1992. V. 69. P. 545; <http://doi.org/10.1007/BF02636106>
13. Judde A., Villeneuve P., Rossignol-Castera A., et al. // *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 2003. V. 80. P. 1209; <http://doi.org/10.1007/s11746-003-0844-4>
14. Mazaletskaia L., Sheludchenko N., Shishkina L. // *Chem. Chem. Technol.* 2012. V. 6. № 1. P. 35; <http://doi.org/10.23939/chcht06.01.035>
15. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. // *Биофизика*. 2010. Т. 55. № 1. С. 25.

16. Мазалецкая Л.И., Шелудченко Н.И., Шишкина Л.Н. // Прикл. биохимия и микробиол. 2010. Т. 46. № 2. С. 148.
17. Эмануэль Н.М., Заиков Г.Е., Майзус З.К. Роль среды в радикально-цепных реакциях окисления органических соединений. М.: Наука, 1973.
18. Denisov E. T., Afanas'ev I. B. Oxidation and antioxidant in organic chemistry and biology. Taylor & Francis Group, 2005.
19. Менгеле Е.А., Карташева З.С., Плащина И.Г. и др. // Коллоид. журн. 2008. Т. 70. № 6. С. 805.
20. Денисов Е.Т., Азатян В.В. Препринт. Ингибирование цепных реакций. Черноголовка: ИПХФ РАН, 1997.
21. Pedrielli P., Pedulli G. F., Skibsted L. H. // J. Agric. Food Chem. 2001. V. 49. № 6. P. 3034; <https://doi.org/10.1021/jf010017g>
22. Рогинский В.А. Фенольные антиоксиданты. М.: Наука, 1988.
23. Русина И.Ф., Карпунин О.Н., Касаикина О.Т. // Хим. физика. 2013. Т. 32. № 8. С. 49; <https://doi.org/10.7868/S0207401X13080098>
24. Русина И.Ф., Вепринцев Т.Л., Васильев Р.Ф. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 12; <http://doi.org/10.31857/S0207401X22020108>
25. Amorati R., Baschieri A., Cowden A., et al. // Biomimetics. 2017. V. 2. P. 9; <https://doi.org/10.3390/biomimetics2030009>
26. Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Константинова Т.В. и др. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 28; <https://doi.org/10.31857/S0207401X23010107>
27. Шарафутдинова Р.Р., Насибуллин Р.С., Фахретдинова Е.Р. // Хим. физика и мезоскопия. 2008. Т. 10. № 4. С. 510.
28. Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Повх А.Ю. и др. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 9. С. 57; <http://doi.org/10.31857/S0207401X21090089>
29. Мазалецкая Л.И., Карпухина Г.В., Майзус З.К. // Нефтехимия. 1979. Т. 19. № 2. С. 214.
30. Плисс Е.М., Лошадкин Д.В., Гробов А.М., и др. // Хим. физика. 2015. Т. 34. № 1. С. 68; <http://doi.org/10.7868/S0207401X15010094>
31. Amorati R., Baschieri A., Morroni G., et al. // Chem. Eur. J. 2016. V. 22. № 23. P. 7924.
32. Тихонов И.В., Бородин Л.И., Плисс Е.М. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 11. С. 3; <http://doi.org/10.31857/S0207401X2011014X>
33. Молодочкина С.В., Лошадкин Д.В., Плисс Е.М. // Хим. физика. 2024. Т. 43. № 1. С. 52.
34. Kancheva V. D., Kasaikina O. T. // Curr. Med. Chem. 2013. T. 20. C. 4784; <http://doi.org/10.2174/09298673113209990161>

KINETICS OF THE SOY LECITHIN OXIDATION AT HIGH CONCENTRATIONS. THE EFFECT OF ANTIOXIDANTS

L. I. Mazaletskaya^{1*}, N. I. Sheludchenko¹, O. T. Kasaikina²

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

*E-mail: lim@sky.chph.ras.ru

Soy lecithin (RH) oxidation, initiated with different AIBN concentration, has been studied in a wide range of lecithin concentrations (0.027–0.4 mol/l). It was found that the oxidizability parameter $a = k_p/(2k_t)^{0.5}$, where k_p and k_t are the rate constants of chain propagation and termination reduced significantly at higher lecithin concentration, while a linear dependence of oxidation rate on (AIBN)^{0.5} remained. The antiradical activity (fk_{inh}) of different antioxidants (AO) was evaluated at [RH] = 0.4 mol/l, which showed that the antiradical activity of phenols (PhOH) in lecithin is significantly lower than in hydrocarbons. The antiradical activity and inhibitory effects of lecithin oxidation decrease in the following raw: α -tocopherol > 3,6-di-tert-butyl-1,2-benzoquinone > quercetin > 2,4,6-tri-tert-butylphenol.

Keywords: soy lecithin, oxidation, antioxidants, quercetin, α -tocopherol, 2,4,6-tri-tert-butylphenol, 3,6-di-tert-butyl-1,2-benzoquinone.

REFERENCE

- G. Cevc, *Phospholipids Handbook* (New York: Marcel Dekker Inc., 1993).
- R. Gupta, H.S. Muralidhara, H.T. Davis, *Langmuir*. **17**, 5176 (2001).
<https://doi.org/10.1021/la0103721>
- L.R.C. Barclay, J.M. MacNeil, J.A. VanKessel, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 6740 (1984).
<http://doi.org/10.1021/ja00334a045>
- B.J. Roschek, K.A. Tallman, C.L. Rector, et al., *Org. Chem.* **71**, 3527 (2006).
<https://doi.org/10.1021/jo0601462>
- L. Xu, T.A. Davis, N.A. Porter, *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 13037 (2009).
<https://doi.org/10.1021/ja9029076>
- Y. Wu, T. Wang, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**, 319 (2003).
- L.E. Palacios, T. Wang, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **82**, 571 (2005).
<https://doi.org/10.1007/s11746-005-1111-4>
- O.N. Voichenko, I.A. Shabanova, E.O. Gerasimenko, et al., *Novye tekhnologii*. No 2, 18 (2011) (in Russia).
- W. Chaayasit, R.J. Elias, D.J. McClements, et al., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **47**, 299 (2007).
<https://doi.org/10.1080/10408390600754248>
- O.T. Kasaikina, D.A. Krugovov, E.A. Mengele, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **119**, 1600286 (2017).
<https://doi.org/10.1002/ejlt.201600286>
- E.I. Evans, *Ind. Engin. Chem.* **27**, 329 (1935).
<https://doi.org/10.1021/ie50303a019>
- M.F. King, L.C. Boyd, B.W. Sheldon, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **69**, 545 (1992).
<https://doi.org/10.1007/BF02636106>
- A. Judde, P. Villeneuve, A. Rossignol-Castera, et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **80**, 1209 (2003).
<https://doi.org/10.1007/s11746-003-0844-4>
- L. Mazaletskaya, N. Sheludchenko, L. Shishkina, *Chem. and Chem. Technol.* **6**, 35 (2012).
<https://doi.org/10.23939/chcht06.01.035>
- L.I. Mazaletskaya, N.I. Sheludchenko, L.N. Shishkina, *Biophysics*. **55**, 18 (2010).
<https://doi.org/10.1134/S0006350910010045>
- L.I. Mazaletskaya, N.I. Sheludchenko, L.N. Shishkina, *Applied Biochemistry and Microbiology*. **46**, 135 (2010).
<https://doi.org/10.1134/S000368381002002X>
- N.M. Emanuel, G.E. Zaikov, Z.K. Maizus, *Oxidation of Organic Compounds. Effect of Medium* (Oxford: Pergamon. 1984).
- E.T. Denisov, I.B. Afanas'ev, *Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology* (Taylor & Francis Group, 2005).
- E.A. Mengele, Z.S. Kartasheva, O.T. Kasaikina, et al., *Colloid Journal*. **70**, 753 (2008).
<https://doi.org/10.1134/S1061933X08060112>
- E. Denisov, V. Azatian (Preprint, *Ingibirovanie Tsepnyikh Reakciy*, Chernogolovka. 1997).
- P. Pedrielli, G.F. Pedulli, L.H. Skibsted, *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3034 (2001).
<https://doi.org/10.1021/jf010017g>
- V.A. Roginsky, *Fenol'nye antioksidanty* (M: Nauka, 1988 (in Russia)).
- I.F. Rusina, O.N. Karpukhin, O.T. Kasaikina, *Russ. J. Phys. Chem. B.* **7**, 463 (2013).
<https://doi.org/10.1134/S1990793113040192>
- I.F. Rusina, T.L. Veprintsev, R.F. Vasil'ev, *Russ. J. Phys. Chem. B.* **16**, 50 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122010274>
- R. Amorati, A. Baschieri, A. Cowden, L. et al., *Biomimetics*. **2**, 9 (2017).
<https://doi.org/10.3390/biomimetics2030009>
- L.N. Shishkina, M.V. Kozlov, T.V. Konstantinova, et al., *Russ. J. Phys. Chem. B.* **17**, 141 (2023).
<https://doi.org/10.1134/s1990793123010104>

27. R.R. Sharafutdinova, R.S. Nassibullin, E.R. Fachret-dinova, *Khimicheskaya fizika i mezoskopiya*. **10**, 510 (2008) (in Russia).
28. L.N. Shishkina, M.V. Kozlov, A.Y. Povkh. et al., *Russ. J. Phys. Chem. B*. **15**, 861 (2021).
<https://doi.org/10.1134/S1990793121050080>
29. L.I. Mazaletskaya, G.V. Karpukhina, *Neftekhimiya*. **19**, 214 (1979) (in Russia).
30. E.M. Pliss, D.V. Loshadkin, A.M. Grobov, et al., *Russ. J. Phys. Chem. B*. **9**, 127 (2015).
<https://doi.org/10.1134/S1990793115010091>
31. R. Amorati, A. Baschieri, G. Morroni, et al., *Chem. Eur. J.* **22**, 7924 (2016).
32. I.V. Tikhonov, L.I. Borodin, E.M. Pliss, *Russ. J. Phys. Chem. B*. **14**, 910 (2020).
<https://doi.org/10.1134/S1990793120060147>
33. S.V. Molodochkina, D.V. Loshadkin, E.M. Pliss, *Russ. J. Phys. Chem. B*. **18**, 136 (2024).
<https://doi.org/10.1134/S1990793124010160>
34. V.D. Kancheva, O.T. Kasaikina, *Current Medicinal Chemistry*. **20**, 4784 (2013).
<https://doi.org/10.2174/09298673113209990161>

УДК 547.539.4+547.341+541.128

СПИНОВЫЕ АДДУКТЫ ПРИ ФОТОЛИЗЕ СМЕШАННОГО БЕНЗОИЛЬНОГО ФОСФОНиеВО-ИОДОНиеВОГО ИЛИДА В ДИХЛОРМЕТАНЕ

© 2024 г. И. Д. Потапов^{1,2}, М. В. Мотякин¹, Т. А. Подругина², Т. Д. Некипелова^{1*}¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: nekip@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024;

после доработки 24.04.2024;

принята в печать 20.05.2024

Смешанные фосфониево-иодониевые илиды представляют интерес в качестве реagens для синтеза новых гетероциклических соединений. Ранее показано, что реакции фосфониево-иодониевых илидов под действием света происходят с образованием радикалов. В работе с помощью спиновых ловушек PBN и DMPO исследованы радикалы, образующиеся при фотолизе как самого илида, так и соединений, являющихся его фрагментами, дифенилиодониевая соль и трифенилфосфин, или участвующие в его реакциях, а именно дихлорметан и фенилацетилен. Полученные результаты подтвердили радикальный механизм фотораспада илида и позволили уточнить состав первичных радикалов, образующихся при фотолизе. Определены ранее неизвестные значения магнитно-резонансных параметров спиновых аддуктов для некоторых радикалов.

Ключевые слова: фосфониево-иодониевые илиды, фотолиз, спиновые ловушки PBN и DMPO, радикальные интермедиаты, ЭПР-спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0207401X24110031

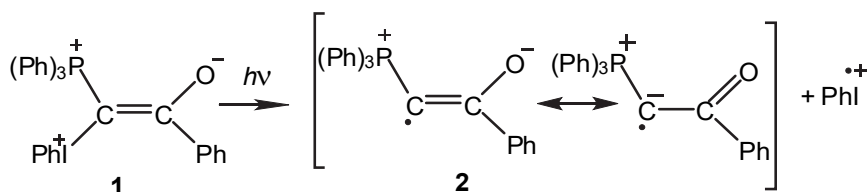
1. ВВЕДЕНИЕ

В последние годы смешанные фосфониево-иодониевые илиды (Y) привлекают значительное внимание в качестве reagens для синтеза новых гетероциклических соединений, которые находят все большее применение как функциональные материалы в органической электронике и в тест-системах для анализа биологических систем [1–4]. Особенно интересными с практической точки зрения являются реакции фотораспада Y и их взаимодействие с ацетиленами, которые происходят в дихлорметане. Первоначально предполагалось, что реакции фотораспада Y протекают по ионному механизму, и гетероциклы разных классов получают из одного и того же промежуточного карбокатиона, который образуется в результате отщепления PhI^+ при фотолизе [5]. Однако

недавно была установлена возможность радикального распада илидов [6–8] и предложен возможный механизм гомолитического распада для смешанного бензоильного илида **1** (Схема 1), аналогичный распаду диарилиодониевых солей. Образующиеся радикальные продукты могут реагировать как с растворителем, так и с добавленными ацетиленами.

Отметим, что радикалы, образовавшиеся из илида **1**, были зафиксированы методом стационарной ЭПР-спектроскопии, которая позволяет детектировать долгоживущие радикалы. В то же время очевидно, что при гомолитическом распаде Y должны происходить химические реакции с участием короткоживущих радикалов $\text{PhI}^{\bullet+}$ и радикалов из CH_2Cl_2 . Для понимания механизма химических реакций с участием Y и их контроля

Схема 1



необходима идентификация всех типов радикалов на разных стадиях фотохимических превращений Y .

Для решения данной задачи был выбран метод спиновых ловушек. Метод основан на реакции короткоживущего радикала $R^{\bullet}$ со спиновой ловушкой, приводящей к образованию стабильного нитроксильного радикала (спинового аддукта) [9, 10]. По g -фактору и изотропным константам сверхтонкого взаимодействия (СТВ) образующегося нитроксильного радикала определяется природа присоединенного короткоживущего радикала. Отметим, что константы СТВ нитроксильного радикала зависят от полярности растворителя [11–15]. В полярных растворителях равновесие сдвинуто в сторону цвиттер-ионной структуры нитроксила, в которой на атоме азота сосредоточено больше спиновой плотности, и, соответственно, выше изотропная константа СТВ радикала. Зависимость констант СТВ от растворителя затрудняет интерпретацию экспериментальных данных. К сожалению, значения магнитно-резонансных параметров спиновых аддуктов определены не для всех растворителей. Поэтому прежде всего в данной работе были выполнены модельные эксперименты для определения констант СТВ предполагаемых спиновых аддуктов в используемом растворителе.

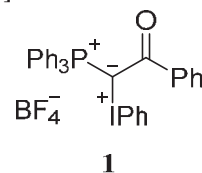
Короткоживущий радикал $R^{\bullet}$ может также вступать в реакцию с нитроксильным радикалом, образуя при этом диамагнитный продукт. Данная реакция является вторичной, однако она также присутствует в растворе и влияет на время жизни спинового аддукта. В настоящей работе мы использовали две спиновые ловушки, PBN и DMPO. Выбор обусловлен тем, что спиновая ловушка PBN широко применяется для детектирования радикалов с неспаренными электронами, локализованными на атомах углерода, фосфора или

азота, в то время как спиновая ловушка DMPO служит для идентификации алкокси- и перекисных радикалов [9, 10]. Структуры спиновых ловушек PBN и DMPO и их реакции с короткоживущими радикалами представлены на *Схеме 2*.

Метод спиновых ловушек является изящным инструментом идентификации короткоживущих радикалов и нашел широкое применение в разных областях химии и биологии. Однако экспериментально измеренных данных магнитно-резонансных параметров ЭПР-спектров аддуктов спиновой ловушки DMPO с углерод-центрированными радикалами не так много, как для PBN. Поэтому, некоторые полученные в работе данные ЭПР являются новыми, что повышает актуальность работы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

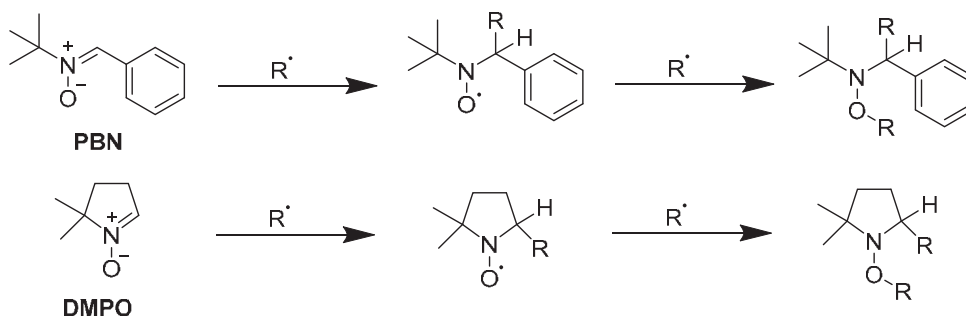
Илид **1** ((2-оксо-2-фенил-1-(трифенил- λ^5 -фосфанилиден)этил)(фенил) иодоний тетрафторборат), общая формула представлена ниже, синтезировали согласно методике, предложенной в работах [16, 17].



Хлористый метилен (эталонный, “Компонент-Реактив”, Россия) не содержащий стабилизатора и HCl, спиновые ловушки 5,5-диметилпирролин-N-оксид (DMPO, “Abcam”, UK) и N-трет-Бутил- α -фенилнитрон (PBN, “Sigma-Aldrich”), дифенилиодоний хлорид ((Ph) $_2$ I $^+$ Cl $^-$, ACROS Organics, Belgium), трифенилфосфин (Ph $_3$ P, ACROS Organics) использовали без предварительной очистки. Фенилацетилен (“Sigma-Aldrich”) очищали перед использованием перегонкой.

Концентрация соединений в исследуемых растворах CH $_2$ Cl $_2$: дифенилиодониевая соль – 40 мМ,

Схема 2



трифенилфосфин — 50 мМ, фенилацетилен — 150 мМ, илид **1** — 50 мМ. Концентрация ловушек в растворах — 50 мМ.

Облучение исследуемых растворов проводили УФ-излучением с длиной волны $\lambda = 365$ нм (АФС-УФ 365 “Соларис”, Россия). Спектры ЭПР X-диапазона регистрировали на спектрометре EMX (Bruker, Germany). Облучение проводили в стеклянных ампулах внутренним диаметром ~ 1.5 мм. Сразу после облучения ампулы с образцом помещали в резонатор ЭПР-спектрометра. Мощность микроволнового поля во избежание эффектов насыщения была не более 2 мВт. При записи спектров амплитуда модуляции (100 кГц) всегда не превышала наименьшую ширину резонансной линии. Для определения значений магнитно-резонансных параметров ЭПР сигналов использовали программы WINEPR и SIMFONIA (Bruker,

Germany), а также WinSim (NIEHS/NIH, USA) [18]. Значения магнитно-резонансных параметров аддуктов, полученных при моделировании экспериментальных спектров, представлены в табл. 1. Отметим, что спектры регистрировали непосредственно в процессе реакции, что, несомненно, влияло на точность определения как констант сверхтонкого взаимодействия (СТВ) спиновых аддуктов, так и их g-факторов. Погрешность в определении констант СТВ составляла ~ 5 –10%, для g-фактора — ± 0.0001 .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дихлорметан CH_2Cl_2

Как предположили авторы работы [19], дихлорметан в фотохимических реакциях фосфониево-иодониевых илидов выступает не только как растворитель, но может также быть реагентом. На

Таблица 1. Значения магнитно-резонансных параметров спиновых аддуктов PBN и DMPO и возможные структуры короткоживущих радикалов, образующихся при УФ-облучении ($\lambda = 365$ нм) соответствующих соединений в CH_2Cl_2 при 290 К

Соединение	Радикалы	a_N , Гс	a_H , Гс	Константы СТВ на других ядрах, Гс	g-Фактор
PBN					
CH_2Cl_2	PBN/ $\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$	13.5	1.7		2.0063
$\text{Ph}_2\text{I}^+ \text{Cl}^-$	PBN/Ph $\cdot$	14.7	2.7	$a_{35\text{Cl}} = 6.2$ $a_{37\text{Cl}} = 5.2$	2.0062
	PBN/ $\text{Cl}\cdot$	12.45	0.8		2.0064
	PBN/ $\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$	13.4	1.8		2.0063
$(\text{Ph})_3\text{P}$	PBN/Ph $\cdot$	14.7	2.6	$a_P = 16.5$	2.0062
	PBN/Ph $_2\text{P}\cdot$	14.5	3.6		2.0061
Ph–C $\equiv$ CH	PBN/ $\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$	13.5	1.7		2.0063
	PBN/Ph– $\cdot\text{C}=\text{CH}-\text{R}$	15.9	2.2		2.0060
Илид 1	PBN/F $\cdot$	12.5	2.2	$a_F = 50.0$	2.0064
	PBN-2	14.13	7.75	$a_P = 8.85$	2.0061
DMPO					
CH_2Cl_2	DMPO/ $\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$	13.0	8.7	$a_H = 1.6$	2.0063
$\text{Ph}_2\text{I}^+ \text{Cl}^-$	DMPO/ $\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$	13.0	9.2	$a_H = 1.0$	2.0063
	DMPO-3	12.45	—	$a_H = 1.5$ 2(H)	2.0062
	DMPOX	6.7	—	$a_H = 3.5$ (2H)	2.0067
$(\text{Ph})_3\text{P}$	DMPO/Ph $\cdot$	14.6	20.7	$a_P = 37.4$ $a_H = 1.4$	2.0061
	DMPO/ $\cdot\text{PPh}_2$	14.1	16.8		2.0060
	DMPO/ $\cdot\text{CHCl}_2$	14.2	13.8		2.0063
Ph–C $\equiv$ CH	DMPO/Ph– $\cdot\text{C}=\text{CH}-\text{R}$ ($>90\%$)	14.15	19.4		2.0061
	—	15.2		$a_H = 2.5$ (2H)	2.0062
Илид 1	DMPO-5	6.9	—	$a_P = 13.1$ $a_H = 0.7$ (2H)	2.0059
	DMPO/F $\cdot$	12.4	2.1	$a_F = 49.0$	2.0065
	DMPO/Ph $\cdot$	14.1	21.5	$a_H = 0.9$ (2H)	2.0061

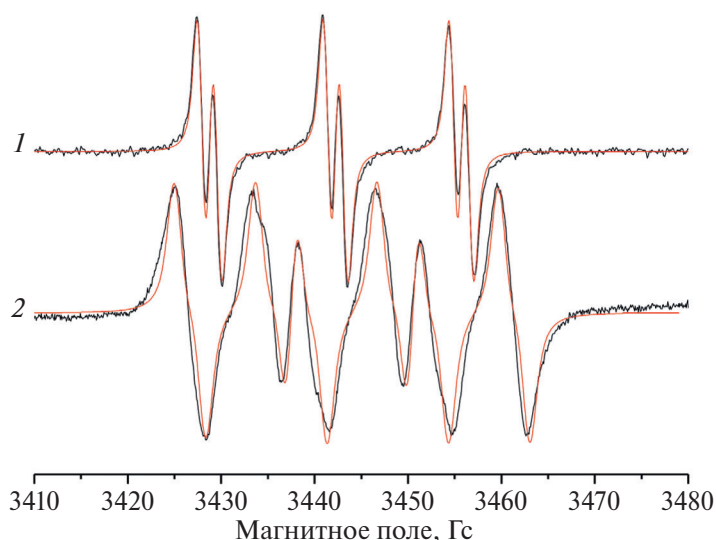


Рис. 1. Экспериментальные (черные линии) и теоретические (красные линии) спектры ЭПР аддуктов PBN (спектр 1) и DMPO (спектр 2) после 4-минутного фотолиза ($\lambda = 365$ нм) раствора дихлорметана CH_2Cl_2 при 290 К.

рис. 1 представлены экспериментальные и смоделированные спектры ЭПР спиновых аддуктов PBN и DMPO, образующихся при УФ-облучении CH_2Cl_2 . Полученные значения магнитно-резонансных параметров хорошо коррелируют с уже известными в литературе данными для захваченного $(\text{CH}_2\text{Cl})^\cdot$ радикала [20–23]. Этот радикал, как показано в работах [23–25], образуется при фотокалалитическом разложении и окислении CH_2Cl_2 .

Отметим широкие линии сигналов в спектрах DMPO/ $(\text{CH}_2\text{Cl})^\cdot$. По всей видимости, они имеют дополнительные малые расщепления на магнитных ядрах. Введение константы СТБ $a_{1/2} = 1.7$ Гс, использованное нами, улучшает совпадение модельного и экспериментального спектров.

Дифенилиодониевая соль $\text{Ph}_2\text{I}^+\text{Cl}^-$

Иодониевые соли (а смешанные фосфониево-иодониевые илиды можно считать иодониевой солью) могут подвергаться распаду по обеим связям $\text{C}-\text{I}^+-\text{Ph}$ с образованием соответствующих радикалов [26, 27]. Рассмотрим, какие радикалы детектируются спиновыми ловушками при фотоиндуцированном распаде $\text{Ph}_2\text{I}^+\text{Cl}^-$.

На рис. 2 представлены экспериментальные (черные линии) и смоделированные (красные линии) ЭПР-спектры аддуктов PBN (рис. 2а) и DMPO (рис. 2б), зарегистрированные после УФ-облучения $\text{Ph}_2\text{I}^+\text{Cl}^-$ в CH_2Cl_2 .

В первые минуты после УФ-облучения с помощью ловушки PBN детектируется спиновой ад-

дукт (рис. 2а, спектр 1) с магнитно-резонансными параметрами (см. табл. 1), близкими к $\text{PBN}/\text{Ph}^\cdot$. Согласно данным из работы [11], для $\text{PBN}/\text{Ph}^\cdot$ константы СТБ следующие: $a_N = 14.68$ Гс, $a_H = 2.58$ Гс. Отметим, что в аддукте $\text{PBN}/\text{IPh}^{+\cdot}$ расщепление на атоме иода может не наблюдаться, если радикал присоединился по бензольному кольцу. Поэтому сказать точно какой радикал, $\text{Ph}^\cdot$ или $\text{IPh}^{+\cdot}$, был захвачен, не представляется возможным.

Со временем в ЭПР-спектре аддуктов PBN появляются другие радикалы (рис. 2а, спектр 2, табл. 1). Их суперпозиционный спектр хорошо моделируется сигналами от $\text{PBN}/^\cdot\text{Cl}$ (55% в композиционном спектре, $a_N = 12.45$ Гс, $a_H = 0.8$ Гс, $a_{35\text{Cl}} = 6.2$ Гс, $a_{37\text{Cl}} = 5.2$ Гс для $\text{PBN}/^\cdot\text{Cl}$ [20, 21]), $\text{PBN}/^\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$ (9% в композиционном спектре) и уже образовавшемся в растворе $\text{PBN}/\text{Ph}^\cdot$ (12% в композиционном спектре). Через 25 мин сигнал от $\text{PBN}/^\cdot\text{Cl}$ исчезает, и остаются сигналы от $\text{PBN}/\text{Ph}^\cdot$ и $\text{PBN}/^\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$ (рис. 2а, спектр 3).

В присутствии DMPO после фотолиза раствора $\text{Ph}_2\text{I}^+\text{Cl}^-$ наблюдается спектр ЭПР (рис. 2б, спектр 1), представляющий собой суперпозицию сигналов двух аддуктов DMPO. Первый сигнал относится к уже известному $\text{DMPO}/^\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$ (55% в композиционном спектре). Константы СТБ для второго аддукта указывают на отсутствие протона в β -положении соответствующего нитроксильного радикала. Отметим, что в присутствии ионов хлора и хлорсодержащих соединений, DMPO могут подвергаться окислительно-восстановитель-

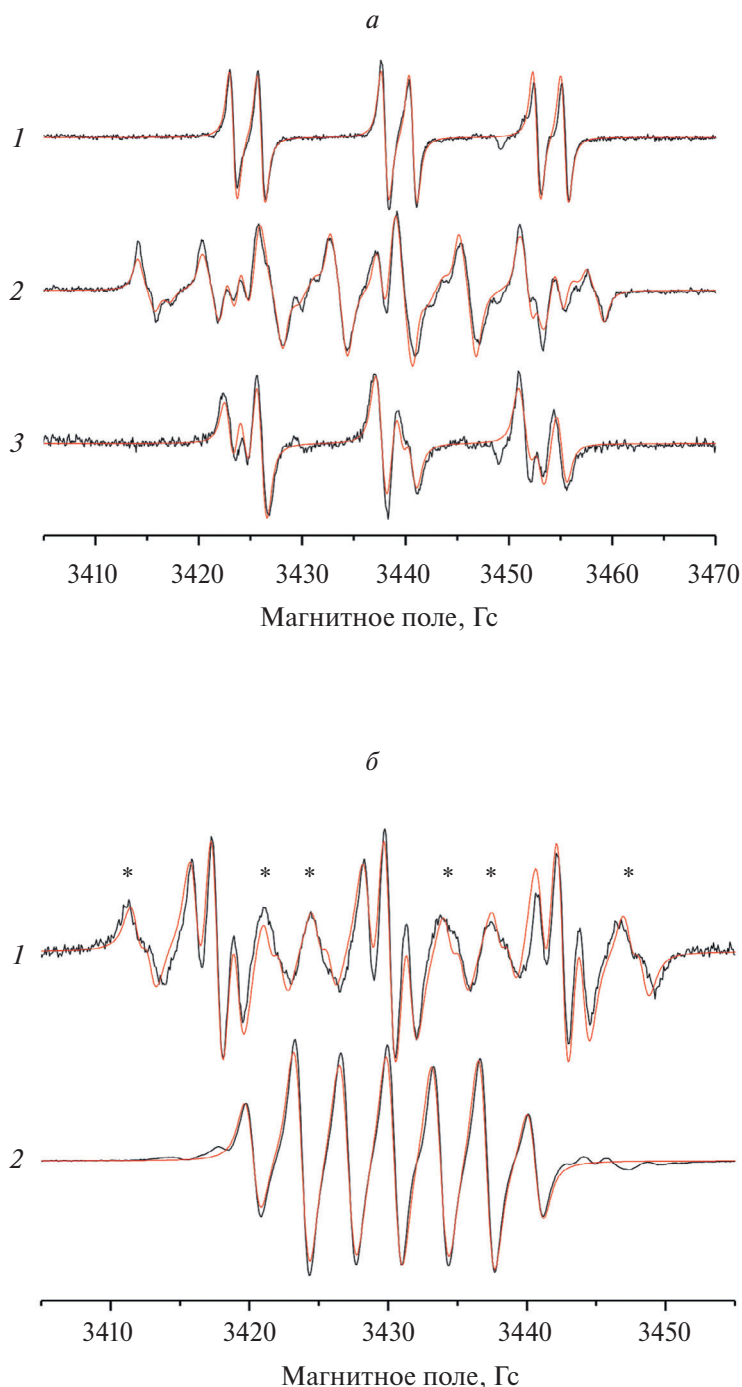
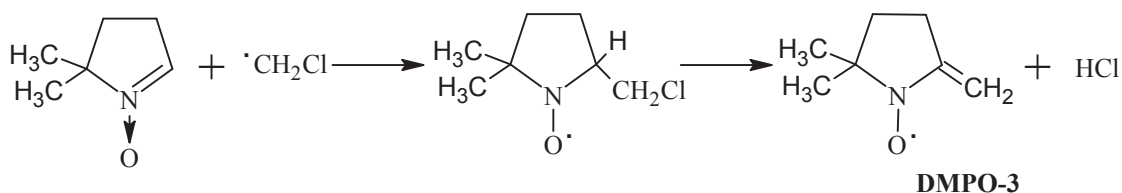


Рис. 2. Экспериментальные (черные линии) и теоретические (красные линии) ЭПР-спектры спин-аддуктов PBN (*a*) и DMPO (*б*), зарегистрированные после 3-минутного УФ-облучения $\text{Ph}_2\text{I}^+\text{Cl}^-$ в CH_2Cl_2 при температуре 290 К; (*a*) – спектры аддуктов PBN после облучения в течение 0 – (1), 5 – (2), 25 мин (3); *б* – ЭПР-спектр аддуктов DMPO (1), зарегистрированный после 3-минутного фотолиза раствора (звездочками отмечены линии ЭПР, относящиеся к аддукту $\text{DMPO}/^*\text{CH}_2\text{Cl}$); ЭПР-спектр аддуктов DMPO (2), зарегистрированный после 10-минутного фотолиза раствора.

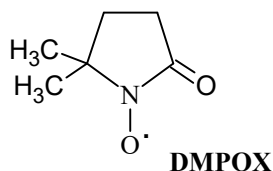
ным реакциям с образованием продуктов, отличных от наблюдаемых в других условиях [28–31]. По константам СТВ и g -фактору можно предположить, что в нашем случае образуется нитро-сильный радикал (DMPO-3) в результате следующих реакций (см. Схему 3).

Облучение раствора диарилиодониевой соли в присутствии DMPO в течение 10 мин изменяет вид спектра (рис. 2б, спектр 2). В нем доминирует (> 90%) сигнал с константами СТВ $a_{\text{N}} = 6.7$ Гс и $a_{\text{H}} = 3.5$ Гс (2H). Отметим, что типичные значения констант СТВ на атоме азота для аддуктов DMPO

Схема 3



лежат в диапазоне $\sim 12\text{--}16$ Гс [20], если реакция присоединения короткоживущего радикала протекает по обычной схеме (см. Схему 2). Полученное в нашем эксперименте значение константы a_N значительно отличается. Отметим также отсутствие константы на протоне в β -положении. Полученные значения констант СТВ близки к константам 5,5-диметил-2-пирролидон-оксильного радикала (DMPOX) [28–31], который образуется в результате окислительной реакции DMPO. Структура данного радикала представлена ниже:



Трифенилфосфин $(\text{Ph})_3\text{P}$

Как мы предположили ранее [6–8], при фотолизе илуда **1** образующиеся радикалы содержат трифенилфосфониевую группу. Поэтому с использованием спиновых ловушек были исследованы радикалы, возникающие при фотолизе трифенилфосфина $(\text{Ph})_3\text{P}$ в CH_2Cl_2 . Согласно данным работ [32, 33] фотолиз $(\text{Ph})_3\text{P}$ ведет к образованию радикалов $\text{Ph}^\bullet$ и $\text{Ph}_2\text{P}^\bullet$. Спектры ЭПР спиновых аддуктов PBN (рис. 3, спектр 1) и DMPO (рис. 3, спектр 2), регистрируемых при фотолизе трифенилфосфина $(\text{Ph})_3\text{P}$ в растворе CH_2Cl_2 , представляют собой суперпозицию нескольких сигналов, относящихся к аддуктам с разными захваченными радикалами (табл. 1).

Спектр ЭПР аддуктов PBN описывается суперпозицией двух сигналов. Первый сигнал можно отнести к аддукту $\text{PBN}/\text{Ph}^\bullet$ (30% в композиционном спектре), так как значения его спектральных параметров практически совпадают с величинами для $\text{PBN}/\text{Ph}^\bullet$, полученными нами при фотолизе $\text{Ph}_2\text{I}^+\text{Cl}^-$ и известными из работы [28]. Значения констант СТВ второго сигнала (70% в композиционном спектре) близки к аддукту PBN с радикалом $\text{Ph}_2\text{P}^\bullet$. По данным, приведен-

ным в работах [32, 33], значения констант СТВ для $\text{PBN}/\text{Ph}_2\text{P}^\bullet$ составляют: $a_N = 14.1$ Гс, $a_H = 3.2$ Гс, $a_P = 18.2$ Гс в бензоле. Как отмечалось выше, величины изотропных констант СТВ зависят от полярности растворителя, поэтому незначительное различие в них может наблюдаться для разных растворителей. Отметим, что значения констант СТВ на атоме фосфора в известных аддуктах PBN с фосфор-центрированными радикалами лежат в диапазоне $17\text{--}19$ Гс [20, 32, 34].

Спектр ЭПР аддуктов DMPO представляет собой суперпозицию трех сигналов. Параметры первого сигнала соответствуют величинам для $\text{DMPO}/\text{PPh}_2^\bullet$ (40% в композиционном спектре). Согласно данным из работ [20, 32, 34] значения констант СТВ этого аддукта в бензоле – $a_N = 13.6$ Гс, $a_H = 18.3$ Гс, $a_P = 37.2$ Гс, что соответствует с полученным в нашем эксперименте результатам. Вторым захваченным радикалом (20% в композиционном спектре) можно считать $\text{Ph}^\bullet$, так как расчетные значения констант СТВ хорошо согласуются с данными, приведенными в работах [20, 35]. Третьим захваченным радикалом (40% в композиционном спектре) может быть $^\bullet\text{CHCl}_2$. На это указывает величина g -фактора данного аддукта и значения констант СТВ на атоме азота и водорода, которые отличаются от значений для захваченного $^\bullet\text{CH}_2\text{Cl}$ радикала. Интересно отметить, что данный радикал при фотолизе CH_2Cl_2 нами не регистрировался (см. выше).

Фенилацетилен

Как отмечалось выше, реакции смешанных фосфониево-иодониевых илидов с ацетиленами создают дополнительные возможности для получения новых, ранее труднодоступных фосфорсодержащих гетероциклических соединений, позволяя синтезировать их в одну стадию при комнатной температуре. Для определения механизма данных реакций необходимо знать прежде всего какие радикалы могут образовываться в самом ацетилене. В данной работе нами был выбран фенилацетилен.

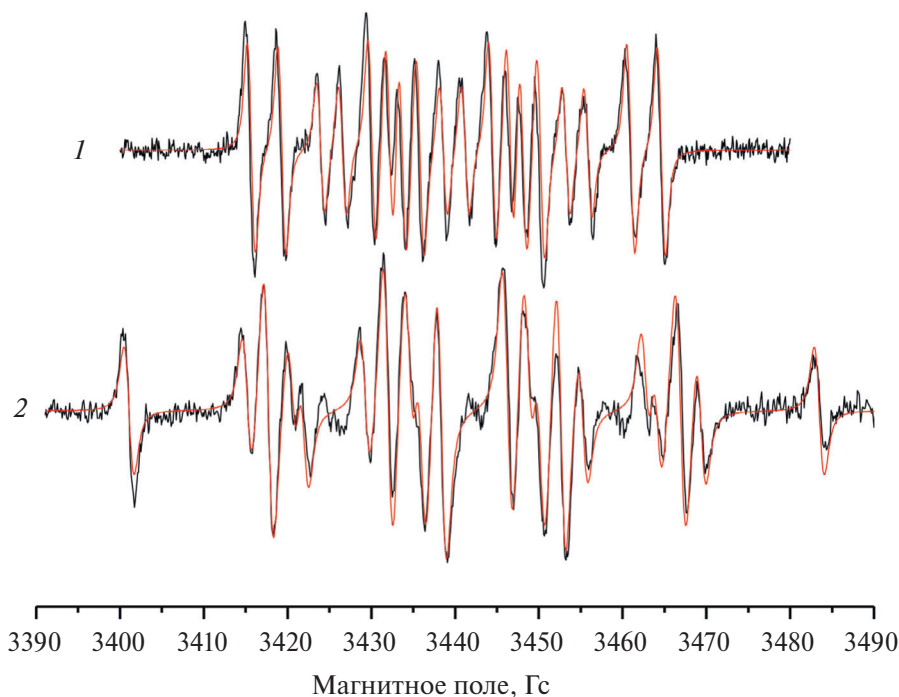


Рис. 3. Экспериментальные (черные линии) и теоретические (красные линии) ЭПР-спектры спиновых аддуктов, зарегистрированные после УФ-облучения раствора $(\text{Ph})_3\text{P}$ в CH_2Cl_2 при 290 К: 1 – спектр аддуктов PBN, зарегистрированный после 80-секундного УФ-облучения раствора; 2 – спектр ЭПР аддуктов DMPO после 120-секундного УФ-облучения раствора.

Полученные ЭПР-спектры аддуктов PBN в растворе фенилацетилена описываются суперпозицией двух основных сигналов (рис. 4, спектр 1, табл. 1). Значения спектральных параметров первого сигнала близки по величине к аддукту $\text{PBN}/\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$ (49% в композиционном спектре). Вторым захваченным радикалом (51% в композиционном спектре), может быть радикал со структурой, подобной радикалу $\text{Ph}-\cdot\text{C}=\text{CH}-\text{R}$, ведущему полимеризацию ацетиленов [36]. Отметим, что значение константы СТВ на атоме азота второго радикала достаточно большое (~ 15.9 Гс), что характерно для присоединенных алкильных радикалов [20, 37–39].

В растворе фенилацетилена после фотолиза в присутствии DMPO также детектируются несколько аддуктов с разными захваченными радикалами (рис. 4, спектр 2, табл. 1). Доминирующим нитроксильным радикалом ($> 90\%$ в композиционном спектре), как и в случае с PBN, предположительно, является аддукт DMPO с радикалом $\text{Ph}-\cdot\text{C}=\text{CH}-\text{R}$, ведущим полимеризацию. Его значения магнитно-резонансных параметров наиболее близки к известным в литературе данным для $\text{DMPO}/\text{Ph}\cdot$ и $\text{DMPO}/\cdot\text{CH}_2\text{Ph}$ [20, 35].

Вторым по вкладу в композиционный спектр (чуть более 7%) может быть нитроксильный радикал с константами СТВ $a_{\text{N}} = 15.2$ Гс и $a_{\text{H}} = 2.5$ Гс (2H). Как и при фотолизе раствора дифенилиодониевой соли, данный нитроксильный радикал может быть продуктом окислительно-восстановительных реакций DMPO в растворе. Константы СТВ других радикалов определить не представляется возможным из-за их слабых сигналов в суперпозиционном ЭПР-спектре.

Илид 1

В работах [6–8] показано, что при фотолизе илида I происходит образование радикальных интермедиатов, была предложена схема радикального распада илида (Схема 1) и зарегистрированы долгоживущие радикалы 2 с помощью стационарной ЭПР-спектроскопии. Используя спиновые ловушки, можно предположить какие еще радикалы могут образовываться.

На рис. 5 представлены ЭПР-спектры аддуктов PBN (спектр 1) и DMPO (спектр 2), полученные после фотолиза растворов илида 1 в CH_2Cl_2 .

Спектр аддуктов PBN представляет собой суперпозицию ЭПР-сигналов двух нитроксильных

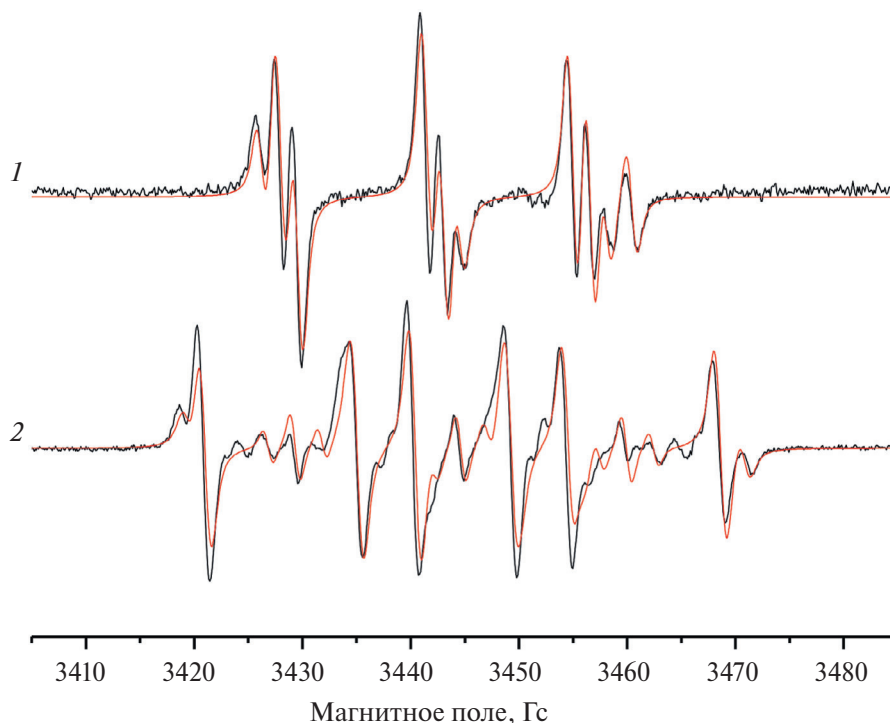
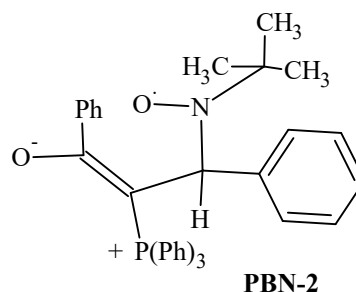


Рис. 4. Экспериментальные (черные линии) и теоретические (красные линии) ЭПР-спектры аддуктов PBN (спектр 1) и DMPO (спектр 2), зарегистрированные после УФ-облучения раствора фенилацетилена в CH_2Cl_2 при 290 К.

радикалов (на рис. 5 их линии ЭРП отмечены “+” и “*”). Значения констант СТВ первого радикала (линии ЭПР отмечены значком “*” на рис. 5, спектр 1) близки к данным для нитроксильного радикала, образовавшегося в результате реакции спиновой ловушки с атомом фтора, т.е. $\text{PBN}/\text{F}^\bullet$. Согласно данным из работ [20, 40, 41], значения констант СТВ на атомарном фторе в аддуктах PBN находятся в диапазоне 35–49 Гс, что близко к значению в 50 Гс, полученному нами. Этот результат указывает на возможное участие противоиона (BF_4^-) в фотохимических реакциях илида **1**.

Второй радикал (линии ЭПР отмечены значком “+” на рис. 5, спектр 1) относится к аддукту с захваченным углерод-центрированным радикалом, в структуре которого близко от реакционного центра находится атом со спином 1/2. Этим радикалом, согласно структуре илида **1**, может быть атом фосфора. В работе [8] расшифрована сверхтонкая структура ЭПР-спектров долгоживущего радикала и предложена его структурная формула (радикал **2** на *Схеме 1*). По нашему мнению, именно радикал **2** реагирует с ловушкой с образованием аддукта PBN-2:



Сравнение значений магнитно-резонансных параметров данного аддукта с параметрами аддуктов с фосфор-центрированными радикалами (см. выше) подтверждает наше предположение. Значения констант СТВ на атоме фосфора значительно меньше в наблюдаемом нами радикале, а константа СТВ на водороде больше и по своей величине близка к константе на атоме фосфора в данном нитроксильном радикале (табл. 1).

В растворе CH_2Cl_2 илида **1** в присутствии DMPO после фотолиза детектируется интенсивный ЭПР-спектр (рис. 5, спектр 2). Моделирование спектра предполагало наличие трех разных радикалов в растворе. Значения магнитно-резонансных параметров первых двух аддуктов DMPO хорошо известны в литературе [11, 20], их относят к $\text{DMPO}/\text{Ph}^\bullet$ (на рис. 5 спектр 2 отмечены знач-

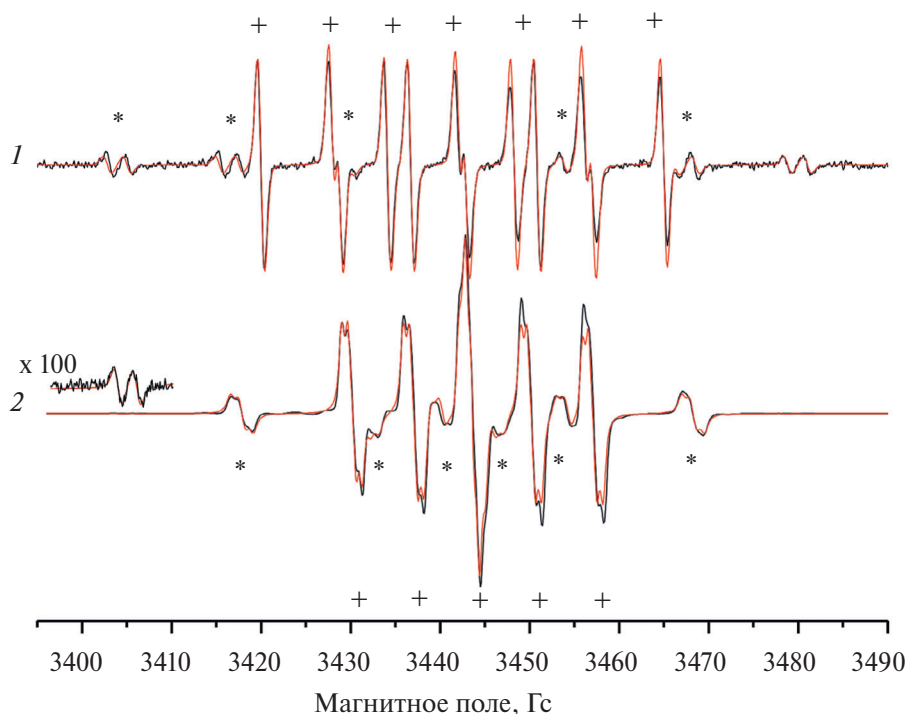
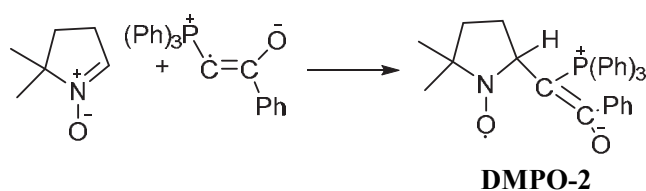


Рис. 5. Экспериментальные (черные линии) и теоретические (красные линии) спектры ЭПР аддуктов PBN (спектр 1) и DMPO (спектр 2) после фотолиза ($\lambda = 365$ нм) раствора илида **1** в CH_2Cl_2 при 290 К. На вставке — усиленная в 100 раз низкочастотная компонента сигнала от DMPO/ $\text{F}^\bullet$ -радикала.

ком “*”) и DMPO/ $\text{F}^\bullet$ (рис. 5, спектр 2, вставка). Наличие DMPO/ $\text{Ph}^\bullet$ в растворе подтверждает механизм фотораспада илидов, предложенный нами в работах [6–8].

Третьим захваченным радикалом в растворе по аналогии с PBN может быть радикал **2** илида. Согласно классической схеме (Схема 2), при его реакции с DMPO должен образоваться нитроксильный радикал (DMPO-2):

Схема 4



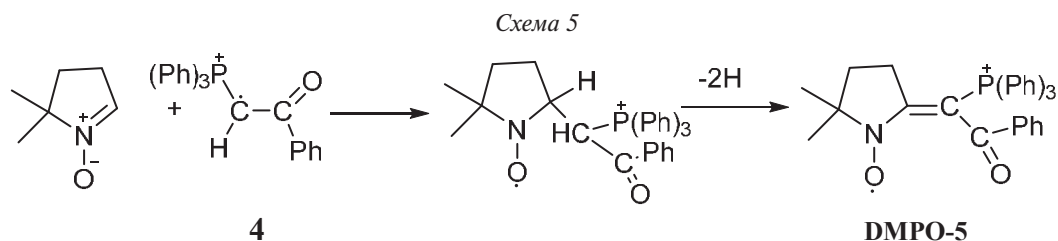
Однако в спектре полученного аддукта отсутствует расщепление на β -протоне и значение константы СТВ на атоме азоте ($a_N = 6.9$ Гс) существенно ниже стандартного значения. Образование аддукта с таким низким значением a_N может указывать на то, что присоединенный радикал является протонированной формой радикала **2**. Тогда, согласно результатам, приведенным в работах [30, 31], в исследуемой системе могут протекать реакции, представленные на Схеме 5.

В результате этих реакций образуется аддукт DMPO-5. Именно данная структура аддукта удовлетворительно объясняет значения констант СТВ на азоте, фосфоре и двух протонах пирролинового цикла (табл. 1).

Образование радикала **4** предполагалось ранее на основе анализа спектра ЭПР, регистрируемого в процессе фотолиза **1** при комнатной температуре [6].

Отметим, что в литературе хорошо известны значения параметров аддуктов PBN и DMPO с фосфор-центрированными радикалами и нет данных, с которыми можно было бы сравнивать параметры по углерод-центрированным радикалам с близко находящимся в структуре атомом фосфора. Идентификация и объяснение значений магнитно-резонансных параметров спиновых аддуктов PBN и DMPO с радикалами **2** и **4** выполнены впервые.

Как показано в работах [16, 17, 19], фотохимические реакции смешанных фосфониево-иодониевых илидов с ацетиленами являются сложными и многостадийными. В настоящей работе определены радикальные интермедиаты отдельных соединений, участвующих в таких реакциях, необходимые для понимания механизма их



действия в смеси илидов с ацетиленами. В дальнейшем планируются исследования фотохимических реакций илидов с разными ацетиленами и в разных растворителях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В присутствии спиновых ловушек PBN и ДМРО, проведено ЭПР-исследование фотохимической реакции распада смешанного фосфониево-иодониевого илида и соединений, участвующих в его реакциях с ацетиленами в растворе CH_2Cl_2 . Определены значения магнитно-резонансных параметров образующихся аддуктов, позволившие идентифицировать структуру захваченных радикалов. Полученные результаты подтвердили радикальный механизм фотораспада илида, предложенный в более ранних наших работах.

Показано, что как спиновая ловушка ДМРО, так и ее аддукты, образующиеся в фотохимических реакциях смешанных фосфониево-иодониевых илидов в растворе CH_2Cl_2 могут подвергаться окислительно-восстановительным реакциям, в результате которых образуются нитроксильные радикалы с нетипичными значениями констант СТВ. Наличие радикалов $\cdot\text{CH}_2\text{Cl}$, $\cdot\text{CHCl}_2$ доказывает, что дихлорметан в фотохимических реакциях может выступать не только как растворитель, но и как реагент.

Спектральные измерения методом ЭПР-спектроскопии проводились в Центре коллективного пользования ИБХФ РАН "Новые материалы и технологии".

Работа выполнена в рамках госзадания ИБХФ РАН (тема № 122041400114-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baumgartner T. // Acc. Chem. Res. 2014. V. 47. № 5. P. 1613; <https://doi.org/10.1021/ar500084b>
2. Regulska E., Romero-Nieto C. // Dalton Trans. 2018. V. 47. № 31. P. 10344; <https://doi.org/10.1039/C8DT01485J>
3. Duffy M. P., Delaunay W., Bouit P. et al. // Chem. Soc. Rev. 2016. V. 45. № 19. P. 5296; <https://doi.org/10.1039/C6CS00257A>
4. Belyaev A., Chen Y.-T., Su S.-H. et al. // Chem. Commun. 2017. V. 53. № 79. P. 10954; <https://doi.org/10.1039/C7CC06882D>
5. Kampmeier J. A., Nalli T. W. // J. Org. Chem. 1994. V. 59. № 6. P. 1381; <https://doi.org/10.1021/jo00085a030>
6. Некипелова Т.Д., Каспаров В.В., Коварский А.Л. и др. // Докл. АН. 2017. Т. 474. № 6. С. 707.
7. Некипелова Т. Д., Мотякин М. В., Каспаров В. В. и др. // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 19.
8. Потапов И. Д., Мотякин М. В., Некипелова Т. Д., Подругина Т. А. // Изв. АН. Сер. хим. 2024. Т. 73. № 3. С. 523.
9. Villamena F.A. Reactive species detection in biology. From Fluorescence to Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. Amsterdam: Elsevier, Science, 2016.
10. Davies M. J. // Methods. 2016. V. 109. P. 21; <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.05.013>
11. Janzen E. G., Coulter G. A., Oehler U. M. et al. // Can. J. Chem. 1982. V. 60. № 21. P. 2725; <https://doi.org/10.1139/v82-392>
12. Chumakova N. A., Lazhko A. E., Matveev M. V. et al. // Russ. J. Phys. Chem. B. 2023. V. 16. № 8. P. 1397; <https://doi.org/10.1134/S1990793122080073>
13. Ivanova T. A., Zubanova E. M., Popova A. A. et al. // Russ. J. Physical Chemistry B. 2022. V. 16. № 7. P. 1208; <https://doi.org/10.1134/S1990793122070089>
14. Ivanova T. A., Melnikov M. Ya., Timashev P. S. et al. // Russ. J. Phys. Chem. B. 2023. V. 17. № 2. P. 471; <https://doi.org/10.1134/S1990793123020276>
15. Popova A. A., Golubeva E. N. // Russ. J. Phys. Chem. B. 2023. V. 17. № 7. P. 1540; <https://doi.org/10.1134/S1990793123070187>
16. Matveeva E. D., Podrugina T. A., Pavlova A. S. et al. // Eur. J. Org. Chem. 2009. V. 14. P. 2323; <https://doi.org/10.1002/ejoc.200801251>
17. Matveeva E. D., Vinogradov D. S., Podrugina T. A. et al. // Ibid. 2015. V. 33. P. 7324; <https://doi.org/10.1002/ejoc.201500876>
18. <http://www.niehs.nih.gov/research/resources/software/toxpharm/tools/index.cfm>
19. Levina I.I., Klimovich O.N., Vinogradov D.S. et al. // J. Phys. Org. Chem. 2018. V. 31. № 7. P. e3844.

20. *Buettner G.R.* // Free Radical Biol. Med. 1987. V. 3. P. 259.
21. *Davies M. J., Slater T. F.* // Chem.-Biol. Interact. 1986. V. 58. № 2. P. 137.
22. *Sang H., Janzen E. G., Poyer J. L. et al.* // Free Radical Biol. Med. 1997. V. 22. № 5. P. 843.
23. *Brusa M.A., Di Iorio Y., Churio M.S. et al* // J. Mol. Catal. A: Chem. 2007. V. 268. № 1-2. P. 29;
<https://doi.org/10.1016/j.molcata.2006.12.008>
24. *Calza P., Minero C., Pelizzetti E.* // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1997. V. 93. № 21. P. 3765;
<https://doi.org/10.1039/A703867D>
25. *Calza P., Minero C., Pelizzetti E.* // Environ. Sci. Technol. 1997. V. 31. № 8. P. 2198;
<https://doi.org/10.1021/es960660x>
26. *Romanczyk P. P., Kurek S. S.* // Electrochim. Acta. 2020. V. 351. P. 136404;
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136404>
27. *Dektar J.L., Hacker N.P.* // J. Org. Chem. 1990. V. 55. P. 639;
<https://doi.org/10.1021/jo00289a045>
28. *Bernofsky C., Bandara B.M.R., Hinojosa O.* // Free Radical Biol. Med. 1990. V. 8. № 3. P. 231.
29. *Stan S., Daeschel M.A.* // J. Agric. Food Chem. 2005. V. 53. № 12. P. 4906;
<https://doi.org/10.1021/jf047918k>
30. *Aurich H.G., Schmidt M., Schwerzel Th.* // Ber. 1985. V. 118. P. 1086.
31. *Bandara B.M.R., Hinojosa O., Bernofsky C.* // J. Org. Chem. 1992. V. 57. P. 2652.
32. *Sueishi Y., Miyake Y.* // Bull. Chem. Soc. Jpn. 1997. V. 70. P. 397.
33. *Sueishi Y., Nishihara Y.* // J. Chem. Research (S). 2001. P. 84.
34. *Noel-Duchesneau L., Lagadic El., Morlet-Savary F. et al.* // Org. Lett. 2016. V. 18. P. 5900.
35. *Chignell C.F., Motten A.G., Sik R.H. et al.* // Photochem. Photobiol. 1994. V. 59. № 1. P. 5.
36. *Hwang J.S., Tsonis C.P.* // Polymer. 1981. V. 22. № 11. P. 1462.
37. *Novakov C.P., Feierman D., Cederbaum A.I. et al.* // Chem. Res. Toxicol. 2001. V. 14. № 9. P. 1239;
<https://doi.org/10.1021/tx015507h>
38. *Kunitake T., Murakami S.* // J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 1974. V. 12. № 1. P. 67.
39. *Candra H., Davidson I.M.T., Symons M.C.R.* // J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1. 1983. V. 79. № 11. P. 2705.
40. *Pryor W.A., Nuggehalli S.K., Scherer K.V. et al.* // Chem. Res. Toxicol. 1990. V. 3. P. 2.
41. *Ebersson L.* // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. 1992. № 10. P. 1807;
<https://doi.org/10.1039/P29920001807>

SPIN ADDUCTS IN PHOTOLYSIS OF MIXED BENZOYL PHOSPHONIUM- IODONIUM YLIDES IN DICHLOROMETHANE

I. D. Potapov^{1,2}, M. V. Motyakin¹, T. A. Podrugina², T. D. Nekipelova^{1*}

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

²*Moscow State Lomonosov University, Department of Chemistry, Moscow, Russia*

*E-mail: nekip@sky.chph.ras.ru

Mixed phosphonium-iodonium ylides are of interest as reactants for the synthesis of new heterocyclic compounds. Recently it has been shown that the reactions of the phosphonium-iodonium ylides under the action of light occurs with the formation of radicals. The radicals generated in the photolysis of the ylide itself and the compounds, which are its fragments, diphenyliodonium salt and triphenylphosphine, as well as participating in its reactions, dichloromethane and phenylacetylene, have been studied with the use of PBN and DMPO spin traps. The obtained results have confirmed the radical mechanism of the photodecomposition of the ylide and allowed to specify the composition of primary radicals generated in the photolysis. The unknown magnetic-resonance parameters for some radicals have been determined.

Keywords: phosphonium-iodonium ylides, photolysis, spin traps, PBN and DMPO, radical intermediates, EPR spectroscopy.

REFERENCES

1. T. Baumgartner, Acc. Chem. Res. **47**, 1613 (2014).
<https://doi.org/10.1021/ar500084b>
2. E. Regulska, C. Romero-Nieto, Dalton Trans. **47**, 10344 (2018).
<https://doi.org/10.1039/C8DT01485J>
3. M.P. Duffy, W. Delaunay, P. Bouit et al, Chem. Soc. Rev. **45**, 5296 (2016).
<https://doi.org/10.1039/C6CS00257A>
4. A. Belyaev, Y.-T. Chen, S.-H. Su et al, Chem. Commun. **53**, 10954 (2017).
<https://doi.org/10.1039/C7CC06882D>
5. J.A. Kampmeier, T.W. Nalli, J. Org. Chem. **59**, 1381 (1994).
<https://doi.org/10.1021/jo00085a030>
6. T.D. Nekipelova, V.V. Kasparov, A.L. Kovarskii et al, Dokl. Phys. Chem. **474**, 109 (2017).
<https://doi.org/10.1134/S0012501617060070>
7. T.D. Nekipelova, M.V. Motyakin, V.V. Kasparov et al, Russ. J. Phys. Chem. B **13**, 907 (2019).
<https://doi.org/10.1134/S1990793119060265>
8. I.D. Potapov, M.V. Motyakin, T.D. Nekipelova, T.A. Podrugina, Russ. Chem. Bull., **73**, 523 (2024).
<https://doi.org/10.1007/s11172-024-4161-6>
9. F.A. Villamena, *Reactive species detection in biology. From Fluorescence to Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy* (Elsevier, Amsterdam, 2016).
10. M. J. Davies, Methods **109**, 21 (2016).
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.05.013>
11. E.G. Janzen, G.A. Coulter, U.M. Oehler et al, Canad. J. Chem. **60**, 2725 (1982).
<https://doi.org/10.1139/v82-392>
12. N.A. Chumakova, A.E. Lazhko, M.V. Matveev et al, Russ. J. Phys. Chem. B. **16**, 1397 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122080073>
13. T.A. Ivanova, E.M. Zubanova, A.A. Popova et al, Russ. J. Phys. Chem. B. **16**, 1208 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122070089>
14. T.A. Ivanova, M.Ya. Melnikov, P.S. Timashev, E.N. Golubeva, Russ. J. Phys. Chem. B. **17**, 471 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123020276>
15. A.A. Popova, E.N. Golubeva, Russ. J. Phys. Chem. B. **17**, 1540 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123070187>
16. E.D. Matveeva, T.A. Podrugina, A.S. Pavlova et al, Eur. J. Org. Chem. **14**, 2323 (2009).
<https://doi.org/10.1002/ejoc.200801251>
17. E.D. Matveeva, D.S. Vinogradov, T.A. Podrugina et al, Eur. J. Org. Chem. **33**, 7324 (2015).
<https://doi.org/10.1002/ejoc.201500876>
18. <http://www.niehs.nih.gov/research/resources/software/toxpharm/tools/index.cfm>
19. I.I. Levina, O.N. Klimovich, D.S. Vinogradov et al, J. Phys. Org. Chem. **31**, e3844 (2018).
20. G.R. Buettner, Free Radic. Biol. Med. **3**, 259 (1987).
21. M. J. Davies, T. F. Slater, Chem.-Biol. Interact. **58**, 137 (1986).
22. H. Sang, E. G. Janzen, J. L. Poyer et al, Free Radic. Biol. Med. **22**, 843 (1997).
23. M.A. Brusa, Y. Di Iorio, M.S. Churio et al, J. Mol. Catal. A: Chem. **268**, 29 (2007).
<https://doi.org/10.1016/j.molcata.2006.12.008>
24. P. Calza, C. Minero, E. Pelizzetti, J. Chem. Soc. Faraday Trans. **93**, 3765 (1997).
<https://doi.org/10.1039/A703867D>
25. P. Calza, C. Minero, E. Pelizzetti, Environ. Sci. Technol. **31**, 2198 (1997).
<https://doi.org/10.1021/es960660x>
26. P. P. Romanczyk, S. S. Kurek, Electrochim. Acta. **351**, 136404 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136404>
27. J.L. Dektar, N.P. Hacker, J. Org. Chem. **55**, 639 (1990).
<https://doi.org/10.1021/jo00289a045>

28. C. Bernofsky, B.M.R. Bandara, O. Hinojosa, *Free Radic. Biol. Med.* **8**, 231 (1990).
29. S. Stan, M.A. Daeschel, *J. Agric. Food Chem.* **53**, 4906 (2005).
<https://doi.org/10.1021/jf047918k>
30. H.G. Aurich, M. Schmidt, Th. Schwerzel, *Ber.* **118**, 1086 (1985).
31. B. M. R. Bandara, O. Hinojosa, C. Bernofsky, *J. Org. Chem.* **57**, 2652 (1992).
32. Y. Sueishi, Y. Miyake, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **70**, 397 (1997).
33. Y. Sueishi, Y. Nishihara, *J. Chem. Research (S)*. 84 (2001).
34. L. Noel-Duchesneau, El. Lagadic, F. Morlet-Savary et al, *Org. Lett.* **18**, 5900 (2016).
35. C.F. Chignell, A.G. Motten, R.H. Sik et al, *Photochem. Photobiol.* **59**, 5 (1994).
36. J.S. Hwang, C.P. Tsonis, *Polymer.* **22**, 1462 (1981).
37. C.P. Novakov, D. Feierman, A.I. Cederbaum et al, *Chem. Res. Toxicol.* **14**, 1239 (2001).
<https://doi.org/10.1021/tx015507h>
38. T. Kunitake, S. Murakami, *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* **12**, 67 (1974).
39. H. Candra, I.M.T. Davidson, M.C.R. Symons, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1.* **79**, 2705 (1983).
40. W.A. Pryor, S.K. Nuggehalli, K.V. Scherer et al, *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 2 (1990).
41. L. Ebersson, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* **10**, 1807 (1992).
<https://doi.org/10.1039/P29920001807>

УДК 538.956

ВЛИЯНИЕ РЕГИОДЕФЕКТОВ НА ПОЛЯРИЗАЦИЮ СЕГНЕТОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРОВ ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

© 2024 г. В. В. Агражев, Д. В. Дмитриев, В. Я. Кривнов*, В. И. Султанов

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

*E-mail: krivnov@deom.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024;

после доработки 24.04.2024;

принята в печать 25.05.2024

Предложена модель для исследования влияния региодефектов (противоположная ориентация соседних мономерных единиц вдоль цепи) на поведение сегнетоэлектрических полимеров в электрическом поле при низких температурах. В рамках модели показано, что вблизи региодефектов происходит плавная переориентация дипольных моментов мономеров, что согласуется с данными, полученными в молекулярно-динамических (МД) расчетах. Получено аналитическое выражение для зависимости средней поляризации цепи от температуры, электрического поля и концентрации региодефектов. Из сравнения с МД-расчетами проведены оценки жесткости связи соседних мономеров и наведенного электрического поля. Исследована квантовая версия предложенной модели. Показано, что основное состояние является синглетным, а возбуждения могут быть как бесщелевыми, так и со щелью, в зависимости от четности количества мономеров между дефектами. На нуль-температурной кривой намагниченности имеется плато.

Ключевые слова: сегнетоэлектрические полимеры, поливинилиденди-фторид, региодефект.

DOI: 10.31857/S0207401X24110041

1. ВВЕДЕНИЕ

Сегнетоэлектрические полимеры [1–6] вызывают интерес с точки зрения их практического применения в так называемых “зеленых технологиях”. Они обладают рядом интересных свойств: например, в них наблюдаются пьезоэлектрический и электрокалорический эффекты. Пьезоэлектрический эффект хорошо известен и связан с возникновением разности потенциалов на образце при его механической деформации. Пьезоэлектрические полимерные материалы широко используются в различных механических сенсорах и датчиках [4, 7]. Электрокалорический эффект менее известен и состоит в обратимом изменении температуры образца в адиабатических условиях при изменении внешнего электрического поля. В последнее время ведутся активные работы над созданием принципиально новых рефрижераторов и кондиционеров на основе электрокалорического эффекта, которые не будут иметь движущихся частей. Сегнетоэлектрические полимеры имеют существенное преимущество по сравнению с неорганическими соединениями, поскольку они более легкие и обладают пластичностью, что обес-

печивает им стабильность при механических нагрузках.

В настоящее время значительный электрокалорический эффект обнаружен у трех сополимеров винилидендифторида (ВДФ, $F_2C=CH_2$): поли(ВДФ–ТрФЭ) [8], поли(ВДФ–ТрФЭ–ХФЭ) [9] и поли(ВДФ–ТрФЭ–ХТФЭ) [10], где ТрФЭ – трифторэтилен ($F_2C=CHF$), ХФЭ – 1-хлор-1-фторэтилен ($ClFC=CH_2$) и ХТФЭ – хлортрифторэтилен ($ClFC=CF_2$). Специфические электрические свойства этих сополимеров обусловлены наличием постоянных дипольных моментов у мономеров, образующих полимерную цепь, которые могут ориентироваться разнообразными способами в зависимости от кристаллической фазы полимерных кристаллитов аморфно-кристаллического полимера [11, 12].

Сегнетоэлектрические полимеры синтезируются из мономеров путем классической радикальной полимеризации, в которой атом углерода растущей полимерной цепи образует новую ковалентную связь с одним из атомов углерода свободной молекулы мономера. В случае мономера ВДФ два атома углерода существенно различаются

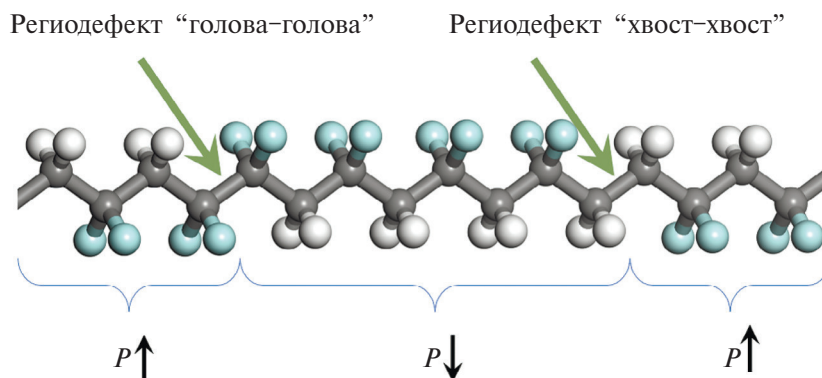


Рис. 1. Региодефекты в цепи ПВДФ. Цветовые обозначения элементов: углерод — серый, водород — белый, фтор — бирюзовый.

по электронной плотности, и концевой $-\text{CF}_2$ -группе энергетически более выгодно образовывать новую химическую связь с атомом углерода CH_2 -группы, формируя таким образом региорегулярную цепь поливинилидендифторида (ПВДФ) с чередующимися CF_2 - и CH_2 -группами. То же относится и к ТрФЭ. В *транс*-планарной конформации полимерной цепи дипольные моменты всех мономеров направлены в одну сторону, что крайне важно для электрофизических свойств. Однако региоселективность присоединения мономеров не является абсолютной, что приводит к образованию региодефектов, т.е. связей CF_2-CF_2 и CH_2-CH_2 , так называемых дефектов “голова–голова” и “хвост–хвост” (рис. 1). Дипольные моменты мономеров в полимерной цепи ориентированы в противоположных направлениях до и после региодефекта. Очевидно, что региодефекты оказывают существенное влияние на диэлектрические свойства гомополимера и сополимеров ВДФ [13].

Основным состоянием кристалла поли(ВДФ–ТрФЭ) является полярная β -фаза, когда все диполи региорегулярной цепи направлены параллельно друг другу, и все дипольные моменты различных цепей ориентированы также в одном направлении. Наличие региодефектов приводит к тому, что некоторые участки полимерной цепи имеют ориентацию дипольных моментов, противоположную направлению среднего дипольного момента в кристалле. Такая ориентация диполей энергетически невыгодна, и мономеры пытаются развернуться параллельно общему дипольному моменту кристалла. Однако это приводит к формированию спиралевидных участков цепи, что также повышает энергию системы. Из этого сле-

дует, что существует некая оптимальная длина участков цепи, на которых происходит переориентация мономеров. В настоящей работе мы рассмотрели задачу об одиночной цепи с региодефектами в среднем электростатическом поле кристалла, вызванном наличием поляризации.

ВЛИЯНИЕ РЕГИОДЕФЕКТОВ НА ЗАВИСИМОСТЬ ПОЛЯРИЗАЦИИ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ И ВНЕШНЕГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Как показывают молекулярно-динамические (МД) расчеты, при относительно низких температурах ($T < 300$ К) концентрация *gash*-конформаций в полимерных цепях без региодефектов экспоненциально мала [14]. Поэтому дипольные моменты соседних мономеров в одной цепи, $\mathbf{d}_i$ и $\mathbf{d}_{i+1}$, почти параллельны. Такая цепочка эффективно описывается в терминах ферромагнитно взаимодействующих единичных векторов $\mathbf{n}_i = \mathbf{d}_i/|\mathbf{d}|$. Поскольку валентные углы в поли(ВДФ–ТрФЭ) полимерах очень жесткие, взаимные отклонения дипольных моментов соседних мономеров происходят преимущественно в плоскости, перпендикулярной оси цепочки. Энергия такой цепочки (без региодефектов) имеет вид:

$$E = -\kappa d^2 \sum \mathbf{n}_i \mathbf{n}_{i+1} - \mathcal{E} d \sum n_i^z, \quad (1)$$

где κ — параметр, характеризующий жесткость ферромагнитной связи соседних мономеров; $\mathcal{E}_{in} = \mathcal{E}_{in} + \mathcal{E}_{ex}$ — сумма среднего электростатического поля кристалла $\mathcal{E}_{in}$, вызванного наличием поляризации, и внешнего электрического поля $\mathcal{E}_{ex}$, действующего на дипольные моменты мономеров.

Поскольку дипольные моменты соседних мономеров на региодефекте направлены антипа-

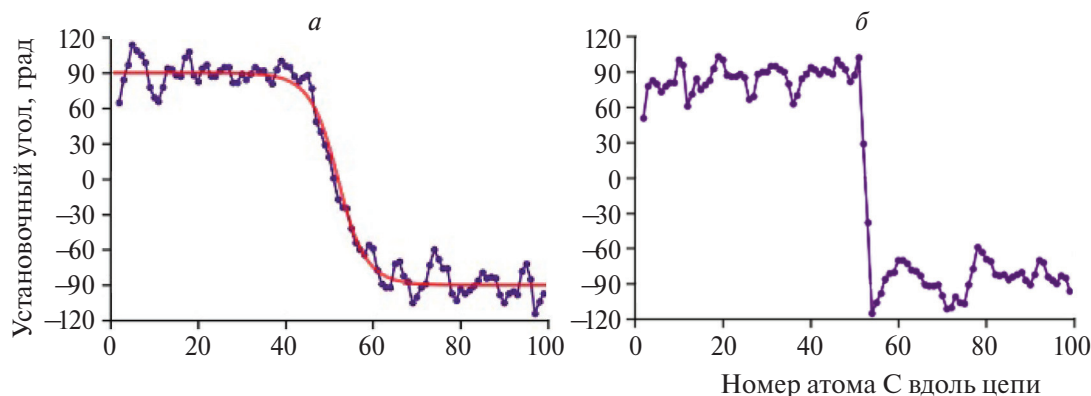


Рис. 2. Профили локальных установочных углов вдоль полимерной цепи, содержащей один региодефект: *а* — кинк-подобный профиль без двугранных углов в *гош*-конформации; красной линией показано аналитическое односолитонное решение уравнения синус-Гордона, *б* — типичный профиль с тремя двугранными углами в *гош*-конформации около региодефекта.

раллельно, то цепочка вблизи региодефекта вынуждена деформироваться, чтобы развернуть ориентацию диполей параллельно общему дипольному моменту кристалла. Молекулярно-динамические расчеты показывают, что при наличии региодефектов, существует два варианта разворота цепочки на 180° . В первом случае вблизи региодефекта образуются несколько *гош*-конформаций, которые на участке в 3–4 мономера разворачивают цепочку на 180° . Во втором случае, *гош*-конформации вблизи региодефектов отсутствуют, и разворот цепочки на 180° происходит плавно. Молекулярно-динамические расчеты для обоих случаев показаны на рис. 2. В настоящей работе мы будем изучать второй случай.

Антипараллельная ориентация соседних дипольных моментов на региодефекте означает, что соответствующий член взаимодействия меняет знак: $E = \kappa d^2 \mathbf{n}_i \mathbf{n}_{i+1}$. Для дальнейшего анализа удобно параметризовать единичные вектора углом φ_i в плоскости, перпендикулярной оси цепочки: $\mathbf{n}_i = (\cos \varphi_i, \sin \varphi_i)$. Тогда выражение для энергии цепочки примет вид

$$E = -\sum J_i \cos(\varphi_i - \varphi_{i+1}) - h \sum \cos \varphi_i. \quad (2)$$

Здесь $h = \mathcal{E}d$, $J_i = -\kappa d^2$ для региодефекта и $J_i = \kappa d^2$ в остальных случаях.

Поскольку мы рассматриваем низкие температуры, при которых взаимные отклонения дипольных моментов соседних мономеров малы, то можно применить так называемое континуальное приближение, при котором вместо набора переменных φ_i вводится непрерывное поле $\varphi(x)$. Тогда,

в случае отсутствия региодефектов выражение для функционала энергии примет вид

$$E[\varphi] = \int \left[\frac{J}{2} \left(\frac{\partial \varphi}{\partial x} \right)^2 - h \cos \varphi \right] dx. \quad (3)$$

Минимизация функционала (3) приводит к нелинейному уравнению типа уравнения синус-Гордона [15]:

$$J \frac{\partial^2 \varphi}{\partial x^2} - h \sin \varphi = 0. \quad (4)$$

Тривиальное решение этого уравнения: $\varphi(x) = 0$, соответствует полностью поляризованному состоянию и, очевидно, имеет минимальную энергию для цепочки без региодефектов.

При наличии региодефектов на каждом из них необходимо задавать специальное граничное условие, которое обеспечивает антипараллельность дипольных моментов соседних мономеров. Для региодефекта, расположенного в точке x_0 , оно имеет вид

$$\lim_{x \rightarrow +x_0} \varphi(x) - \lim_{x \rightarrow -x_0} \varphi(x) = \pi. \quad (5)$$

Сначала рассмотрим случай одного региодефекта в цепочке. В этом случае в силу симметрии граничное условие (5) превращается в

$$\lim_{x \rightarrow +x_0} \varphi(x) = - \lim_{x \rightarrow -x_0} \varphi(x) = \frac{\pi}{2}.$$

Уравнение (4) с таким граничным условием имеет точное решение:

$$\varphi(x) = 4 \arctan \left[\left(\sqrt{2} - 1 \right) \exp(|x| \sqrt{h/J}) \right]. \quad (6)$$

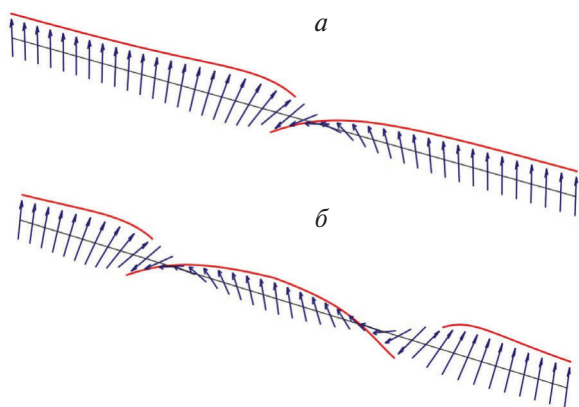


Рис. 3. Схематичный рисунок ориентации мономеров цепи ПВДФ вблизи одного региодефекта (а) и на участке цепи между двумя региодефектами (б).

Это решение схематично показано на рис. 3а. Из уравнения (6) следует, что характерная ширина кинка (доменной стенки), на котором система переходит в поляризованное состояние, $\sim \sqrt{J/h}$. Эту ширину можно оценить из сравнения с МД-расчетами, показанными на рис. 2а. Как видно из этого рисунка, уравнение (6) прекрасно согласуется с МД-расчетами [14], ширина кинка при этом равна $\sqrt{J/h} \approx 4$ мономерам.

Рассмотрим теперь случай, когда региодефекты располагаются периодически на расстоянии l друг от друга. В этом случае достаточно рассмотреть один участок между двумя соседними региодефектами. Этот участок цепи описывается уравнением (4) со следующими граничными условиями на краях: $\varphi(0) = \varphi(l) = \pi/2$. Аналитическое решение уравнения (4) с такими граничными условиями неизвестно, поэтому проведем анализ предельных случаев.

Введем безразмерный параметр, который характеризует отношение расстояния между региодефектами l к ширине кинка:

$$\xi = \frac{l}{2} \sqrt{h/J}. \quad (7)$$

В режиме, когда расстояния между дефектами намного меньше ширины кинка, т.е. при $\xi \ll 1$, приближенное решение уравнения (4) имеет вид

$$\varphi(x) = \frac{\pi}{2} - h \frac{x(l-x)}{2J}. \quad (8)$$

Энергия на участке $[0, l]$ в этом случае равна

$$E = -\frac{h^2 l^3}{24J}. \quad (9)$$

В режиме, когда расстояния между дефектами много больше ширины кинка, т.е. при $\xi \gg 1$, решение уравнения (4) можно приближенно записать в виде

$$\varphi(x) = 4 \arctan \left[\frac{\sqrt{2}-1}{\cosh \xi} \cosh \left(\frac{2x-l}{l} \xi \right) \right]. \quad (10)$$

Это решение схематично показано на рис. 2б. Энергия в этом случае равна

$$E = -hl + 4\sqrt{Jh}. \quad (11)$$

Приближенное выражение для энергии, имеющее правильные асимптотики (9) и (11), можно представить в виде

$$E = -hl \frac{\xi^2}{\xi^2 + 2\xi + 6}. \quad (12)$$

Следующий шаг нашего анализа — учет тепловых флуктуаций. Тепловые флуктуации при низких температурах приводят к небольшим отклонениям углов φ_i от их оптимальных значений. В континуальном приближении это приводит к малым вариациям $\varphi(x)$ около решения уравнения Эйлера (3), которое мы обозначим за $\varphi_0(x)$, так что $\varphi(x) = \varphi_0(x) + \chi(x)$. Тогда функционал энергии между двумя дефектами на расстоянии l можно представить в виде

$$E[\chi] = E[\varphi_0] + \int_0^l \left[\frac{J}{2} \left(\frac{\partial \chi}{\partial x} \right)^2 - h \cos(\varphi_0(x)) \chi^2 \right] dx, \quad (13)$$

где $E[\varphi_0]$ задается уравнением (12).

Линейные члены по $\chi(x)$ в уравнении (13) отсутствуют, поскольку мы рассматриваем малые вариации вблизи минимума энергии. Для учета тепловых флуктуаций в первом приближении достаточно вместо $\cos(\varphi_0(x))$ использовать его среднее значение на участке $[0, l]$, которое приближенно равно

$$\cos(\varphi_0(x)) = f(\xi) = \frac{1}{2} \left(1 + \tanh^2 \xi - \frac{\tanh \xi}{\xi} \right). \quad (14)$$

Вклад участка $[0, l]$ в статистическую сумму имеет вид функционального интеграла по полю $\chi(x)$:

$$Z = \int D[\chi(x)] \exp \left(-\frac{E[\chi]}{T} \right). \quad (15)$$

Здесь мы использовали шкалу температуры, где постоянная Больцмана $k_B = 1$.

Этот функциональный интеграл совпадает с функциональным интегралом для квантового осциллятора с частотой $\omega = \sqrt{Jh f(\xi)}/T$ и приводит к свободной энергии

$$F = -T \ln Z = E[\varphi_0] + T \ln \left(2 \sinh \left(\xi \sqrt{f(\xi)} \right) \right). \quad (16)$$

Тогда средняя нормализованная поляризация $p = d_i^z/d$ на участке $[0, l]$, и, в силу периодичности на всей цепочке, определяется производной от свободной энергии $p = -(1/l)(\partial F/\partial h)$. В двух предельных случаях средняя нормализованная поляризация равна

$$p = \begin{cases} \frac{l^2}{12J} h - \frac{T}{lh}, & \xi \ll 1, \\ 1 - \frac{2}{l} \sqrt{J/h} - \frac{T}{4\sqrt{Jh}}, & \xi \gg 1. \end{cases} \quad (17)$$

Как показывают МД-расчеты, для реалистичных концентраций региодефектов ($\sim 5\%$), поляризация системы при низких температурах оказывается близкой к максимальной. Поэтому мы уделим особое внимание анализу случая $\xi \gg 1$. В этом случае уравнении (17) присутствуют два члена, уменьшающие поляризацию и имеющие простой физический смысл. Первый член есть доля цепочки вблизи региодефектов, где мономеры не успели подстроиться по полю. Поэтому этот член есть отношение ширины кинка к среднему расстоянию между региодефектами и не зависит от температуры. Второй член в уравнении (17) описывает уменьшение поляризации за счет температурных флуктуаций на участках цепи за пределами кинков. Поэтому он не содержит концентрации региодефектов и получается из анализа классической ферромагнитной цепочки в магнитном поле (3) без дефектов. Известно, что вычисление статистической суммы этой модели сводится к задаче квантового ротатора в “гравитационном” поле [16, 17] и уменьшение поляризации за счет тепловых флуктуаций совпадает с результатом, полученным в работах [16, 17].

Молекулярно-динамические расчеты показывают [14], что поляризация при низких температурах линейно спадает: $p \approx 1 - 3 \cdot 10^{-5} T$. Учитывая полученную ранее оценку ширины кинка, мы можем вычислить параметры модели (2): $J \approx 30\,000$ К, $h \approx 2000$ К, что соответствует электростатическому полю кристалла $\mathcal{E}_{in} = 4 \cdot 10^9$ В/м. Эти оценки показывают, что для температур $T < 300$ К

используемое континуальное приближение оправдано.

Зависимость поляризации от концентрации региодефектов $n_d = l^{-1}$ в МД-расчетах для трех и шести процентов региодефектов оказывается квадратичной: $(1 - p) \sim n_d^2$, в отличие от уравнения (17). Мы полагаем, что это связано с коррелированным взаимодействием соседних цепочек, которое не учитывается в нашей модели.

КВАНТОВАЯ ВЕРСИЯ МОДЕЛИ

Рассмотрим квантовый вариант модели (2), то есть цепочку спинов, которая состоит из n ферромагнитных (индекс “F”) доменов, содержащих по r спинов $s = 1/2$, с антиферромагнитным (индекс “AF”) взаимодействием [15, 18] концевых спинов соседних доменов. Гамильтониан такой модели имеет вид

$$H = -J_F \sum_{k=1}^n \sum_{i=1}^{r-1} \mathbf{S}_{k,i} \mathbf{S}_{k,i+1} + J_{AF} \sum_{k=1}^n \mathbf{S}_{k,r} \mathbf{S}_{k+1,1}. \quad (18)$$

Эта модель имеет ряд интересных свойств в зависимости от отношения обменных интегралов $\lambda = J_F/J_{AF}$. В первом предельном случае, т.е. при $\lambda \ll 1$, основное состояние при фиксированном значении полного спина $0 \leq S_{tot} \leq n(r-2)/2$ имеет следующую структуру: концевые спины соседних доменов образуют синглет, а $(r-2)$ спинов внутри домена можно рассматривать как один суммарный спин $L = (r-2)/2$. В другом предельном случае, т.е. при $\lambda \gg 1$, все r спинов домена образуют спин $\tau = r/2$. В обоих предельных случаях модель сводится к антиферромагнитной гейзенберговской цепочке спинов L или τ с гамильтонианом

$$H = J_{ef} \sum_{k=1}^n \mathbf{R}_k \mathbf{R}_{k+1} \quad (19)$$

где под $\mathbf{R}_k$ подразумеваются $\mathbf{L}_k$ или $\boldsymbol{\tau}_k$. В (19) мы опустили постоянные, а эффективные обменные интегралы при $\lambda \ll 1$ и $\lambda \gg 1$ равны $J_{ef} = J_F^2/[2(r-2)^2 J_{AF}]$ и $J_{ef} = J_{AF}/r^2$, соответственно. Очевидно, что в обоих предельных случаях основное состояние (19) является синглетом, но, как показывают расчеты, оно синглетно и при промежуточных значениях λ . Замечательно, что если $r/2$ является целым числом, в обоих предельных случаях синглет-триплетные возбуждения имеют щель, а для полуцелых чисел $r/2$ спектр модели бесщелевой. Этот факт для модели (19) был предсказан

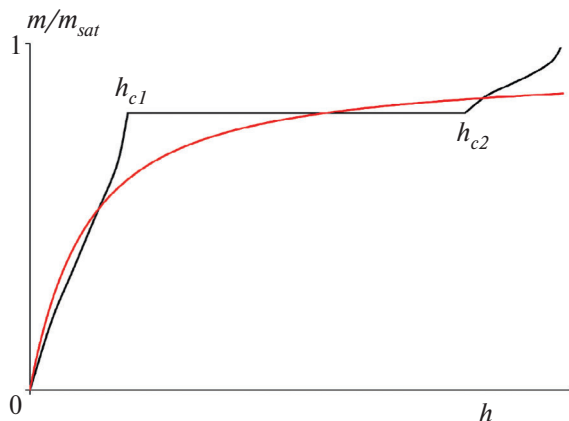


Рис. 4. Схематичный рисунок кривой намагниченности (отнесенной к намагниченности насыщения $m_{sat} = 1/2$) квантовой модели ферромагнитных доменов спинов с антиферромагнитными взаимодействиями на границе доменов (черная кривая). Для сравнения приведена кривая средней нормализованной поляризации классической модели (красная кривая), заданной уравнением (14).

Халдейном [19]. Отметим, что такой же характер спектра имеет место и для промежуточных значений λ .

Одним из наиболее интересных свойств модели (19) является наличие плато на нуль-температурной кривой намагниченности (отнесенной к общему числу спинов $s = 1/2$ в системе), $m(h)$, при $m = 1/2 - 1/r$ (рис. 4). На первый взгляд, это невозможно, поскольку $m(h)$ для модели (19) — непрерывно возрастающая функция h . Отметим, однако, что гамильтониан (19) для предельного случая $\lambda \ll 1$ имеет место в спиновых секторах $S_{tot} \leq S_p = n(r-2)/2$ (для случая $\lambda \gg 1$ он справедлив при всех значениях S_{tot}). Если $S_{tot} = S_p$, то все $(r-2)$ спинов каждого домена поляризованы и состояние с $S_{tot} = S_p + 1$ соответствует переходу одного из синглетов в триплетное состояние и имеется щель $\Delta E_{up} = E(S_p + 1) - E(S_p)$. Верхнее поле плато намагниченности, h_{up} , равно ΔE_{up} . Аналогично, нижнее поле плато ... Ширина плато $W = h_{up} - h_{low}$ и при $\lambda \ll 1$ она равна $W = J_{AF} - \frac{1}{2}J_F + 2(r-2)^2 J_F^2/J_{AF}$.

В пределе же $\lambda \gg 1$ плато отсутствует. Это означает, что при некотором λ_c плато исчезает. Предполагается, что ширина плато стремится к нулю при $\lambda \rightarrow \lambda_c$ с экспоненциальной особенностью (переход Костерлица—Таулеса). Как показано в работе [20], $\lambda_c \approx 5$ для $r = 4$ и $\lambda_c = (m-2)$ в пределе $r \gg 1$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрена задача поведения одиночной цепи полимера поли(ВДФ—ТрФЭ) с региодефектами в электрическом поле при низких температурах. Полимерная цепь описывалась ферромагнитной моделью классических спинов в континуальном приближении. Учитывалось как внешнее, так и наведенное электрическое поле, вызванное поляризацией цепей. Региодефекты описывались теоретически по образцу антиферромагнитного взаимодействия соседних спинов.

В рамках предложенной модели показано, что вблизи региодефектов на определенном участке цепи (доменная стенка, или кинк) происходит плавная переориентация мономеров и аналитически полученный профиль поляризации цепи совпадает с данными, полученными в МД-расчетах. Такая структура цепи вблизи дефекта может приводить к появлению относительно большого свободного объема в кристаллах с региодефектами [21]. Получено аналитическое выражение для зависимости средней поляризации цепи от температуры, электрического поля и концентрации региодефектов. Из сравнения с МД-расчетами проведены оценки величин жесткости связи соседних мономеров и наведенного электрического поля.

Исследована квантовая версия предложенной модели. Показано, что основное состояние является синглетным, а возбуждения могут быть как бесщелевыми, так и со щелью, в зависимости от четности количества мономеров между дефектами. На нуль-температурной кривой намагниченности может наблюдаться плато.

Авторы благодарят Межведомственный суперкомпьютерный центр Российской академии наук за предоставленные вычислительные ресурсы.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (тема исследования № 122041400110-4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tasaka S., Miyasato K., Yoshikawa M. et al. // *Ferroelectrics*. 1984. V. 57. № 1. P. 267.
2. Tasaka S., Ohishi K., Inagaki N. // *Ibid.* 1995. V. 171. № 1. P. 203.
3. Wedel A., von Berlepsch H., Danz R. // *Ibid.* 1991. V. 120. № 1. P. 253.
4. Bae J.-H., Chang S.-H. // *Funct. Compos. Struct.* 2019. V. 1. № 1. P. 012003.

5. Воробьев А.О., Кульбакин Д.Е., Чистяков С.Г. и др. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 11. С. 9.
6. Игнатъева Л.Н., Мащенко В.А., Горбенко О.М. и др. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 11. С. 23.
7. Кочервинский В.В., Градов О.В., Градова М.А. // Успехи химии. 2022. Т. 91. № 11. С. RCR5037.
8. Lu S. G., Rozic B., Kutnjak Z., et al. // Integr. Ferroelectr. 2011. V. 125. № 1. P. 176.
9. Neese B., Chu B., Lu S-G. et al. // Science. 2008. V. 321. № 5890. P. 821.
10. Basso V., Russo F., Gerard J.-F. et al. // Appl. Phys. Lett. 2013. V. 103. № 20. P. 202904.
11. Sultanov V.I., Atrazhev V.V., Dmitriev D.V. et al. // Macromolecules. 2021. V. 54. № 8. P. 3744.
12. Sultanov V.I., Atrazhev V.V., Dmitriev D.V. // J. Polym. Sci. 2023. V. 61. № 18. P. 2091.
13. Anousheh N., Godey F., Soldera A. // J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 2017. V. 55. № 3. P. 419.
14. Sultanov V. I., Atrazhev V. V., Dmitriev D. V. // J. Phys. Chem. B. 2024. V. 128. № 26. P. 6376.
15. Лихачев В.Н., Виноградов Г.А., Эрихман Н.С. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 3.
16. Takahashi M., Nakamura H., Sachdev S. // Phys. Rev. B. 1996. V. 54. № 2. P. R744.
17. Marko J.F., Siggia E.D. // Macromolecules. 1995. V. 28. № 26. P. 8759.
18. Кривнов В.Я., Дмитриев Д.В. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 29.
19. Haldane F.D.M. // Phys. Rev. Lett 1983. V. 50. № 15. P. 1153.
20. Chen W., Hida K., Sanctuary B.C. // J. Phys. Jpn. 2000. V. 69. № 10. P. 3414.
21. Ливанова Н.В., Правада Е.С., Ковалева Л.А., Попов А.А. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 5. С. 43.

IMPACT OF REGIODEFFECTS ON POLARIZATION OF FERROELECTRIC POLYMERS AT LOW TEMPERATURES

V. V. Atrazhev, D. V. Dmitriev, V. Ya. Krivnov*, V. I. Sultanov

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**E-mail: krivnov@deom.chph.ras.ru*

A model is proposed to study the effect of regiodefects on the behavior of ferroelectric polymers in an electric field at low temperatures. Within the framework of the model, it is shown that there is a smooth reorientation of the dipole moments of monomers near the regiodefects, which is in agreement with the data obtained in molecular dynamics (MD) calculations. An analytical expression is obtained for the dependence of the average polarization on temperature, electric field, and concentration of regiodefects. Comparison with MD calculations allows us to estimate the bond stiffness of neighboring monomers and the induced electric field. The quantum version of the proposed model is investigated. It is shown that the ground state is singlet, and excitations can be either gapful or gapless, depending on the parity of the number of monomers between defects. There is a plateau on the zero-temperature magnetization curve.

Keywords: ferroelectric polymers, polyvinylidene fluoride, regiodefect

REFERENCES

1. S. Tasaka, K. Miyasato, M. Yoshikawa, et al., *Ferroelectrics*, **57**, 267 (1984).
<https://doi.org/10.1080/00150198408012768>
2. S. Tasaka, K. Ohishi, N. Inagaki, *Ferroelectrics*, **171**, 203 (1995).
<https://doi.org/10.1080/00150199508018432>
3. A. Wedel, H. von Berlepsch, R. Danz, *Ferroelectrics*, **120**, 253 (1991).
<https://doi.org/10.1080/00150199108008249>
4. J.-H. Bae, S.-H. Chang, *Funct. Compos. Struct.*, **1**, 012003 (2019).
<https://doi.org/10.1088/2631-6331/ab0f48>
5. A.O. Vorobyev, D.E. Kulbakin, S.G. Chistyakov, et al., *Russ. J. Phys. Chem. B* **17**, 1316 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123060106>
6. L.N. Ignatieva, V.A. Mashchenko, O.M. Gorbenko, et al., *Russ. J. Phys. Chem. B* **17**, 1330 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123060039>
7. V.V. Kochervinskii, O.V. Gradov, M.A. Gradova *Russ. Chem. Rev.* **91**, RCR5037 (2022).
<https://doi.org/10.57634/RCR5037>
8. S.G. Lu, B. Rozic, Z. Kutnjak, et al., *Integr. Ferroelectr.* **125**, 176 (2011).
<https://doi.org/10.1080/10584587.2011.574491>
9. B. Neese, B. Chu, S.-G. Lu, et al., *Science* **321**, 821, (2008).
<https://doi.org/10.1126/science.1159655>
10. V. Basso, F. Russo, J.-F. Gerard, et al., *Appl. Phys. Lett.* **103**, 202904 (2013).
<https://doi.org/10.1063/1.4830369>
11. V.I. Sultanov, V.V. Atrazhev, D.V. Dmitriev, et al. *Macromolecules* **54**, 3744 (2021).
<https://doi.org/10.1021/acs.macromol.0c02465>
12. V.I. Sultanov, V.V. Atrazhev, D.V. Dmitriev, *J. Polym. Sci.* **61**, 2091 (2023).
<https://doi.org/10.1002/pol.20230153>
13. N. Anousheh, F. Godey, A. Soldera *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **55**, 419 (2017).
<https://doi.org/10.1002/pola.28407>
14. V. I. Sultanov, V. V. Atrazhev, D. V. Dmitriev, *J. Phys. Chem. B* **128**, 6376 (2024).
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.4c00826>
15. V. N. Likhachev, G. A. Vinogradov and N. S. Erikhman, *Russ. J. Phys. Chem. B* **14**, 391 (2020).
<https://doi.org/10.1134/S1990793120030203>
16. M. Takahashi, H. Nakamura, S. Sachdev *Phys. Rev. B* **54**, R744 (1996).
<https://doi.org/10.1103/PhysRevB.54.R744>
17. J.F. Marko, E.D. Siggia, *Macromolecules* **28**, 8759 (1995). <https://doi.org/10.1021/ma00130a008>
18. V.Ya. Krivnov and D.V. Dmitriev, *Russ. J. Phys. Chem. B* **15**, 89 (2021).
<https://doi.org/10.1134/S199079312101022X>
19. F.D.M. Haldane, *Phys. Rev. Lett.* **50**, 1153 (1983).
<https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.50.1153>
20. W. Chen, K. Hida, B. C. Sanctuary, *J. Phys. Jpn.* **69**, 3414 (2000).
<https://doi.org/10.1143/JPSJ.69.3414>
21. N.M. Livanova, E.S. Pravada, L.A. Kovaleva, A.A. Popov, *Russ. J. Phys. Chem. B* **17**, 738 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123030077>

УДК 577.322.75

ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ДЕНАТУРАЦИИ МОЛЕКУЛЫ ПЛАЗМИНОГЕНА ПРИ ИНДУЦИРОВАННОМ ОКИСЛЕНИИ

© 2024 г. Л. А. Вассерман¹, Е. С. Гаврилина¹, Л. В. Юрина^{1*},
А. Д. Васильева¹, М. А. Розенфельд¹¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: lyu.yurina@gmail.com

Поступила в редакцию 26.03.2024;
после доработки 24.04.2024;
принята в печать 20.05.2024

Статья посвящена исследованию термической денатурации молекулы плазминогена при индуцированном окислении гипохлоритом в концентрациях 30, 62.5, 125 и 250 мкМ. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии было определено, что в присутствии окислителя энтальпия денатурации молекулы плазминогена понижается. Наиболее заметно это проявляется для пика, показывающего плавление крингл-доменов K4–K5. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными по окислительной модификации аминокислотных остатков плазминогена, обработанного гипохлоритом в разных концентрациях, с использованием метода tandemной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). В совокупности полученные данные и результаты предыдущих исследований показывают, что структура полноразмерного плазминогена адаптирована к умеренному окислению, индуцированному HOCl.

Ключевые слова: плазмин(оген), окисление, термическая денатурация, дифференциальная сканирующая микрокалориметрия.

DOI: 10.31857/S0207401X24110058

1. ВВЕДЕНИЕ

Плазминоген является предшественником сериновой протеазы плазмина. Полноразмерный плазминоген (Glu-плазминоген) состоит из 791 аминокислотного остатка и семи доменов — N-концевого PAN-apple домена (PAr), пять крингл-доменов (K1–K5) и серинового протеазного (SP) домена. В физиологических условиях плазминоген превращается в плазмин путем расщепления пептидной связи в петле активации (между Arg561 и Val562) тканевым активатором плазминогена (tPA) или урокиназным активатором плазминогена (uPA) [1, 2]. Плазминоген может принимать две различные конформации, называемые закрытой и открытой. Полноценный плазминоген циркулирует в закрытой конформации и может принимать открытую конформацию при связывании с фибрином или поверхностью клетки. Отщепление PAr-домена от молекулы плазминогена приводит к образованию его альтернативной формы, называемой Lys-плазминогеном, которая принимает открытую конформацию [1]. Плазминоген в открытой конформации принимает гибкую

форму “бусинок на нити”, в которой активационная петля более доступна для расщепления tPA или uPA.

Плазмин(оген) рассматривают в качестве ключевого участника процессов фибринолиза, гемостаза, деградации внеклеточного матрикса и заживления ран. Помимо этого, существуют как прямые, так и косвенные способы, при использовании которых плазминоген и белки системы активации способствуют воспалению, и в последнее время особое внимание уделяется роли плазминогена в регуляции, развитии и прогрессировании заболеваний с воспалительным компонентом. Образование активных форм кислорода (АФК) играет центральную роль в прогрессировании многих воспалительных заболеваний. Нарушение баланса между генерацией АФК и работой антиоксидантных систем организма приводит к чрезмерной выработке АФК. Хлорноватистая кислота (HOCl — OCl) — основной сильный окислитель, вырабатываемый нейтрофилами, и мощный бактерицидный агент. *In vitro* один миллион стимулированных нейтрофилов может произво-

дить 0.1 мкМ HOCl. Такая концентрация HOCl может уничтожить около 15 миллионов бактерий *Escherichia coli* менее чем за 5 мин [3]. Хотя HOCl обладает мощными бактерицидными свойствами и играет важную роль в иммунном ответе, этот окислитель также вызывает повреждение биологических молекул. Концентрации HOCl *in vivo* оцениваются в диапазоне 12–250 мкМ [4].

В ранее проведенных работах нами были выявлены участки окислительных модификаций молекулы плазминогена при индуцированном окислении. Был проанализирован вклад этих модификаций в нарушение структуры и функции исследуемого белка. Был выявлен ряд модификаций функционально значимых остатков ароматических аминокислот (Trp235, Trp417, Trp427, Tyr672 и Trp761), предположительно ответственных за снижение биологической активности плазмина, образованного из окисленного плазминогена. Легко окисляемые остатки метионинов Met57, Met182, Met385, Met404, Met585 и Met788, расположенные в различных частях плазминогена, вероятно, служат перехватчиками АФК. В совокупности данные предыдущих исследований показывают, что структура Glu-плазминогена адаптирована к умеренному окислению, индуцированному HOCl [5].

Цель данной работы — исследование влияния индуцированного гипохлоритом окисления плазминогена на устойчивость структуры его отдельных областей к тепловой денатурации. В данной работе результаты, полученные методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) были сопоставлены с полученными ранее результатами масс-спектрометрии по идентификации окислительных сайтов в белке при его обработке вышеупомянутым окислителем [5]. Это позволит глубже понять механизм повреждения структуры и функции модифицированного белка.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

Объединенный пул образцов донорской плазмы крови был получен от ФГБУ “НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева” Минздрава России.

Полноразмерный плазминоген выделяли из плазмы крови человека методом аффинной хроматографии на Lys-Sepharose 4B, производства компании (Amersham, Britain) при 4 °C и pH 8.0

[6]. Концентрирование и замену буфера на 50 мМ фосфатный буфер, содержащий 150 мМ NaCl при pH 7.4, осуществляли с помощью центробежных фильтров Amicon Ultra (10 кДа, UFC501096, Merck, Germany) в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически на длине волны $\lambda = 280$ нм. Гомогенность плазминогена оценивали методом электрофореза в полиакриламидном геле (4%-ый концентрирующий гель, 12%-ный разделительный гель) восстановленных образцов в присутствии 1%-ного β -меркаптоэтанола в буфере Лэммли [7].

Фибриноген (ФГ) очищали из плазмы человека путем осаждения глицином [8–10] и растворяли в 50 мМ фосфатном буфере, содержащем 150 мМ NaCl, при pH 7.4.

Плазминоген (3 мг/мл) обрабатывали HOCl в разных концентрациях (30, 62.5, 125 и 250 мкМ на 1 мг плазминогена) в течение 1 ч при температуре 37 °C. Реакцию останавливали при десятикратном избытке L-метионина [11, 12].

Превращение плазминогена в плазмин осуществляли с помощью стрептокиназы (Beringwerke, Germany) в молярном соотношении плазминоген:стрептокиназа 100:1 [13]. Время инкубации смеси плазминогена и стрептокиназы составляло 40 мин при 37 °C.

Для оценки влияния окисления молекулы плазминогена на образование продуктов гидролиза фибрина к 125 мкл раствора фибриногена (2 мг/мл) добавляли 15 мкл плазмина (0.1 мг/мл) и инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. Реакцию останавливали путем добавления буфера для образцов с додецилсульфатом натрия без β -меркаптоэтанола и нагреванием при 90 °C в течение 5 мин. Образование продуктов деградации фибрина в результате гидролиза плазмином определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (5%-ный концентрирующий гель, 8%-ный разделяющий гель) в присутствии додецилсульфата натрия.

Термодинамические параметры денатурации плазминогена (3.0 мг/мл) в отсутствие и в присутствии окислителя (гипохлорита натрия) в разных концентрациях определяли с помощью высокочувствительной ДСК на микрокалориметре ДАСМ-4 (Пушино, Россия). Объем образца составлял 0.5 мл в закрытой ячейке. Измерения проводили в области температур 10–90 °C при

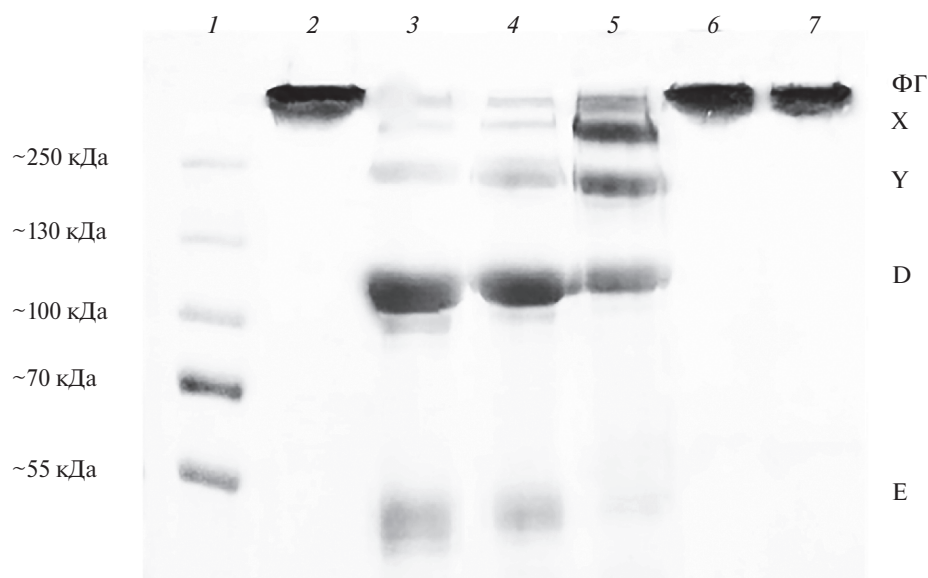


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов деградации фибриногена ФГ, образованных под воздействием плазмينا (5%-ный концентрирующий гель, 8%-ный разделяющий гель). Дорожка 1 – маркерные белки; 2 – негидролизированный фибриноген; 3 – гидролиз фибриногена плазмином, образованным из неокисленного плазминогена; продукты распада фибриногена, продуцируемые плазмином, образованные из: 4 – плазминогена, обработанного 30 мкМ HOCl/OCl ; 5 – плазминогена, обработанного 62.5 мкМ HOCl/OCl ; 6 – плазминогена, обработанного 125 мкМ HOCl/OCl ; 7 – плазминогена, обработанного 250 мкМ HOCl/OCl .

постоянном давлении 2.5 МПа и скорости нагревания $1^\circ\text{C}/\text{мин}$. Шкалу избыточной теплоемкости для каждого эксперимента калибровали с помощью эффекта Джоуля–Ленца [14]. В качестве раствора сравнения при измерении использовали 50 мМ фосфатный буфер (150 мМ NaCl, pH 7.4).

Средние значения термодинамических параметров денатурации определяли из не менее чем трех параллельных измерений. Значение температуры денатурации каждого перехода соответствовало его максимуму на термограмме. Значение экспериментальной энтальпии денатурации соответствовало площади под пиком кривой избыточной теплоемкости как функции температуры. Энтальпию денатурации и температуры переходов определяли с помощью программы НАИРТА, ИНЭОС РАН. Расчет молярной энтальпии денатурации (ΔH) проводили на 1 моль плазминогена.

Для деконволюции термограмм применяли программу Peak Fit (AISN Software Incorporated, Vers. 4). Рассчитывали термодинамические параметры, соответствующие каждому термодинамическому переходу.

Результаты

Опосредованный плазмином гидролиз фибриногена приводил к накоплению продуктов распада

фибриногена – фрагментов X, Y, D и E. Окисление плазминогена 30 мкМ HOCl/OCl (рис.1, дорожка 4) практически не влияло на накопление продуктов распада фибриногена по сравнению с таковыми для контрольного образца (дорожка 3). При окислении плазминогена 62.5 мкМ HOCl/OCl (дорожка 5), наблюдалось снижение активности образованного из него плазмينا, о чем свидетельствует снижение содержания позднего продукта распада фибриногена, фрагмента E, и увеличение количества ранних и промежуточных продуктов, фрагментов X и Y; при этом сохраняется часть исходного фибриногена. В то же время при более высокой дозе окислителей (125 и 250 мкМ HOCl/OCl) ферментативная активность молекул плазмينا практически исчезает, о чем свидетельствовала сохранность большей части исходного фибриногена (дорожки 6 и 7).

На рис. 2 представлены ДСК-термограммы, а в табл. 1 приведены термодинамические параметры денатурации интактного плазминогена и в присутствии окислителя при разных его концентрациях. В качестве окислителя использовали гипохлорит натрия.

Из приведенных на рис. 2 ДСК-термограмм видно, что на кривых денатурации плазминогена наблюдаются три перехода: низкотемпературный

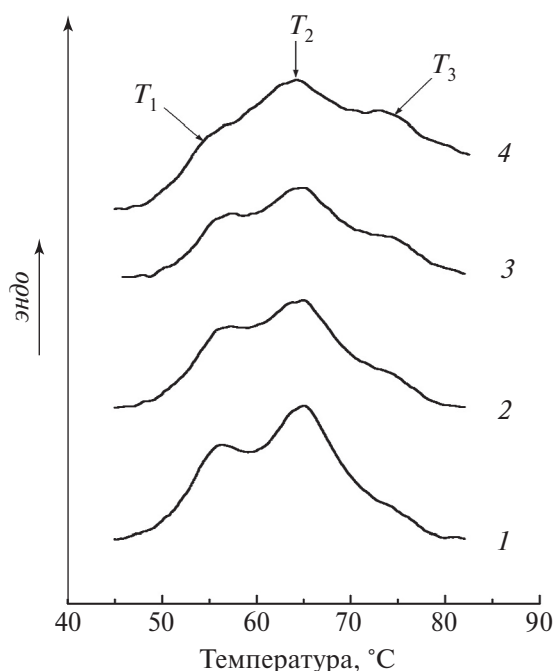


Рис. 2. ДСК-Термограммы денатурации контрольного образца плазминогена (1) и образцов, обработанных гипохлоритом натрия в разных концентрациях: 62.5 мкМ (2), 125 мкМ (3), 250 мкМ (4), 50 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, 150 мМ NaCl, концентрация плазминогена – 3 мг/мл; T_1 , T_2 , T_3 – температуры денатурации переходов.

в области 56–58 °С, промежуточный (второй) в области 65 °С и высокотемпературный в области 74 °С. Наличие нескольких температурных переходов на ДСК-термограммах наблюдали и ранее [15]. Следует отметить, что при повторном сканировании на ДСК-термограмме не наблюдается каких-либо температурных переходов, что коррелирует с литературными данными для применяемых условий (pH 7.4) [15]. Ранее было показано, что в нейтральных средах денатурация плазминогена происходит необратимо, тогда как в кислых средах она является обратимым процессом [15, 16].

Таблица 1. Термодинамические параметры денатурации контрольного и обработанных HOCl образцов плазминогена 50 мМ (фосфатный буфер, pH 7.4, 150 мМ NaCl)

Концентрация окислителя, мкМ	ΔH , кДж/Моль	T_1 , °С	T_2 , °С	T_3 , °С
0	1.48 ± 0.13	56.3 ± 0.1	65.1 ± 0.1	74.2 ± 0.1
62.5	1.25 ± 0.13	57.1 ± 0.1	65.0 ± 0.2	73.6 ± 0.1
125	1.02 ± 0.11	57.3 ± 0.1	63.7 ± 0.1	74.0 ± 0.1
250	0.78 ± 0.13	57.7 ± 0.1	65.1 ± 0.2	74.1 ± 0.1

Примечание: T_1 , T_2 и T_3 – температуры денатурации переходов (доменов); ΔH – суммарная энтальпия денатурации плазминогена.

При окислении плазминогена гипохлоритом натрия наблюдается уменьшение общей молярной энтальпии денатурации. При этом температура низкотемпературного перехода с увеличением концентрации окислителя немного возрастает, а температуры второго и высокотемпературного переходов близки к соответствующим значениям для контрольного образца плазминогена. Очевидно, что окислительная модификация плазминогена гипохлоритом натрия сопровождается нарушениями структуры белка. Причем, чем больше концентрация окислителя, тем больше окислительная модификация плазминогена.

Известно, что деконволюция функции избыточной теплоемкости позволяет разрешить все температурные переходы и оценить их термодинамические параметры (температуру и энтальпию) [17]. Деконволюцию кривых теплоемкости делали, исходя из модели независимых переходов “все или ничего”. Результаты деконволюции приведены на рис. 3 и в табл. 2.

Показано, что в нейтральной среде структура молекулы плазминогена представлена в виде семи доменов, которые соединены пептидными связями [6]. В плазминогене присутствуют пять крингл-структур между аминокислотными остатками 79–560. Каждая крингл-структура является независимой единицей и может плавиться кооперативно или более-менее независимо от других доменов плазминогена.

Из приведенных данных видно, что температура денатурации низкотемпературного перехода при увеличении концентрации окислителя практически не меняется, что сопровождается уменьшением доли молярной энтальпии перехода в общей экспериментальной энтальпии денатурации и значения энтальпии перехода по сравнению с соответствующими значениями для контрольного образца плазминогена. Можно предположить, что

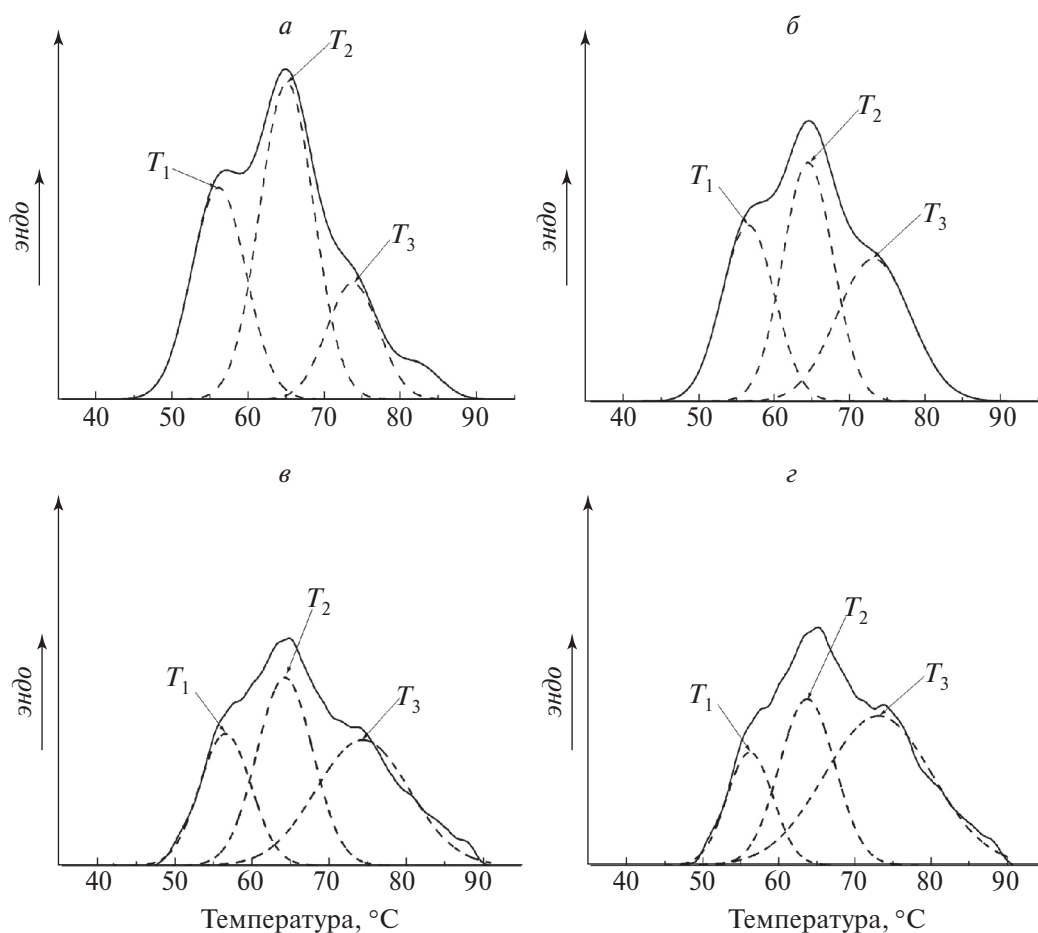


Рис. 3. Деконволюция ДСК-термограмм денатурации контрольного образца плазминогена (а) и образцов, обработанных гипохлоритом натрия в разных концентрациях: 62.5 мкМ (б), 125 мкМ (в); 250 мкМ (г) на 1 мг белка; 50 мМ фосфатный буфер, pH 7.4, 150 мМ NaCl, концентрация плазминогена – 3 мг/мл. Сплошные линии – экспериментальная ДСК-термограмма, штриховые – результат деконволюции ДСК-термограмм, где T_1 , T_2 и T_3 соответствуют температурным переходам.

с увеличением концентрации окислителя происходит большее нарушение структуры доменов, ответственных за низкотемпературный переход, что сопровождается уменьшением их доли в общей молярной экспериментальной энтальпии денату-

рации и энтальпии низкотемпературного перехода плазминогена. Температура денатурации, как и доли молярной энтальпии перехода в общей экспериментальной энтальпии денатурации, а также значения энтальпии перехода второго темпера-

Таблица 2. Результаты деконволюции термограмм денатурации контрольного образца плазминогена и образцов, обработанных HOCl 50мМ (фосфатный буфер, pH 7.4, 150 мМ NaCl)

Концентрация окислителя, мкМ	Низкотемпературный переход			Второй температурный переход			Высокотемпературный переход		
	T_1 , °C	α_1 , %	ΔH_1 , кДж/М	T_2 , °C	α_2 , %	ΔH_2 , кДж/М	T_3 , °C	α_3 , %	ΔH_3 , кДж/М
0	56.1	32.0	0.47	65.0	46.6	0.69	74.0	21.4	0.32
62.5	56.5	29.3	0.37	64.4	37.8	0.47	73.2	33.0	0.41
125	56.4	23.5	0.24	64.3	36.3	0.37	74.4	40.2	0.41
250	56.2	17.1	0.13	63.7	30.3	0.24	73.1	52.6	0.41

Примечание: T_1 , T_2 и T_3 – температуры денатурации переходов (доменов); α_1 , α_2 и α_3 – доли молярной энтальпий переходов(доменов) в общей экспериментальной энтальпии денатурации; ΔH_1 , ΔH_2 , ΔH_3 – энтальпии переходов, полученные исходя из общей экспериментальной молярной энтальпии плавления.

турного пика с увеличением концентрации гипохлорита натрия уменьшаются по сравнению с соответствующими показателями для контрольного образца плазминогена. Таким образом, в результате действия окислителя также происходят нарушения в структуре доменов, ответственных за этот температурный переход. Температура перехода в области 74 °С практически не меняется с увеличением концентрации окислителя, но доли молярной энтальпии перехода в общей экспериментальной энтальпии денатурации возрастают. При этом значение энтальпии денатурации незначительно увеличивается при концентрации гипохлорита натрия 62.5 мкМ по сравнению с соответствующим значением для контрольного образца плазминогена, и дальнейшее увеличение концентрации окислителя не влияет на данную характеристику. Поэтому можно предположить, что некоторые домены, ответственные за данный температурный переход, проявляют большую устойчивость к воздействию окислителя.

Таким образом, при окислении плазминогена наблюдается нарушение структуры доменов, ответственных за низкотемпературный и второй температурный переход. В то же время домены, ответственные за высокотемпературный переход, более устойчивы к окислению.

Согласно [15], низкотемпературный переход соответствует плавлению крингл-доменов K1–K3, второй переход соответствует плавлению K4–K5, а также PAr-домена, высокотемпературный – серинового протеазного домена.

3. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным ДСК известно, что в присутствии окислителя энтальпия денатурации молекулы плазминогена понижается. Наиболее заметно это проявляется для пика, показывающего плавление доменов K4–K5, что согласуется с полученными ранее методом ВЭЖХ-МС/МС данными по окислительной модификации аминокислотных остатков плазминогена, обработанного гипохлоритом в разных концентрациях. Наибольшему окислению подвергается крингл-домен K–4. В этом домене были идентифицированы следующие окисленные аминокислотные остатки: Met385, Tyr397, Met404 и Trp417. В крингл-доме K-5 были обнаружены два окисленных аминокислотных остатка триптофана – Trp486 и Trp523. В

PAN-apple домене был идентифицирован только окисленный Met57 [5].

Доля молярной энтальпии низкотемпературного перехода, соответствующего плавлению крингл-доменов 1–3, снижается несколько меньше. Согласно данным масс-спектрометрии в K-1 были обнаружены окисленные Tyr80 и Trp 108. В K-2 были выявлены окислительные модификации следующих аминокислотных остатков: Met182, Trp190, Trp235. В крингл-доме K-3 были идентифицированы окисленные Tyr304 и Trp 325 [5]. При этом известно, что Trp235 играет роль в междоменных взаимодействиях молекулы плазминогена и, следовательно, отвечает за поддержание конформации молекулы. Изменение конформации молекулы белка может привести к нарушению его стабильности, что может вызвать понижение молярной энтальпии температурных переходов, характеризующих плавление некоторых доменов.

Доля молярной энтальпии высокотемпературного перехода, соответствующего плавлению SP-домена, в общей экспериментальной энтальпии денатурации растет. Это свидетельствует о том, что даже при окислении этого домена он остается устойчивым к тепловой денатурации. SP-домен содержит каталитическую триаду (His603, Asp646 и Ser741) и является наиболее значимым для ферментативной активности плазмин(огена). В SP-доме были обнаружены следующие окисленные аминокислотные остатки: Met585, Tyr672, Trp685, Trp761 и Met788. Известно, что Tyr672, так же, как и Trp235 из K-2, отвечает за поддержание междоменных взаимодействий в молекуле плазминогена [5].

При окислении плазминогена небольшими концентрациями НОСl первыми в окислительные модификации вовлекаются аминокислотные остатки метионина, расположенные на поверхности белка. Окисление остатков метионина до метионинсульфооксида может приводить к нарушению конформации молекулы белка. При этом наблюдается нарушение укладки полипептидной цепи, что, в свою очередь, приводит к обнажению более гидрофобных, чем метионин, аминокислотных остатков, которые теперь также доступны для окислителя [18]. Такое нарушение конформации может приводить к дальнейшей дестабилизации белка, а также к его агрегации.

Данная работа выполнена при бюджетном финансировании по госзаданию (тема № 01201253311).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Miles L.* // Trends in Cardiovascular Medicine. 2003. V. 13. № 1. P. 21; doi: 10.1016/S1050-1738(02)00190-1
2. *De Souza L.R., Melo P.M., Paschoalin T. et al.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun.. 2013. V. 433, № 3. P. 333. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.001
3. *McKenna S.M., Davies K.J.A.* // Biochem. J. 1988. V. 254. № 3. P. 685; doi: 10.1042/bj2540685
4. *Ulfig A., Leichert L.I.* // Cell. Mol. Life Sci. 2021. V. 78. № 2. P. 385; doi: 10.1007/s00018-020-03591-y
5. *Vasilyeva A. Yurina L., Ivanov V. et al.* // Intern. J. of Biolog. Macromol. 2022. V. 206. P. 64; doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.02.128
6. *Deutsch D.G., Mertz E.T.* // Science. 1970. V. 170. № 3962. P. 1095; doi: 10.1126/science.170.3962.1095
7. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680; doi: 10.1038/227680a0
8. *White N.J., Wang Y., Fu X. et al.* // Free Radical Biol. and Med. 2016. V. 96. P. 181; doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.023
9. *Васильева А.Д., Юрина Л.В., Азарова Д.Ю. и др.* // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 51; doi: 10.31857/S0207401X220201455
10. *Юрина Л.В., Васильева А.Д., Евтушенко Е.Г. и др.* // Хим. физика. 2024. V. 43. № 4. С. 81.
11. *Lau W.-H., White N.J., Yeo T.-W. et al.* // Sci. Rep. 2021. V. 11. № 1. 15691; doi: 10.1038/s41598-021-94401-3
12. *Шайтан К.В.* // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 6. С. 40; doi: 10.31857/S0207401X23060109
13. *Васильева А.Д., Юрина Л.В., Щеголихин А.Н. и др.* // Докл. АН. 2019. Т. 488. №5. С. 560; doi: 10.31857/S0869-56524885560-566
14. *Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Константинова Т.В. и др.* // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 28; doi: 10.31857/S0207401X23010107
15. *Castellino F.J., Ploplis V.A., Powell J.R., Strickland D.K.* // J. Biol. Chem. 1981. V. 256. № 10. P. 4778.
16. *Novokhatny V.V., Kudinov S.A., Privalov P.L.* // J. of Mol. Biol. 1984. V. 179. № 2. P. 215; doi: 10.1016/0022-2836(84)90466-2
17. *Freire E., Biltonen R.L.* // Biopolymers. 1978. V. 17. № 2. P. 481; doi: 10.1002/bip.1978.360170213
18. *Розенфельд М.А., Юрина Л.В., Васильева А.Д.* // Успехи соврем. биологии. 2021. Т. 141. № 4. С. 315; doi: 10.31857/S0042132421040050

STUDY OF THERMAL DENATURATION OF THE PLASMINOGEN MOLECULE UNDER INDUCED OXIDATION

L. A. Wasserman¹, E. S. Gavrilina¹, L. V. Yurina^{1*}, A. D. Vasilyeva¹, M. A. Rosenfeld¹

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*E-mail: lyu.yurina@gmail.com

The article is devoted to the study of thermal denaturation of the plasminogen molecule during induced oxidation by hypochlorite in a concentration range (30, 62.5, 125 and 250 μM). By differential scanning calorimetry, it was determined that in the presence of an oxidizing agent, the enthalpy of denaturation of the plasminogen molecule decreases. This is most noticeable for the peak showing the melting of the K4-K5 domains. These results are consistent with previously obtained data on the oxidative modification of amino acid residues of plasminogen treated with different concentrations of hypochlorite using the HPLC-MS/MS method. Taken together, these data and the results of previous studies indicate that the structure of Glu-plasminogen is adapted to moderate HOCl-induced oxidation.

Keywords: plasmin(ogen), oxidation, thermal denaturation, differential scanning calorimetry (DSC).

REFERENCES

1. L. Miles, Trends in Cardiovascular Medicine. **13**(1), 21–30 (2003).
doi: 10.1016/S1050-1738(02)00190-1
2. L.R. De Souza, P.M. Melo, T. Paschoalin, et al., Biochemical and Biophysical Research Communications. **433**(3), 333–337 (2013).
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.03.001
3. S.M. McKenna, K.J.A. Davies, Biochemical Journal. **254**(3), 685–692 (1988).
doi: 10.1042/bj2540685
4. A. Ulfig, L.I. Leichert, Cell. Mol. Life Sci. **78**(2), 385–414 (2021).
doi: 10.1007/s00018-020-03591-y
5. A. Vasilyeva, L. Yurina, V. Ivanov, et al., International Journal of Biological Macromolecules. **206**, 64–73 (2022).
doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.02.128
6. D.G. Deutsch, E.T. Mertz, Science. **170**(3962), 1095–1096 (1970).
doi: 10.1126/science.170.3962.1095
7. U.K. Laemmli, Nature. **227**(5259), 680–685 (1970).
doi: 10.1038/227680a0
8. N.J. White, Y. Wang, X. Fu, et al., Free Radical Biology and Medicine. **96**, 181–189 (2016).
doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.023
9. A.D. Vasilyeva, L.V. Yurina, D.Y. Azarova, et al., Russ. J. Phys. Chem. B. **16**, 118–122 (2022).
doi: 10.1134/S1990793122010316
10. L.V. Yurina, A.D. Vasilyeva, E.G. Evtushenko, et al., Russ. J. Phys. Chem. B. **18**(2), 521–526 (2024).
doi: 10.1134/S1990793124020349
11. W.H. Lau, N.J. White, T.W. Yeo, et al., Sci Rep. **11**(1), 15691 (2021).
doi: 10.1038/s41598-021-94401-3
12. K.V. Shaitan, Russ. J. Phys. Chem. B. **17**(3), 550–571 (2023).
DOI: 10.1134/S1990793123030259
13. A.D. Vasilyeva, L.V. Yurina, A.N. Shchegolikhin, et al., Dokl Biochem Biophys. **488**(1), 332–337 (2019).
doi: 10.1134/S1607672919050144
14. L.N. Shishkina, M.V. Kozlov, T.V. Konstantinova, et al., Russ. J. Phys. Chem. B. **17**(1), 141–147 (2023).
doi: 10.1134/S1990793123010104
15. F.J. Castellino, V.A. Ploplis, J.R. Powell, D.K. Strickland, J Biol Chem. **256**(10), 4778–4782 (1981).
16. V.V. Novokhatny, S.A. Kudinov, P.L. Privalov, Journal of Molecular Biology. **179**(2), 215–232 (1984).
doi: 10.1016/0022-2836(84)90466-2
17. E. Freire, R.L. Biltonen, Biopolymers. **17**(2), 481–496 (1978).
doi: 10.1002/bip.1978.360170213
18. M.A. Rosenfeld, L.V. Yurina, A.D. Vasilyeva, Biology Bulletin Reviews. **11**(7), 647–664 (2021).
doi: 10.1134/S2079086421070070

УДК 57.03; 53.05

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КОФАКТОРА FAD И NAD(P)H-ОКСИДАЗНЫХ КОМПЛЕКСОВ В СПЛЕНОЦИТАХ МЫШЕЙ И КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ ЛЬЮИС ПРИ АПОПТОЗЕ МЕТОДОМ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2024 г. Е. М. Миль¹, А. А. Албантова^{1*}, Л. И. Матиенко¹,
А. Н. Голощапов¹, М. А. Коровин¹, В. В. Кувыркова¹

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

*E-mail: albantovaaa@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024;
после доработки 24.04.2024;
принята в печать 20.05.2024

В настоящей работе исследовано содержание кофактора FAD и ферментных NAD(P)H-оксидазных комплексов методами флуоресцентной и конфокальной микроскопии (с флуорофорами Appexin V–FITC, 7-AAD (7-Aminoactinomycin D), EtBr) при апоптозе, вызванном анфеном натрия в сочетании с пероксидом водорода в спленоцитах здоровых мышей и в опухолевых клетках карциномы Льюис. Применение этих методов дает возможность наблюдать и количественно оценить апоптотический эффект анфена натрия и пероксида водорода, а также позволяет визуализировать метаболические изменения в клетке, усиление флуоресценции FAD в опухолевых клетках и NAD(P)H-оксидазных комплексов в спленоцитах. Полученные данные свидетельствуют о возможности применения анфена натрия в сочетании с пероксидом водорода в качестве противоопухолевого препарата, действующего на определенные типы клеток.

Ключевые слова: анфен натрия, клетки карциномы Льюис, NAD(P)H-оксидазный комплекс, кофактор FAD.

DOI: 10.31857/S0207401X24110061

1. ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных окислительно-восстановительных пар в клетке является пара кофакторов, FAD и NAD(P)H, между которыми постоянно осуществляется обмен электронами в NAD(P)H-оксидажном комплексе. Никотинамидадениндинуклеотид (NAD(P)H) – эндогенный тканевый флуорофор, который поглощает свет в области длины волны $\lambda = 330$ нм, а флавинадениннуклеотид – (FAD) в области $\lambda = 450$ нм. Поскольку они участвуют во многих клеточных процессах, таких как клеточный метаболизм, работа дыхательной цепи митохондрий, появляется возможность использовать их в качестве маркеров клеточного метаболизма в процессах, происходящих в клетке.

Комплекс NAD(P)H способен флуоресцировать только в восстановленной форме, а флавиновые нуклеотиды и FAD – только в окисленной [1]. Кроме того, NAD(P)H-оксидазный комплекс

с белками присутствует практически во всех клетках на поверхности мембраны и имеет обозначение NOX (1–7).

В данный момент хорошо разработанным методом исследования является лазерно-индуцированная флуоресцентная спектроскопия, которая активно используется в диагностике тканевой гипоксии [1]. Важные особенности методов флуоресцентной и конфокальной микроскопии – наблюдение и исследование живых клеток при развитии апоптоза. Это дает возможность получать дополнительную информацию о протекании метаболических процессов по сравнению с методами атомно-силовой микроскопии [2, 3] и электронной микроскопии [4, 5].

Комплексы NAD(P)H-оксидазы семейства NOX на данный момент являются единственной группой ферментов, у которых главная функция – это выработка активных форм кислорода (АФК). Они представляют собой связанные мембраной

ферменты, способные выполнять перенос электрона от NAD(P)H на молекулярный кислород, образуя при этом супероксид [6]. При этом все NAD(P)H-оксидазы семейства NOX представляют собой интегральные белки мембран, которые содержат шесть трансмембранных спиралей и пять петель, локализованных в водной фазе. В активном центре NAD(P)H-оксидазы на С-концевом участке цепи находится редокс-пара кофакторов FAD и NAD(P)H, близко расположенных друг к другу (расстояние между ними составляет 7.8 Å).

Цель настоящего исследования — оценка содержания клеток с кофактором FAD методом флуоресцентной микроскопии и клеток с NADPH-оксидазными комплексами методом конфокальной микроскопии при воздействии анфена натрия (ANa) в сочетании с пероксидом водорода при развитии апоптоза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методическая часть

В работе в качестве антиоксиданта использовали ANa, (2-(карбокси)-2-(N-ацетиламино)-3-(3',5'-ди-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропионат натрия) — один из антиоксидантных препаратов [7–9], некоторые из которых были синтезированы в Институте химической физики и нашли применение в практике. Препарат растворяли в физиологическом растворе и вводили в суспензию клеток в концентрации 10^{-4} М. В исследовании были использованы белые беспородные мыши, а также мыши-гибриды первого поколения F1 (C57BL/6 × DBA/2), (возраст 3–4 мес., масса 22–25 г) из питомника “Столбовая”, у которых из селезенки выделяли спленоциты. Мышей умертвляли методом декапитации под эфирным наркозом.

Клетки карциномы Льюис мышей выделяли из опухоли на 14-е сутки после трансплантации опухолевых клеток (по методике, изложенной в работе [10]). Для получения суспензии клеток, в том числе клеток опухоли и селезенки спленоцитов, готовили согласно методике из работы [11], измельчали в физиологическом растворе, диспергировали многократно и фильтровали через нейлоновую (100 мкм) сетку. Взвесь клеток осаждали при 150g и ресуспендировали осадок для получения суспензии клеток. Затем вводили реципиентам в объеме 0.2 мл в мышцу бедра задней лапы ($7 \cdot 10^6$ клеток/мышь), либо использовали в экспе-

риментах *in vitro*. Число клеток определяли в камере Горяева. Клетки в присутствии исследуемых соединений инкубировали в течение 2 ч при 37 °C в среде 199 в растворе Хенкса (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАН) для различных условий: в контрольных образцах, при совместном введении анфена натрия (10^{-4} М) и пероксида водорода (5 мкМ), а также при последовательном введении пероксида водорода (5 мкМ) и анфена натрия (10^{-4} М).

Микрофотографии клеток карциномы Льюис получали с помощью метода флуоресцентной микроскопии (объективы с увеличением 40x и 100x) при возбуждении на длине волны $\lambda = 450$ с фильтром $\lambda = 530$ нм, отсекающим возбуждающий свет. В работе использовали микроскоп, производства компании Carl Zeiss (Germany), Jena, оснащенный системой оптического возбуждения на диодных лазерах и фильтрации, после чего происходила фиксация на камеру (HDCCD). Основным используемым флуорофором является Annexin V-FITC, способный связываться с фосфатидилсеринном в апоптотической клетке, создавая при этом зеленое свечение. Известно, что NAD(P)H-оксидазный комплекс содержит в структуре NOX(1–7) и FAD, и находится на внешней стороне мембраны клетки. Благодаря данному явлению количество клеток, подвергнувшихся запрограммированной гибели, определяли на конфокальном микроскопе как отношение окрашенных флуорофором Annexin V-FITC клеток к их общему числу на микрофотографии.

Конфокальные изображения были получены с использованием микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Jena, Germany), оснащенного конфокальным устройством модели CSU-X1 (производства Yokogawa Corporation of America). Расчеты проводились с помощью программы ImageJ. Обнаружено, что в контрольных образцах число нежизнеспособных, мертвых клеток (определяемое по образованию комплекса EtBr с ДНК, красное свечение) составляло около 2–3%. Число клеток с апоптозом (определяемое по флуоресценции Annexin AV-FITC, зеленое свечение) в суспензии спленоцитов составило 1–4%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее методом Western Blotting было установлено, что ANa вызывает апоптоз клеток карциномы Льюис и прекращает размножение клеток

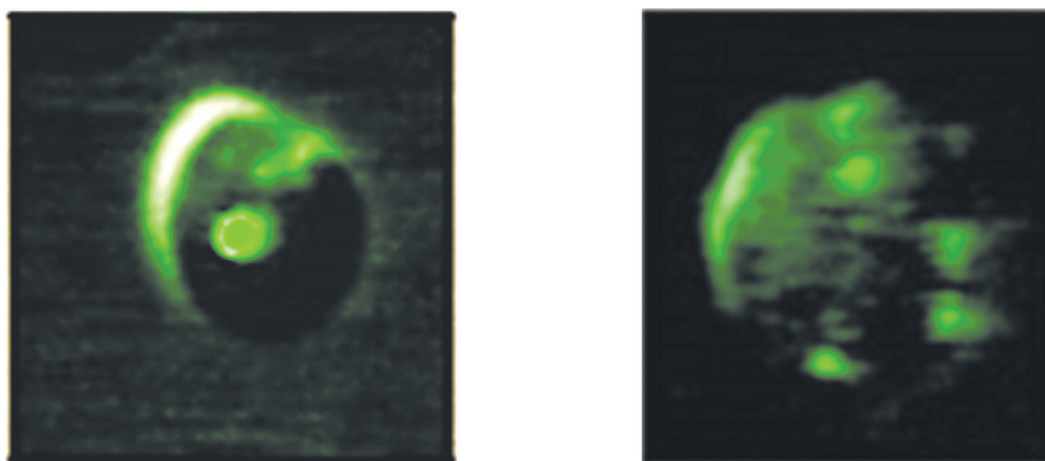


Рис. 1. Флуоресценция FAD в спленоцитах мышей: единичное (слева) и множественное свечение (справа) в клетках при апоптозе.

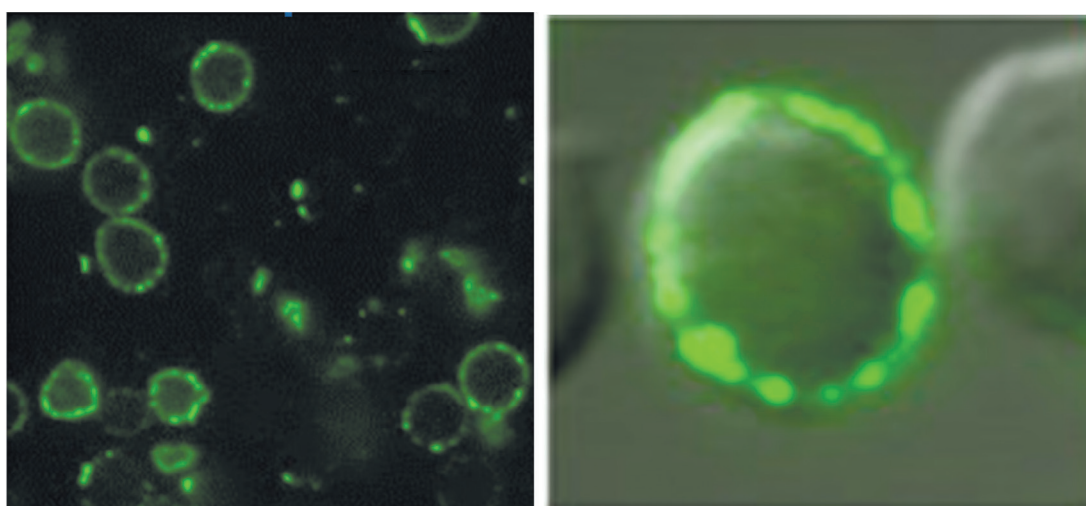


Рис. 2. Микрофотографии спленоцитов при апоптозе, вызванном действием анфена натрия (10^{-4} М), и увеличенное в 6 раз изображение клетки (на мембране видны гранулы NAD(P)H-оксидазных ферментных комплексов NOX). Конфокальный микроскоп с увеличением 100x (флуорофор – Annexin V-FITC).

при трансплантации опухоли. Усиление апоптоза наблюдалось при совместном действии {ANa + H_2O_2 } [12]. В качестве удобной модели здоровых клеток использовали спленоциты мышей.

При регистрации спленоцитов с использованием флуоресцентного микроскопа (описание см. выше) наблюдались яркие структуры, обладающие автофлуоресценцией (рис. 1). Они присутствовали в контрольных образцах и при апоптозе. Их число центров варьировало от 1–2 до 8–10 в разных клетках. Количество клеток с автофлуоресценцией увеличивалось с развитием апоптоза, вызванном действием анфена натрия и пероксида водорода. Ряд клеток (менее 1%) имели увеличенные размеры и размытые флуоресцирующие объекты, возможно, липофусциновые образования. Это

точечное свечение, наблюдаемое в зеленой области, как показано в работах [13, 14], обусловлено в основном кофактором FAD в окисленном состоянии. Он присутствует в том числе в NAD(P)H-оксидазном комплексе. В работах [13, 14] также показано, что кофактор FAD участвует в ряде других окислительно-восстановительных систем, например в митохондриях и связан с флавопротеинами, но его флуоресценция в этих комплексах тушится белками электрон-транспортной цепи.

С другой стороны, при апоптозе спленоцитов, наряду со свечением мембраны в условиях добавления Annexin AV-FITC в конфокальном микроскопе на внешней стороне мембраны видны округлые гранулы (рис. 2). Эти гранулы подобны струк-

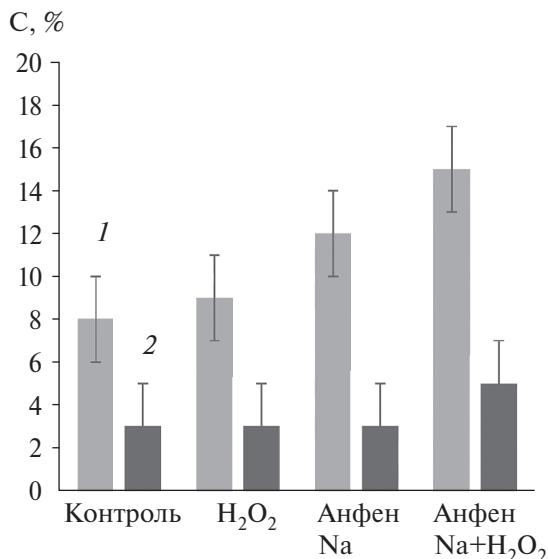


Рис. 3. Диаграмма содержания апоптотических клеток в культуре спленоцитов (флуорофор – AnnexinV-FITC) – 1, количество нежизнеспособных клеток (флуорофор EtBr) – 2. Изменение содержания клеток под действием пероксида водорода (5 мкМ), анфена натрия (10^{-4} М), и при их совместном воздействии.

турам, описанным для многих других клеток [10, 13–15], в частности для нейтрофилов. Наблюдаемые объекты можно отнести к сложным NAD(P)H-оксидазным ферментативным комплексам, называемым NOX(1–7), которые содержатся практически во всех клетках млекопитающих. Основная функция NOX состоит в образовании супероксид-аниона или пероксида водорода. При этом происходит перенос электрона с внутриклеточного NAD(P)H на внеклеточный кислород. Эта система используется клеткой для защиты от бактериального и микробного заражений [14]. Недавно было обнаружено, что комплексы NAD(P)H-оксидазы играют важную роль в ряде патологий, таких как болезнь Альцгеймера и нейродегенеративные заболевания [15, 16]. Оказалось, что экспрессия NOX связана также с канцерогенезом. Например, экспрессия NOX в желудочно-кишечном тракте повышается в аденомах и высоко дифференцированных аденокарциномах [17].

Таблица 1. Процентное содержание апоптотических клеток и клеток с FAD в спленоцитах здоровых животных и опухолевых клеток мышей с карциномой Льюис

Образцы	Клетки в апоптозе, %		Клетки с FAD, %	
	норма	опухоль	норма	опухоль
Контрольный	8	14.8	17	65
Анфен Na	10	31.7	25	60
Анфен Na+H ₂ O ₂	15	73.5	29	73

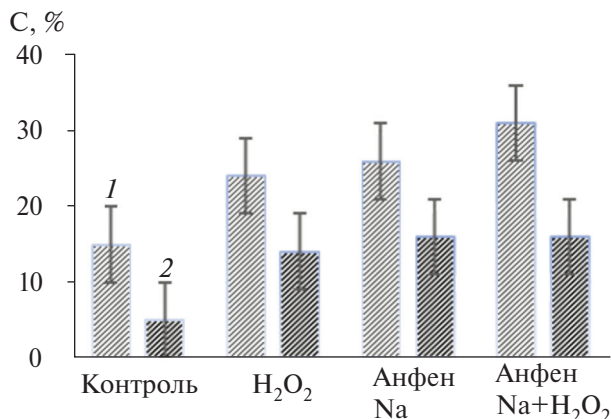


Рис. 4. Процент клеток с флуоресценцией FAD – 1 и иммунофлуоресцией гранул NAD(P)H-оксидазных комплексов – 2 в культуре спленоцитов под действием пероксида водорода (5 мкМ), анфена натрия (10^{-4} М) и при их совместном воздействии.

В настоящей работе было определено число апоптотических клеток, а также число нежизнеспособных клеток при апоптозе спленоцитов, вызванном препаратами. Из рис. 3 видно, что при введении антиоксиданта ANa вместе с пероксидом водорода увеличивается число апоптотических клеток в спленоцитах мышей. Содержание нежизнеспособных клеток остается на невысоком уровне. Это означает, что клетки находятся на начальной стадии апоптоза, и апоптоз в спленоцитах составляет 15% от общего количества клеток. В этих же условиях апоптоз может составлять более 70% в опухолевых клетках (см. табл. 1).

Далее было определено процентное содержание клеток с NAD(P)H-оксидазным комплексом и сопоставлено с содержанием клеток с флуоресценцией FAD. На рис. 4 можно видеть корреляцию между исследуемыми объектами. Это означает, что FAD действительно является частью NAD(P)H-оксидазного комплекса.

Как видно из табл. 1, содержание FAD и число апоптотических клеток при апоптозе, вызванном ANa и {ANa + H₂O₂} в несколько раз больше, чем в спленоцитах здоровых мышей. То есть окисли-

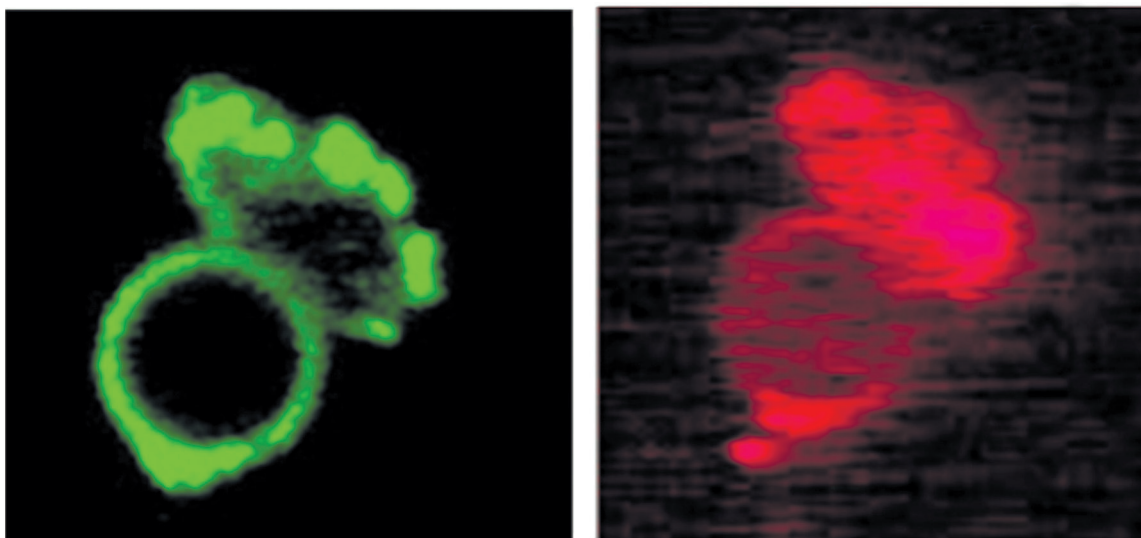


Рис. 5. Микрофотографии нейтрофила в культуре спленоцитов, который находится в стадии нетоза – выброса сети ДНК, окруженной NAD(P)H-оксидазными комплексами – (флуорофор – AnnexinV-FITC(*а*) и 7AAD (*б*)). Конфокальный микроскоп с увеличением 100х.

тельно-восстановительная функция комплекса NADPH увеличивается. В то же время ANa в сочетании с H_2O_2 может рассматриваться в качестве потенциального противоопухолевого препарата, вызывающего быстрый апоптоз (>70%) опухолевых клеток. Ранее было показано, что ANa снижает антиапоптотические белки семейства Bcl-2, воздействуя на митохондриальные пути апоптоза клеток.

В суспензии спленоцитов мышей были обнаружены нейтрофилы, которые находились в стадии нетоза (net – сеть), т.е. связаны с выбросом NAD(P)H-оксидазного комплекса (рис. 5), совместно с обволакиванием микроорганизмов и бактерий сетью ДНК. При этом бактерии, как известно, разрушаются с помощью супероксида или пероксида водорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод флуоресценции в клетках спленоцитов позволил проследить за развитием апоптоза и оценить изменение числа флуоресцирующих клеток с кофактором FAD и клеток с ферментными NAD(P)H-оксидазными комплексами под действием анфена Na и пероксида водорода. Следует отметить, что в клетках мышей с карциномой Льюис было обнаружено многократное увеличение автофлуоресценции FAD как в контрольных образцах, так и при усилении апоптоза, что может быть характерным для животных опухоленосителей. Ранее в работе [18] было показано, что соот-

ношение эндогенных кофакторов FAD и NAD(P)H может рассматриваться в качестве метаболической характеристики раковых заболеваний, а также позволяет оценить воздействие противоопухолевых препаратов. Мы предполагаем, что сложный NAD(P)H-оксидазный комплекс NOX [19–21], может менять локализацию при развитии апоптоза. Так, при начальной стадии апоптоза в ряде клеток наблюдается ровная граница мембраны спленоцита, а при воздействии анфена натрия и пероксида водорода число апоптотических клеток, содержащих гранулы NOX, возрастает. Возможно, что следом за экспозицией фосфадитилсерина, происходит экспозиция NAD(P)H-оксидазного комплекса, вследствие чего наблюдаются выступающие на поверхность мембраны гранулы, окрашенные зеленым цветом (флуорофор Annexin V-FITC).

Наше исследование выполнено по теме, утвержденной Минобрнауки и высшего образования Российской Федерации (minobrnauki.gov.ru), 44.4. “Комплексное изучение механизмов и эффектов действия природных и синтетических антиоксидантов, противоопухолевых препаратов (химические и физические факторы). Изучение биологических механизмов старения”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beloborodova N.V. // General Reanimatology. 2019. V. 15. № 6. P. 62; doi:10.15360/1813-9779-2019-6-62-79

2. *Binyukov V.I., Mil E.M., Matienko L.I., Albantova A.A., Goloshchapov A.N.* // *Micro (MDPI)*. 2023. V. 3. № 2. P. 382;
<http://doi.org/10.3390/micro3020026>
3. *Матиенко Л.И., Миль Е.М., Бинюков В.И.* // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 6. С. 87;
doi: 10.31857/S0207401X20060084
4. *Mcintosh J.R.* // *J. Cell Biol.* 2001. V. 153. No 6. P.25;
doi: 10.1083/jcb.153.6.f25
5. *Захаров Н.С., Попова А.Н., Захаров Ю.А., Пугачёв В.М., Руссаков Д.М.* // *Хим. физика*. 2022. Т. 41. № 7. С. 84;
doi: 10.31857/S0207401X22070172
6. *Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воротников А.В.* // *Биол. мембраны*. 2012. Т. 29. № 1–2. С. 21.
7. *Русина И.Ф., Вепринцев Т.Л., Васильев Р.Ф.* // *Хим. физика*. 2022. Т.41. № 2. С. 12;
<http://doi.org/10.31857/S0207401X22020108>
8. *Герасимов Н.Ю., Неврова О.В., Жигачева И.В., Генерозова И.П., Голощапов А.Н.* // *Хим. физика*. 2023. Т. 42. № 1. С. 22;
doi: 10.31857/S0207401X23010041
9. *Садыков Р.А., Хурсан С.Л., Суханов А.А., Кучин А.В.* // *Хим. физика*. 2023. Т. 42. № 12. С. 3;
doi: 10.31857/S0207401X23120099
10. *Миль Е.М., Бинюков В.И., Ерохин В.Н., Албантова А.А., Володькин А.А., Голощапов А.Н.* // *Цитология*. 2020. Т. 62. № 7. С. 503;
doi: 10.31857/S0041377120070032
11. *Ерохин В.Н., Кременцова А.В., Семенов В.А., Бурлакова Е.Б.* // *Изв. АН. Сер. биол.* 2020. № 5. С. 583.
12. *Миль Е.М., Бинюков В.И., Ерохин В.Н.* // *Докл. АН*. 2018. Т. 482. № 5. С. 598.
13. *Becker W.* // *J. Microsc.* 2012. V. 247. No 2. P. 119;
doi: 10.1111/j.1365-2818.2012.03618.x
14. *Druzkova I.N., Shirmanova M.V., Lukina M.M. et al.* // *Cell Cycle*. 2016. V. 15. № 9. P. 1257;
doi: 10.1080/15384101.2016.1160974
15. *Alen L-A.H.* // *Methods Molec. Biol.* 2007. V. 412. P. 273;
doi:10.1007/978-1-59745-467-4_18
16. *Rokutan K., Kawahara T., Kuwano Y. et al.* // *Antioxidants Redox Signaling*. 2006. V. 8. № 9–10. P. 1573;
doi:10.1089/ars.2006.8.1573
17. *Ma M.W., Wang J., Zhang Q. et al.* // *Mol. Neurodegeneration*. 2017. № 12. P. 7;
<https://doi.org/10.1186/s13024-017-0150-7>
18. *Lukina M. M., Dudenkova V. V., Ignatova N. I. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta – Genetic Subj.* 2018. V. 1862. № 8. P. 1693;
doi: 10.1016/j.bbagen.2018.04.021
19. *Babkina A.S.* // *General Reanimatology*. 2019. V. 15. № 6. P. 50;
<https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-6-50-61>
20. *Vermot A., Petit-Härtlein I., Smith S.M.E., Fieschi F.* // *Antioxidants (Basel)* 2021. V. 10. № 6: P. 890;
doi: 10.3390/antiox10060890
21. *Bedard K., Krause K.H.* // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. № 1. P. 245;
doi:10.1152/physrev.00044.20

DETERMINATION OF THE CONTENT OF FAD COFACTOR AND NAD(P)H-OXIDASE COMPLEXES IN MOUSE SPLENOCYTES AND LEWIS CARCINOMA CELLS UNDER CONDITIONS OF APOPTOSIS BY CONFOCAL MICROSCOPY METHOD

E. M. Mil¹, A. A. Albantova^{1*}, L. I. Matienko¹,
A. N. Goloshchapov¹, M. A. Korovin¹, V. V. Kuvyrkova¹

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

**E-mail: albantovaaa@mail.ru*

In this work, using fluorescence and confocal microscopy, we studied the content of the cofactor FAD and enzymatic NAD(P)H-oxidase complexes (with fluorophores AnnexinV-FITC, 7-AAD (7-aminoactinomycin D), EtBr) under conditions of apoptosis caused by sodium anphen with hydrogen peroxide in healthy mouse splenocytes and Lewis carcinoma tumor cells. The use of fluorescence microscopy allows observing and quantifying the apoptotic effect of sodium anphen and hydrogen peroxide, and visualization of metabolic changes in the cell, including increased fluorescence of FAD in tumor cells and NAD(P)H-oxidase complexes in splenocytes. The data obtained indicate the possibility of using sodium anphen in combination with hydrogen peroxide as an antitumor drug acting on certain types of cells.

Keywords: sodium anphen, Lewis Carcinoma cells, NAD(P)H, FAD.

REFERENCES

1. N.V. Beloborodova, General Reanimatology **15**, 62 (2019);
DOI:10.15360/1813-9779-2019-6-62-79
2. V.I. Binyukov, E.M. Mil, L.I. Matienko, et al., Micro (MDPI) **3**, 382 (2023);
<http://doi.org/10.3390/micro3020026>
3. L.I. Matienko, E.M. Mil, V.I. Binyukov, Russ. J. Phys. Chem. B **14**, 559 (2020);
<https://doi.org/10.1134/S1990793120030227>
4. J.R. McIntosh, J. Cell Biol., **153**, 25 (2001);
<https://doi.org/10.1083/jcb.153.6.F25>
5. N.S. Zakharov, A.N. Popova, Yu.A. Zakharov, et al., Russ. J. Phys. Chem. B **16**, 780 (2022);
DOI:10.1134/s1990793122040170
6. V.A. Tkachuk, P.A. Tyurin-Kuzmin, V.V. Belousov, et al., Biological membranes, **29**, 21 (2012) (in Russian).
7. I.F. Rusina, T.L. Veprintsev, R.F. Vasiliev, Russ. J. Phys. Chem. B **16**, 50 (2022);
<https://doi.org/10.1134/S1990793122010274>
8. N.Yu. Gerasimov, O.V. Nevrova, I.V. Zhigacheva, et al., Russ. J. Phys. Chem. B **17**, 135 (2023);
DOI:10.1134/S1990793123010049
9. R.A. Sadykov, S.L. Khursan, A.A. Sukhanov, et al., Russ. J. Phys. Chem. B **17**, 1251 (2023);
DOI:10.1134/S1990793123060209
10. E.M. Mil, V.I. Binyukov, V.N. Erokhin, et al., Cytology **62**, 503 (2020) (in Russian);
DOI:10.31857/S0041377120070032
11. V.N. Erokhin, A.V. Kremontsova, V.A. Semenov, et al., Bull. Russ. Acad. Sci., Biochemistry No 5, 583 (2020) (in Russian).
12. E.M. Mil, V.I. Binyukov, V.N. Erokhin, Dokl. Chem. **482**, 598 (2018) (in Russian).
13. W. Becker, J. Microscopy **247**, 119 (2012);
DOI:10.1111/j.1365-2818.2012.03618.x
14. I.N. Druzhkova, M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, et al., Cell Cycle **15**, 1257 (2016);
DOI:10.1080/15384101.2016.1160974
15. N.J. Clifton, Methods in molecular biology **412**, 273 (2007);
DOI:10.1007/978-1-59745-467-4_18
16. K. Rokutan, T. Kawahara, Y. Kuwano, et al., Antioxid. Redox. Signal **8**, 1573 (2006);
DOI:10.1089/ars.2006.8.1573
17. M.W. Ma, Wang J., Zhang Q., et al., Molecular Neurodegeneration No 12, 7 (2017);
<https://doi.org/10.1186/s13024-017-0150-7>
18. M.M. Lukina, V.V. Dudenkova, N.I. Ignatova, et al., Biochim. Biophys. Acta - Genetic Subj. **1862**, 1693 (2018);
DOI:10.1016/j.bbagen.2018.04.021
19. A.S. Babkina, General Reanimatology **15**, 50 (2019);
<https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-6-50-61>
20. A. Vermot, I. Petit-Härtlein, S.M.E. Smith, et al., Antioxidants (Basel) **10**, 890 (2021);
DOI:10.3390/antiox10060890
21. K. Bedard, K.H. Krause, Physiol. Rev. **87**, 245 (2007);
DOI:10.1152/physrev.00044.2005

УДК 535.379 : 544.431.7

ВЛИЯНИЕ ХЕЛАТА ЕВРОПИЯ НА КИНЕТИКУ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПРИ СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНОМ ОКИСЛЕНИИ ЛИПИДНЫХ ОБРАЗЦОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2024 г. В. В. Наумов¹, Г. Ф. Федорова¹, Т. Л. Вепринцев¹,
О. И. Яблонская¹, А. В. Трофимов^{1, 2*}

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

²Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия

*E-mail: avt_2003@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024;
после доработки 24.04.2024;
принята в печать 20.05.2024

Химически инертный люминофор — усилитель хемилюминесценции 1,10-фенантролин-трис(теноил-трифторацетонат) трехвалентного европия на порядок усиливает интенсивность свечения при инициированном окислении липидных образцов растительного происхождения (подсолнечное масло). Введение в хемилюминесцентную систему усилителя приводит к изменению характера кинетики, убирая характерные пики на кинетических кривых по окончании периода индукции процесса окисления, но не изменяя величины самого периода индукции. При помощи математического компьютерного моделирования на основе кинетической схемы из 23 элементарных реакций показано, что указанные различия можно объяснить непропорциональным увеличением введенным люминофором квантовых выходов хемилюминесценции от нескольких электронно-возбужденных продуктов (эмиттеров света), образующихся в процессе окисления.

Ключевые слова: хемилюминесценция, 1,10-фенантролин-трис(теноил-трифторацетонат) трехвалентного европия, растительные липиды, свободно-радикальное окисление, кинетика.

DOI: 10.31857/S0207401X24110072

1. ВВЕДЕНИЕ

Исследование хемилюминесценции, сопровождающей окислительные взаимодействия, важно прежде всего для изучения действия активных форм кислорода в большом разнообразии химических и биологических систем, а также механизмов влияния антиоксидантов различной природы на процессы окисления в этих системах [1–11]. В биологических системах и процессах антиоксиданты (биоантиоксиданты) могут как выступать в роли непосредственных перехватчиков активных форм кислорода, так и влиять на редокс-чувствительные сигнальные пути [12, 13]. Понимание особенностей механизмов и кинетического поведения таких процессов, в том числе, в присутствии биоантиоксидантов, способствует разработке эффективных аналитических и биоаналитических подходов, расширяя арсенал методов фотоники биологических объектов с люминесцентных [14–16] до хеми- и биолюминесцентных [17].

Чувствительность хемилюминесцентных методов исследования окислительных и других химических процессов повышается на порядки при использовании усилителей свечения — люминесцирующих веществ, не вступающих в химическое взаимодействие с компонентами реакционной смеси, но увеличивающих квантовые выходы хемилюминесценции за счет переноса (миграции) энергии с электронно-возбужденных продуктов реакции на молекулу люминофора [18–20]. Применение химически инертных усилителей свечения оказывается весьма полезным при исследовании кинетики хемилюминесцентных реакций, так как приводит к многократному (на порядки) увеличению интенсивности излучения, не меняя наблюдаемого кинетического профиля изучаемого процесса. Однако при наличии в системе нескольких эмиттеров хемилюминесценции (продуктов, образующихся в электронно-возбужденном состоянии, способных излучать фотоны), можно предполо-

жить, что суммарный эффект усиления будет меняться в зависимости от структуры и свойств этих веществ. Ранее в опытах без применения усилителей нами было показано что при окислении таких многокомпонентных липидных образцов растительного происхождения, какими являются образцы подсолнечного масла, образуются несколько эмиттеров хемилюминесценции [21].

Поэтому в настоящей работе нами проведено сравнительное изучение кинетики хемилюминесценции при инициированном окислении подсолнечного масла в присутствии усилителя свечения и без него. Для интерпретации полученных результатов использован метод компьютерного математического моделирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

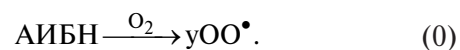
Методика измерения интенсивности хемилюминесценции и экспериментальная установка описаны в работах [22–24]. Исследуемая система содержала 2%-ный или 4%-ный раствор подсолнечного масла в хлорбензоле. Окисление проводили при температуре 60 °С. В качестве источника свободных радикалов использовали инициатор 2,2'-азо-диизобутиронитрил (АИБН) [22, 25–27]. Полученная при этом скорость зарождения свободных радикалов (скорость инициирования) составляла $1 \cdot 10^{-7}$ моль $\cdot$ л $^{-1} \cdot$ с $^{-1}$.

В качестве усилителя хемилюминесценции использовали люминофор 1,10-фенантролин-трис(теноил-трифторацетонат) трехвалентного европия (хелат европия) в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л [28]. Этот хелатный комплекс европия испускает свет в узкой спектральной полосе в районе 613 нм, которой соответствует 80% испускаемых квантов люминесценции [29]. Специальными опытами по окислению углеводородов было установлено отсутствие химического взаимодействия хелата европия с компонентами реакционной смеси [30–32]. Математическое моделирование кинетики проводили по методике, представленной в работах [33–36]. Значения констант скорости элементарных реакций, использованные в расчетах, были взяты из работ [22, 26, 37–39] и пересчитаны к температурам, при которых проводились эксперименты. В случае отсутствия литературных данных были использованы оценки, основанные на аналогии с другими процессами и данных по реакционной способности реагирующих частиц [26].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена кинетика хемилюминесценции при инициированном окислении подсолнечного масла в хлорбензоле в присутствии люминофора и без него. Видно, что введение хелата европия не влияет на величину периодов индукции окисления, но сильно изменяет форму и масштаб кинетических кривых. Характерные пики интенсивности по окончании периодов индукции, получавшиеся в отсутствие люминофора, исчезают (сглаживаются) при его наличии. Поскольку хелат европия химически инертен [30–32], мы предположили различную степень усиления свечения от различных эмиттеров хемилюминесценции в его присутствии. Для подтверждения этого предположения была использована математическая модель, в основу которой положена кинетическая схема процесса окисления, использованная нами ранее [21] для описания кинетики хемилюминесценции в данной системе в отсутствие активатора. Эта схема включает в себя приведенные ниже элементарные реакции (NRP – нереакционноспособный продукт, АОН – антиоксидант).

Стадия зарождения свободных радикалов:



Продолжение цепей окисления и превращения свободных радикалов:

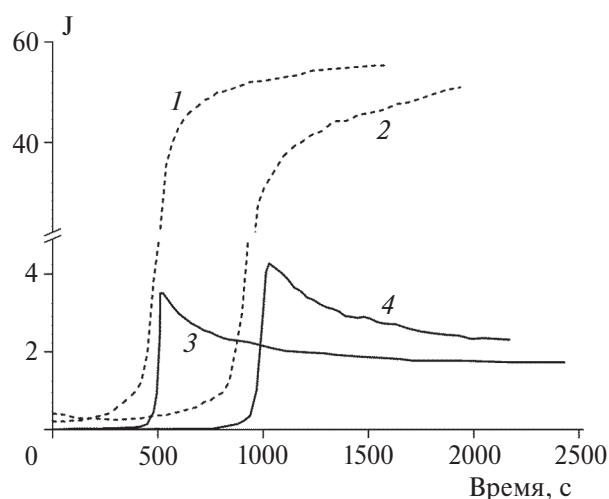
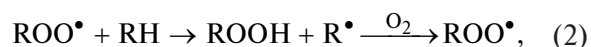
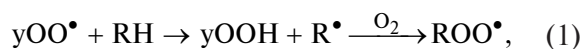
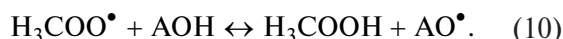
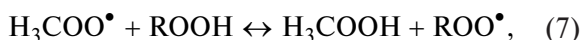
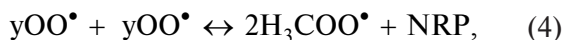
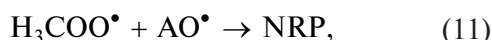


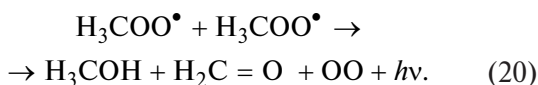
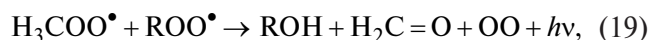
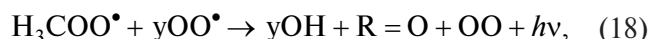
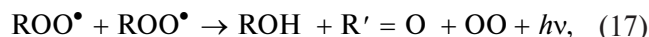
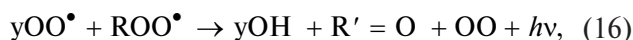
Рис. 1. Кинетика интенсивности (J) хемилюминесценции при инициированном окислении подсолнечного масла в присутствии хелата европия (1, 2) и без него (3, 4). Концентрация масла – 2% (1, 3) и 4% (2, 4) по объему.



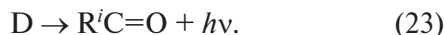
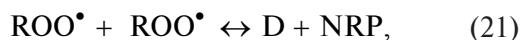
Безызлучательный обрыв цепей окисления:



Хемилюминесцентные реакции:



В настоящей работе кинетическая схема была дополнена реакциями, учитывающими образование (рис. 2) диоксетанов (D) и молекулярную хемилюминесценцию при их распаде [40–45]:



В целях моделирования было сделано предположение, что основными окисляющимися компонентами в подсолнечном масле являются триглицериды, содержащие остатки линолевой кислоты (63.4%), поскольку именно эти вещества наиболее подвержены окислению [46, 47]. С учетом их содержания в масле в качестве исходной концентрации субстрата окисления RH были

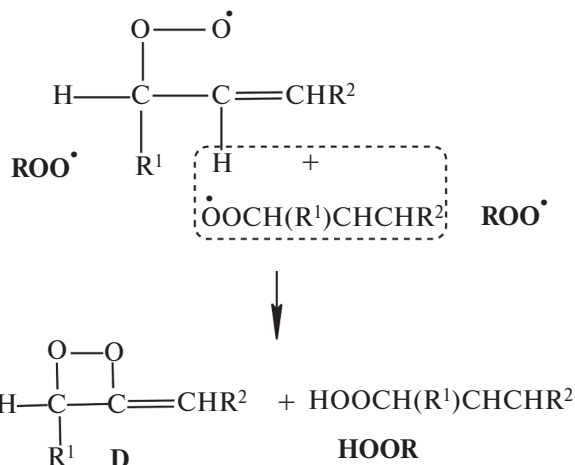


Рис. 2. Схема образования диоксетана (D) при диспропорционировании перекисных радикалов.

приняты значения 0.0134 и 0.0268 М для 2%-ных и 4%-ных растворов масла соответственно [21]. Концентрация присутствующего в масле природного антиоксиданта АОН была подобрана исходя из величины периодов индукции на кинетических кривых в соотношении $[AOH]_0 = 1.87 \cdot 10^{-3} \cdot [RH]_0$. Значения констант скорости варьировали в пределах 1–2 порядков. Ниже приведены значения, использованные для построения графиков модельных кинетических кривых (рис. 3–5): (1) 100, (2) 50, (3) $1.5 \cdot 10^4$, (–3) $1 \cdot 10^5$, (4) $5 \cdot 10^7$; (5) $1 \cdot 10^3$, (6) $1.2 \cdot 10^5$, (–6) $1 \cdot 10^5$, (7) $2 \cdot 10^4$, (–7) $1 \cdot 10^5$, (8) $2 \cdot 10^6$, (–8) $1 \cdot 10^4$, (9) $3 \cdot 10^6$, (–9) $2 \cdot 10^4$, (10) $1 \cdot 10^7$, (–10) $5 \cdot 10^3$, (11) $1 \cdot 10^8$, (12) $1 \cdot 10^4$, (13) $1 \cdot 10^8$, (14) $1 \cdot 10^8$, (15) $1 \cdot 10^3$, (16) $5 \cdot 10^5$, (17) $5 \cdot 10^6$, (18) $2 \cdot 10^7$, (19) $1 \cdot 10^7$, (20) $1 \cdot 10^6$, (21) $1 \cdot 10^4$, (22) $1 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, (23) $1 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$. Исследовали зависимость формы кинетических кривых хемилюминесценции от соотношения квантовых выходов хемилюминесцентных реакций. При этом подразумевалось соотношение, в котором J – интенсивность хемилюминесценции, η_i – квантовый

$$J = \sum_i \eta_i w_i,$$

выход хемилюминесценции i -й реакции в отн. ед., w_i – скорость реакции (i). Параметры η_i варьировали в пределах трех порядков.

Модельные кинетические кривые хемилюминесценции, представленные на рис. 3, иллюстрируют зависимость формы этих кривых от величины квантовых выходов отдельных хемилюминесцентных реакций η_i . Видно, что характерные пики свечения образуются лишь при относи-

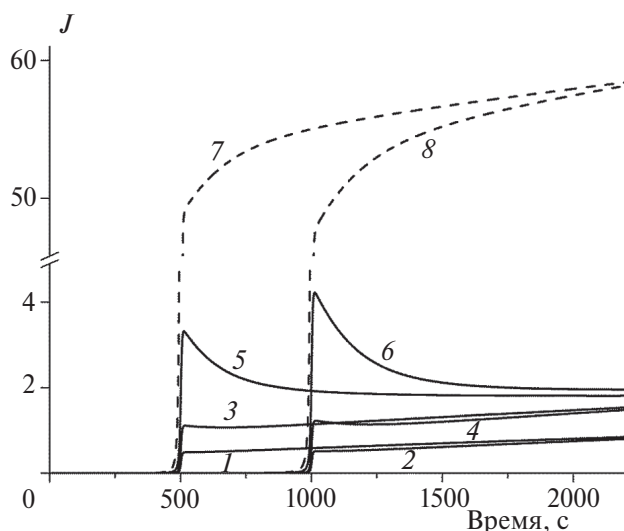


Рис. 3. Модельные кинетические кривые интенсивности (J) хемилюминесценции в присутствии хелата европия (7, 8) и без него (1–6) при инициированном окислении 2%-ного (1, 3, 5, 7) и 4%-ного (2, 4, 6, 8) растворов растительного масла в хлорбензоле и квантовых выходах η_i (в отн. ед.) реакций (16), (17), (18), (19), (20), (23), соотносящихся как: 31 : 4 : 4 : 4 : 4 : 2.1 · 10⁴ (1, 2); 135 : 7 : 7 : 7 : 7 : 3.3 · 10⁴ (3, 4); 1000 : 1 : 1 : 1 : 1 : 0.5 · 10⁴ (5, 6); 500 : 500 : 250 : 850 : 50 : 25 · 10⁴ (7, 8).

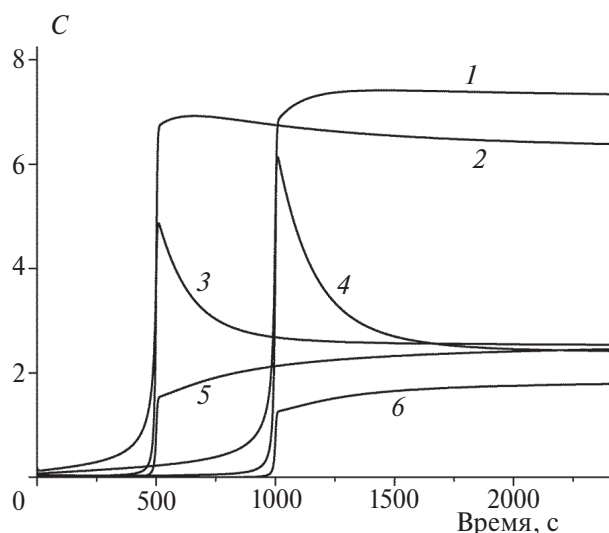


Рис. 4. Изменения концентраций (C) перекисных радикалов ($\cdot 10^8$ M) при компьютерном математическом моделировании кинетики окисления 2%-ного (2, 3, 5) и 4%-ного (1, 4, 6) растворов подсолнечного масла в хлорбензоле; 1, 2 — $[ROO\cdot]$; 3, 4 — $[yOO\cdot]$; 5, 6 — $[H_3COO\cdot]$.

тельно высоком квантовом выходе хемилюминесценции в реакции (16). Представляет интерес сопоставление кинетики хемилюминесценции (рис. 1 и 3) с результатами компьютерного математического моделирования кинетики переки-

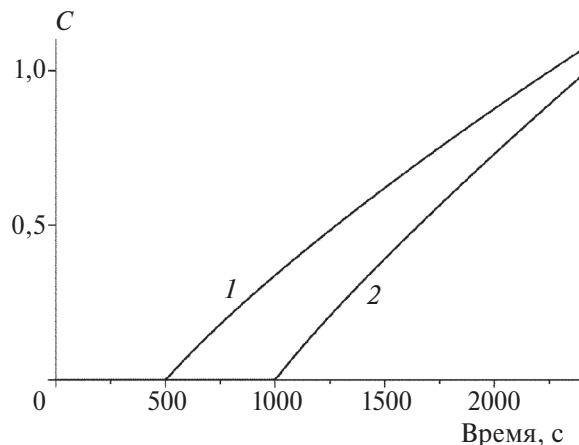


Рис. 5. Модельная кинетика образования диоксетанов ($C = 10^7$ [D] M) при инициированном окислении 2%-ного (1) и 4%-ного (2) растворов растительного масла в хлорбензоле.

сных радикалов, представленными на рис. 4. Характерные пики на кинетических кривых по окончании периодов индукции зависят только от концентрации изобутиронитрил-перекисных радикалов, чем объясняется наличие аналогичных пиков на кинетических кривых хемилюминесценции в отсутствие активатора (рис. 1, 3), возникновение которых происходит синхронно с изменениями концентрации изобутиронитрил-перекисных радикалов (рис. 4).

Кинетические кривые образования диоксетанов, представленные на рис. 5, показывают, что накопление этих продуктов по реакциям (21) и (22) начинается в развивающемся при высоких концентрациях свободных радикалов цепном процессе перекисного окисления по окончании периодов индукции, в течение которых происходит расходование антиоксиданта АОН по реакциям (8)–(11) и (13)–(15). Термический распад диоксетана, сопровождающийся хемилюминесценцией, происходит весьма медленно ввиду низкого значения константы скорости реакции (23) [20, 43, 44]. Возникающая при термическом распаде диоксетанов молекулярная хемилюминесценция [40–45] по реакции (23) не влияет на образование пиков хемилюминесценции, так как сразу по окончании периодов индукции концентрация диоксетанов крайне мала (рис. 5) и может вносить заметный вклад в суммарную хемилюминесценцию системы лишь при относительно высоких квантовых выходах реакции (23) (рис. 3).

Введение хелата европия не влияет на величину периодов индукции, но увеличивает общую ин-

тенсивность свечения и изменяет форму кинетических кривых, сглаживая пики хемилюминесценции по окончании периодов индукции за счет непропорционального изменения квантовых выходов отдельных реакций (рис. 3).

Эффективность переноса энергии на молекулу акцептора — усилителя хемилюминесценции сильно зависит от мультиплетности донора энергии — первичного электронно-возбужденного продукта хемилюминесцентной реакции [19, 20, 43]. Поэтому отсутствие пиков на кривых, полученных в экспериментах в присутствии люминофора, с учетом того, что в реакциях (16) и (17) в возбужденном состоянии образуется один и тот же продукт: $R'=O^*$, указывает на то, что в этих реакциях преобладающие мультиплетные состояния (S или T) этого кетона различны.

Сопоставление рис. 1 и 3 показывает, что результаты компьютерного математического моделирования хорошо согласуются с результатами эксперимента, подтверждая, таким образом, обоснованность сделанных предположений и адекватность разработанной схемы, описывающей кинетику хемилюминесценции при инициированном окислений подсолнечного масла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение в окисляющуюся систему усилителя хемилюминесценции приводит не только к увеличению на порядок общей интенсивности свечения, но и к изменению характера кинетики. При этом характерные пики на кинетических кривых по окончании периода индукции процесса окисления исчезают, но не изменяется величина самого периода индукции. Разработанная кинетическая схема из 23 элементарных реакций дала возможность показать, что указанные различия являются следствием непропорционального увеличения с помощью хелата европия квантовых выходов хемилюминесценции от нескольких электронно-возбужденных продуктов (эмиттеров света), образующихся в процессе окисления.

Работа выполнена при поддержке Министерством науки и высшего образования РФ в рамках (госзадания по теме № 001201253314).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vassil'ev R.F. // Progress in Reaction Kinetics / Ed. Porter G. V. 4. Oxford: Pergamon Press, 1967. P. 305.

2. Chemical and Biological Generation of Excited States / Eds. Adam W., Cilento G. N.Y.: Acad. Press, 1982.
3. Adam W., Trofimov A.V. // The Chemistry of Peroxides Ed. Rappoport Z. V. 2. Part 2. Patai Series: The Chemistry of Functional Groups. 2006. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. Chapter 15. P. 1171.
4. Васильев Р.Ф., Трофимов А.В., Цаплев Ю.Б. // Успехи химии. 2010. Т. 79. С. 91; <https://doi.org/10.1070/RC2010v079n02ABEH004064>
5. Цаплев Ю.Б., Трофимов А.В. // Изв. АН. Сер. хим. 2023. № 1. С. 73; <https://doi.org/10.1007/s11172-023-3715-3>
6. Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V. et al. // Photochem. Photobiol. 2017. V. 93. P. 579; <https://doi.org/10.1111/php.12689>
7. Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F. // Analyst. 2009. V. 134. P. 2128; <https://doi.org/10.1039/B905059K>
8. Русина И.Ф., Вепринцев Т.Л., Васильев Р.Ф. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 12; <https://doi.org/10.31857/S0207401X22020108>
9. Меньшов В.А., Кънчева В.Д., Яблонская О.И., Трофимов А.В. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 49; <https://doi.org/10.31857/S0207401X21020114>
10. Naumov V.V., Trofimov A.V., Fedorova G.F. et al. // Intern. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. 8486; <https://doi.org/10.3390/ijms24108486>
11. Zhigacheva I.V., Rusina I.F., Krikunova N.I. et al. // Ibid. 2023. V. 24. 13172; <https://doi.org/10.3390/ijms241713172>
12. Saha S., Saso L., Trofimov A.V., Yablonskaya O.I. // Biomedicines. 2023. V. 11. 1377; <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051377>
13. Balansky R., La Maestra S., Kancheva V.D. et al. // Food Chem. Toxicol. 2021. V. 155. 112383; <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112383>
14. Разумов В.Ф. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 2. С. 14; <https://doi.org/10.31857/S0207401X23020139>
15. Колыванова М.А., Климович М.А., Дементьева О.В. и др. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 64; <https://doi.org/10.31857/S0207401X23010065>
16. Яковлева М.А., Радченко А.Ш., Костюков А.А. и др. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 20; <https://doi.org/10.31857/S0207401X22020169>
17. Volodyaev I., Trofimov A., Vladimirov Yu.A. // Ultra-Weak Photon Emission from Biological Systems / Eds. Volodyaev I., van Wijk E., Cifra M., Vladimirov Yu.A., AG, Cham: Springer Nature Switzerland, 2023. P. 131; https://doi.org/10.1007/978-3-031-39078-4_10
18. Vassil'ev R.F. // Nature. 1962. V. 196. P. 668; <https://doi.org/10.1038/196668a0>
19. Vassil'ev R.F. // Ibid. 1963. V. 200. P. 773; <https://doi.org/10.1038/200773b0>
20. Fedorova G.F., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F., Veprintsev T.L. // ARKIVOC. 2007. № 8. P. 163.

- <https://doi.org/10.1002/chin.200709275>
21. Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д., Наумов В.В. и др. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 36.
<https://doi.org/10.31857/S0207401X20060126>
22. Шляпнитох В.Я., Карпунхин О.Н., Постников Л.М. и др. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М.: Наука, 1966.
23. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. // Кинетика и катализ. 2004. Т. 45. № 3. С. 355.
24. Васильев Р.Ф., Вепринцев Т.Л., Долматова Л.С. и др. // Там же. 2014. Т. 55. № 2. С. 157;
<https://doi.org/10.7868/S0453881114020154>
25. Van Hook J.P., Tobolsky A.V. // J. Am. Chem. Soc. 1958. V. 80. P. 779;
<https://doi.org/10.1021/ja01537a006>
26. Kancheva V.D., Dettori M.A., Fabbri D. et al. // Antioxidants. 2021. V. 10. P. 624;
<https://doi.org/10.3390/antiox10040624>
27. Vasvari G., Kuramshin E.M., Holly S. et al. // J. Phys. Chem. 1988. V. 92. P. 3810;
<https://doi.org/10.1021/j100324a026>
28. Dawson W.R., Kropp J.L., Windsor M.W. // Ibid. 1966. V. 45. P. 2410.
<https://doi.org/10.1063/1.1727955>
29. Wildes P.D., White E.H. // J. Amer. Chem. Soc. 1971. V. 93. P. 6286;
<https://doi.org/10.1021/ja00752a058>
30. Наумов В.В., Федорова Г.Ф., Васильев Р.Ф. и др. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 24;
<https://doi.org/10.31857/S0207401X21020126>
31. Fedorova G.F., Lapina V.A., Menshov V.A. et al. // Photochem. Photobiol. 2019. V. 95. P. 780;
<https://doi.org/10.1111/php.13058>
32. Belyakov V.A., Vasil'ev R.F. // Ibid. 1970. V. 11. P. 179;
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1970.tb05986.x>
33. Mendes P. // Comput. Appl. Biosci. 1993. V. 9. P. 563.
34. Mendes P. // Trends Biochem. Sci. 1997. V. 22. P. 361;
[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01103-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01103-1)
35. Mendes P., Kell D.B. // Bioinformatics. 1998. V. 14. P. 869;
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.10.869>
36. Hoops S., Sahle S., Gauges R. et al. // Ibid. 2006. V. 22. P. 3067.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl485>
37. Denisov E.T. Liquid-Phase Reaction Rate Constants. N.Y.: Springer, 2012.
38. Denisov E.T., Azatyan V.V. Inhibition of Chain Reactions. Boca Raton: CRC Press, 2000.
39. Denisov E.T., Afanas'ev I.B. Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. Boca Raton: CRC Press, 2005.
40. Беляков В.А., Филиппова Т.В., Заседателев С.Ю., Блюмберг Э.А. // Изв. АН СССР. Сер. хим. 1979. № 7. С. 1485.
41. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Федорова Г.Ф. // Там же. 1983. № 12. С. 2709.
42. Timmins G.S., Dos Santos R.E., Whitwood A.C. et al. // Chem. Res. Toxicol. 1997. V. 10. № 10. P. 1090;
<https://doi.org/10.1021/tx970075p>
43. Шарипов Г.Л., Казаков В.П., Толстиков Г.А. Химия и хемилюминесценция 1,2-диоксетанов. М.: Наука, 1990.
44. Adam W., Beinhauer A., Hauer H. // Handbook of Organic Photochemistry / Ed. Scaiano J.C. V. 2. Boca Raton: CRC Press, Inc, 1989. P. 271.
45. Trofimov A.V., Vasil'ev R.F., Mielke K., Adam W. // Photochem. Photobiol. 1995. V. 62. P. 35.
46. Рогинский В.А. // Кинетика и катализ. 1990. Т. 31. № 3. С. 546.
47. Yanishlieva N., Popov A. // Rev. Franc. Corps Gras. 1973. V. 20. P. 11.

INFLUENCE OF EUROPIUM CHELATE ON THE CHEMILUMINESCENCE KINETICS DURING FREE-RADICAL OXIDATION OF LIPID SAMPLES OF VEGETABLE ORIGIN

V. V. Naumov¹, G. F. Fedorova¹, T. L. Veprintsev¹,
O. I. Yablonskaya¹, A. V. Trofimov^{1,2*}

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia

*E-mail: avt_2003@mail.ru

The chemically inert luminophore, chemiluminescence enhancer 1,10-phenanthroline-tris(thenoyl-trifluoroacetate) of trivalent europium, increases the intensity of the light emission by an order of magnitude during the initiated oxidation of lipid samples of vegetable origin (sunflower oil). The introduction of the light enhancer into the chemiluminescence system leads to altering the kinetic profile, removing characteristic peaks on the kinetic curves at the end of the induction period of the oxidation process, but without changing the induction period itself. With the mathematical computer modeling based on a kinetic scheme of 23 elementary reactions, it was shown that the observed kinetic behavior can be rationalized by a disproportionate increase in quantum yields of chemiluminescence derived from different electronically excited products (light emitters) formed during the oxidation process.

Keywords: chemiluminescence, 1,10-phenanthroline-tris(thenoyl-trifluoroacetate) of trivalent europium, vegetable lipids, free-radical oxidation, kinetics.

REFERENCES

- R.F. Vasil'ev, In: Progress in Reaction Kinetics (G. Porter, Ed.). V. 4. Pergamon Press. Oxford. 1967. P. 305.
- W. Adam, G. Cilento (Eds), Chemical and Biological Generation of Excited States. Academic Press. New York. 1982.
- W. Adam, A.V. Trofimov, In: The Chemistry of Peroxides (Z. Rappoport, Ed.). V. 2. Part 2. Patai Series: The Chemistry of Functional Groups. 2006. John Wiley & Sons Ltd.. Chichester. Chapter 15. P. 1171.
- R.F. Vasil'ev, A.V. Trofimov, Yu.B. Tsaplev, Russ. Chem. Rev. **79**, 77 (2010).
<https://doi.org/10.1070/RC2010v079n02ABEH004064>
- Yu.B. Tsaplev, A.V. Trofimov, Russ Chem Bull **72**, 73 (2023).
<https://doi.org/10.1007/s11172-023-3715-3>
- G.F. Fedorova, V.A. Menshov, A.V. Trofimov, et al., Photochem. Photobiol. **93**, 579 (2017).
<https://doi.org/10.1111/php.12689>
- G.F. Fedorova, V.A. Menshov, A.V. Trofimov, R.F. Vasil'ev, Analyst **134**, 2128 (2009).
<https://doi.org/10.1039/B905059K>
- I.F. Rusina, T.L. Veprintsev, R.F. Vasil'ev, Russ. J. Phys. Chem. B. **16** (1), 50 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122010274>
- V.A. Menshov, V.D. Kancheva, O.I. Yablonskaya, A.V. Trofimov, Russ. J. Phys. Chem. **15** (1), 108 (2021).
<https://doi.org/10.1134/S1990793121010231>
- V.V. Naumov, A.V. Trofimov, G.F. Fedorova, et al., Int. J. Mol. Sci. **24**, 8486 (2023).
<https://doi.org/10.3390/ijms24108486>
- I.V. Zhigacheva, I.F. Rusina, N.I. Krikunova, et al., Int. J. Mol. Sci. **24**, 13172 (2023).
<https://doi.org/10.3390/ijms241713172>
- S. Saha, L. Saso, A.V. Trofimov, O.I. Yablonskaya, Biomedicines. **11**, 1377 (2023).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines11051377>
- R. Balansky, S. La Maestra, V.D. Kancheva, et al., Food Chem. Toxicol. **155**, 112383 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112383>
- W.F. Razumov, Russ. J. Phys. Chem. B **17** (1), 36 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S199079312301027X>
- M.A. Kolyvanova, M.A. Klimovich, O.V. Dement'eva, et al., Russ. J. Phys. Chem. B **17** (1), 206 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123010062>
- M.A. Yakovleva, A.Sh. Radchenko, A.A. Kostyukov et al., Russian Journal of Physical Chemistry B. **16** (1), 90 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S199079312201033X>
- I. Volodyaev, A. Trofimov, Yu.A. Vladimirov // In: Ultra-Weak Photon Emission from Biological Systems (I. Volodyaev, E. van Wijk, M. Cifra, Yu.A. Vladimirov, Eds.). 2023. Springer Nature Switzerland AG. Cham. 2023. P. 131.
https://doi.org/10.1007/978-3-031-39078-4_10
- R.F. Vasil'ev, Nature **196**, 668 (1962).
<https://doi.org/10.1038/196668a0>
- R.F. Vasil'ev, Nature **200**, 773 (1963).
<https://doi.org/10.1038/200773b0>
- G.F. Fedorova, A.V. Trofimov, R.F. Vasil'ev, T.L. Veprintsev, ARKIVOC № 8, 163 (2007).
<https://doi.org/10.1002/chin.200709275>
- R.F. Vasil'ev, V.D. Kancheva, V.V. Naumov, et al., Russ. J. Phys. Chem. B **14** (3), 479–482 (2020).
<https://doi.org/10.1134/S1990793120030264>

22. V.Ya. Shlyapintokh, O.N. Karpukhin, L.M. Postnikov, et al., *Chemiluminescence Techniques in Chemical Reactions*, New York: Consultants Bureau, 1968.
23. V.A. Belyakov, R.F. Vasil'ev, G.F. Fedorova, *Kinetics and Catalysis* **45**, 329 (2004).
<https://doi.org/10.1023/B:KICA.0000032165.13080.c6>
24. R.F. Vasil'ev, T.L. Veprintsev, L.S. Dolmatova, et al., *Kinetics and Catalysis* **55**, 148 (2014).
<https://doi.org/10.1134/S0023158414020153>
25. J.P. Van Hook, A.V. Tobolsky, *J. Am. Chem. Soc.* **80** 779 (1958).
<https://doi.org/10.1021/ja01537a006>
26. V.D. Kancheva, M.A. Dettori, D. Fabbri, et al., *Antioxidants* **10**, 624 (2021).
<https://doi.org/10.3390/antiox10040624>
27. G. Vasvari, E.M. Kuramshin, S. Holly, et al., *J. Phys. Chem.* **92**, 3810 (1988).
<https://doi.org/10.1021/j100324a026>
28. W.R. Dawson, J.L. Kropp, M.W. Windsor, *J. Chem. Phys.* **45**, 2410 (1966).
<https://doi.org/10.1063/1.1727955>
29. P.D. Wildes, E.H. White, *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 6286 (1971).
<https://doi.org/10.1021/ja00752a058>
30. V.V. Naumov, G.F. Fedorova, R.F. Vasil'ev, et al., *Russ. J. Phys. Chem. B* **15** (1), 6 (2021).
<https://doi.org/10.1134/S1990793121010243>
31. G.F. Fedorova, V.A. Lapina, V.A. Menshov, et al., *Photochem. Photobiol.* **95**, 780 (2019).
<https://doi.org/10.1111/php.13058>
32. V.A. Belyakov, R.F. Vasil'ev, *Photochem. Photobiol.* **11**, 179 (1970).
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1970.tb05986.x>
33. P. Mendes, *Comput. Appl. Biosci.* **9**, 563 (1993).
34. P. Mendes, *Trends Biochem. Sci.* **22**, 361 (1997).
[https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(97\)01103-1](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(97)01103-1)
35. P. Mendes, D.B. Kell, *Bioinformatics* **14**, 869 (1998).
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/14.10.869>
36. S. Hoops, S. Sahle, R. Gauges, et al., *Bioinformatics* **22**, 3067 (2006).
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl485>
37. E.T. Denisov, *Liquid-Phase Reaction Rate Constants*, Springer New York, New York, 2012.
38. E.T. Denisov, V.V. Azatyan, *Inhibition of Chain Reactions*, CRC Press, Boca Raton, 2000.
39. E.T. Denisov, I.B. Afanas'ev *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology*. CRC Press, Boca Raton, 2005.
40. V.A. Belyakov, T.V. Filippova, S.Yu. Zasedatelev, E.A. Blyumberg, *Bull. Acad. Sci. USSR Div. Chem. Sci.* **28**, 1381 (1979).
41. V.A. Belyakov, R.F. Vasil'ev, G.F. Fedorova, *Russ. Chem. Bull.* **32**, 2429 (1983). <https://doi.org/10.1007/BF00954469>
42. G.S. Timmins, R.E. Dos Santos, A.C. Whitwood, et al., *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 1090 (1997).
<https://doi.org/10.1021/tx970075p>
43. G.L. Sharipov, V.P. Kazakov, G.A. Tolstikov, *Chemistry and Chemiluminescence of 1,2-Dioxetanes* (in Russian), Nauka, Moscow, 1990.
44. W. Adam, A. Beinhauer, H. Hauer, In: *Handbook of Organic Photochemistry*, V. 2 (J.C. Scaiano (Ed.)), CRC Press, Boca Raton, 1989. P. 271.
45. A.V. Trofimov, R.F. Vasil'ev, K. Mielke, W. Adam, *Photochem. Photobiol.* **62**, 35 (1995).
<https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1995.tb05235.x>
46. V.A. Roginskii, *Kinetics and Catalysis* **31**, 475 (1990).
47. N. Yanishlieva, A. Popov, *Rev. Franc. Corps Gras.* **20**, 11 (1973).

УДК 544.3.03:544.032:544.77

СТРУКТУРНЫЕ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ БИОПОЛИМЕРНОЙ ПЕРОРАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ КОМБИНАЦИИ НУТРИЦЕВТИКОВ

© 2024 г. М. Г. Семёнова*, А. С. Антипова, Е. И. Мартиросова,
М. С. Анохина, Д. В. Зеликина, Н. Г. Богданова, Н. П. Пальмина

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

**E-mail: mariagersem@mail.ru*

Поступила в редакцию 26.03.2024;

после доработки 24.04.2024;

принята в печать 20.05.2024

На основе фосфатидилхолина сои (ФХ) была получена липосомальная форма комбинации гидрофобных нутрицевтиков (омега-3 докозагексаеновой полиненасыщенной жирной кислоты (ДГК) и одного из наиболее активных растительных антиоксидантов, а именно эфирного масла гвоздики (ЭМГ)). С помощью ЭПР-спектроскопии изучено влияние ДГК и ЭМГ на микровязкость бислоя липосом ФХ. Кроме того, по данным дифференциально-сканирующей калориметрии установлено влияние ДГК и ЭМГ на фазовое состояние бислоя модельных липосом дипальмитоилфосфатидилхолина. Комбинацией методов ЭПР-спектроскопии, дифференциально-сканирующей калориметрии, а также лазерного светорассеяния изучено, каким образом инкапсулирование липосом ФХ-ДГК-ЭМГ ковалентным конъюгатом (К) казеината натрия и мальтодекстрина влияет как на структурное состояние бислоя, инкапсулированных липосом, так и на структурные (молярная масса, размер, плотность, архитектура, дзета-потенциал) и термодинамические параметры (осмотический второй вириальный коэффициент) сформировавшегося между ними водорастворимого супрамолекулярного комплекса ФХ-ДГК-ЭМГ-К. Установлены ключевые структурные параметры этого комплекса, обеспечивающие эффективную защиту ПНЖК, входящих в его состав, от окисления кислородом воздуха.

Ключевые слова: липосомы, биополимеры, нутрицевтики, структура, термодинамические параметры, супрамолекулярный комплекс, система доставки.

DOI: 10.31857/S0207401X24110084

1. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общепризнано, что дефицит в организме человека ряда биологически активных веществ, так называемых нутрицевтиков (веществ, обладающих, как питательной, так и фармацевтической ценностью), может приводить к развитию различных хронических неинфекционных заболеваний (сахарный диабет 2-го типа, онкология, сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания) [1, 2]. Установлено, что обогащение пищевых продуктов низкомолекулярными нутрицевтиками (антиоксидантами (эфирные масла, каротиноиды и др.), фосфолипидами, незаменимыми полиненасыщенными жирными кислотами (омега-3 и омега-6 ПНЖК в их оптимальном соотношении 1 : 1 ÷ 4 : 1), витаминами (Д, В, С и др.)), является эффективной стратегией

в противодействии дефициту биологически активных веществ [3, 4]. Однако сохранение структуры нутрицевтиков и, соответственно, их биологической активности остается проблемой на практике. Для решения этой проблемы разрабатываются различные по своей природе пероральные системы доставки нутрицевтиков (мицеллы, липосомы, полимерные наночастицы и эмульсии) [5, 6].

Хорошо известно, что уникальная структура липосом позволяет широко использовать их для инкапсулирования и в качестве средства доставки различных активных фармацевтических ингредиентов [7], однако их применение для инкапсулирования нутрицевтиков еще недостаточно хорошо изучено. Среди липосом фосфолипидов липосомы фосфатидилхолина (ФХ) являются

одними из наиболее перспективных и полезных для здоровья природных наноразмерных систем доставки как гидрофобных, так и гидрофильных нутрицевтиков. Такая липосомальная форма нутрицевтиков обладает рядом преимуществ перед другими системами доставки. Так, сходство бислоя ФХ с клеточной мембраной может облегчить биоусвоение нутрицевтиков в клетках пищеварительного тракта [8]. Кроме этого, биоусвоению нутрицевтиков может содействовать способность липосом ФХ формировать смешанные мицеллы с желчными солями в тонком кишечнике. И в дополнении к этому ФХ является хорошо известным гепатопротектором [9]. Однако, наряду с этими преимуществами, липосомы ФХ имеют ряд недостатков. Это – нестабильность структуры липосом и связанное с этим, неконтролируемое высвобождение из них загруженных нутрицевтиков, а также склонность липосом ФХ, изначально содержащих ПНЖК, к автоокислению кислородом воздуха, особенно при повышенных температурах пищевых производств и при хранении.

В настоящее время хорошо известно, что природные биосовместимые полимеры могут улучшить растворимость лекарственных веществ и повысить их пероральную биодоступность [10, 11]. При этом в случае разработки пероральных систем доставки липосомальных форм нутрицевтиков большой интерес вызывают ковалентные конъюгаты пищевых белков и полисахаридов, полученные объединением аминокислотных групп белка с восстанавливающими карбонильными концевыми группами полисахаридов на первой стадии реакции Майяра (Maillard). Основными преимуществами ковалентных конъюгатов, полученных по реакции Майяра, являются их растворимость и стабильность в широких диапазонах рН и ионной силы, включая изоэлектрическую точку белков [12], а также контролируемый ферментативный гидролиз в пищеварительном тракте, задаваемый как природными белками и полисахаридами, так и их молярным соотношением в конъюгате [13]. Эти свойства ковалентных конъюгатов могут быть важны при инкапсулировании и защите нутрицевтиков в экстремальных условиях пищевых производств и при хранении, а также для их контролируемого высвобождения и биодоступности в различных условиях окружающей среды пищеварительного тракта (специфические ферменты,

рН и ионная сила в ротовой полости, желудке и тонком кишечнике).

Таким образом, целью нашей работы было выяснение физико-химических закономерностей, лежащих в основе формирования структуры, и свойств системы доставки на основе ковалентного конъюгата казеината натрия (Каз-Na) и мальтодекстрина (МД) для липосомальной формы фосфатидилхолина (ФХ), обогащенной комбинацией гидрофобных нутрицевтиков, а именно омега-3 ПНЖК (докозагексаеновой жирной кислотой, ДГК) и наиболее эффективным растительным антиоксидантом (эфирным маслом гвоздики, ЭМГ [14]) в их адекватных для оздоровительного эффекта количестве и соотношении [15].

Для достижения этой цели необходимо было решить ряд задач. Используя ЭПР-спектроскопию, а также дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) ставилась задача изучить влияние встраивания выбранных гидрофобных нутрицевтиков (ДГК, ЭМГ), а также инкапсулирования липосом конъюгатом Каз-Na-МД (К), на структурное состояние бислоя липосом, сформированных в водной среде. Проводя измерения методом лазерного светорассеяния в статическом, динамическом и электрофоретических режимах ставилась задача охарактеризовать структурные (размер, молярная масса, архитектура, заряд, плотность), а также термодинамические (осмотический второй вириальный коэффициент) параметры супрамолекулярных комплексов ФХ-ДГК-ЭМГ-К в водной среде. На основании полученных данных требовалось выяснить основные взаимосвязи между структурными/термодинамическими параметрами супрамолекулярного комплекса ФХ-ДГК-ЭМГ-К и его функциональностью, а именно растворимостью в водной среде и защитными способностями по отношению к автоокислению кислородом воздуха включенных в его состав эссенциальных ПНЖК.

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы

Были использованы: соевый фосфатидилхолин (ФХ) 98%-ной химической чистоты (марка Lipoid S 100) производства фирмы “Lipoid GmbH” (Германия) – состав основных жирных кислот ФХ представлен ранее в работе [16]; докозагексаеновая полиненасыщенная жирная кислота (ДГК) ³

98%-ной химической чистоты (D2534, “Sigma-Aldrich”, США); синтетический дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) 99%-ной химической чистоты (P-5911, “Sigma-Aldrich”, США); ковалентный конъюгат казеината натрия (Каз-Na) (C8654, Sigma-Aldrich, Новая Зеландия) и мальтодекстрина (МД) марки Paselli SA2 с декстрозным эквивалентом равным 2 (“Avebe Group”, Нидерланды), был приготовлен при весовом соотношении белок : мальтодекстрин = 1 : 2 по методике, описанной ранее [6]; эфирное масло из бутонов цветов гвоздичного (ЭМГ) дерева (*Eugenia caryophyllata* Thumb, “Plant Lipids Ltd.”, Индия); 16-доксилстеариновая кислота (16-ДСК, 810604P, “Avanti Polar Lipids”, США); NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , HCl , NaOH , NaN_3 , трихлоруксусная кислота (ТХУ), тиобарбитуровая кислота (ТБК), диэтиловый эфир (“Баум-Люкс”, Россия) имели высокую степень химической чистоты ($> 99\%$), $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ — 95%. Все растворы были приготовлены на бидистиллированной воде. Азид натрия ($2 \cdot 10^{-4}$ г/мл) добавлялся к буферу в качестве антимикробного агента.

2.2. Методы

Липосомы ФХ ($1.0 \cdot 10^{-3}$ г/мл) и ДПФХ ($1.0 \cdot 10^{-3}$ г/мл), нагруженные докозагексаеновой кислотой ($0.5 \cdot 10^{-3}$ г/мл) при отсутствии и в присутствии ($0.06 \cdot 10^{-3}$ г/мл) ЭМГ, получали по методике, включающей несколько последовательных стадий. На первой стадии необходимые количества ФХ/ДПФХ и ДГК растворяли в этаноле. При этом в случае липосом ФХ-ДГК и ФХ-ДГК-ЭМГ достигалось равное весовое соотношение омега-3 к омега-6 ПНЖК. Затем к полученному раствору добавляли фосфатный буфер (pH 7.0, $I = 0.001\text{M}$) до 50%-ной объемной концентрации спирта в водной среде. Для экспериментов, в которых не изучалась защита от окисления, пропускали через полученную дисперсию инертный газ аргон в течение 1 мин. Далее проводили механическую гомогенизацию этой дисперсии при 20000 об/мин, 2 мин (“Heidolph”, Германия). В процессе гомогенизации при необходимости добавляли спиртовой раствор ЭМГ.

На следующей стадии полученную дисперсию обрабатывали ультразвуком (гомогенизатор VCX-130, “Sonics & Materials”, США) три раза по 5 мин (40%-ная мощность сигнала в режиме: 30 с обработки — 30 с перерыв). При обработке ультразву-

ком образец находился во льду. Затем полученную дисперсию пропускали 19 раз через мембранный фильтр с диаметром пор 100 нм, используя экстраuder (“Avanti Polar Lipid”, США).

Для удаления этанола из полученных дисперсий ФХ/ДПФХ использовали равновесный диализ против фосфатного буфера (pH = 7.0, $I = 0.001\text{M}$), гидромодуль составлял 20, продолжительность диализа — 24 ч. Предварительная оценка показала, что липосомы ФХ/ДПФХ не проникали через поры используемого диализного шланга (Visking Dialysis Tubing, тип 36/32, “Serva Electrophoresis”, Германия). Остаточное количество этанола в растворах ФХ/ДПФХ составляло 0.5 об./об.%. При приготовлении липосом для измерения методом ЭПР использовали гидромодуль 50, остаточное количество этанола в растворах ФХ составляло 0.007 об./об.%. Для экспериментов, в которых не изучалась защита от окисления, липосомы хранили в среде Ag в холодильнике ($2-8^\circ\text{C}$).

Самопроизвольные образования супрамолекулярных комплексов конъюгата Каз-Na-МД (К) с липосомами формировались (40°C , 1 ч) при смешении растворов конъюгата и липосом в термостатируемом шейкере (GFL 3032, Германия). Весовое соотношение липосомы : конъюгат = 1 : 10. Ранее было показано, что данное соотношение обеспечивало высокие защитные свойства конъюгата по отношению к автоокислению липосом ФХ, обогащенных триглицеридами льняного масла, содержащими 55% α -линоленовой и 19% линолевой ПНЖК [6].

Измерение термодинамических параметров и функций фазового перехода в бислое липосом проводили на модельном дипальмитоилфосфатидилхолине с использованием метода ДСК на микрокалориметре ДАСМ-4М (Пушино, Россия). Измерения проводили при постоянном давлении в 2.5 атм в температурном диапазоне от 20 до 50°C . Скорость нагрева соответствовала $0.5^\circ\text{C}/\text{мин}$ для всех измерений. Концентрация в образцах составляла ($1.0 \cdot 10^{-3}$ г/мл) ДПФХ. Чувствительность калориметрического измерения составляла не менее $5 \cdot 10^{-6}$ Дж/с. Результаты, представленные в данной работе, являются средним значением, как минимум, трех независимых измерений.

Многоугловое лазерное (633 нм , He-Ne лазер) светорассеяние в статическом и динамическом

режимах (ЛС-01, ЗАО “Научные приборы” Санкт-Петербург, Россия) использовали для определения как структурных параметров (гидродинамического радиуса, R_h ; радиуса инерции, R_G ; структурно-чувствительного параметра, характеризующего форму частиц, $\rho = R_G/R_h$; средневесовой молярной массы, M_w ; плотности, $d = M_w/(N_A V)$), так и термодинамического параметра — осмотического второго вириального коэффициента, A_2 , характеризующего термодинамическое сродство частиц комплекса к растворителю [6]. Результаты, представленные в данной работе, являются средним значением экспериментальных величин, полученных в статическом режиме при экстраполяции, выполненной по 13 углам рассеяния в диапазоне 40–140° и как минимум по семи значениям концентрации. В динамическом режиме измерений усреднение проводили, как минимум, по десяти независимым измерениям.

Данные, полученные методом дифференциальной рефрактометрии (633 нм, “Shimadzu”, Япония) использовали для определения инкрементов показателей преломления, dn/dc , изучаемого конъюгата Каз-На-МД и его комплексов с липосомами, $dn/dc = 0.17 \cdot 10^{-3} \pm 0.01 \text{ м}^3/\text{кг}$.

Метод электрофоретического лазерного рассеяния света (633 нм, He-Ne-лазер, двуглового анализатора размера частиц и молекул Zeta sizer Nano ZS, “Malvern”, Великобритания) использовали для измерения дзета-потенциала. Результаты, представленные в данной работе, являются средним значением, как минимум, пяти независимых измерений.

Структурное состояние бислоя изучаемых липосом как свободных, так и инкапсулированных конъюгатом, оценивали с помощью спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Спектры ЭПР были получены в присутствии спинового зонда (16-доксилстеариновой кислоты) при температуре 20 °С на спектрометре EMX (Bruker, Германия). Кажущуюся микровязкость глуболежащих областей бислоя (20–22 Å) липосом характеризовали временем вращательной корреляции (τ_c) зонда 16-ДСК, которое рассчитывалось по формуле для быстрого анизотропного вращения радикала [17]. Молярное соотношение 16-ДСК и ФХ составляло 1 : 1000. Концентрация ФХ поддерживалась постоянной и равной 1.56 мг/мл. Концентрации других компонентов липосом составляли: 0.875 для ДГК, 0.1 для ЭМГ

и 10 мг/мл для конъюгата (Каз-На-МД). Результаты, представленные в данной работе, являются средним значением, как минимум, десяти независимых измерений.

Метод спектрофотометрии (спектрофотометр СФ-2000, “Спектр”, Россия) был использован для оценки как степени инкапсулирования липосом конъюгатом Каз-На-МД по величине абсорбции свободными липосомами, измеренной при длине волны $\lambda = 215 \text{ нм}$ в их экстракте диэтиловым эфиром из водных растворов, так и вторичного продукта перекисного окисления липидов — малонового диальдегида (МДА) по реакции с ТБК в присутствии ТХУ.

Статистический анализ проводили с использованием программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, USA) и Origin Pro 8.1 (OriginLab, USA). Для определения статистических различий проводился однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с Тьюки (Tukey)–тестом. Статистическая значимость различий между сравниваемыми группами устанавливалась на уровне $p < 0.05$.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

3.1. Структурные и термодинамические параметры супрамолекулярных комплексов

В первую очередь необходимо отметить, что степень инкапсулирования всех видов изученных липосом конъюгатом Каз-На-МД составляла $\geq 95\%$. Общую структуру супрамолекулярных комплексов и их термодинамическое сродство к водной среде характеризовали методом лазерного светорассеяния в статическом, динамическом и электрофоретических режимах. В табл. 1 представлены измеренные значения структурных и термодинамических параметров образующихся супрамолекулярных комплексов конъюгата Каз-На-МД с липосомами (ФХ-ДГК) при отсутствии и в присутствии ЭМГ.

Величина структурно-чувствительного параметра ρ , лежащая в пределах ошибки измерений в диапазоне от 1 до 2, указывает на то, что супрамолекулярные частицы, так же как и исходный конъюгат, имели сферическую архитектуру [18]. Сопоставление средневесовых молярных масс комплексов и исходного конъюгата Каз-На-МД свидетельствует о значительной ассоциации исходных частиц конъюгата в результате инкапсу-

Таблица 1. Значения структурных и термодинамических параметров ковалентного конъюгата Каз-На-МД (К), а также его комплексов с липосомами ФХ-ДГК при отсутствии и в присутствии эфирного масла гвоздики (pH = 7.0, I = 0.001 М, 25 °С)

Образец	$M_w \cdot 10^{-6}$, Да	R_G , нм	$\rho = R_G/R_h$	d , мг/см ³	A_2 , м ³ /моль	ζ -потенциал, мВ
Каз-На-МД (К)	6.0 ± 0.8^b	125 ± 6^e	1.75 ± 0.09^a	1.20 ± 0.12^e	2.74 ± 0.40^e	-23.0 ± 1.2^e
ФХ-ДГК-К	101 ± 13^a	290 ± 15^a	2.10 ± 0.11^a	1.63 ± 0.20^b	123.8 ± 18.6^a	-42.76 ± 2.14^a
ФХ-ДГК-ЭМГ-К	120 ± 15^a	212 ± 11^b	1.95 ± 0.10^a	5.19 ± 0.65^a	73.7 ± 11.1^b	-34.68 ± 1.73^b

Примечание. Индексы “a” – “e” указывают на статистически значимые различия (при $p < 0.05$) между сравниваемыми в одном столбце величинами измеренных параметров.

лирования липосом. При этом коэффициент ассоциации ($k_{Mw} = M_w^{\text{комплекс}}/M_w^{\text{конъюгата}}$) достигал величины ~ 17 для комплекса ФХ-ДГК-К и ~ 20 – для комплекса ФХ-ДГК-ЭМГ-К. При этом, радиус инерции, R_G , комплексов сохранялся, как и у конъюгата, на субмикронном уровне. В то же время коэффициент увеличения размера частиц в результате этой ассоциации ($k_{RG} = R_G^{\text{комплекс}}/R_G^{\text{конъюгат}}$) был практически на порядок ниже, чем k_{Mw} . А именно, $k_{RG} \approx 2.3$ для комплекса ФХ-ДГК-К и $k_{RG} \approx 1.7$ для комплекса ФХ-ДГК-ЭМГ-К. В результате наблюдаемая ассоциация приводила к возрастанию плотности (d) комплексных частиц, величина которой достигала практически четырехкратного увеличения по сравнению с плотностью частиц конъюгата в случае присутствия ЭМГ в липосомах.

На основании этих данных можно предположить, что липосомы играли роль эффективных как межмолекулярных, так и внутримолекулярных “сшивающих” агентов, особенно в присутствии ЭМГ. Функция ЭМГ, как “сшивающего” агента белковых макромолекул, подтверждается литературными данными [6]. При этом сравнение величин ζ -потенциала исходного конъюгата и комплексов (табл. 1) с величиной ζ -потенциала соответствующих липосом – (-63.2 ± 3.2) мВ для ФХ-ДГК и (-63.3 ± 3.2) мВ для ФХ-ДГК-ЭМГ, указывает на значительное снижение ζ -потенциала липосом при их инкапсулировании конъюгатом Каз-На-МД. На основании этого можно предположить, что электростатические взаимодействия между противоположно заряженными функциональными группами белка и липидов (ФХ и ДГК) вносят существенный вклад в формирование изучаемых супрамолекулярных комплексов. При этом важно отметить, что величина ζ -потенциала комплексов, превышающая 30 мВ, обеспечивала им высокий уровень растворимости

и коллоидной стабильности в водной среде. Это хорошо согласовывалось с высокими положительными значениями осмотического второго вириального коэффициента в разложении химических потенциалов растворителя и комплексов по концентрации, характеризующее высокое термодинамическое сродство комплексов к водной среде.

3.2. Структурное состояние бислоя липосом

Для оценки структурного состояния бислоя липосом ФХ в супрамолекулярных комплексах использовали метод ЭПР-спектроскопии. В табл. 2 представлены данные о влиянии введения ДГК и ЭМГ, а также инкапсулирования липосом конъюгатом Каз-На-МД, на время вращательной корреляции в двух перпендикулярных направлениях (τ_{c1} , τ_{c2}) спинного зонда 16-ДСК в глуболежащих областях (20–22 Å) бислоя липосом ФХ. Введение ДГК статистически достоверно снижало время вращательной корреляции зонда 16-ДСК, свидетельствуя об уменьшении микровязкости бислоя ФХ, находящегося в жидкокристаллическом состоянии. Этот результат был обусловлен нарушением упорядоченности бислоя за счет встраивания в него изогнутых полиненасыщенных

Таблица 2. Влияние ДГК, ЭМГ и конъюгата (Каз-На-МД) на время вращательной корреляции спинного зонда 16-ДСК в глуболежащих областях (20–22 Å) бислоев липосом ФХ, в водной среде (pH = 7.0, фосфатный буфер, I = 0.001М)

Образец	$\tau_{c1} \cdot 10^{10}$, с ⁻¹	$\tau_{c2} \cdot 10^{10}$, с ⁻¹
ФХ	9.60 ± 0.15^b	9.5 ± 0.1^e
ФХ-ДГК	9.2 ± 0.1^e	9.1 ± 0.1^e
ФХ-ДГК-ЭМГ	9.2 ± 0.1^e	9.0 ± 0.3^e
ФХ-ДГК-К	18.7 ± 0.4^a	15.90 ± 0.05^a
ФХ-ДГК-ЭМГ-К	18.2 ± 0.6^a	15.0 ± 0.5^b

Индексы “a” – “e” указывают на статистически значимые различия (при $p < 0.05$) между сравниваемыми в одном столбце величинами измеренных параметров.

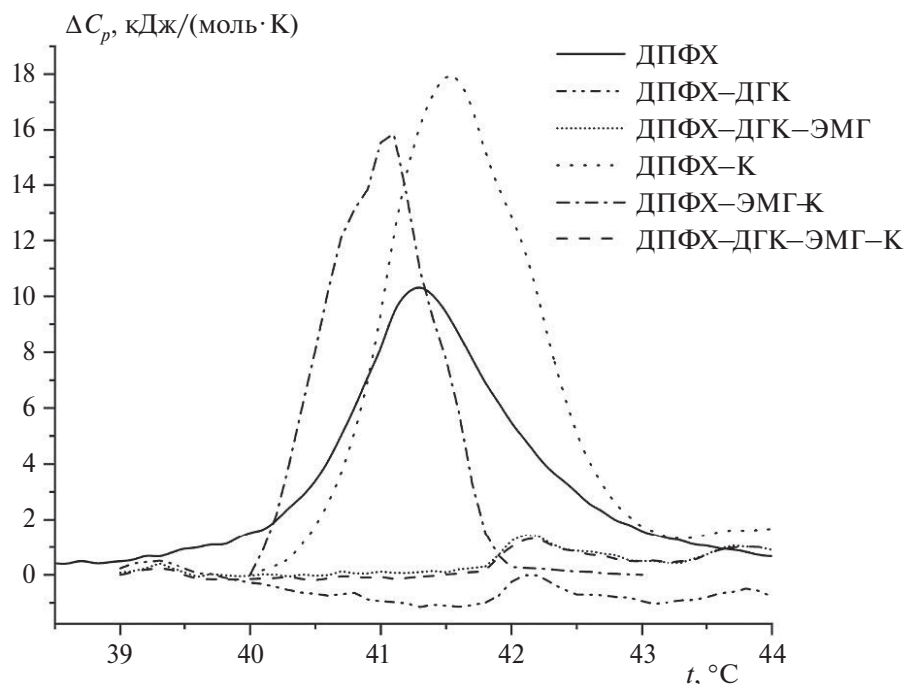


Рис. 1. Термограммы фазового перехода бислоя липосом ДПФХ ($0.5 \cdot 10^{-3}$ М) из гелеподобного в жидкокристаллическое состояние в присутствии ДГК, ЭМГ и в результате инкапсулирования конъюгатом (Каз-На-МД); pH = 7.0, $I = 0.001$ М.

углеводородных цепочек ДГК [19]. Добавление ЭМГ, состоящего на 72% из небольших молекул эвгенола, в изученной концентрации не изменяло время вращательной корреляции зонда 16-ДСК.

В то же время инкапсулирование липосом конъюгатом приводило к ярко выраженному возрастанию времен вращательной корреляции зонда 16-ДСК, указывая на значительное увеличение микровязкости в глуболежащих областях (20–22 Å) бислоя липосом ФХ. Такое влияние конъюгата, очевидно, было связано со встраиванием гидрофобных участков белка в бислой, приводя к его уплотнению [20].

Дополнительная информация о влиянии введения ДГК, ЭМГ и инкапсулирования конъюгатом Каз-На-МД на структурное состояние бислоя липосом была получена на липосомах модельного дипальмитоилфосфатидилхолина методом дифференциальной сканирующей калориметрии. Из рис. 1 видно, что на термограмме, полученной для липосом ДПФХ, при температуре $t = (41.3 \pm 0.1)$ °C наблюдается фазовый переход (ФП) бислоя из гелеподобного фазового состояния в жидкокристаллическое. Этот переход характеризуется величиной энтальпии $\Delta H_{\text{ФП}} = (17.4 \pm 1.6)$ кДж/моль. Инкапсулирование липосом ДПФХ конъюгатом приводило к небольшому сдвигу температуры ФП,

(41.5 ± 0.1) °C, и статистически значимому возрастанию энтальпии, (25.2 ± 2.3) кДж/моль. По-видимому, этот результат подтверждает данные ЭПР-спектроскопии, предполагающей встраивание гидрофобных участков белка в бислой липо-

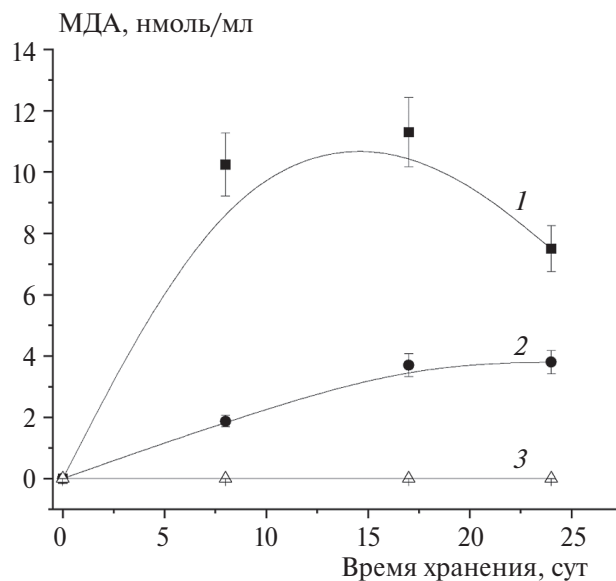


Рис. 2. Накопление вторичного продукта перекисного окисления ПНЖК (МДА) в водных растворах липосом ФХ-ДГК (1), ФХ-ДГК-ЭМГ (2) и супрамолекулярного комплекса ФХ-ДГК-ЭМГ-К (3) при их хранении в течение 24 сут при комнатной температуре (20–22 °C) на свету (pH = 7.0, $I = 0.001$ М).

сом ДПФХ. При этом увеличение $\Delta H_{\text{ФП}}$ могло свидетельствовать как о формировании новых гидрофобных связей между гидрофобными функциональными группами белка и углеводородными цепочками жирных кислот в бислое ДПФХ, так и о возрастании энергии гидрофобного притяжения между углеводородными цепочками жирных кислот ДПФХ, формирующих бислой.

В присутствии ЭМГ в бислое ДПФХ встраивание гидрофобных участков белка, входящего в состав конъюгата, приводило к не столь выраженному возрастанию энтальпии ФП, (21.3 ± 1.9) кДж/моль, и снижению температуры ФП, (41.1 ± 0.1) °С. По-видимому, в присутствии ЭМГ меньшее число гидрофобных взаимодействий белок–ДПФХ было реализовано.

В то же время встраивание ДГК в бислой липосом ДПФХ переводило его из гелеподобного состояния в жидкокристаллическое при температуре менее 40 °С, и фазовый переход между этими двумя состояниями на термограммах исчезал (рис. 1). Этот результат согласуется с уменьшением микровязкости жидкокристаллического бислоя ФХ в присутствии ДГК, обнаруженным методом ЭПР-спектроскопии. При этом инкапсулирование липосом ДПФХ–ДГК и ДПФХ–ДГК–ЭМГ конъюгатом не могло вернуть бислой из жидкокристаллического состояния в гелеподобное, как хорошо видно на рис. 1.

3.3. Защита ПНЖК от окисления

Высокая плотность (табл. 1) супрамолекулярного комплекса ФХ–ДГК–ЭМГ–К, а также значительное возрастание микровязкости бислоя инкапсулированных в нем липосом (табл. 2) препятствовали диффузии кислорода к ПНЖК, входящим в их состав, тем самым способствуя защите их от автоокисления кислородом воздуха. Об этом свидетельствовало отсутствие накопления малонового диальдегида в растворе комплекса ФХ–ДГК–ЭМГ–К при его хранении в течение 24 сут при комнатной температуре на свету (рис. 2). При этом следует отметить, что такой эффективный растительный антиоксидант, как ЭМГ, также внёс вклад в эту защиту (рис. 2).

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сформированный супрамолекулярный комплекс ФХ–ДГК–ЭМГ–К отвечал всем требованиям, предъявляемым к системам доставки ну-

трицевтиков. Так, инкапсулирование конъюгатом Каз–На–МД липосомальной формы ДГК в присутствии ЭМГ, сопровождающееся значительным повышением микровязкости бислоя липосом, ярко выраженной ассоциацией исходного конъюгата и повышением плотности комплекса, препятствовало окислению и деградации ДГК и ПНЖК фосфатидилхолина. Кроме этого, термодинамическое сродство комплекса к водной среде, а также его наноразмеры и высокий дзета-потенциал, обеспечивали его высокую водорастворимость. Это является одним из ключевых факторов, определяющих усвоение пероральной системы доставки в биологических жидкостях пищеварительного тракта, на более чем 90%, состоящих из воды.

В этом исследовании были использованы приборы ЦКП ИБХФ РАН (центра магнитной спектроскопии и сектора лазерного светорассеяния).

Авторы выражают благодарность фирмам Lipoid GmbH (Германия) и AVEBE Group (Нидерланды) за бесплатное предоставление образцов фосфатидилхолина и мальтодекстрина для этого исследования соответственно.

Работа Семёновой, Антиповой, Мартиросовой, Зеликиной и Пальминой была поддержана грантом № 21-16-00085 Российского научного фонда (<https://rscf.ru/project/21-16-00085/>): работа Анохиной и Богдановой, как разработчиков методологии проведения измерений поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (рег. № научной темы: 122041300204-1).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ahmed M.K., Ahmed F., Tian H. et al. // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2020. V. 19. № 1. P. 64.*
2. *Kalkman H.O., Hersberger M., Walitza S. et al. // Intern. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 9. Article 4393.*
3. *Patel A., Desai S.S., Mane V.K. et al. // Trends Food Sci. Technol. 2022. V. 120. P. 140.*
4. *Scotto di Palumbo A., McSwiney F.T., Hone M. et al. // J. Diet. Suppl. 2022. V. 19. № 4. P. 499.*
5. *Kharat M., McClements D.J. // J. Colloid Interface Sci. 2019. V. 557. P. 506.*
6. *Александрова В.А., Фоторьянская А.М. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 12. С. 66.*
7. *Шишкина Л.Н., Козлов М.В., Константинова Т.В. и др. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 28.*
8. *Piwovarczyk L., Kucinska M., Tomczak S. et al. // Nanomaterials. 2022. V. 12. № 8. Article 1274.*

9. Na J.-Y., Song K., Kim S. *et al.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2015. V. 460. № 2. P. 308.
10. Терешкин Э.В., Терешкина К.Б., Лойко Н.Г. и др. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 5. С. 30.
11. Стовбун С.В., Веденкин А.С., Михалёва М.Г. и др. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 12. С. 66.
12. Falsafi S.R., Rostamabadi H., Samborska K. *et al.* // Pharmacol. Res. 2022. V. 178. Article 106164.
13. Gumus C.E., Davidov-Pardo G., McClements D. J. // Food Hydrocolloids. 2016. V. 60. P. 38.
14. Misharina T.A., Alinkina E.S., Vorobjeva A.K. *et al.* // Appl. Biochem. Microbiol. 2016. V. 52. № 3. P. 336.
15. Методические рекомендации МР 2.3.1.0253-21. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. М.: Роспотребнадзор, 2021. С. 72.
16. Zelikina D., Chebotarev S., Komarova A. *et al.* // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. 2022. V. 651. Article 129630.
17. Buttefield D.A., Whisnant C.C., Chesnut D.B. // BBA. 1976. V. 426 № 4. P. 697.
18. Burchard W. Light scattering technique. // Physical techniques for the study of food biopolymers / Ed. Ross-Murphy S.B. Glasgow: Blackie, 1994. P. 151.
19. Pedroni V.I., Sierra M.B., Alarcón L.M. *et al.* // Biochim. Biophys. Acta Biomembr. 2021. V. 1863. № 6. Article 183584.
20. Dragicevic-Curic N., Friedrich M., Petersen S. *et al.* // Intern. J. Pharm. 2011. V. 412. № 1–2. P. 85.

STRUCTURAL AND THERMODYNAMIC PARAMETERS OF A BIOPOLYMERIC ORAL DELIVERY SYSTEM FOR LIPOSOMAL FORM OF A COMBINATION OF NUTRACEUTICALS

M. G. Semenova^{1*}, A. S. Antipova¹, E. I. Martirosova¹, M. S. Anokhina¹,
D. V. Zelikina¹, N. G. Bogdanova¹, N. P. Palmina¹

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.*

**E-mail: mariagersem@mail.ru*

A liposomal form of a combination of hydrophobic nutraceuticals (omega-3 docosahexaenoic polyunsaturated fatty acid (DHA) and clove essential oil (CEO)) was prepared based on soya phosphatidylcholine (PC). The impact of DHA and CEO on the microviscosity of the bilayer of PC liposomes was investigated through the use of EPR spectroscopy. Furthermore, the influence of DHA and CEO on the phase state of the bilayer of model dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes was ascertained through the analysis of DSC data. A combination of EPR spectroscopy, DSC and laser light scattering methods was employed to investigate the effect of liposome encapsulation (PC-DHA-CEO) with a covalent conjugate (C) of sodium caseinate and maltodextrin on the structural state of the encapsulated liposome. Furthermore, the investigation concentrated on the structural characteristics (molar mass, size, density, architecture and zeta potential) and the thermodynamic parameters (osmotic second virial coefficient) of the water-soluble supramolecular complex PC-DHA-CEO-C. The key structural parameters of this complex have been identified as providing effective protection of PUFAs included in its composition from oxidation by air oxygen.

Keywords: liposomes, biopolymers, nutraceuticals, structure, thermodynamic parameters, supramolecular complex, delivery system.

REFERENCES

1. Ahmmed M.K., Ahmmed F., Tian H. et al. // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. **19**, 64 (2020).
2. Kalkman H.O., Hersberger M., Walitza S. et al. // Int. J. Mol. Sci. **22**, 4393 (2021).
3. Patel A., Desai S.S., Mane, V.K. et al. // Trends Food Sci. Technol. **120**, 140 (2022).
4. Scotto di Palumbo A., McSwiney F.T., Hone M. et al. // J. Diet. Suppl. **19**, 499 (2022).
5. Kharat M., McClements D.J. // J. Colloid Interface Sci. **557**, 506 (2019).
6. Aleksandrova V.A., Futoryanskaya A.M. // Russ. J. Phys. Chem. B. **17**, 1394 (2023).
7. Shishkina L.N., Kozlov M.V., Konstantinova T.V. et al. // Russ. J. Phys. Chem. B. **17**, 141 (2023).
8. Piwowarczyk L., Kucinska M., Tomczak S. et al. // Nanomater. **12**, 1274 (2022).
9. Na J.-Y., Song K., Kim S. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. **460**, 308 (2015).
10. Tereshkin E.V., Tereshkina K.B., Loiko N.G., et al. // Russ. J. Phys. Chem. B. **17**, 608 (2023).
11. Stovbun S.V., Vedenkin A.S., Mikhaleva M.G., et al. // Russ. J. Phys. Chem. B. **16**, 1147 (2022).
12. Falsafi S.R., Rostamabadi H., Samborska K. et al. // Pharmacol. Res. **178**, 106164 (2022).
13. Gumus C.E., Davidov-Pardo G., McClements D.J. // Food Hydrocoll. **60**, 38 (2016).
14. Misharina T.A., Alinkina E.S., Vorobjeva A.K. et al. // Appl. Biochem. Microbiol. **52**, 336 (2016).
15. Methodical recommendations MR 2.3.1.0253-21. Norms of physiological needs in energy and food substances for different population groups of the Russian Federation. Moscow: Rospotrebnadzor, 2021. P. 72.
16. Zelikina D., Chebotarev S., Komarova A. et al. // Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp. **651**, 129630 (2022).
17. Buttefield D.A., Whisnant C.C., Chesnut D.B. // BBA. **426**, 697 (1976).
18. Burchard W., in *Physical techniques for the study of food biopolymers*, Ed. By RossMurphy S.B. (Blackie, Glasgow, 1994), p. 151.
19. Pedroni V.I., Sierra M.B., Alarcón L.M. et al. // Biochim. Biophys. Acta, Biomembr. **1863**, 183584 (2021).
20. Dragicevic-Curic N., Friedrich M., Petersen S. et al. // Int. J. Pharm. **412**, 85 (2011).

УДК 543.9:543.552:57.083.3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СЕРДЕЧНОГО ТРОПОНИНА I МЕТОДОМ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА НА МАГНИТНЫХ ЧАСТИЦАХ С ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ

© 2024 г. О. Н. Сорокина^{1*}, Т. С. Константинова¹, А. К. Воробьева¹,
А. Д. Васильева¹, Л. В. Юрина¹, А. В. Ерёменко¹, А. В. Лыженкова²,
Л. О. Минушкина³, Д. А. Затейщиков^{2,3}, И. Н. Курочкин^{1,4}

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

²ГБУЗ “Городская клиническая больница №29 им. Н.Э. Баумана ДЗ г. Москвы”, Москва, Россия

³ФГБУ ДПО “Центральная государственная медицинская академия”

УД Президента РФ, Москва, Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*E-mail: alsiona@gmail.com

Поступила в редакцию 26.03.2024;

после доработки 24.04.2024;

принята в печать 20.05.2024

Разработан высокочувствительный метод для количественного экспресс-определения сердечного тропонина (сТn I) в сыворотке крови человека. Метод основан на проведении иммуноферментного анализа (ИФА) на магнитных частицах в объеме образца сыворотки крови, что позволяет существенно снизить диффузионные ограничения, характерные для традиционного ИФА. В качестве ферментной метки использовался высокопроизводительный фермент — щелочная фосфатаза, который в комбинации с субстратом 1-нафтилфосфатом натрия демонстрировал каталитическую эффективность: $(k_{cat}/K_m) = 26\,500 \text{ (с} \cdot \text{ммоль/л)}^{-1}$. Электрохимическое детектирование сигнала было реализовано на планарных электродных структурах, изготавливаемых по промышленной технологии трафаретной печати. Детектирование проводилось в режиме дифференциальной импульсной вольтамперометрии с расчетным пределом обнаружения в 0.075 мкмоль/л продукта ферментативной реакции, что существенно превосходит чувствительность колориметрических методов детектирования. Комбинация предложенных методов и подходов позволила реализовать количественный анализ сТn I в сыворотке крови человека за 20 мин с расчетным пределом обнаружения в 7 пг/мл и верхним референтным пределом нормы (99-й перцентиль), составляющим 22 пг/мл.

Ключевые слова: иммуноферментный анализ, магнитные частицы, щелочная фосфатаза, электрохимическое детектирование, сердечный тропонин I.

DOI: 10.31857/S0207401X24110095

1. ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания, такие как острый инфаркт миокарда (ИМ), являются одной из наиболее распространенных причин смерти людей как в развивающихся, так и в развитых странах [1–4]. Диагностика ИМ — сложный процесс, который требует комплексного подхода, сочетающего несколько методов исследований, таких как оценка симптомов, электрокардиограмма, определение биомаркеров повреждения сердечной мышцы и пр. Одним из ключевых биомаркеров, используемых для диагностики ИМ, является сердечный тропонин I (сТnI) [5, 6]. Он представляет собой контрактильный белок опре-

деленной структуры [7], присутствующий исключительно в сердечной мышце, который высвобождается в кровь при повреждении миокарда (инфаркте миокарда) [8].

Физиологический уровень сТnI в крови здорового человека составляет менее 0.04 нг/мл [9]. Патологическая концентрация сТnI в крови, свидетельствующая о повреждении сердечной мышцы, может быть определена несколькими методами, которые различаются по продолжительности анализа и чувствительности.

Для количественного определения сТnI широко применяется иммуноферментный анализ

(ИФА), в основе которого лежит специфическая реакция антиген—антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала. Нижние пределы обнаружения для сТn I методом ИФА могут находиться в интервале варьирования от 0.01 до 0.04 нг/мл [10], однако время анализа оказывается довольно длительным и обычно составляет около 1–2 ч.

В настоящей работе предложен метод количественного определения сердечного тропонина I в сыворотке и плазме крови человека методом гетерогенного иммуноферментного анализа на магнитных частицах с электрохимическим детектированием сигнала. В разрабатываемом методе использование магнитных частиц в качестве твердой фазы [11] дает ряд преимуществ перед традиционными методами гетерогенного ИФА, проводимыми на поверхности полистирольных планшетов. Реакция взаимодействия целевого антигена с антителами, связанными с поверхностью магнитных частиц, происходит в объеме образца, благодаря чему преодолеваются диффузионные ограничения и увеличивается скорость и иммунореакции, и ферментативного процесса. Электрохимический метод детекции характеризуется быстротой и чувствительностью и широко используется для определения различных белков в крови [12]. Предлагаемый метод анализа может быть реализован за 20 мин, что сопоставимо с современными методами экспресс-диагностики маркеров крови [13, 14]. Чувствительность метода иммуноанализа сравнима с традиционным ИФА и современными методами анализа и составляет 7 пг/мл. Верхний референтный предел нормы (99-й перцентиль) составляет 22 пг/мл.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ковалентная модификация магнитных частиц

Магнитные частицы SileksMag-NH₂, производства ООО “Силекс”, (Россия) покрыты SiO₂-оболочкой и имеют на своей поверхности активные NH₂-группы для возможности иммобилизации антител (АТ) захвата к сТnI (клоны 20С6 и 7В9 производства ООО “Хайтест”, Россия). Такие частицы активно используются для выделения различных белковых структур [15]. Ковалентная иммобилизация антител на поверхности магнитных частиц проводилась по методике производителя — ООО “Силекс”. Модифицированные час-

тицы в концентрации 10 мг/мл необходимо хранить в фосфатно-солевом буфере с добавлением 0.5% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 1% L-метионина, 0.02% NaN₃ при pH 7.4 и температуре 4 °С.

Конъюгирование антител с ферментной меткой

Для конъюгирования антител детекции к сТn I (клоны 506сс и RecR33сс) с ферментом щелочной фосфатазой (код LPP-229, Toyobo enzymes, Japan) использовали метод сшивки через модификацию антител N-сукцинимидил-S-ацетилпропионатом (SATP, производства компании Thermo Fisher, USA) и фермента через модификацию сульфосукцинимидил-4-[N-малеидометил]циклогексан-1-карбоксилатом ((Sulfo-SMCC), Thermo Fisher, USA), согласно протоколу производителя. В результате получали стоковый раствор антител, конъюгированных с ферментной меткой с концентрацией АТ 1 мг/мл.

Ферментативная реакция

Мононатриевая соль 1-нафтилфосфата использовалась как электрохимический субстрат для фермента щелочной фосфатазы. В результате ферментативного гидролиза 1-нафтилфосфата в щелочной среде при pH 9.5 – 10 образуется электрохимически активный продукт реакции – 1-нафтол. Константу Михаэлиса (K_m) и максимальную скорость ферментативного процесса (V_{max}) с субстратом 1-нафтилфосфатом мононатриевой соли определяли по кривой Михаэлиса—Ментена [16] для щелочной фосфатазы в составе иммунологического комплекса на магнитных частицах. Экспериментально рассчитанная величина K_m составляла 0.127 ммоль/л при максимальной скорости реакции 13 800 нА/(с · мкмоль · л⁻¹). Для обеспечения оптимальных условий работы ферментной метки используют концентрацию субстрата $>10K_m$. Это позволяет добиться максимальной скорости наработки продукта в течение всего времени процесса. Для проведения анализа была выбрана концентрация ферментативного субстрата, равная 1.5–2 ммоль/л. Щелочная фосфатаза в комбинации с субстратом 1-нафтилфосфатом демонстрирует высокую каталитическую эффективность (k_{cat}/K_m) = 26 500 (с · ммоль/л)⁻¹, где каталитическую константу k_{cat} оценивали из данных по V_{max} и чувствительности метода электрохимической детекции к продукту фермента-

тивной реакции 1-нафтолу (4.1 нА на 1 мкмоль/л 1-нафтола).

ДЕТЕКТИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОГО СИГНАЛА

В результате проведения электрохимической реакции на поверхности рабочего электрода происходило окисление гидроксильной группы 1-нафтола с образованием продукта реакции — 1,4-нафтохинона. Электрохимическое окисление фенольных соединений активно используется для изучения ферментативных процессов в различных системах [17, 18].

В работе использовались двухэлектродные электрохимические сенсоры, изготовленные на лавсановых подложках по технологии трафаретной печати с золотым рабочим электродом и электродом сравнения Ag/AgCl производства ООО “Компания “Элта”, (Россия). Для изготовления рабочего электрода использовалась паста ПЗл-М производства ООО “НПП Дельта-пасты” (Россия), а для электрода сравнения — паста ПСХП-1 того же производителя.

Электрохимические сигналы 1-нафтола регистрировали в буферном растворе диэтаноламина с концентрацией 50 ммоль/л с добавлением 5 ммоль/л $MgCl_2$ и 100 ммоль/л KCl с pH = 9.5 методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВАМ) на потенциостате Corrtest CS350M производства компании Wuhan Corrtest Instruments Corp., Ltd., (КНР) при следующих условиях регистрации: $E_{begin} = 0.05$ В, $E_{end} = 0.5$ В, $\Delta E = 12.5$ мВ, $E_{puls} = 50$ мВ, $t_{puls} = 0.06$ с, $N_{puls} = 0.5$. Чувствительность электрохимического детектирования 1-нафтола методом ДИВАМ составляет $k = 4.1$ нА/(мкмоль $л^{-1}$), а расчетный предел обнаружения ($3SD_0/k$) = 0.075 мкмоль/л (1.5 пмоль), что существенно превосходит чувствительность колориметрического анализа, которая составляет ~8.5 мкмоль/л для 3,3',5,5'-тетраметилбензидин-диимина. Линейный характер концентрационной зависимости для сигнала ДИВАМ 1-нафтола составляет 3 порядка и лежит в диапазоне от 0.1 до 100 мкмоль/л.

Процедура проведения анализа

Сборку иммунологического комплекса осуществляли по следующей процедуре: в пробирку с единичным объемом магнитных частиц

(1–4 мкл), модифицированных АТ к сТnI вносили 50 мкл сыворотки крови человека, содержащей тройной комплекс TnITC в концентрациях 0, 0.75, 1.875, 7.5 и 10 нг/мл и 75 мкл АТ, конъюгированных с ферментной меткой, в концентрации 0.12–1 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере с Твин-20 0.1% (ФСБТ) и БСА 5% при pH 7.4. После смешивания всех компонентов проводили их инкубацию в пробирке при комнатной температуре (23–25 °С) и при 37 °С в течение 10 мин и постоянном перемешивании. После сборки иммунологического комплекса несвязавшиеся компоненты системы убирали путем двукратной отмычки магнитных частиц буфером ФСБТ и однократной отмычки 50 ммоль/л диэтаноламинным (ДЭА) буфером с pH = 9.5 для перевода системы в необходимую для работы фермента щелочную среду. Все отмычки осуществлялись с использованием внешнего магнитного поля постоянного магнита [19]. Затем к фракции магнитных частиц с иммунологическим комплексом на поверхности добавляли 40 мкл субстрата в концентрации 1.5 мкмоль/л в ДЭА-буфере с pH = 9.5 с добавлением KCl в концентрации 100 ммоль/л и $MgCl_2$ в концентрации 5 ммоль/л и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре или 37 °С и постоянном перемешивании. По истечении времени инкубации субстрат с наработанным продуктом переносили на рабочую поверхность электрохимического сенсора и проводили электрохимическое измерение сигнала ДИВАМ в условиях для регистрации 1-нафтола.

Оптимизация параметров сборки иммунологического комплекса

Предлагаемый метод иммунологического анализа включает в себя четыре основные стадии: иммунохимическая реакция на магнитных частицах, отмычка иммунологического комплекса от несвязавшихся компонентов системы, инкубация с ферментативным субстратом для наработки электрохимически активного продукта, регистрация электрохимического сигнала.

Эффективная реализация иммунологического анализа требует подбора и оптимизации условий сборки комплекса на магнитных частицах, таких как количество магнитных частиц с АТ захвата, концентрация ферментной метки, конъюгированной со вторыми антителами, и температура процесса. Объем магнитных частиц (V) для ана-

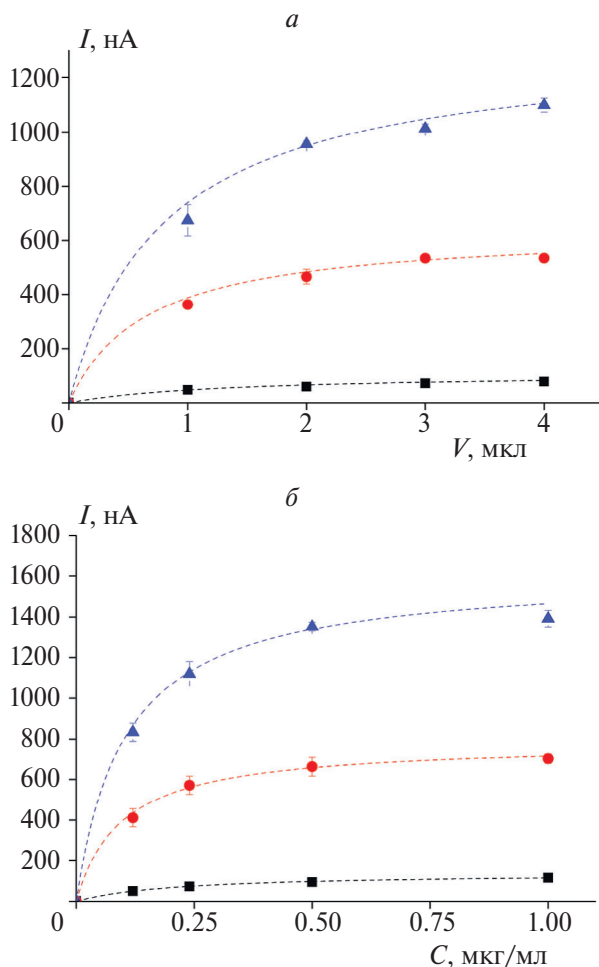


Рис. 1. Зависимости электрохимического сигнала от количества магнитных частиц (а) и от концентрации АТ, конъюгированных с ферментной меткой (б), для разной концентрации сТн I в пробе ■ — 1 нг/мл, ● — 10 нг/мл, ▲ — 25 нг/мл.

лиза варьировали в диапазоне от 1 до 4 мкл на пробу, концентрацию ферментной метки (C) в диапазоне 0.12–1 мкг/мл, сборку иммунологического комплекса и наработку продукта реакции проводили при комнатной температуре (23–25 °С) и при 37 °С. Варьируя один из указанных выше параметров, другой оставляли постоянным.

На рис.1 представлены зависимости интенсивности электрохимического сигнала от объема магнитных частиц и концентрации конъюгата антител с ферментной меткой. Данные, полученные при электрохимическом детектировании продукта ферментативной реакции, свидетельствуют о том, что оптимальный объем магнитных частиц для достоверной иммунопреципитации целевого белка из образца сыворотки крови человека составляет 3 мкл на одну пробу (рис. 1а), а конъюгата АТ с ферментной меткой — 0.5 мкг/мл (рис. 1б). Уве-

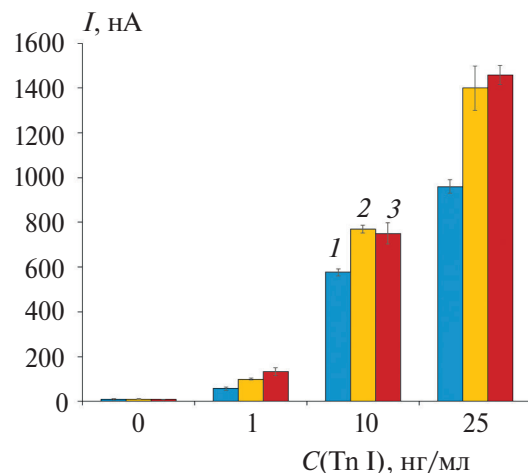


Рис. 2. Зависимость интенсивности электрохимического сигнала от температурного режима сборки иммунологического комплекса на магнитных частицах и наработки продукта ферментативной реакции; 1 — температура сборки иммунологического комплекса 25 °С, температура наработки продукта ферментативной реакции 25 °С; 2 — температура сборки иммунологического комплекса 25 °С, температура наработки продукта ферментативной реакции 37 °С; 3 — температура сборки иммунологического комплекса 37 °С, температура наработки продукта ферментативной реакции — 37 °С.

личение объема магнитных частиц и АТ, конъюгированных с ферментом, выше оптимальных значений существенно не влияет на эффективность сборки иммунологического комплекса. Проверка температурных режимов для процессов сборки иммунологического комплекса и наработки продукта ферментативной реакции показала, что при комнатной температуре ферментативный процесс существенно замедляется, по сравнению с наработкой при 37 °С, а на сборку иммунологического комплекса температурный режим значительного влияния не оказывает (рис. 2).

С использованием данных по оптимизации процедуры анализа была получена калибровочная зависимость интенсивности электрохимического сигнала от концентрации тропонина I в пробе с использованием коммерческого калибратора тройного комплекса TnITC производства ООО “Хайтест” (Россия), рис. 3 (круглые маркеры). При сборке иммунологического комплекса для калибровочной зависимости использовали магнитные частицы в количестве 3 мкл на одну пробу, 50 мкл сыворотки крови человека и 75 мкл АТ, конъюгированных с ферментной меткой в концентрации 0.5 мкг/мл. Сборку иммунологического комплекса проводили в одну стадию при комнат-

Таблица 1. Сводная таблица данных измерения концентрации тропонина I в образцах сыворотки крови пациентов, предоставленных ГКБ №29. Сравнение результатов, полученных в ГКБ №29 и на анализаторе Getein 1100

№ пробы	Данные из ГКБ №29, нг/мл	Данные анализатора Getein 1100, нг/мл	Расчетные значения, нг/мл	Относительная ошибка, %	I_{av} , нА	SD, нА	RSD, %
10	0.01	0.01	0.000 ± 0.000	—	1.34	0.07	6
12	0.01	0.01	0.002 ± 0.002	79	1.97	0.38	19
17	0.01	0.01	0.003 ± 0.002	19	2.25	0.35	16
20	0.01	0.01	0.004 ± 0.003	80	2.35	0.70	30
5	0.01	0.01	0.005 ± 0.003	30	2.52	0.66	26
28	0.01	0.01	0.006 ± 0.004	65	2.88	0.90	31
66	0.01	0.01	0.007 ± 0.003	45	3.05	0.70	23
57	0.01	0.01	0.008 ± 0.003	37	3.23	0.64	20
50	0.01	0.01	0.008 ± 0.003	31	3.25	0.54	17
34	0.01	0.01	0.009 ± 0.001	13	3.65	0.29	8
6	0.01	0.01	0.010 ± 0.002	24	3.70	0.54	14
25	0.01	0.01	0.014 ± 0.001	9	4.68	0.26	6
3	0.01	0.01	0.014 ± 0.001	9	4.70	0.30	6
4	0.01	0.01	0.017 ± 0.001	8	5.37	0.32	6
2	0.02	0.01	0.013 ± 0.001	4	4.45	0.17	4
27	0.02	0.01	0.006 ± 0.002	28	2.83	0.38	13
11	0.04	0.01	0.034 ± 0.015	38	9.35	3.38	43
32	0.09	0.06	0.049 ± 0.022	44	12.78	4.92	38
38	0.11	0.08	0.081 ± 0.007	9	20.03	1.58	8
61	0.94	2.54	0.916 ± 0.071	8	210.25	16.21	8
58	10.69	12.27	10.153 ± 0.219	2	1403.13	28.72	2

Примечание: I_{av} — среднее значение интенсивности электрохимического сигнала, SD — стандартное отклонение интенсивности электрохимического сигнала от среднего значения, RSD — относительное стандартное отклонение интенсивности электрохимического сигнала от среднего значения.

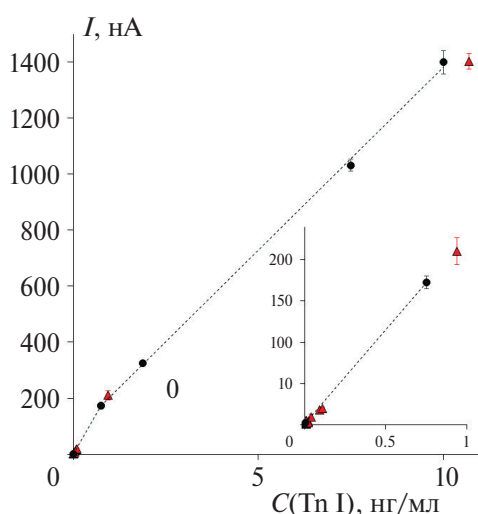


Рис. 3. Калибровочная зависимость интенсивности электрохимического сигнала от концентрации тропонинового комплекса TnITC в образце (•); на вставке — начальный участок калибровочной зависимости; ▲ — интенсивность сигналов с TnI в образцах сыворотки крови пациентов в зависимости от концентрации с Tn I по данным ГКБ №29.

ной температуре, а наработку ферментативного продукта — при 37 °С. Электрохимический сигнал регистрировали в режиме ДИВАМ для количественного определения 1-нафтола.

Калибровочную зависимость получали в диапазоне концентраций тропонина I от 0 до 10 нг/мл. Условно зависимость можно разделить на два линейных участка — от 0 до 1 нг/мл и от 1 до 10 нг/л, описываемых уравнениями линейной регрессии: $y = 228.0x + 1.5$ и $y = 130.9x + 74.1$ соответственно. Разрабатываемый метод иммуноанализа с электрохимическим детектированием обладает высокой чувствительностью и низким пределом обнаружения. Предел обнаружения, рассчитанный по калибровочной зависимости в диапазоне концентраций тропонина I от 0 до 1 нг/мл как $3SD_0/228.0$, составляет 7 пг/мл.

Построение калибровочной зависимости позволяет реализовать апробацию метода иммуноферментного анализа на магнитных частицах

с электрохимическим детектированием на сывотках крови пациентов с подозрением на инфаркт миокарда, предоставленных кардиологическим отделением Городской клинической больницы №29 (ГКБ №29). На рис. 3 треугольными маркерами приведены данные по интенсивности электрохимических сигналов, полученных для образцов сыворотки крови пациентов в соответствии с концентрацией сTnI, измеренной на анализаторе Mindray bs800 (КНР) в лаборатории ГКБ № 29. Полученные значения интенсивности сигналов для пациентов удовлетворительно соотносятся с калибровочной зависимостью для тройного комплекса TnITC. В табл. 1 представлены данные по концентрации сTnI в образцах крови пациентов, измеренные в ГКБ №29 на анализаторе Mindray bs800, а также референсным методом на экспресс-анализаторе Getein-1100 (КНР) в лабораторных условиях ИБХФ РАН и методом ИФА на магнитных частицах и рассчитанные по уравнениям для разных участков калибровочной зависимости.

Для реализации метода иммуноанализа, кроме чувствительности, важным параметром является специфичность анализа, которая определяется как верхний референтный предел концентрации целевого белка, при котором 99 из 100 лиц здоровой популяции будут иметь отрицательный результат тестирования – 99-й процентиль. Для расчета 99-го percentиля были проведены измерения 16 проб сыворотки здоровых людей, чей показатель сTnI не превышает 20 пг/мл. Для каждой пробы было проведено по два независимых анализа, включая сборку иммунологического комплекса, наработку продукта ферментативной реакции и регистрацию электрохимического сигнала. В результате для статистической обработки был получен массив из 32 независимых величин. С использованием полученных значений интенсивностей электрохимического сигнала была проведена линейная интерполяция между соседними значениями в наборе данных из 32 упорядоченных по величине сигналов. Верхний референтный предел концентрации целевого белка или 99-й процентиль списка (от меньших к большим) рассчитывался как наименьшее в списке число, которое больше, чем 99% всех чисел исследуемого ряда. Расчет проводился в программе *Excel* с использованием встроенной статистической функции ПРОЦЕНТИЛЬ.ВКЛ. В результате обработки значение верхнего референтного предела

нормы для разрабатываемого метода анализа было определено как ~22 пг/мл.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метод иммуноферментного анализа на магнитных частицах с электрохимическим детектированием, предложенный в работе, демонстрирует высокую чувствительность и специфичность при количественном определении сердечного тропонина I в сыворотке крови человека. Разработанный метод может стать платформой для создания автоматизированных систем диагностики маркеров острого инфаркта миокарда и других специфических маркеров заболеваний. Такие системы диагностики могут оказаться востребованными для проведения экспресс-анализа в медицинских организациях по месту приема пациента.

Авторы выражают благодарность ГКБ №29 за предоставленные образцы сыворотки и плазмы крови.

Работа выполнена за счет средств госзадания (тема № 122041400080-0).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hahla M.S., Saeed Y., Razieh H.* // Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. 2016. V. 7. № 6. P. 2013–6.
2. National Center for Health Statistics. Multiple Cause of Death by Single Race 2018-2022 on CDC WONDER Database, 2023; <https://wonder.cdc.gov/wonder/help/mcd-expanded.html>
3. *Федеральная служба государственной статистики (Росстат)*. Оперативные демографические показатели за январь – июнь 2020 г., 2021; https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/BgiLrP31/demogr_01-06.pdf
4. *Богачев Р.С., Михайлова Л.В., Щербанев К.Г. и др.* // Электронный науч. журн. “Социальные аспекты здоровья населения”. 2023. Т. 69. № 2; <http://vestnik.mednet.ru/content/view/1461/30/lang,ru/>
5. *Docherty A.B., Sim M., Oliveira J. et al.* // Crit Care. 2017. V. 21. P. 216.
6. *Карибаев К.Р., Маханов Д.И., Майдыров Е.С. и др.* // Вестн. Новгородского ГУ. 2018. Т. 112. № 6. С. 59.
7. *Шайтан К.В.* // Хим. физика. 2023. Т. 42 №6. С. 40.
8. *Katrakha I.A., Katrukha A.G.* // Clinical Chem. 2021. V. 67. № 1. P. 124.
9. *Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., et al.* // Circulation. 2018. V. 138. № 20. P. e618.
10. *Babuín L., Jaffe A.S.* // CMAJ. 2005. V. 173. № 10. P. 1191.
11. *Альмов М.И., Сеплярский Б.С., Кочетков Р.А.* // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 8. С. 87.

12. Reddy K.K., Bandal H., Satyanarayana M. et al. // Adv. Sci. 2020. V. 7. P. 1902980.
13. Нечаева Н.Л., Сорокина О.Н., Константинова Т.С. и др. // ЖАХ. 2022. Т. 77. № 5. С. 406.
14. Nechaeva N.L., Sorokina O.N., Konstantinova T.S. et al. // Talanta. 2021. V. 224. P. 121860.
15. Васильева А.Д., Юрина Л.В., Азарова Д.Ю. и др. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 51.
16. Хренова М.Г., Поляков И.В., Немухин А.В. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 6. С. 65.
17. Мисин В.М., Сажина Н.Н. // Хим. физика. 2010. Т. 29. № 9. С. 56.
18. Сажина Н.Н., Мисин В.М. // Хим. физика. 2012. Т. 31. № 11. С. 48.
19. Подойницын С.Н., Сорокина О.Н., Коварский А.Л. // Хим. физика. 2016. Т. 35. № 3. С. 84.

CARDIAC TROPONIN I DETERMINATION BY ELISA IMMUNO ASSAY ON MAGNETIC PARTICLES WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION

O. N. Sorokina^{1*}, T. S. Konstantinova¹, A. K. Vorobyova¹, A. D. Vasilyeva¹,
L. V. Yurina¹, A. V. Eremenko¹, A. V. Lyzhenkova², L. O. Minushkina³,
D. A. Zateyshchikov^{2,3}, I. N. Kurochkin^{1,4}

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Bauman City Clinical Hospital No.29, Health Department of Moscow, Moscow, Russia

³ "Central State Medical Academy" Department of the President of the Russian Federation

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*E-mail: alsiona@gmail.com

A high sensitive method for the quantitative rapid determination of cardiac Troponin I in human serum has been developed. The method is based on an enzyme-linked immunosorbent assay on magnetic particles in the volume of a blood serum sample, which can significantly reduce the diffusion limits typical for common ELISA. Alkaline phosphatase which is a high-performance enzyme was used as an enzyme label. The enzyme demonstrated a catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) = 26500 1/(s·mM) in combination with the substrate 1-naphtyl phosphate mono-sodium salt. The planar electrochemical sensors manufactured by industrial screen-printing technology were used for signal detection. The detection was carried out in differential pulse voltammetry mode. The calculated limit of detection by the enzymatic reaction product was 0.075 μM which significantly exceeded the sensitivity of colorimetric methods. The combination of the proposed methods and approaches makes it possible to obtain a quantitative analysis for cardiac TnI in human serum within 20 minutes with an estimated detection limit of 7 pg/mL and an upper reference limit of normal analyte concentration (99-th percentile) of 22 pg/mL.

Keywords: linked immunosorbent assay, magnetic particles, alkaline phosphatase, electrochemical detection, cardiac Troponin I.

REFERENCES

1. Hahla M.S., Saeed Y., Razieh H. // Res. J. Pharm. Biol. Chem. Sci. **7** (6), 2013 (2016).
2. National Center for Health Statistics. Multiple Cause of Death 2018–2021 on CDC WONDER Database (2023) <https://wonder.cdc.gov/wonder/help/mcd-expanded.html>
3. Federal State Statistics Service (Rosstat). Operational demographic indicators for January – June 2020 (2021). https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/BgjLrP31/demogr_01-06.pdf
4. Bogachev R.S., Mikhailova L.V., Shcherbaney K.G., et al. // "Social Aspects of Population Health" scientific e-journal. **69** (2) (2023) <http://vestnik.mednet.ru/content/view/1461/30/lang,ru/>
5. Docherty A.B., Sim M., Oliveira J., et al. // Crit Care. **21**, 216 (2017).
6. Karibaev K.R., Makhanov D.I., Maidurov E.S., et al. // Vestnik Novsu. **112** (6), 59 (2018).
7. Shaitan K.V. // Russ. J. Phys. Chem. B **17** (3), 550 (2023).
8. Katrukha I.A., Katrukha A.G. // Clinical Chem. **67** (1), 124 (2021).
9. Thygesen K., Alpert J.S., Jaffe A.S., et al. // Circulation. **138** (20), e618 (2018).
10. Babuin L., Jaffe A.S. // CMAJ. **173** (10), 1191 (2005).
11. Alymov M.I., Septyarskii B.S., A. Kochetkov // Russ. J. Phys. Chem. B **17** (4), 1005 (2023).
12. Reddy K.K., Bandal H., Satyanarayana M., et al. // Adv. Sci. **7**, 1902980 (2020).
13. Nechaeva N.L., Sorokina O.N., Konstantinova T.S., et al. // J. Anal. Chem. **77**, (5) 531 (2022).
14. Nechaeva N.L., Sorokina O.N., Konstantinova T.S., et al. // Talanta. **224**, 121860 (2021).
15. Vasilyeva A.D., Yurina L.V., Azarova D.Yu., et al. // Russ. J. Phys. Chem. B. **16** (1) 118 (2022).
16. Khrenova M.G., Polyakov I.V., Nemukhin A.V. // Russ. J. Phys. Chem. B. **16** (3), 455 (2022).
17. Misin V.M., Sazhina N.N. // Russ. J. of Phys. Chem. B. **4** (5), 797 (2010).
18. Sazhina N.N., Misin V.M. // Khim. Fizika (in Russian) **31** (11), 48 (2012).
19. Podoynitsyn S.N., Sorokina O.N., Kovarsky A.L. // Russ. J. Phys. Chem. B. **10** (2), 321 (2016).

УДК 57.01357.042617.7

ВЛИЯНИЕ СПЕКТРАЛЬНОГО СОСТАВА СВЕТА НА УПРУГО-МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СКЛЕРЫ И РАЗВИТИЕ БЛИЗОРУКОСТИ

© 2024 г. Н. Н. Трофимова^{1*}, Е. А. Храмцова¹, Ю. С. Петронюк¹,
К. Г. Антипова², А. Е. Крупнин², А. В. Ратновская¹, В. В. Соколова¹,
Е. И. Медникова³, Т. С. Гурьева³

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

² Научно-исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

³ Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: ntrofimova@mail.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024;
после доработки 24.04.2024;
принята в печать 20.05.2024

В работе представлены результаты исследования спектр-индуцированной миопии на модели взросления перепела. Методами акустической микроскопии в нативном состоянии определены геометрические размеры структурных элементов глаза, участвующих в фокусировке оптической системы, и выявлены закономерности их изменения по мере роста организма и в ходе эмметропии. Особый упор делался на состав, структуру и механические свойства склеральной оболочки как основной несущей ткани глаза, отвечающей за его форму и размер.

Ключевые слова: глаз, склера, миопия, акустическая микроскопия, механические характеристики, гистология, перепел японский.

DOI: 10.31857/S0207401X24110105

1. ВВЕДЕНИЕ

Упругая роговично-склеральная оболочка защищает орган зрения от физических воздействий, обеспечивает опорный каркас внутренних и внешних структур глаза, его эмметропию, регулирует нормализацию внутриглазного давления, жидкостной метаболизм глазного яблока и защиту от ультрафиолета. В процессе онтогенеза происходит созревание склеры, связанное с изменением ее упругих свойств и геометрических размеров. Экспериментально показано [1, 2], что к миопическим нарушениям приводят изменение спектрального состава повседневного освещения, наложение рассеивающих линз и частичная экранизация глаза. В результате подобных воздействий происходит удлинение оптической переднезадней оси (ПЗО) глаза. Причиной изменения формы глаза является увеличение или уменьшение толщины склеральной оболочки, ее упруго-прочностных свойств и компонентного состава внеклеточного матрикса [3]. Динамика этих показателей является индикатором развития близорукости на ранних этапах.

Существует несколько вариантов для условий, провоцирующих экспериментальную близорукость. Первый из них — это механическая депривация: в глаз лабораторного животного вставляется окклюдер, осуществляющий постоянное давление, при котором глазное яблоко начинает менять форму. Другим вариантом является изменение параметров повседневного света — его интенсивности и спектрального состава. Данные способы были реализованы на различных видах лабораторных животных. Курообразные птицы являются успешной биологической моделью для экспериментального изучения зрения, в том числе механизмов возникновения миопии человека, благодаря сходному набору фоторецепторов [4] и наличию оксикаротиноидной защиты [5]. Изменения на границе хрящевой и волокнистой склеры миопических глаз кур, по-видимому, аналогичны изменениям в склере млекопитающих [3].

В работе [6] было показано, что задняя часть склеры близоруких глаз цыплят имеет более толстую хрящевую и более тонкую фиброзную часть, а в пограничной области наблюдается аномальная

пролиферация хондроцитов. В другом эксперименте на модели цыплят [7] при механической депривации в слабовидящих глазах в хрящевой части склеры также наблюдались повышенная пролиферация хондроцитов и активный синтез внеклеточного матрикса. В работе [8] было установлено, что изменялись упругие свойства только задней части склеры, в то время как экваториальная часть не претерпевала существенных изменений.

Также изучалась возможность возврата глазного яблока к исходной форме [9]. После извлечения окклюдера птиц содержали при двух источниках белого света — стандартного и обогащенного синей спектральной компонентой. Было показано, что во втором случае восстановление формы шло быстрее предположительно за счет метаболических изменений, пролиферации клеток и синтеза коллагена. В работе [10] при использовании светодиодных светильников с длиной волны $\lambda=465$ нм (синий свет) и 615 нм (красный) было установлено, что наибольшее влияние на изменения ПЗО оказывал спектральный состав света, а не его интенсивность.

Экспериментальное стимулирование развития близорукости в ускоренной шкале времени реализуемо при использовании перепела японского (*Coturnix japonica dom.*) [11]. В 2020–2022 нами были выполнены исследования структур глаза птенцов японского перепела: выявлены особенности развития глаза перепела в норме, показано негативное влияние красной спектральной компоненты повседневного освещения на развитие глаза [12, 13], исследованы возможности измерения механических характеристик склеры для птенцов на ранних сроках [14].

Цель данной работы — исследование влияния повседневного освещения разного спектрального состава (синий — 450 нм, желтый — 570 нм) на течение процесса эметропизации глаза за счет изменения в структуре и механических свойствах склеральной оболочки. В задачи входило сопоставить данные, полученные ультразвуковыми и оптическими методами, с результатами механических испытаний на одноосное растяжение. Основной упор делался на определение возрастных триггерных точек в развитии глаза в период от вылупления и до полного взросления.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнялись на цыплятах с момента вылупления до 45 суточного возраста, что соответствует приблизительно 0–18 годам возраста человека и охватывает весь период созревания структур глаза. В рамках данной работы были выбраны три критические точки развития: 10 сут — цыплята без дифференцировки пола, 25 сут — начало полового созревания и 45 сут — начало яйценоскости.

Повседневное освещение осуществлялось светодиодными источниками с синим и желтым светофильтрами. Спектр синего освещения ($\lambda_{\max} = 450$ нм) соответствовал полосе восприятия преимущественно синечувствительных колбочек, желтого освещения ($\lambda_{\max} = 560$ нм) — центральных колбочек (рис. 1).

Суточный режим состоял из 16 ч дневного освещения и 8 ч темноты. Все источники освещения были откалиброваны по количеству мВт световой энергии в максимуме спектра. Калибровка проводилась с использованием спектрометра МК-350. Создаваемая освещенность находилась в физиологических пределах, соответствовала стандартной и была достаточной для уверенного нахождения птицами корма и поилок. Птицам был обеспечен доступ к воде и корму *ad libitum* (специализированный стандартный корм для цыплят перепелов — ПК2-3). Содержание птиц и их вывод из эксперимента декапитацией выполнялись согласно “Правилам надлежащей лабораторной практики”, утвержденным Приказом Министерства Здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 года № 199н. Исследования проводились в группах

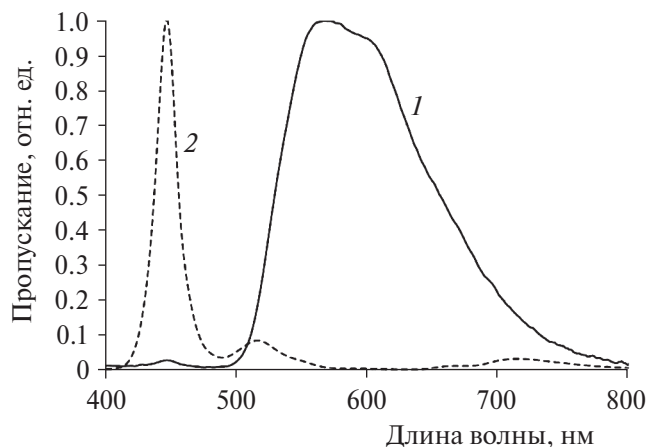


Рис. 1. Спектры используемых светильников: желтый (1) и синий (2) с максимумами при $\lambda_{\max} = 560$ и синий — $\lambda_{\max} = 450$ нм соответственно.

“желтого” и “синего” света из шести птиц каждого возраста. Вес птиц варьировался в диапазоне от (39 ± 1) г для 10 суточных птенцов, (114 ± 5) г — для 25 суточных и (165 ± 5) г — для 45 суточных птиц.

Ультразвуковая микроскопия

Для исследования размеров и конфигурации глаз в процессе роста использовался акустический микроскоп СИАМ-2018, разработанный в ИБХФ РАН, Россия [13, 15]. В процессе сканирования короткий ультразвуковой фокусированный импульс (30–80 МГц) с полной угловой апертурой в 22° распространялся в иммерсионной жидкости. Ультразвуковой сигнал частично отражался от поверхности глаза, частично распространялся вглубь, достигая дна склеральной оболочки. Амплитуда эхо-сигналов с разной глубины регистрировалась и отображалась градациями серого цвета шаг за шагом (25 мкм) при перемещении акустической линзы в плоскости XZ [16]. Получаемые акустические изображения соответствовали сагиттальному сечению глаза с ПЗО вдоль оси Z. Эхо-импульсным методом измерялись продольный размер глазного яблока, толщина склерально-роговичной оболочки и хориоретинального комплекса. Для расчетов использовались опубликованные значения скорости звука в тканях глаз [17]. Ультразвуковое сканирование выполнялось *in vitro* на энуклеированных глазах. Лабораторные исследования структур глаза методами ультразвуковой микроскопии являются неинвазивными, не требуют фиксации и окрашивания тканей, позволяют быстро набрать необходимую статистику.

Механические испытания

Механические свойства склер исследовали в условиях одноосного растяжения на универсальной испытательной машине Instron 5965 (USA), оснащенной датчиком ± 50 Н. Образцы в форме полосок шириной 3.5 мм и длиной рабочей части 6 мм фиксировали в пневматических захватах с прокладками из наждачной бумаги для предотвращения проскальзывания. Испытания проводили на воздухе при 23°C с постоянной скоростью деформирования в 6 мм/мин. Механические характеристики: модуль упругости на линейном участке, E ; предел прочности σ_B и деформацию разрушения ϵ_B определяли по кривым растяжения материала в координатах “напряжение—дефор-

мация”. При проведении нагрузочных тестов волокнистая часть склеры удалялась при подготовке препаратов, так как основную функцию поддержания формы глаза выполняет именно хрящевая часть. Для механических испытаний иссекалась полоска хрящевой части склеры, не затрагивающая область зрительного нерва. По данным работы [7] иссеченные участки захватывали области с потенциально измененной толщиной хрящевой ткани, повышенной активностью хондроцитов и избытком протеогликанов.

Определение содержания мелатонина и серотонина в сетчатке

Содержание мелатонина и серотонина определяли масс-спектрометрически на базе «Клиники новых медицинских технологий АрхиМед». Использовались аналитические стандарты производства компании Sigma-Aldrich (USA). Пробоподготовку осуществляли методом жидкостной экстракции. Органический слой перемещали в стеклянную центрифужную пробирку и упаривали в токе азота досуха при 40°C . Затем восстанавливали 200 мкл смеси метанол/вода в соотношении 1 : 1. После экстракции 10 мкл раствора наносили на хроматографическую колонку. Хроматографическое разделение выполнялось за счет градиентного элюирования системой метанол/вода. Аналитическая система укомплектована масс-спектрометром QTRAP 6500 производства компании AB SCIEX (Canada). Детектирование ионов осуществлялось в положительном режиме мониторинга множественных реакций (MRM) в соответствии с методикой определения. Обработка хроматографических данных выполнялась с использованием ПО Multiquant (версия 3.0.3).

Подготовка гистологических препаратов

Глаза цыплят были зафиксированы фиксирующей смесью ФСУ (формалин 40% — 96-градусный этиловый спирт — ледяная уксусная кислота в соотношении 9 : 3 : 1), затем отмывались водопроводной водой. Далее материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, переводили в бутанол, затем в ксилол и пропитывали парапластом. Были приготовлены серии срезов в сагиттальной плоскости (толщиной 7 мкм) при помощи ротационного микротомы RM 2125 производства компании Leica (Germany). Затем срезы были наклеены на предметные стекла, депарафи-

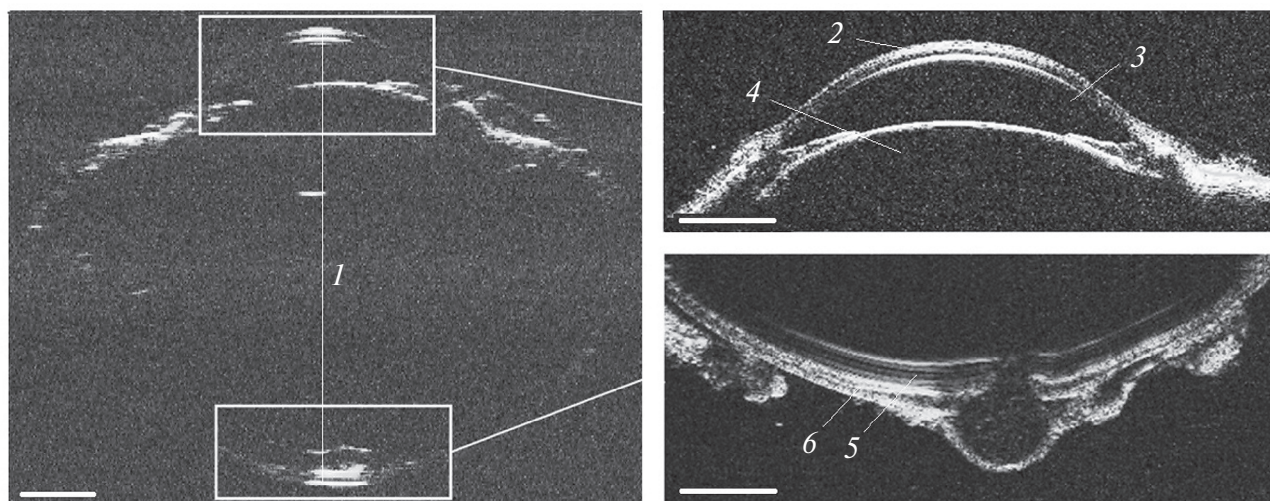


Рис. 2. Акустические изображения глаза перепела, полученные методом ультразвуковой микроскопии: 1 – передне-задняя ось, 2 – роговица, 3 – передняя камера, 4 – хрусталик, 5 – хориоретинальный слой, 6 – склера. Масштабный бар – 1 мм.

низированы ксилолом и проведены по спиртам уменьшающейся концентрации до дистиллированной воды, окрашены гематоксилином Корацци и эозином по стандартной методике и проведены по спиртам возрастающей концентрации до ксилола с последующим заключением в канадский бальзам [18].

Статистика

Статистическую обработку данных измерений проводили в *Microsoft Excel* и *Origin*. Данные были проверены на соответствие нормальному закону распределения. В каждом наборе были определены медианные значения величин вместе с соответствующими доверительными интервалами. На диаграммах приведены среднеквадратичные отклонения величин внутри выборки по возрасту.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние синего света на формирование глаза птиц оценивалось по уровню мелатонина и серотонина. Моноамины, такие как мелатонин и серотонин, вовлечены в модуляцию роста глаз. Мелатонин синтезируется фоторецепторами сетчатки и эпителиальными клетками цилиарного тела и проявляет циркадный ритм с пиковыми уровнями в ночное время. Роль мелатонина в регуляции роста глаза еще изучается, однако установлено, что интравитреальные инъекции мелатонина для группы цыплят оказывают противомииопический эффект при депривации формы. Серотонин как природный предшественник мелатонина также

участвует в регуляции роста глаз и оказывает противоположный эффект, усиливая развитие депривационной миопии [19].

В наших экспериментах измерение уровня гормонов проводились на птицах, которые находились при световой экспозиции желтым и синим светом максимально длительный срок – 350 сут. По прошествии этого времени были взяты пробы сетчатки у каждой группы птиц. Оказалось, что в случае желтого освещения содержание мелатонина в полтора раза выше, чем в случае синего освещения – 11 410 и 7000 пг/мл соответственно. Относительно серотонина наблюдалась обратная картина – у птиц, содержащихся при синем свете, его величина почти вдвое превышает аналогичные данные для птиц, живущих при желтом свете: 45 000 и 24 000 пг/мл соответственно. Эти данные подтверждают, что синий свет угнетает выработку мелатонина, нарушая в организме цикл “сна–бодрствования” [1, 20, 21]. Результат уверенно свидетельствует о действительно значимом воздействии света на зрительную систему.

Ультразвуковым методом была выполнена визуализация сечения глаза в двух взаимно перпендикулярных плоскостях. На изображении дорсального сечения отчетливо наблюдались структуры переднего и заднего отделов глаза, их симметрия относительно центральной оси (рис. 2). Ориентация зондирующего пучка вдоль оси глазного яблока 1 позволила выполнить измерения толщины роговицы 2, хориоретинального слоя 5 и склеры 6 с минимальной погрешностью.

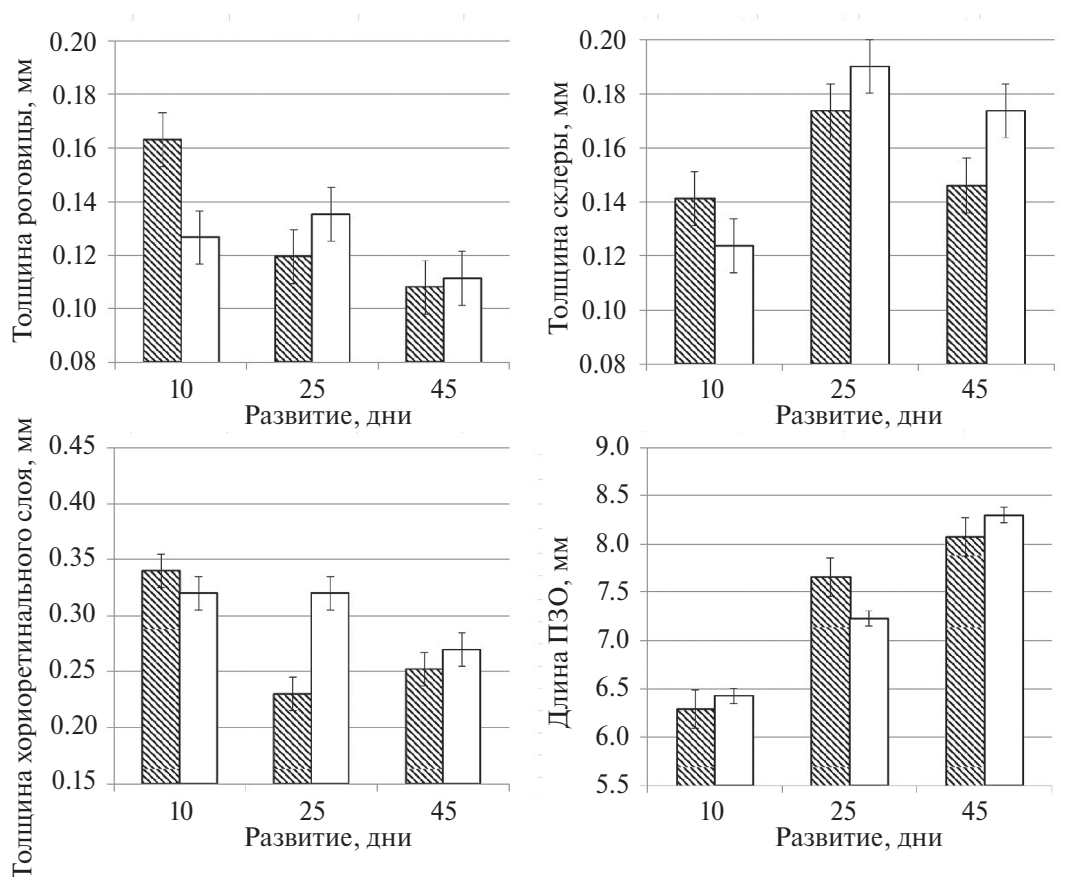


Рис. 3. Структурные изменения глаза перепела, полученные методом ультразвуковой микроскопии в периоде 10–45 сут развития. Белые столбики соответствуют группе физиологического желтого освещения, серые — синего.

Из уже опубликованных данных известно, что величина ПЗО оси глаза поступательно растет в процессе взросления птиц, содержащихся при естественном освещении [12]. По сравнению с нормальным развитием сужение спектрального состава повседневного освещения в синюю и красную область спектра приводит к дополнительному росту ПЗО и миопизации глаза в возрасте 25 сут, т.е. в пике созревания половой и гормональной систем.

На рис. 3 представлены результаты ультразвуковых измерений для трех возрастов птиц “синей” и “желтой” групп. Как видно из графиков, длина ПЗО поступательно растет с возрастом. На 10-е сутки в обеих группах ее величина изменяется незначительно от 6.1 до 6.5 мм, что свидетельствует об изменениях внутри оптической системы глаза, не затрагивающих его геометрию. Это подтверждается увеличением толщины роговицы и хориоретинального комплекса в “синей” группе. Суммарная толщина склеры, состоящей из хрящевых и волокнистых слоев, в нативном со-

стоянии по ультразвуковым данным у “синей” группы оказалась больше на 14% (рис. 3).

Сравнение результатов механических испытаний хрящевой части склеры на 10-е сутки развития показывает существенное различие величин модуля упругости — 8.4 и 6.5 МПа для “синей” и “желтой” групп, соответственно, при одинаковом пределе прочности: 1.6 и 1.7 МПа (рис. 4). На 25-е сутки величина ПЗО для “синей” группы превысила значение ПЗО для “желтой” группы на 6%. При этом толщина хориоретинального комплекса и роговицы в “синей” группе резко уменьшилось. Это обусловлено переключением каскадного механизма миопизации на следующий этап — реформирование склеры. Толщина склеры в “синей” группе оказывается ниже контрольной на 9% (рис. 3). Результаты механических испытаний показывают качественные изменения в характере деформирования склеры. Это сопровождается появлением начального нелинейного участка на кривой нагружения с низким значением модуля упругости в обеих группах — 1.1 МПа для “синей” и

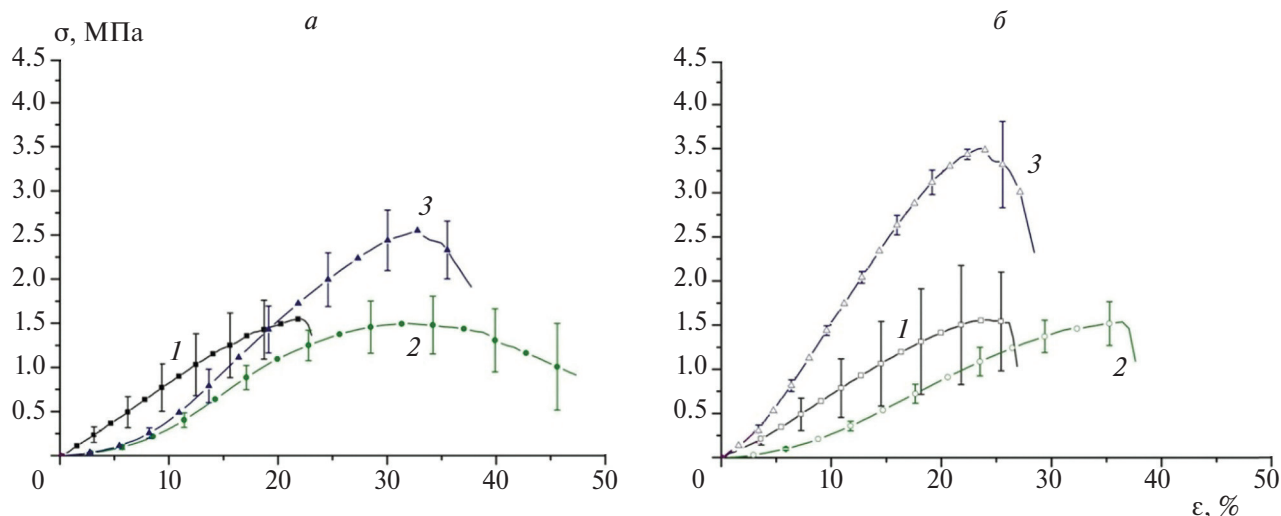


Рис. 4. Деформационные кривые склер перепела на 10-е (1), 25-е (2) и 45-е сут (3) развития при синем (а) и при желтом (б) освещении.

0.5 МПа для “желтой”. Величина модуля упругости на линейном участке и предел прочности остаются для “желтой” группы на уровне 2.2 и 1.7 МПа соответственно. Для “синей” группы эти значения остаются без изменений относительно 10-суточных значений. Величина деформации разрыва увеличивается в обеих группах: до 37% для “синей” и до 39% для “желтой” (рис. 4). Такое поведение ткани может свидетельствовать об изменениях в сетке неколлагеновых гликопротеинов и протеогликанов, или происходят реорганизация и изменение толщины коллагеновых волокон [3, 22].

На 45-е сутки разница в значениях ПЗО между группами стала незначительной. Толщина роговицы также оказалась одинаковой. В “синей” группе уменьшилась толщина хориоретинального слоя на 6.5%; аналогичные изменения произошли в склере — толщина уменьшилась на 14%.

Механические испытания образцов из “желтой” группы показывают увеличение значения модуля упругости до 18.9 МПа и предела прочности до 3.6 МПа, а также снижение величины деформации разрушения до 26%. В “синей” группе наблюдалось увеличение значений модуля упругости и предела прочности до 12 МПа и 2.6 МПа соответственно. При этом деформация разрыва в норме уменьшается (на 33%), а для “синей” группы остается прежней. Увеличение модуля упругости в целом свидетельствует о повышении жесткости высокоэластичной сетки, соединяющей коллагеновые пластины, и вероятном увеличении количества узлов сшивки между коллагеновыми волокнами.

Известно, что сигнальный каскад глаза при миопии включает в себя следующие стадии передачи: сетчатка, ретинально-пигментный эпителий, хориоидея, склера. Сетчатка является первичной тканью, которая преобразует информацию об оптической дефокусировке в молекулярные сигналы. Эти сигналы передаются к склере через сосудистую оболочку и провоцируют структурные изменения в ней. Хориоидальная компенсация (увеличение толщины хориоидеи за счет притока жидкости) является промежуточным этапом, позволяющим вместе с хрусталиковой аккомодацией быстро обеспечить необходимую фокусировку на сетчатке и поддерживать ее до изменения ПЗО за счет склеральных изменений [23]. В свою очередь склера при миопии претерпевает ряд биохимических изменений, начиная от потери сухой массы склеры, снижения накопления коллагена, снижения уровня гиалурона и сульфатированных гликозаминогликанов до усиления ферментативной деградации, подавления агрегации и подавления синтеза коллагена. Предыдущие исследования показали, что эти биохимические изменения в склере могут облегчить скольжение коллагеновых фибрилл относительно друг друга и вызывать увеличение угла извитости пучков коллагеновых фибрилл во время развития миопии [1]. Структура и состав ткани определяют ее физические и механические характеристики [24, 25].

На рис. 5 показаны результаты гистологического исследования. Существенных различий на гистологических препаратах для “синей” и “желтой” групп на 45-е сутки развития обнаружено не

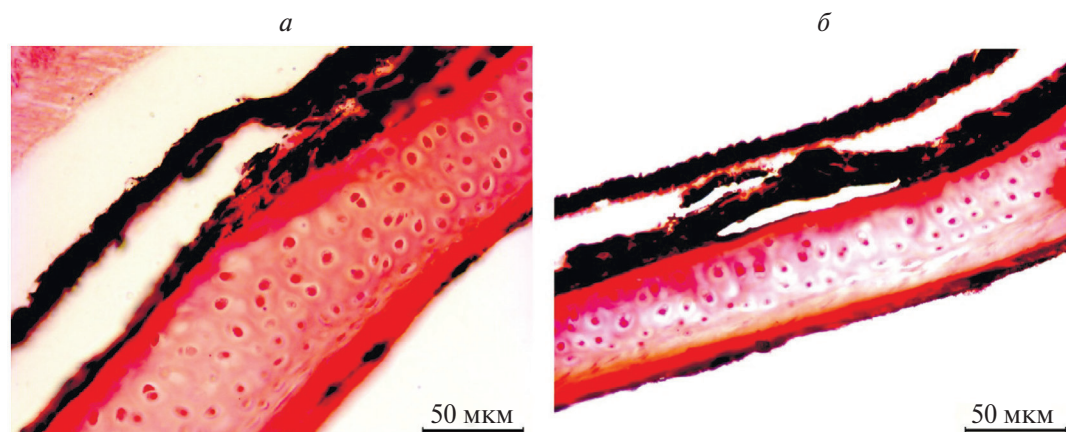


Рис. 5. Оптические изображения склер перепела на 45-е сут развития при синем (а) и желтом (б) освещении.

было (рис. 5). Гиалиновый хрящ обладает нормальной структурой в обоих случаях. Таким образом, возможной причиной снижения механических свойств склеры, индуцированного синим освещением, являются изменения на молекулярном уровне. Для подтверждения этой гипотезы должны быть проведены дополнительные исследования хрящевой части склеры, например, методом электронной микроскопии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявление механизмов формирования миопии при эметропизации глаза уже много лет занимает приоритетное положение в офтальмологии. Ранняя диагностика миопии и возможность ее коррекции в случае начавшихся патологических изменений на ранних стадиях позволит своевременно начать профилактику или терапию и избежать серьезных нарушений зрения во взрослом состоянии.

Нахождение птиц в условиях стабильного освещения с заданным спектром, в отличие от экспериментов на одном глазу с депривацией формы или наложением линз, как описано в литературе, позволяет оценить системное влияние состава спектра. Такая постановка эксперимента является приближенной к реальным условиям, когда искусственный свет с измененным спектральным составом от ламп и приборов внутри помещений воздействует на оптическую систему глаза в течение всего периода бодрствования и изо дня в день оказывает влияние на эметропизацию глаза в период взросления.

Полученные в данной работе результаты показывают, что значения модуля упругости скле-

ральной оболочки, изменяются в условиях интенсивного роста организма, особенно в подростковом возрасте. Триггерной точкой в этих изменениях является возраст около 25 сут, соответствующий началу полового созревания. Проведение столь длительных исследований позволило установить, что величина ПЗО к фертильному возрасту (45 сут) у обеих групп выравнивается. Можно предположить, что изменения затрагивают другие структуры глаза, не исследуемые в данной работе, например хрусталик и его сферичность, размер передней или задней камеры. Поскольку толщина склеры и ее механические свойства в двух группах в зрелом возрасте все же различаются, исходя из наших результатов, и по литературным данным установлено, что склера при близорукости претерпевает ряд биохимических изменений, начиная от потери сухой массы, снижения накопления коллагена до усиления ферментативной деградации и подавления синтеза коллагена [1], для более глубокого понимания процессов спектр-индуцированной миопизации на цитологическом и молекулярном уровне целесообразным представляется проведение электронно-микроскопических исследований склеры и расширение экспериментальных групп животных на более зрелый возраст.

Авторы работы выражают искреннюю благодарность лаборатории «АРХИМЕД» за проведение гормональных анализов. Авторы также благодарят А.А. Несмелова и ресурсный центр «Полимер» НИЦ «Курчатовский институт» за помощь в проведении механических испытаний.

Работа выполнена в рамках госзадания тема № 001201253314, ИБХФ РАН и НИЦ «Курчатовский институт».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Troilo D., Smith E. L. 3rd, Nickla D. L. et al. // Invest. Ophthalmol.vis.sci. 2019. V. 60. № 3. P. M31–M88.
2. Wallman J., & Winawer J. // Neuron. 2004. V.43. № 4. P. 447.
3. Kusakari T., Sato T., Tokoro T. // Exp. Eye Res. 2001. № 73(4). P. 3533–46.
4. Wisely C.E., Sayed J.A., Tamez H. et al. // Prog. Retin. Eye Res. 2017. V. 61. P. 72.
5. Зак П.П., Зыкова А.В., Трофимова Н.Н. и др. // Докл. АН. 2010. Т. 434. № 2. P. 272.
6. Tokoro T. // Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 1994. №12. P.1213.
7. Kusakari T., Sato T., & Tokoro T. // Exp. Eye Res. 1997. V. 64. № 3. P. 465.
8. Phillips J. R., Khalaj M. & McBrien N. A. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000. V. 41. №8. P. 2028.
9. Najjar R.P., Chao De La Barca J.M., Barathi V.A. et al. // Sci. Rep. 2021. V. 11. № 1. P. 7586.
10. Rucker, F. J., Wallman, J. // J. Vision. 2012. № 12(6). P. 23.
11. Пигирева М.Д., Афанасьев Г.Д. Перепеловодство. М.: Росагропромиздат, 1989.
12. Трофимова Н.Н., Петронюк Ю.С., Гурьева Т.С. и др. // Сенсорные системы. 2022. Т. 36. № 3. С. 226.
13. Петронюк Ю.С., Трофимова Н.Н., Зак П.П. и др. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 27.
14. Храмова Е.А., Крашенинников С.В., Петронюк Ю.С. и др. // Актуал. вопр. биол. физики и химии. 2020. Т. 5. № 2. С. 331.
15. Петронюк Ю. С., Храмова Е. А., Левин В. М. и др. // Изв. РАН. Сер. физ. 2020. V. 84 № 6. С. 799.
16. Passmann C., Ermert H. // Proc. IEEE Ultrasonics Symposium, V. 3., Cannes, France: IEEE, 1994. P. 1661.
17. Хилл К., Тер Хаар Г., Бэмбер Дж. Ультразвук в медицине / Под ред. Сапожникова О.А. и др. М.: Физмалит, 2008.
18. Роскин Г И., Левинсон Л.Б. Микроскопическая техника. 3-е изд. М.: Советская наука, 1957.
19. Schaeffel F., Bartmann M., Hagel G., Zrenner E. // Vision Res. 1995. V. 35. № 9. P. 1247.
20. Анисимов В.Н. // УФН. Т. 39. № 4. 2008. С. 40.
21. Ларин И. К. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 84.
22. Boote C., Sigal I.A., Grytz R. et al. // Prog. Retin. Eye Res. V. 2020. 74. P. 100773.
23. Wildsoet C, Wallman J. et al. // Vision Res. 1995. V. 35. № 9. P. 1175.
24. Богословская О.А., Ольховская И.П., Нечитайло Г.С., Глущенко Н.Н. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 12. С. 60.
25. Яковлева М.А., Радченко А.Ш., Костюков А.А. и др. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 20.

EFFECT OF LIGHT SPECTRUM ON ELASTIC-MECHANICAL PROPERTIES OF SCLERA AND MYOPIA DEVELOPMENT

**N. N. Trofimova^{1*}, E. A. Khramtsova¹, Yu. S. Petronyuk¹, K. G. Antipova², A. E. Krupnin²,
A. V. Ratnovskaya³, V. V. Sokolova³, E. I. Mednikova¹, T. S. Guryeva¹**

¹*Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

²*NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia*

³*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*E-mail: ntrofimova@mail.ru

The paper presents the results of a study of spectrum-induced myopia using a model of quail maturation. Using acoustic microscopy methods in the native state, the geometric dimensions of the structural elements of the eye involved in focusing the optical system were determined, and the patterns of their changes as the body grew and during emmetropization were identified. Particular emphasis was placed on the composition, structure and mechanical properties of the sclera, as the main supporting tissue of the eye, responsible for its shape and size.

Keywords: eye, sclera, myopia, acoustic microscopy, mechanical characteristics, histology, quail.

REFERENCES

1. D. Troilo E. L, Smith 3rd, D. L. Nickla et al., Invest. ophthalmol.vis.sci., **60**, M31–M88 (2019).
<https://doi.org/10.1167/iov.18-25967>
2. J. Wallman & J. Winawer, Neuron, **43**, 447–468 (2004).
3. T. Kusakari, T. Sato, T. Tokoro, Exp Eye Res., **73**, 3533–46 (2001).
<https://doi.org/10.1006/exer.2001.1064>
4. C.E. Wisely, J.A. Sayed, H. Tamez, Prog. Retin. Eye Res. **61**, 72–97 (2017).
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.06.004>
5. P.P. Zak, A.V. Zykhova, N.N. Trofimova and A.E. Abu Khamidakh, Dok. Biol. Sci. **10**, 2010297–9 (2010).
<https://doi.org/10.1134/S0012496610050017>
6. T. Tokoro, Nippon Ganka Gakkai Zasshi. **98**, 1213–37 (1994)
7. T. Kusakari, T. Sato & T. Tokoro, Exp. eye res., **64**(3), 465–476 (1997).
<https://doi.org/10.1006/exer.1996.0242>
8. J.R. Phillips, M. Khalaj & N.A. McBrien, Invest. Ophthalmol. & vis. Sci. **41**, 2028–2034 (2000).
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.008>
9. R.P. Najjar, J.M. Chao De La Barca, V.A. Barathi et al., Sci Rep. **7**, 7586 (2021).
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-87201-2>
10. F.J. Rucker, J. Wallman, J. of vision. **12**, 23 (2012).
<https://doi.org/10.1167/12.6.23>
11. M. Pigireva, G. Afanasiev, Quail farming. (M. 1989) (in Russian).
12. N.N. Trofimova, Yu.S. Petronyuk, T.S. Guryeva, et al., Neurosc.& Behavioral Physiol. **53**, 148–153, (2023).
<https://doi.org/10.1007/s11055-023-01399-4>
13. Yu.S. Petronyuk, N.N. Trofimova, P.P. Zak et al., Russian Journal of Phys. Chem. B. **16**(1), 97–102 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122010249>
14. E. Khramtsova, S. Krashenninnikov, Yu. Petronyuk et al., Current issues in biological physics and chemistry, **5**, 2, 331–334 (2020). ISSN 2499-9962.
15. Yu. Petronyuk, E. Khramtsova, V. Levin et al., News of the RAS. Physical series. **84**, 799–802 (2020).
16. C. Passmann and H. Ermert, Proceedings of IEEE Ultrasonics Symposium, Cannes, France, 1994. V. 3. P. 1661–1664.
<https://doi.org/10.1109/ULTSYM.1994.401909>
17. K. Hill, G. Ter Haar, J. Bember, Ultrasound in medicine. Ed. O. Sapojnikov (M.: Physmatlit, 2008) (in Russian).
18. G. Roskin, L. Levinson, Microscopic technique, 3-ed. (M: Sovetskaya nauka, 1957) (in Russian).
19. F. Schaeffel, M. Bartmann, G. Hagel, E. Zrenner, Vis. Res. **35**, 1247–64 (1995)
20. V. Anisimov, Advances in Physiological Sciences. **39**, 40–65 (2008) (in Russian).
21. I. K. Larin, Russian Journal of Physical Chemistry B. **17**, 244–250 (2023).
<https://doi.org/10.1134/s1990793123010074>
22. C. Boote, I.A. Sigal, R. Grytz et al., Prog.in ret.&eye res. **74**, 100773 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.100773>
23. C. Wildsoet, J. Wallman, et al., Vis. Res. **35**, 1175–94 (1995).
[https://doi.org/10.1016/0042-6989\(94\)00233-c](https://doi.org/10.1016/0042-6989(94)00233-c). PMID: 7610579
24. O.A. Bogoslovskaya, I.P. Olkhovskaya, G.S. Nechitailo., N.N. Glushchenko, Russian Journal of Physical Chemistry B. **16**(6), 1141–1146 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S199079312206015X>
25. M.A. Yakovleva A.Sh. Radchenko, A.A. Kostyukov et al., Russian Journal of Physical Chemistry B. **16**(1), 90–96 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S199079312201033X>

УДК 577.344

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ФОТОДЕСТРУКЦИИ БИСРЕТИНОИДОВ ЛИПОФУСЦИНОВЫХ ГРАНУЛ ИЗ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ ГЛАЗА

© 2024 г. М. А. Яковлева^{1*}, А. А. Васин², А. Е. Донцов¹, А. А. Гулин², А. В. Айбуш², А. А. Астафьев², А. М. Шахов², Т. Б. Фельдман^{1,3}, М. А. Островский^{1,3}

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

²Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова

Российской академии наук, Москва, Россия

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

*E-mail: lina.invers@gmail.com

Поступила в редакцию 26.03.2024;

после доработки 24.04.2024;

принята в печать 20.05.2024

В данной работе проведены исследования механизмов образования продуктов окисления бисретиноидов липофусциновых гранул, выделенных из клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека. Описаны физико-химические характеристики продуктов фотоокисления бисретиноидов. Для исследования были использованы методы ИК-спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, флуоресцентной спектроскопии, сканирующей конфокальной микроскопии, методы времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Подробно охарактеризованы свойства продуктов фотоокисления и деградации флуорофоров липофусциновых гранул, в том числе и синтетического *N*-ретинилиден-*N*-ретирилэтаноламина (A2E). Показано, что продукты окислительной деградации липофусциновых гранул аналогичны продуктам фотоокисления основного бисретиноида липофусциновых гранул — A2E. Данные важны как для понимания механизмов образования цитотоксичных продуктов в липофусциновых гранулах, так и установления их химической природы.

Ключевые слова: бисретиноиды, окислительная деградация, флуорофоры, липофусциновые гранулы, ретинальный пигментный эпителий.

DOI: 10.31857/S0207401X24110114

1. ВВЕДЕНИЕ

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) является ведущей причиной потери зрения в развитых странах и занимает третье место среди причин потери зрения во второй половине жизни после глаукомы и диабетической ретинопатии. От потери центрального зрения страдает более 30% населения старше 75 лет. Терминальная стадия ВМД (слепота) встречается у 1.7% всего населения старше 50 лет и около 18% лиц старше 85 лет [1–3].

Развитие ВМД сопровождается патологическими изменениями в тканях глаза [4], особенно в клетках ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и в конечном счете — гибелью фоторецепторных клеток сетчатки. В настоящее время заболевание считается практически неизлечимым, поэтому важной задачей является как можно бо-

лее раннее выявление ВМД с целью принятия своевременных защитно-профилактических мер, позволяющих замедлить развитие этой тяжелой глазной патологии и сохранить хорошее качество жизни пациента на долгие годы.

Существует предположение, что основным триггером развития ВМД является окислительный стресс различной природы [5], который может вызываться синей составляющей солнечного света [6], однако до сих пор механизмы, приводящие к возникновению этой патологии, до конца не изучены. В механизмах старения и дегенерации сетчатки и РПЭ важнейшая роль принадлежит так называемому “пигменту старости” — липофусциновым гранулам (ЛГ), образующимся в клетках РПЭ в результате неполной лизосомальной деградации обломков фоторецепторов [7, 8].

При поглощении видимого света ЛГ способны генерировать активные формы кислорода (АФК), что определяет их фототоксичность [9]. Бисретиноиды (Бис-рет), входящие в состав ЛГ, являются основным источником проявления фототоксичных свойств этим “пигментом старости”. Наиболее изученным Бис-рет ЛГ является *N*-ретинилден-*N*-ретинилэтанолламин (A2E) [10, 11]. При поглощении света в присутствии кислорода бисретиноиды и сами могут окисляться [12–15].

Недавно нами было показано, что при ВМД наблюдается повышенное содержание окисленных форм бисретиноидов (окси-Бис-рет) по сравнению с нормой [16]. Мы предположили, что повышенное содержание окси-Бис-рет может быть биологическим маркером развития патологии даже в отсутствие клинической картины. Однако следует отметить, окисленные формы бисретиноидов изучены недостаточно. Поэтому для лучшего понимания механизмов развития ВМД, а также использования этих знаний для диагностики, требуется детальное рассмотрение физико-химических характеристик этих соединений.

На основе флуоресцентных свойств Бис-рет и окси-Бис-рет в ЛГ разработан и широко внедрен в офтальмологическую практику неинвазивный диагностический метод аутофлуоресценции (АФ) глазного дна. Он позволяет оценить состояние сетчатки и клеток РПЭ у пациентов, избрать тактику лечения и сделать прогноз в отношении развития нейродегенеративного заболевания [17]. В настоящее время предпринимаются попытки усовершенствования метода АФ глазного дна. Перспективной является разработка метода детектирования времени жизни флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) [18]). В экспериментах *in vivo* было показано, что результаты микроскопии методом FLIM для “нормы” и в случае ВМД различаются [19]. Следует отметить, что до сих пор неизвестно, в результате чего возникает разница в характерных временах жизни флуоресценции для “нормы” и патологии. Возможно, причиной возникновения такой разницы в значениях является обнаруженный нами тот факт того, что при ВМД содержание окси-Бис-рет ЛГ в клетках РПЭ выше по сравнению с нормой [14, 16].

Таким образом, целью данной работы было изучение физико-химических характеристик Бис-рет и окси-Бис-рет, содержащихся в ЛГ из клеток

РПЭ глаза. Исследования проводили с использованием методов ИК-спектроскопии, спектроскопии комбинационного рассеяния, флуоресцентной спектроскопии, сканирующей конфокальной микроскопии, времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов (TOF-SIMS) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В качестве объектов исследования использовали суспензию нативных необлученных ЛГ, а также суспензию ЛГ, заранее облученных видимым светом (фотоокисленную) как модель ВМД [14, 16].

2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реактивы. В работе использованы реактивы и растворители компаний “Sigma-Aldrich”, “Fluka” и “Компонент-реактив”.

Материал. Кадаверные глаза доноров без клинических признаков патологии сетчатки и РПЭ получены из Глазного тканевого банка МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Фёдорова Минздрава России на основании “Соглашения о научном сотрудничестве между ФГБУ МНТК “Микрохирургия глаза” им. академика С.Н. Фёдорова Минздрава России и Институтом биохимической физики им. Эмануэля РАН от 11 января 2011 года для проведения научных исследований в лаборатории физико-химических основ рецепции”. До начала эксперимента каждый глаз был тщательно осмотрен врачом-офтальмологом в целях выявления наличия или отсутствия клинических признаков патологии на глазном дне.

Получение липофусциновых гранул из клеток РПЭ и хлороформных экстрактов, содержащих бисретиноиды и их производные. Липофусциновые гранулы были выделены из РПЭ 100 кадаверных глаз без признаков патологии доноров разных возрастов (25–70 лет) с помощью метода градиентного центрифугирования по методике, описанной в работе [9], и суспендированы в растворе 0.1 М Калий-фосфатного буфера, pH = 7.3. Концентрацию гранул определяли по стандартной методике в камере Горяева; исходная концентрация гранул составляла $4 \cdot 10^9$ гранул/мл. Для проведения экспериментов суспензия ЛГ была разделена на две равные части: одну часть ЛГ использовали как контроль, вторую — облучали видимым светом (фотоокисление).

Образцы получали путем нанесения суспензии ЛГ на оптическое стекло из CaF_2 и последующего высушивания в атмосфере аргона. Облучение образцов проводили видимым светом (400–700 нм) светодиодной лампы LED 15W-4000K (поверхностная плотность потока световой энергии, падающей на образец, составляла 100 мВт/см^2). Бис-рет и окси-Бис-рет ЛГ экстрагировали из клеток РПЭ по методу Фолча (Folch) смесью хлороформ–метанол (2 : 1) [20].

Синтез А2Е. Для использования основного бисретиноида ЛГ, А2Е, в качестве стандарта [21] был проведен его синтез и проверена чистота методом ВЭЖХ.

Измерение спектров флуоресценции. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре RF-5301PC (“Shimadzu”, Япония). 3D-анализ проводили на флуоресцентной установке FluoroMax (Horiba) с шагом длины волны возбуждения флуоресценции 2 нм.

Высокоэффективная жидкостная хроматография. Хроматографическое разделение Бис-рет и окси-Бис-рет в хлороформных экстрактах из ЛГ было проведено на хроматографе фирмы “Knauer” (Германия) с колонкой “Диасфер 120-С18” (4 · 250 мм, размер сорбента — 5 мкм). Разделение проводилось путем линейного градиентного элюирования в системе: от 80% ацетонитрила +20% воды (+ 0.05% трифторуксусной кислоты) до 100% ацетонитрила за 20 мин; скорость потока — 1.5 мл/мин. Продукты хроматографического разделения были измерены при помощи фотометрического детектора K-2501 (“Knauer”, Германия).

Масс-спектрометрический анализ. Для идентификации продуктов окисления бисретиноидов ЛГ использовали времяпролетный масс-спектрометр вторичных ионов TOF.SIMS 5 (“ION-TOF”, Германия), оснащенный висмут-марганцевым излучателем первичных ионов и вспомогательными источниками ионов Cs^+ и O_2^- для ионного травления. Методом ионного травления ионами (энергия ионов цезия — 500 эВ исследовали распределение окси-Бис-рет по толщине ЛГ. Чтобы учесть снижение интенсивности ионов в связи с травлением, сигнал ионов окисленных бисретиноидов нормировали на сигнал иона (C_2H_5^+), который принимали за маркер общего сигнала органических ионов.

Для проведения статистического анализа образцы ЛГ, экстракты из ЛГ, и синтетический А2Е наносили на очищенное покровное стекло и высушивали на воздухе. Затем покровное стекло помещали во времяпролетный масс-спектрометр и держали под вакуумом в течение суток перед анализом. Для анализа с каждого образца (темного и облученного) накапливали по 12 масс-спектров. Чтобы нивелировать эффекты, связанные с анализом пустых зон, во всех масс-спектрах исключали зоны с высоким сигналом кремния.

Измерение времени жизни флуоресценции. Измерение времени жизни флуоресценции проводили с использованием оборудования ФИЦ ХФ РАН. Кинетику затухания флуоресценции исследуемых объектов регистрировали с помощью сканирующего конфокального микроскопа LSM 980 (Zeiss, Германия), перестраиваемых фемтосекундных лазеров для возбуждения флуоресценции (“Tsunami”, Spectra-Physics, USA; “Chameleon Discovery NX”, Coherent, USA), а также детекторов микроскопии визуализации времени жизни флуоресценции — системы для коррелированного по времени счета фотонов (Becker & Hickl, Германия).

Рамановская спектроскопия (спектроскопия комбинационного рассеяния). Сравнительный анализ содержания свободных альдегидов и кетонов в исследуемых образцах проводили в ФИЦ ХФ РАН с помощью микроспектрометра широкополосного когерентного антистоксова комбинационного рассеяния света (BCARS), входящего в состав фемтосекундного лазерного комплекса, реализующего двухимпульсную коллинеарную схему генерации CARS-сигнала.

Инфракрасная спектроскопия. Измерения проводили с помощью исследовательского ИК-фурье микроскопа LUMOS II (Bruker, Германия) (комплементарная методика BCARS). В отличие от метода BCARS, ИК-фурье-спектроскопия позволяет получить колебательные спектры в диапазоне от 600 до 3500 см^{-1} .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что при патологии ВМД наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции ЛГ в коротковолновой области ИК-спектра (в области 550 нм) при возбуждении флуоресценции длиной волны 488 нм [14, 16]. Аналогич-

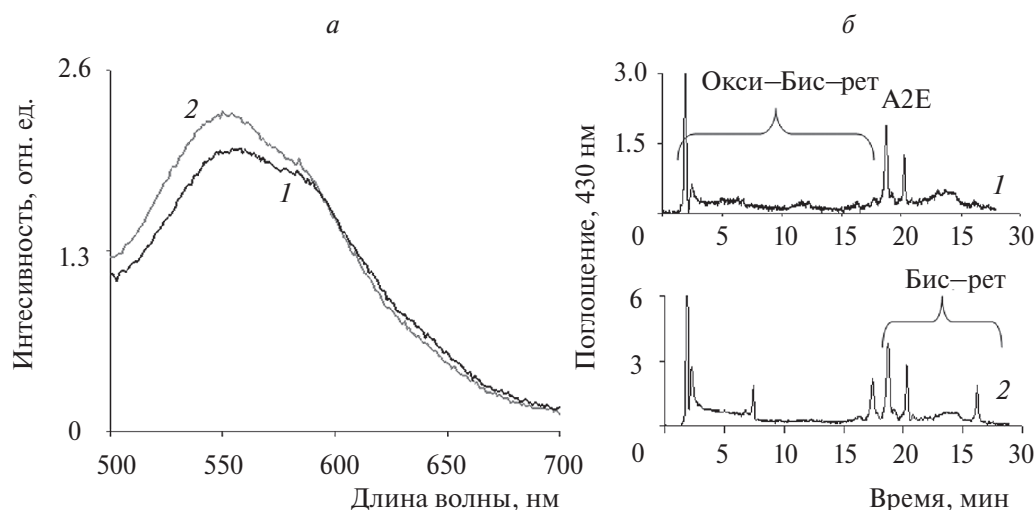


Рис. 1. *a* — Спектры флуоресценции хлороформных экстрактов из суспензий нативных липофусциновых гранул (1) и облученных видимым светом (2) с длиной волны 488 нм; *b* — хроматограммы хлороформного экстракта из суспензии ЛГ: 1 — необлученные ЛГ, 2 — ЛГ после облучения видимым светом. Детектирование — по поглощению на длине волны 430 нм.

ное изменение спектральных свойств ЛГ наблюдается и при их фотоокислении. Анализ ВЭЖХ подтвердил идентичность повышенного содержания окси-Бис-рет в обоих случаях. Таким образом, фотоокисленные ЛГ представляют собой удобную модель для изучения ВМД.

Процесс фотоокисления бисретиноидов ЛГ контролировали по спектрам флуоресценции и данным ВЭЖХ. Были зарегистрированы спектры флуоресценции хлороформных экстрактов из суспензий нативных ЛГ и облученных видимым светом (рис. 1*a*). Из этого рисунка видно, что в случае фотоокисленных ЛГ (рис. 1*a*, кривая 2) наблюдается повышенная интенсивность флуоресценции в области 550 нм по сравнению с необлученной суспензией ЛГ (рис. 1*a*, кривая 1). Хроматографический анализ образца из фотоокисленных ЛГ показывает увеличение содержания начальной группы пиков, относящихся к окси-Бис-рет (рис. 1*b*, кривая 2) по сравнению с образцом из неокисленных ЛГ (рис. 1*b*, кривая 1).

Флуоресцентный 3D-анализ. Для более подробного флуоресцентного анализа были получены 3D-спектры флуоресценции всех исследуемых образцов, а также синтетического A2E (рис. 2). На 3D-спектрах синтетического A2E (рис. 2*a* и *b*), суспензии ЛГ (рис. 2*в* и *г*) и хлороформных экстрактов ЛГ (рис. 2*д* и *е*) видно, что при фотоокислении всех образцов наблюдается сдвиг участков эмиссии флуоресценции в синюю область спектра. Для облученного синтетического A2E

(рис. 2*б*) выявлены два таких участка: возбуждение при 270 нм с эмиссией при 470 нм и возбуждение при 370 нм с эмиссией при 460 нм. Профиль флуоресценции показывает, что максимумы эмиссии находятся в области с длиной волны менее 500 нм. Скорее всего, это может быть связано с накоплением продуктов окисления A2E. Можно предположить, что при фотоокислении происходит разрушение исходной структуры сопряжения A2E и накопление продуктов окисления с более короткой структурой сопряжения. Аналогичная тенденция к изменению профилей флуоресценции в результате облучения наблюдается как для суспензии ЛГ (рис. 2*в* и *г*), так и хлороформного экстракта ЛГ (рис. 2*д* и *е*).

Следует отметить, что в ЛГ кроме A2E есть еще группа неокисленных бисретиноидов, различающихся по структуре между собой, но в целом близких по структуре к A2E. Поэтому на спектрах наблюдается небольшое отличие в положении максимумов флуоресценции синтетического A2E и суспензии ЛГ. У синтетического A2E максимум флуоресценции находится в более длинноволновой области, чем у суммарного спектра флуоресценции группы исходных бисретиноидов в суспензии ЛГ (A2E — 630 нм, ЛГ — 590 нм). Сравнительный анализ исследуемых образцов указывает на то, что в фотоокисленных ЛГ накапливаются продукты, аналогичные продуктам фотоокисления и фотодеградации синтетического бисретиноида A2E.

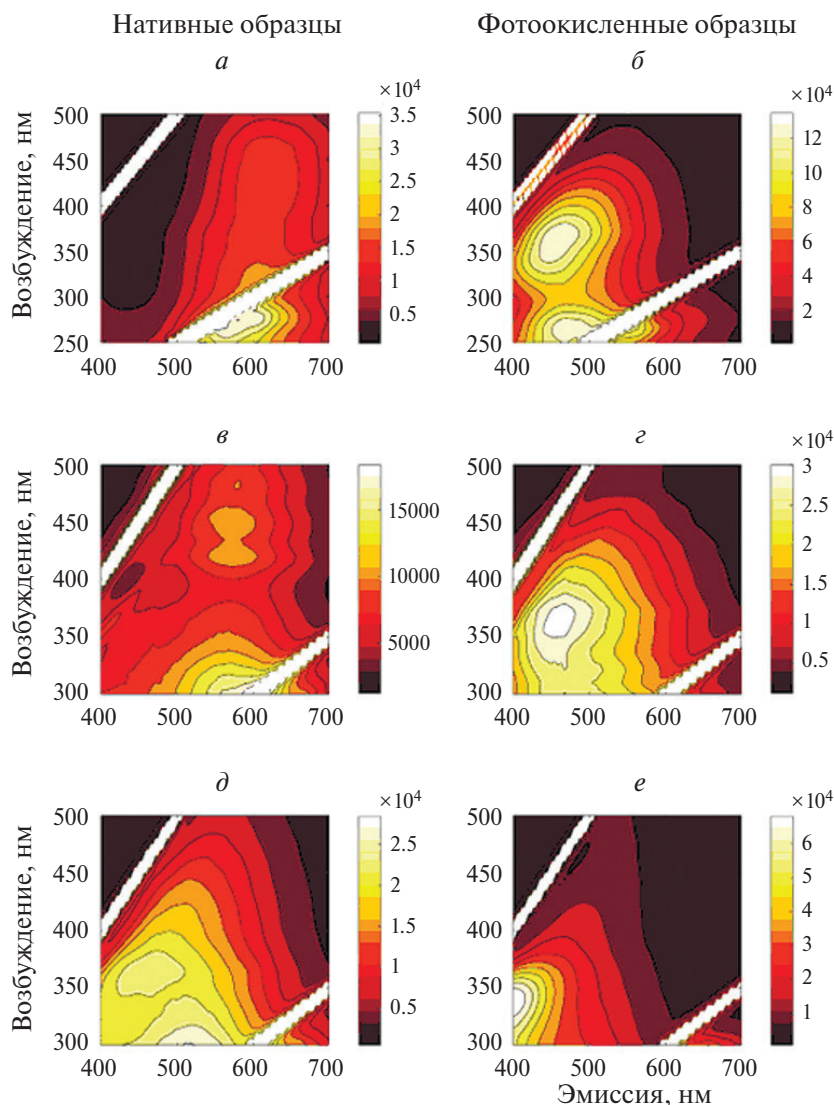


Рис. 2. 3D-спектры флуоресценции: *а* – профили флуоресценции А2Е; *б* – профили флуоресценции А2Е, облученного видимым светом; *в* – профили флуоресценции суспензии ЛГ; *г* – профили флуоресценции суспензии ЛГ, облученной видимым светом; *д* – профили флуоресценции хлороформного экстракта ЛГ; *е* – профили флуоресценции хлороформного экстракта ЛГ, облученного видимым светом.

Динамика гибели флуоресценции бисретиноидов и их окисленных форм. При помощи сканирующего конфокального микроскопа были зарегистрированы кинетические кривые и определены значения времени жизни флуоресценции (τ_1 , τ_2 , τ_3) исследуемых образцов (табл. 1). В результате анализа данных в рамках трехэкспоненциальной модели определены вклады окисленных и неокисленных бисретиноидов в общую интенсивность флуоресценции исследуемых образцов (A_1 , A_2 , A_3) и определена разница вкладами различных групп бисретиноидов.

Как уже было показано (рис. 1а), при облучении ЛГ видимым светом (430–570 нм) происходит увеличение интенсивности их флуоресценции

в более коротковолновой части спектра, из чего можно заключить, что в ЛГ растет содержание окисленных форм бисретиноидов. Как видно из табл. 1, при этом заметно увеличивается среднее значение времени жизни флуоресценции (T_m) – с 711 до 1011 пс. Кроме того, наблюдается увеличение вклада второй (A_2) и третьей (A_3) компонент, которые характеризуют в большей степени флуоресцентные свойства окисленных форм бисретиноидов. При этом вклад компоненты (A_1), которая характеризует флуоресцентные свойства неокисленных бисретиноидов, уменьшается.

В хлороформных экстрактах ЛГ (табл. 1) при фотоокислении наблюдается такая же динамика изменения времен жизни флуоресценции, как и в

Таблица 1. Времена жизни флуоресценции и их вклад в общую флуоресценцию образцов до и после их фотоокисления

Образец	T_m , пс (среднее время)	τ_1 ,	τ_2 ,	τ_3 ,	A_1	A_2	A_3	$(A_2+A_3)/A_1$
Необлученные ЛГ	711.1	289.8	1367.5	4930.6	72.5	23.9	3.4	0.37
Облученные ЛГ	1010.9	398.8	1632.5	5092.8	63.2	32.2	4.5	0.58
Хлороформный экстракт из необлученных ЛГ	680.54	214.02	1194.35	4788.72	72.65	21.83	5.52	0.37
Хлороформный экстракт из облученных ЛГ	1583.00	328.47	2183.30	6706.91	56.24	33.97	9.79	0.78
Синтетический А2Е	99.35	80.97	591.01	2889.80	98.25	1.34	0.41	—

Примечание. Для суспензии ЛГ длина волны возбуждения флуоресценции 515 нм, детектирование эмиссии — при 580 нм; для хлороформного экстракта из ЛГ и синтетического А2Е длина волны возбуждения флуоресценции — 488 нм, детектирование — при 570 нм.

суспензии ЛГ. При этом увеличение среднего времени жизни флуоресценции (T_m) более выражено: после фотоокисления оно выросло в 2.5 раза. Следует отметить, что характерные времена жизни флуоресценции и среднее время для образца суспензии необлученных ЛГ и хлороформного экстракта из необлученных ЛГ очень близки. Это может свидетельствовать о том, что большая часть флуорофоров ЛГ переходит в экстракт.

Также была исследована кинетика гибели флуоресценции А2Е — основного бисретиноида ЛГ (табл. 1). Измерение кинетики гибели флуоресценции А2Е показало, что время жизни флуоресценции неокисленного А2Е составляет 80 пс. Небольшие компоненты с большими временами жизни, вероятно, связаны с присутствием окисленного А2Е в образце. Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что при увеличении содержания продуктов фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов в составе ЛГ происходят изменения как характеристик спектра флуоресценции ЛГ (рис. 1а), так и параметров кинетических кривых затухания флуоресценции (табл. 1).

Сравнительный анализ спектров комбинационного рассеяния и ИК-спектров бисретиноидов и их окисленных форм. Были проведены сравнительные исследования методами комбинационного рассеяния и ИК-спектроскопии по идентификации соединений, содержащих карбонильные группы, в образцах суспензии ЛГ, хлороформных экстрактах ЛГ и синтетического А2Е как до облучения, так и после него всех образцов видимым светом.

На спектрах комбинационного рассеяния хлороформных экстрактов видны явные отличия, возникающие в результате фотоокисления ЛГ

(рис. 3б). Наименьшим изменениям подверглись пики при 1347 и 1440 см^{-1} , которые, скорее всего, относятся к крутильным и ножничным колебаниям групп атомов CH_3 и CH_2 соответственно. Это подтверждает тот факт, что фотоокисление ЛГ никак не воздействует на насыщенные связи в экстрактах. Заметно смещение полос вблизи 1050 и 940 см^{-1} . Пики при 1050 см^{-1} в основном относятся к валентным колебаниям C—C связей. Смещение данных полос говорит о скелетных изменениях в молекулах, содержащихся в составе экстрактов. Кроме того, полоса при 1090 см^{-1} вероятно относится к колебаниям C—O связи первичного спирта. Виден рост интенсивности этой полосы в облученных образцах. Полоса при 1775 см^{-1} , относящаяся к карбонильному колебанию, заметно выше в образце, который был подвергнут фотоокислению. Увеличение сигнала при 1270 см^{-1} свидетельствует об увеличении количества эпоксидов в системе. Таким образом, в хлороформных экстрактах наблюдаются заметные изменения в скелетной структуре молекул, а также увеличение продуктов окисления — эпоксидов и карбониллов.

Анализ ИК-спектров хлороформных экстрактов до и после облучения также подтвердил наблюдаемые изменения (рис. 4б). С одной стороны, виден значительный рост интенсивности полосы при 1630 см^{-1} , которая связана с колебаниями C=O -связи. С другой стороны, в необлученных экстрактах наблюдается интенсивная полоса при 1376 см^{-1} , относящаяся к деформационному колебанию O—H -связи. По-видимому, изменения, происходящие в процессе окисления, сильно затрагивают спиртовые группы в составе хлороформных экстрактов. Были выявлены изменения в

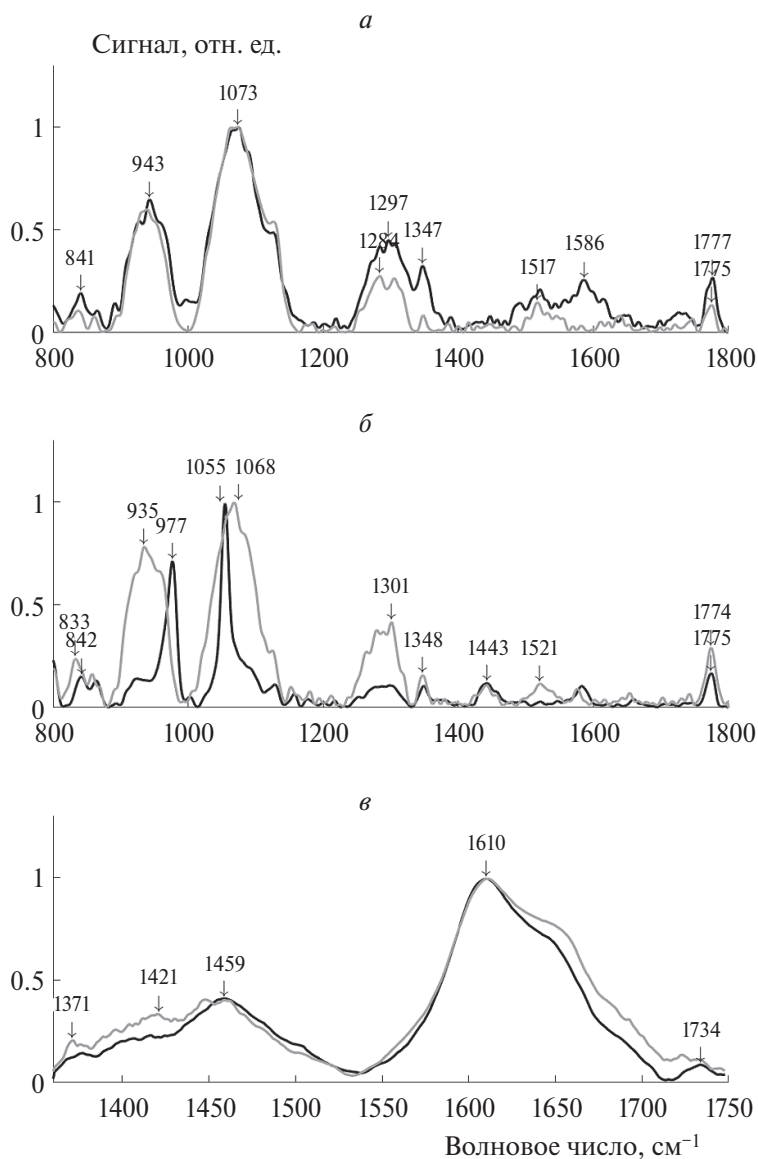


Рис. 3. Спектры комбинационного рассеяния образцов до (черный спектр) и после воздействия видимого света (серый спектр): *а* – суспензия липофусциновых гранул, *б* – хлороформные экстракты из ЛГ, *в* – синтетический А2Е.

области $1050\text{--}1100\text{ см}^{-1}$, которые, вероятно, связаны с колебаниями С–О–С-связей в эфирах.

В случае суспензии ЛГ изменения в ИК-спектрах были не столь значительными (рис. 4*а*) по сравнению с хлороформными экстрактами из ЛГ. Наблюдали увеличение интенсивности и смещение полосы при 1070 см^{-1} , а полоса при 1630 см^{-1} изменениям практически не подвергалась. Вероятно, менее выраженные изменения в ИК-спектрах ЛГ, по сравнению с экстрактами, связаны с тем, что наибольшее число продуктов окисления переходит в экстракт.

В спектрах комбинационного рассеяния суспензии ЛГ (рис. 3*а*) изменения были также менее

выраженными. Отмечено увеличение интенсивности плеча полосы при 1730 см^{-1} , связанного с появлением альдегидов в процессе облучения. Появлялись полосы вблизи 1240 см^{-1} , которые могут быть приписаны эпоксидным соединениям. В спектрах комбинационного рассеяния наблюдается нарастание колебания полос при 1065 и 1113 см^{-1} в процессе окисления ЛГ.

Сравнение спектров комбинационного рассеяния суспензии ЛГ и хлороформных экстрактов из ЛГ позволяет предположить, что в экстракт переходят соединения, вносящие наибольший вклад в полосы при 1350 и 1050 см^{-1} . Данные полосы могут быть отнесены как к липидам, так и к бисретиноидам. Таким образом, видно, что наи-

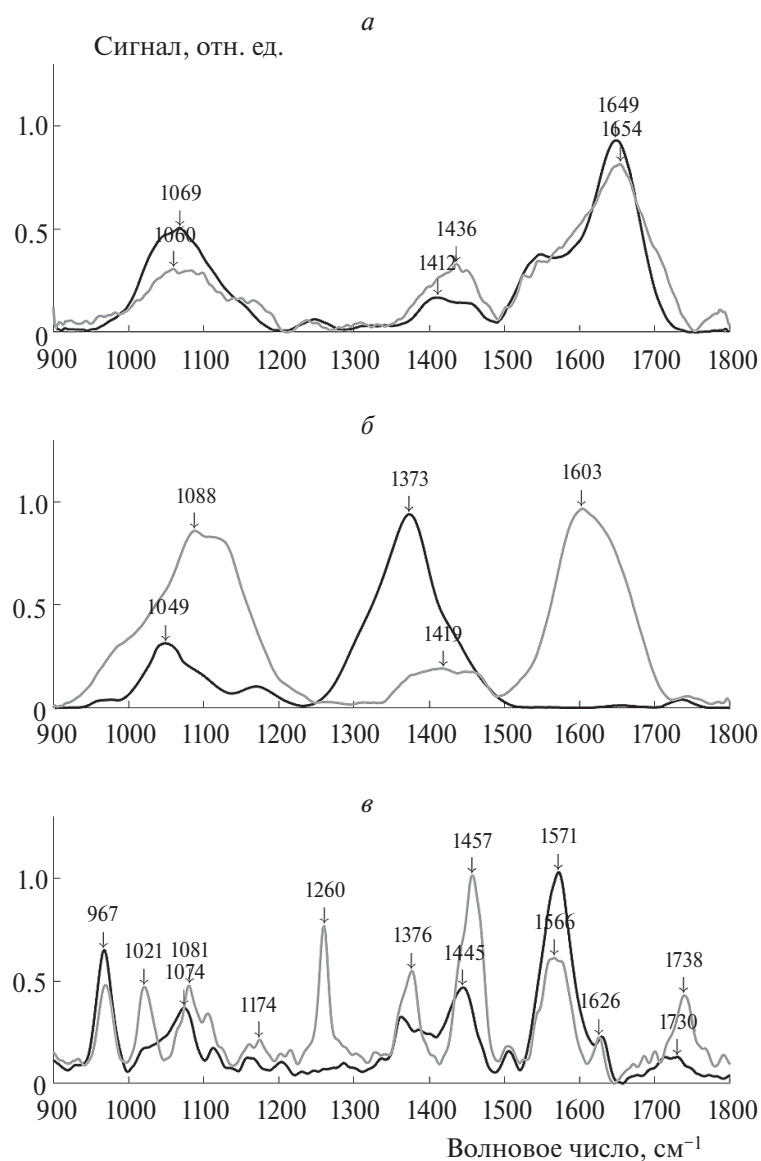


Рис. 4. ИК-спектры образцов до (черный спектр) и после воздействия видимого света (серый спектр): *а* – суспензия липофусциновых гранул, *б* – хлороформные экстракты из ЛГ, *в* – синтетический А2Е.

большим изменениям в процессе окисления подверглись бисретиноиды и липиды.

В спектре А2Е при окислении под воздействием света мы наблюдаем наиболее четкие изменения, так как в исходном образце было одно соединение, а в процессе окисления образовались соединения, представленные другими характерными полосами на ИК-спектрах и комбинационного рассеяния (рис. 4в, 3в), которых не было в исходном образце. На ИК-спектрах обнаружено увеличение интенсивности карбонильных полос (1750, 1450, 1350 см⁻¹) в окисленных образцах (рис. 4в). Полосу при 1740 см⁻¹ можно отнести к валентным колебаниям карбонильной группы. Полосы вблизи 1375 и 1450 см⁻¹, вероятно, являются деформационными

полосами соединений $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})-$ и $-\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$ соответственно. Полоса около 1625 см⁻¹, вероятно, связана с наличием пиридинового кольца. Полоса при 1260 см⁻¹ принадлежит эпоксидной группе. Более широкая полоса при 1740 см⁻¹ для облученного образца указывает на присутствие ненасыщенного сопряженного альдегида вследствие окисления образца. Значительное увеличение интенсивности для ИК-диапазона при 1260 см⁻¹ после окисления образца может быть результатом накопления эпоксидов в процессе фотоокисления. Таким образом, было продемонстрировано образование как продуктов окисления эпоксидов и фураноидов А2Е, так и продуктов их дальнейшего разрушения – альдегидов и кетонов.

Таблица 2. Предполагаемые молекулярные формулы изменяющихся ионов в образцах ЛГ, хлороформных экстрактах из ЛГ и синтетическом А2Е при их фотоокислении

Образец	Значения m/z	Предполагаемые химические формулы ионов
Суспензия ЛГ	524.3	$C_{29}H_{40}N_4O_5^+$, $C_{28}H_{34}N_{11}^+$, $C_{14}H_{36}N_{16}O_6^+$
	385.3	$C_{25}H_{39}NO_2^+$, $C_{23}H_{37}N_4O^+$
	369.3	$C_{26}H_{27}NO^+$, $C_{22}H_{41}O_4^+$, $C_{25}H_{39}NO^+$, $C_{24}H_{37}N_2O^+$
	367.2	$C_{27}H_{27}O^+$, $C_{26}H_{25}NO^+$
	313.3	$C_{19}H_{39}NO_2^+$, $C_{23}H_{37}^+$, $C_{20}H_{41}O_2^+$
	226.1	$C_{15}H_{14}O_2^+$
Хлороформный экстракт из ЛГ	264.3	$C_{19}H_{36}^+$
	478.6	$C_{34}H_{70}^+$
	550.3	$C_{34}H_{46}O_6^+$, $C_{35}H_{42}N_4O_2^+$, $C_{37}H_{44}NO_3^+$, $C_{30}H_{42}N_6O_4^+$
Синтетический А2Е	281.1	$C_{17}H_{15}NO_3^+$, $C_{20}H_{13}N_2^+$, $C_{14}H_{17}O_6^+$, $C_{21}H_{13}O^+$
	282.1	$C_{13}H_{18}N_2O_5^+$, $C_{20}H_{14}N_2^+$, $C_{18}H_{18}O_3^+$, $C_{17}H_{16}NO_3^+$
	323.1	$C_{13}H_{23}O_9^+$, $C_{16}H_{21}NO_6^+$, $C_{11}H_{21}N_3O_8^+$, $C_{23}H_{17}NO^+$
	325.1	$C_{17}H_{15}N_3O_4^+$, $C_{19}H_{17}O_5^+$, $C_{22}H_{15}NO_2^+$, $C_{26}H_{13}^+$
	341.3	$C_{19}H_{41}N_4O^+$, $C_{21}H_{43}NO_2^+$, $C_{25}H_{41}^+$, $C_{20}H_{41}N_2O_2^+$
	399.1	$C_{28}H_{17}NO_2^+$, $C_{26}H_{15}N_4O^+$, $C_{18}H_{23}O_{10}^+$, $C_{25}H_{19}O_5^+$

Сравнительный анализ данных спектроскопии комбинационного рассеяния (рис. 3) и ИК-спектроскопии для ЛГ и А2Е (рис. 4) показал, что для суспензии ЛГ и А2Е наблюдаются схожие тенденции к увеличению сигнала карбонильных полос при 1750, 1450 и 1350 см^{-1} при фотоокислении образцов. Этот факт дает основание предполагать, что в ЛГ детектируются продукты фотоокисления, содержащие альдегиды в свободном состоянии, аналогичные продуктам фотоокисления А2Е.

Масс-спектрометрический анализ. Для анализа продуктов окисления бисретиноидов ЛГ был применен метод времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов. Проведен сравнительный масс-спектрометрический анализ необлученных и облученных видимым светом суспензии ЛГ, хлороформных экстрактов ЛГ и синтетического А2Е (рис. 5).

Для выявления достоверности отличий в результатах анализа образцов ЛГ, до и после окисления был проведен статистический анализ методом главных компонент. Этот метод позволяет выявить пики, вносящие наибольший вклад в различие между масс-спектрами. Анализ проводили по наиболее интенсивным пикам в диапазоне 0–500 Да. Было установлено, что статистически образцы достоверно различались, следовательно, отличия в масс-спектрах между окисленными и нативными образцами статистически достоверны.

Из этого следует, что облучение светом приводит к значительным изменениям в химическом составе ЛГ. Из данных графика нагрузок (loadings) мы получили перечень масс ионов, которые определяли наибольшую вариацию данных (отвечали за отличия в масс-спектрах) для темновых и облученных образцов. На рис. 5 представлены данные масс-спектрометрии — ионы, содержание которых нарастало во всех образцах при фотоокислении.

В табл. 2 приведены предполагаемые химические формулы этих соединений. Изменения сигнала данных соединений, может указывать на то, что они имеют схожую природу, либо являются разными фрагментами одного соединения.

Из рис. 5 видно, что в хлороформном экстракте из ЛГ есть ионы с массами (например, 367.2, 369.3), которые присутствовали и в самих ЛГ. Другими словами, эти соединения являются жирорастворимыми. На рис. 5б (хлороформный экстракт) приведена диаграмма сравнения интенсивностей некоторых ионов с относительно высокой молекулярной массой. Обнаружено значительное снижение интенсивностей для ионов 264.3, 478.6 и 550.3. В табл. 2 по точной массе предложены структуры данных ионов.

Исходя из этого можно сделать вывод, что многие соединения продуктов фотоокисления в ЛГ переходят в хлороформный экстракт. Чтобы доказать, что источником этих ионов являются про-

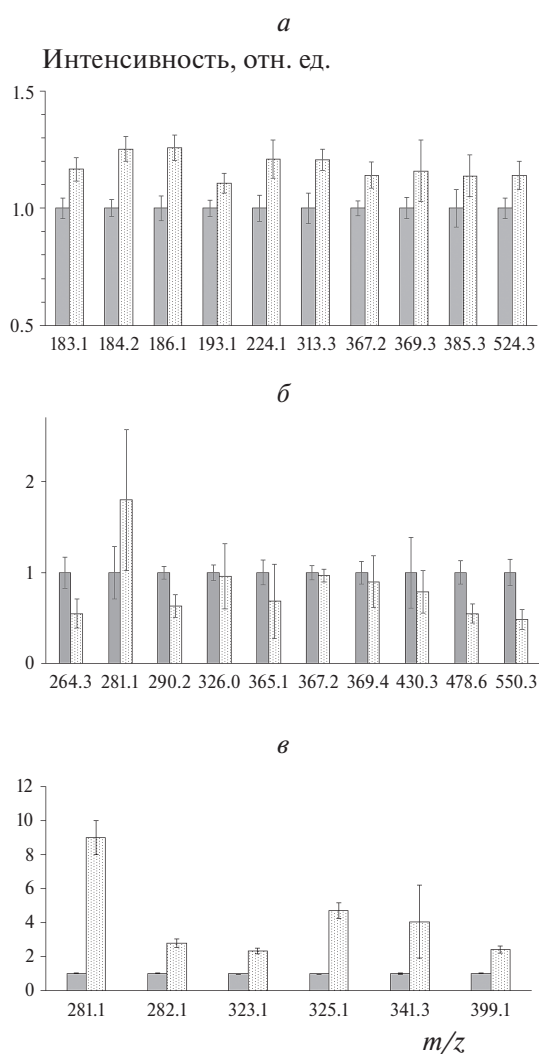


Рис. 5. Гистограммы масс-спектрометрических данных до (темные столбцы) и после воздействия светом (светлые столбцы) на исследуемые образцы: *а* – суспензия ЛГ, *б* – хлороформные экстракты из ЛГ, *в* – синтетический А2Е. Для наглядности интенсивности ионов нормировались на соответствующую среднюю интенсивность иона темного образца.

дукты фотоокисления бисретиноидов, массы этих ионов сравнивались с массами продуктов фотоокисления синтетического А2Е.

Был проведен сравнительный анализ масс фотоокисленного А2Е, которые по своему составу наиболее близки к продуктам фотодеградации бисретиноидов в образце ЛГ. Из рис. 5в видно, что “нарастающие” ионы имеют предполагаемые формулы, похожие на формулы фрагментов бисретиноидов и их производных в ЛГ [12, 13, 22]. Таким образом, можно утверждать, что в процессе фотоокисления ЛГ, действительно, происходит окисление бисретиноидов ЛГ.

Кроме того, анализ образцов методом TOF-SIMS выявил пики с $m/z = 29$ (ион CHO^+), 43 (ион $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}^+$), 60 (ион $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2^+$) и 69 (ион $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}^+$), соответствующие фрагментам карбонильных соединений, которые демонстрировали заметный рост после фотоокисления, как синтетического А2Е, так и самих ЛГ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее нами было обнаружено, что при ВМД наблюдается повышенное содержание окисленных форм бисретиноидов ЛГ в клетках РПЭ [14, 16]. Аналогичные изменения спектральных и хроматографических характеристик ЛГ наблюдаются и при их фотоокислении *in vitro*. Поэтому фотоокисление ЛГ представляет собой удобную модель для изучения механизмов развития ВМД [23]. В данной работе была использована эта модель, чтобы доказать ранее выдвинутое предположение о том, что одним из источников образующихся при фотоокислении ЛГ цитотоксичных карбонильных соединений являются бисретиноиды [24].

Проведен сравнительный физико-химический анализ продуктов фотоокисления ЛГ и синтетического А2Е. Для контроля процесса фотоокисления [25] зарегистрированы спектры флуоресценции суспензии нативных и облученных видимым светом ЛГ, также проведен ВЭЖХ анализ хлороформных экстрактов из образцов суспензии ЛГ. В спектрах фотоокисленных ЛГ наблюдается повышенная интенсивность флуоресценции в области 550 нм по сравнению с необлученной суспензией ЛГ. ВЭЖХ анализ подтвердил повышенное содержание окси-Бис-рет при фотоокислении ЛГ.

Для большей детализации их спектральных свойств проведен флуоресцентный 3D-анализ были получены спектры флуоресценции для всех исследуемых образцов: суспензии ЛГ, хлороформных экстрактов из суспензий ЛГ и синтетического А2Е до и после фотоокисления (рис. 2). Выявлена идентичная тенденция к изменению профилей флуоресценции после облучения как для суспензии ЛГ и хлороформного экстракта из ЛГ, так и для синтетического А2Е. Тем самым, сравнительный анализ исследуемых образцов указывает на то, что в фотоокисленных ЛГ накапливаются продукты, аналогичные продуктам фотоокисления и фотодеградации бисретиноида А2Е.

Сравнительный анализ кривых затухания флуоресценции позволил сделать вывод о том, что при увеличении содержания продуктов фотоокисления и фотодеградаций бисретиноидов в составе ЛГ происходит изменение параметров кинетических кривых затухания флуоресценции. При увеличении содержания окси-Бис-рет в составе ЛГ происходит увеличение среднего значения времени жизни флуоресценции по сравнению с контролем и увеличение вклада в суммарную флуоресценцию продуктов фотоокисления [26]. Аналогичные данные получены и для хлороформного экстракта из ЛГ. Кроме того, получено дополнительное подтверждение того, что исходные неокисленные бисретиноиды характеризуются минимальным временем жизни флуоресценции в составе ЛГ (0.1 нс для А2Е). На основании полученных результатов можно также сделать вывод о том, что наблюдаемое увеличение среднего времени жизни флуоресценции при патологии ВМД относительно “нормы” [19, 27] вызвано увеличением в составе ЛГ окисленных бисретиноидов.

В данном исследовании была сделана попытка охарактеризовать химические свойства продуктов окислительной деструкции бисретиноидов ЛГ, чтобы понять их природу. Ранее было сделано предположение, что эти продукты могут содержать альдегидные группы [15]. Для подтверждения этого предположения проведен сравнительный анализ всех исследуемых образцов с использованием методов комбинационного рассеяния, ИК-спектроскопии и времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов. Проведены исследования по обнаружению и идентификации соединений, содержащих карбонильные группы, в суспензии нативных ЛГ и облученных видимым светом (модель ВМД), а также в хлороформных экстрактах из этих образцов и фотоокисленного синтетического А2Е, основного бисретиноида ЛГ. Сравнительный анализ результатов исследования показал, что для суспензии ЛГ, хлороформных экстрактов из них и синтетического А2Е в спектрах комбинационного рассеяния наблюдаются схожие тенденции к увеличению сигнала карбонильных полос при 1750, 1450 и 1350 см⁻¹ при фотоокислении образцов. Можно предположить, что в ЛГ детектируются продукты фотоокисления, содержащие альдегиды в свободном состоянии, аналогичные продуктам фотоокисления А2Е. Это говорит о том, что химически ак-

тивные карбонильные группы в ЛГ образуются за счет фотоокисления бисретиноидов, одним из которых является бисретиноид А2Е.

Анализ продуктов фотоокисления и фотодеградаций бисретиноидов методом времяпролетной масс-спектрометрии вторичных ионов также подтвердил наличие соединений, содержащих химически активные карбонильные группы. Обнаружены соединения, близкие по массовому числу, количество которых увеличивается при фотоокислении как ЛГ, так и синтетического А2Е. Предложены химические формулы для этих соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе подробно охарактеризованы физико-химические свойства окисленных бисретиноидов ЛГ. Показано, что именно их активное накопление при окислении приводит к увеличению среднего времени жизни флуоресценции, что важно для понимания механизмов развития патогенеза, а также интерпретации данных методами FLIM и АФ. Кроме того, показано, что источником продуктов альдегидной природы, накапливающихся при окислении ЛГ, являются в основном бисретиноиды. Полученные данные важны как для дальнейшего усовершенствования методов ранней диагностики ВДМ, так и для понимания механизмов развития патологии.

Мы благодарим сотрудников Федерального государственного учреждения «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова д-ра мед.наук С.А. Борзенка и к.м.н. М.Х. Хубецову за возможность проведения исследований с использованием кадаверных глаз человека.

Работа выполнена при поддержке Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 122041400102-9), а также при поддержке Программы развития Московского государственного университета (проект № 23-Ш06-20).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zetterberg M. // *Maturitas*. 2016. V. 83. P. 19.
2. Nivison-Smith L., Milston R., Madigan M. et al. // *Optom. Vis. Sci.* 2014. V. 91. № 8. P. 832.
3. Fisher C.R., Ferrington D.A. // *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* 2018. V. 59. № 4. P. 41.
4. Петронюк Ю.С., Трофимова Н.Н., Зак П.П. и др. // *Хим. физика*. 2022. Т. 41. № 2. С. 27.
5. Ruan Y., Jiang S., Gericke A. // *Intern. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 3. P. 1296.
<https://doi.org/10.3390/ijms22031296>

6. Ларин И. К. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 84.
7. Holz F.G., Schütt F., Kopitz J. et al. // Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 1999. V. 40. P. 737.
8. Adler IV L., Chen C., Koutalos Y. // Exp. Eye Res. 2017. V. 155. P. 121.
9. Boulton M., Dontsov A., Jarvis-Evans J., Ostrovsky M. et al. // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1993. V. 19. № 3. P. 201; [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)87085-2](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)87085-2)
10. Lamb L.E., Simon J.D. // Photochem. Photobiol. 2004. V. 79. № 3. P. 127.
11. Recent Advances in Retinal Degeneration (Advances in Experimental Medicine and Biology, 613) NY: Springer, 2008. P. 393; https://doi.org/10.1007/978-0-387-74904-4_46
12. Wu Y., Yanase E., Feng X. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. P. 7275.
13. Ben-Shabat S., Itagaki Y., Jockusch S. et al. // Angew. Chem. Int. Ed. 2002. V. 41. P. 814.
14. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Arbukhanova P.M., Borzenok S.A., Kononikhin A.S., Popov I.A., Nikolaev E.N., Ostrovsky M.A. // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. P. 1075.
15. Yakovleva M.A., Dontsov A.E., Trofimova N.N., Sakina N.L., Kononikhin A.S., Aybush A.V., Feldman T.B., Ostrovsky M.A. // Intern. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 1. P. 222; <https://doi.org/10.3390/ijms23010222>
16. 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. V. 32. P. 144; <https://doi.org/10.1038/s41433-018-0109-0>
17. Holz F.G., Schmitz-Valckenberg S., Spaide R.F. et al. // Atlas of Fundus Autofluorescence Imaging. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag. 2007. P. 342.
18. Schweitzer D., Gaillard E.R., Dillon J. et al. // Invest. Ophthalmol. Visual Sci. 2012. V. 53. № 7. P. 3376; <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8970>
19. Schweitzer D., Quick S., Schenke S. et al. // Ophthalmology. 2009. V. 106. № 8. P. 714; <https://doi.org/10.1007/s00347-009-1975-4>
20. Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. № 1. P. 497.
21. Parish C.A., Hashimoto M., Nakanishi K. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 14609.
22. Dontsov A., Yakovleva M., Trofimova N., Sakina N., Gulin A., Aybush A., Gostev F., Vasin A., Feldman T., Ostrovsky M. // Intern. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 3. P. 1534; <https://doi.org/10.3390/ijms23031534>
23. Wang Z., Keller L.M.M., Dillon J. et al. // Photochem. Photobiol. 2006. V. 82. P. 1251.
24. Feldman T., Ostrovskiy D., Yakovleva M., Dontsov A., Borzenok S., Ostrovsky M. // Intern. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 20. P. 12234; <https://doi.org/10.3390/ijms232012234>
25. Разумов В.Ф. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 2. С. 14.
26. Яковлева М.А., Радченко А.Ш., Костюков А.А. и др. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 20.
27. 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. V. 19. P. 920; <https://doi.org/10.1039/C9PP00406H>

PHYSICAL AND CHEMICAL ANALYSIS OF THE LIPOFUSCIN GRANULE BISRETINOID PHOTODESTRUCTION PRODUCTS FROM RETINAL PIGMENT EPITHELIUM CELLS OF THE EYE

M. A. Yakovleva^{1*}, A. A. Vasin², A. E. Dontsov¹, A. A. Gulin², A. V. Aybush²,
A. A. Astafiev², A. M. Shakhov², T. B. Feldman^{1,3}, M. A. Ostrovsky^{1,3}

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS, Moscow, Russia

² Semenov Federal Research Center for Chemical Physics RAS, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*E-mail: lina.invers@gmail.com

In this work, the mechanisms of formation of the bisretinoid oxidation products in lipofuscin granules isolated from the retinal pigment epithelium cells of the human eye have been studied. The physico-chemical characteristics of the bisretinoid photooxidation products are described. The methods of IR spectroscopy, Raman spectroscopy, fluorescence spectroscopy, scanning confocal microscopy, time-of-flight mass spectrometry of secondary ions (TOF.SIMS) and HPLC were used for the study. The properties of the products of photooxidation and degradation of the fluorophore of lipofuscin granules, including synthetic N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E), are described in detail. It has been shown that the products of oxidative degradation of lipofuscin granules are similar to the products of photooxidation of the main bisretinoid of lipofuscin granules – A2E. These data are important both for understanding the mechanisms of formation of cytotoxic products in lipofuscin granules and for establishing their chemical nature.

Keywords: bisretinoids, oxidative degradation, fluorophores, lipofuscin granules, retinal pigment epithelium of the human eye.

REFERENCES

1. M. Zetterberg, *Maturitas*. **83**, 19 (2016).
2. L. Nivison-Smith, R. Milston, M. Madigan, M. Kalloniatis, *Optom. Vis. Sci.* **91**, 832 (2014).
3. C.R. Fisher, D.A. Ferrington, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* **59**, 41 (2018).
4. Yu.S. Petronyuk, N. N. Trofimova, P.P. Zak et al., *Russian Journal of Phys. Chem. B*. **16**(1), 97–102 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122010249>
5. Y. Ruan, S. Jiang, A. Gericke, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 1296 (2021).
<https://doi.org/10.3390/ijms22031296>
6. I.K. Larin, *Russian Journal of Physical Chemistry B*. **17**, 244–250 (2023).
<https://doi.org/10.1134/s1990793123010074>
7. F.G. Holz, F. Schütt, J. Kopitz, G.E. Eldred, F.E. Kruse, H.E. Völcker, M. Cantz, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* **40**, 737 (1999).
8. L. Adler IV, C. Chen, Y. Koutalos, *Exp. Eye Res.* **155**, 121 (2017).
9. M. Boulton, A. Dontsov, J. Jarvis-Evans, M. Ostrovsky, D. Svistunenko, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **19**, 201 (1993).
[https://doi.org/10.1016/1011-1344\(93\)87085-2](https://doi.org/10.1016/1011-1344(93)87085-2)
10. L.E. Lamb, J.D. Simon, *Photochem. Photobiol.* **79**, 127 (2004).
11. J.R. Sparrow, S.R. Kim, A.M. Cuervo, U. Bandhyopadhyayand, *Adv. Exp. Med. Biol.* **613**, 393 (2008).
https://doi.org/10.1007/978-0-387-74904-4_46
12. Y. Wu, E. Yanase, X. Feng, M.M. Siegel, J.R. Sparrow, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **107**, 7275 (2010).
13. S. Ben-Shabat, Y. Itagaki, S. Jockusch, J.R. Sparrow, N.J. Turro, K. Nakanishi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **41**, 814 (2002).
14. T.B. Feldman, M.A. Yakovleva, P.M. Arbukhanova, S.A. Borzenok, A.S. Kononikhin, I.A. Popov, E.N. Nikolaev, M.A. Ostrovsky, *Anal. Bioanal. Chem.* **407**, 1075 (2015).
15. M.A. Yakovleva, A.E. Dontsov, N.N. Trofimova, N.L. Sakina, A.S. Kononikhin, A.V. Aybush, T.B. Feldman, M.A. Ostrovsky, *Int. J. Mol. Sci.* **23** (1), 222 (2022).
<https://doi.org/10.3390/ijms23010222>
16. T.B. Feldman, M.A. Yakovleva, A.V. Larichev, P.M. Arbukhanova, A.Sh. Radchenko, S.A. Borzenok, V.A. Kuzmin, M.A. Ostrovsky, *Eye*. **32**, 1440 (2018).
<https://doi.org/10.1038/s41433-018-0109-0>
17. F.G. Holz, S. Schmitz-Valckenberg, R.F. Spaide, A.C. Bird, *Atlas of Fundus Autofluorescence Imaging*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. P. 342.
18. D. Schweitzer, E.R. Gaillard, J. Dillon, R.F. Mullins, S. Russell, B. Hoffmann, S. Peters, M. Hammer, C. Biskup, *Investig. Ophthalmol. Visual Sci.* **53** (7), 3376 (2012).
<https://doi.org/10.1167/iovs.11-8970>
19. D. Schweitzer, S. Quick, S. Schenke, M. Klemm, S. Gehlert, M. Hammer, S. Jentsch, J. Fischer, *Ophthalmology*. **106**, 714 (2009).
<https://doi.org/10.1007/s00347-009-1975-4>
20. J. Folch, M. Lees, G.H. Sloane Stanley, *J. Biol. Chem.* **226**, 497 (1957).

21. C.A. Parish, M. Hashimoto, K. Nakanishi, J. Dillon, J. Sparrow, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **95**, 14609 (1998).
22. Z. Wang, L.M.M. Keller, J. Dillon, E.R. Gaillard, Photochem. Photobiol. **82**, 1251 (2006).
23. T. Feldman, D. Ostrovskiy, M. Yakovleva, A. Dontsov, S. Borzenok, M. Ostrovsky, Int. J. Mol. Sci. **23**, 12234 (2022).
<https://doi.org/10.3390/ijms232012234>
24. A. Dontsov, M. Yakovleva, N. Trofimova, N. Sakina, A. Gulin, A. Aybush, F. Gostev, A. Vasin, T. Feldman, M. Ostrovsky, Int. J. Mol. Sci. **23** (3), 1534 (2022).
<https://doi.org/10.3390/ijms23031534>
25. W.F. Razumov, Russian Journal of Physical Chemistry B. **17(1)**, 36 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S199079312301027X>
26. M.A. Yakovleva, A.Sh. Radchenko, A.A. Kostyukov et al., Russian Journal of Physical Chemistry B. **16(1)**, 90-96 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S199079312201033X>
26. M.A. Yakovleva, A.Sh. Radchenko, T.B. Feldman, A.A. Kostyukov, P.M. Arbukhanova, S.A. Borzenok, V.A. Kuzmin, M.A. Ostrovsky, Photochem. Photobiol. Sci. **19**, 920 (2020).
<https://doi.org/10.1039/C9PP00406H>

УДК 544.25

ФАЗОВОЕ ПОВЕДЕНИЕ СМЕСИ V-ОБРАЗНОГО
ЖИДКОГО КРИСТАЛЛА И ПОЛИМЕРА© 2024 г. М. А. Алиев^{1*}, С. Б. Бибилов¹¹Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: maasept@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.03.2024;

после доработки 24.04.2024;

принята в печать 20.05.2024

Фазовое поведение смесей линейного гибкого полимера и биаксиального V-образного жидкого кристалла рассмотрено на основе теории Флори–Хаггинса полимерных растворов и теории нематического упорядочения Ландау–де Жена. Исследовано влияние архитектуры V-образных молекул на фазовые диаграммы системы.

Ключевые слова: V-образные жидкие кристаллы, линейные полимеры, смеси полимеров и жидких кристаллов, нематическая фаза, фазовые диаграммы.

DOI: 10.31857/S0207401X24110121

1. ВВЕДЕНИЕ

Смеси гибких полимеров и жидких кристаллов (ЖК) представляют значительный интерес благодаря их потенциальным приложениям в области электрооптических устройств [1]. Важным обстоятельством является то, что фазовое поведение смесей может контролироваться изменением не только температуры, но и состава смеси [2–11]. К настоящему времени имеется значительное количество исследований, посвященных теоретическому описанию бинарных систем, состоящих из полимеров и одноосных ЖК [12–19]. Значительная часть этих [17–19] и других [20, 21] работ основана на совместном использовании (сочетании подходов) теории полимерных растворов Флори–Хаггинса (FH) [22] и теории нематического упорядочения Майера–Заупе (MS) [23]. При практических расчетах использование данного подхода требует вычисления на каждом шаге интегралов, входящих в энтропийное слагаемое MS-теории, что затрудняет процедуру построения фазовой диаграммы [24]. Аппроксимация указанного слагаемого разложением в ряд Тейлора [25, 26] не позволяет упростить вычисления в связи с его плохой сходимостью [25, 27, 28]. Вычислительная процедура для получения фазовых диаграмм смеси может быть значительно упрощена, если вместо MS-теории воспользоваться разложением свободной энергии Ландау–де Жена по

степеням инвариантов ориентационного тензора [29]; такой подход, однако, затруднен из-за большого количества неизвестных феноменологических параметров теории.

В отличие от упомянутых выше работ, в которых исследовались смеси одноосных ЖК с полимерами, цель настоящей работы — исследование фазового поведения смеси (двуосного) биаксиального V-образного ЖК и гибкого полимера. Системы V-образных («банановидных») ЖК представляют значительный интерес, поскольку не только являются перспективными кандидатами для получения двуосной нематической фазы, но и демонстрируют образование пространственно модулированных нематических фаз [30, 31]. В настоящей работе для описания ориентационного упорядочения V-образных молекул используется разложение свободной энергии Ландау — де Жена. Важной особенностью является то, что соответствующие коэффициенты разложения свободной энергии Ландау — де Жена получены из микроскопической модели V-образной молекулы [32] и не содержат свободных параметров.

Статья организована следующим образом. В разд. 2 описывается модельная смесь полимер/V-образный ЖК, а также на основе подходов Флори–Хаггинса и микроскопической теории Ландау — де Жена строится выражение для свободной энергии двухфазной системы. Фазовые

диаграммы системы, полученные в результате минимизации свободной энергии, и их обсуждение приводится в разд. 3. В заключении содержится сводка основных результатов.

2. МОДЕЛЬ

Рассмотрим смесь из Π_A V-образных молекул и Π_B гибких линейных полимеров, находящуюся в объеме V . Каждая V-образная частица состоит из двух жестких сегментов, соединенных под внешним углом α ($0 \leq \alpha < \pi$) (рис. 1); сегменты образованы мономерными звеньями сорта А, чье общее число в V-образной молекуле есть N_A , причем один из сегментов содержит $N_A^{(1)}$, второй — $N_A^{(2)}$ звеньев: ($N_A^{(1)} + N_A^{(2)} = N_A$). Архитектура такой молекулы определяется долей звеньев в одном из сегментов, $\phi = N_A^{(1)}/N_A$ и углом между сегментами. При $\alpha = 0$ V-образная частица имеет стержнеобразную конформацию и обладает симметрией $D_{\infty h}$, при $0 < \alpha < \pi$ и $\phi = 1/2$ симметрией C_{2v} , наконец при $0 < \alpha < \pi$ и $\phi \neq 1/2$ симметрией C_s . Каждая гибкая макромолекула содержит N_B звеньев сорта В. Общее число мономерных звеньев в системе есть $M = \Pi_A N_A + \Pi_B N_B$. Доля звеньев X_A , принадлежащая V-образным молекулам, определяется выражением $X_A \equiv X = \Pi_A N_A / M$; в предположении несжимаемости системы доля звеньев полимера есть $X_B = 1 - X$.

Выражение для свободной энергии однофазной системы записывается в виде

$$\begin{aligned} \frac{1}{MT} \mathcal{F} = F(p, s, X) = \\ = \frac{X}{N_A} \ln(X) + \frac{1-X}{N_B} (1-X) + \chi X (1-X) - \\ - \frac{u}{3T} X^2 \text{tr}(\mathbf{S}^2) + \frac{X}{N_A} \hat{\mathcal{L}}_A(\mathbf{S}), \end{aligned} \quad (1)$$

где первые три слагаемых в правой части представляют собой свободную энергию изотропной смеси в теории полимерных растворов Флори–Хаггинса [22], параметр χ описывает изотропное взаимодействие между мономерами сортов А и В [33]. Четвертое слагаемое есть энергия анизотропного MS-взаимодействия, способствующего взаимной параллельной ориентации молекул, где u — параметр MS-взаимодействия, тогда как $\mathbf{S}$ есть ориентационный тензорный параметр порядка [29], который для однородной нематической фазы может быть представлен в диагональном виде

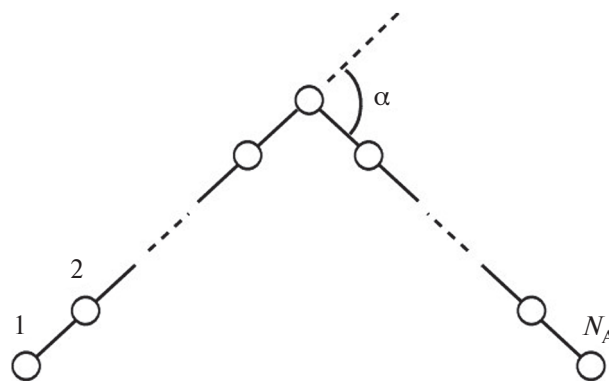


Рис. 1. Модель V-образной молекулы, образованной двумя жесткими сегментами, соединенными под внешним углом α . Молекула состоит из мономерных звеньев (обозначены как 1, 2... N_A), общее число которых равно N_A .

$$\mathbf{S} = \begin{pmatrix} -(p+s)/2 & 0 & 0 \\ 0 & -(p-s)/2 & 0 \\ 0 & 0 & p \end{pmatrix}. \quad (2)$$

В изотропном состоянии собственные значения (СЗ) тензора (2) равны нулю при наборе значений параметров порядка ($p=0, s=0$). Одноосное нематическое состояние реализуется при следующих наборах параметров порядка: ($p \neq 0, s=0$), ($p \neq 0, s=+3p$) и ($p \neq 0, s=-3p$). Отметим, что в любом из этих трех наборов две компоненты вектора собственных значений совпадают и отличны от нуля. Одноосные каламитная (N_V^+) и дискотическая (N_V^-) нематические фазы образуются, если СЗ, отличающееся от других, является наибольшим и наименьшим соответственно. Три разных компоненты СЗ отвечают биаксиальному (двуосному) нематическому состоянию N_B .

Последнее слагаемое в выражении (1), $\hat{\mathcal{L}}_A(\mathbf{S})$, есть энтропийный вклад в разложение свободной энергии Ландау — де Жена расплава V-образных частиц [32]:

$$\begin{aligned} L_A(\mathbf{S}) = \gamma_2 \text{tr}(\mathbf{S}^2) + \gamma_3 \text{tr}(\mathbf{S}^3) + \gamma_4 [\text{tr}(\mathbf{S}^2)]^2 + \\ + \gamma_5 \text{tr}(\mathbf{S}^2) \text{tr}(\mathbf{S}^3) + \gamma_6^{(1)} [\text{tr}(\mathbf{S}^2)]^3 + \gamma_6^{(2)} [\text{tr}(\mathbf{S}^3)]^2, \end{aligned} \quad (3)$$

где инварианты тензора (2), входящие в выражение (3), имеют вид [32]

$$\begin{aligned} \text{tr}(\mathbf{S}^2) &= (1/2)(3p^2 + s^2), \\ \text{tr}(\mathbf{S}^3) &= (3/4)p(p^2 - s^2). \end{aligned} \quad (4)$$

Коэффициенты разложения (3) были найдены ранее [32], исходя из микроскопической модели V-образной молекулы:

$$\gamma_2 = \frac{5}{3\sigma}, \quad (5)$$

$$\gamma_3 = -\frac{50}{63} \frac{A}{\sigma^3}, \quad (6)$$

$$\gamma_4 = \frac{25}{63\sigma^2} + \frac{125}{882} \frac{A^2}{\sigma^5}, \quad (7)$$

$$\gamma_5 = -\frac{2000}{4851} \frac{A}{\sigma^4} - \frac{625A^3}{3087\sigma^7}, \quad (8)$$

$$\gamma_6^{(1)} = \frac{125}{1702701\sigma^3} \times \left(2362 + \frac{16435}{14} \frac{A^2}{\sigma^3} + \frac{53625}{98} \frac{A^4}{\sigma^6} \right), \quad (9)$$

$$\gamma_6^{(2)} = \frac{625}{81081\sigma^3} \left(20 - \frac{137}{49} \frac{A^2}{\sigma^3} + \frac{4290}{343} \frac{A^4}{\sigma^6} \right). \quad (10)$$

Функции A и σ в выражениях (5–10) записываются в следующем виде:

$$\sigma = 1 - 3X_1X_2\sin^2(\alpha), \quad A = 3\sigma - 1. \quad (11)$$

Фазовая диаграмма расплава V-образных частиц, обладающих симметрией C_{2v} , была найдена ранее [32] на основе анализа энтропийного вклада в свободную энергию (3) и анизотропных взаимодействий (1). Эта диаграмма, построенная в плоскости $(\alpha - \tilde{\omega})$, где $\tilde{\omega} = \tilde{\omega}(\alpha) = uN_A/T_A(\alpha)$, а $T_A(\alpha)$ есть температура фазового перехода из изотропного в одноосное нематическое состояние, содержит области устойчивости изотропной фазы, одноосных каламитной и дискотической, а также двуосной нематических фаз. Фазовая диаграмма указанного расплава симметрична относительно значения $\alpha = \pi/2$; функция $T_A(\alpha)$ имеет минимум при $\alpha = \pi/2$. Для стержнеобразных ($\alpha = 0$) молекул подход, разработанный в [32], предсказывает значение величины $\tilde{\omega}(0) = uN_A/T_A(0) \approx 1/0.217 = 4.61$ и скачок параметра порядка $p \approx 0.323$ (соответствующие величины в MS-теории составляют $\tilde{\omega}(0) \approx 1/0.220$ и $p \approx 0.429$). Таким образом, отношение u/T в соответствующем слагаемом выражения (1) может быть записано в виде

$$\frac{u}{T} \equiv \frac{u}{T} \frac{N_A T_A(0)}{N_A T_A(0)} = \tilde{\omega}(0) \frac{T_A(0)}{TN_A} \quad (12)$$

Будем далее считать, что параметр χ модели ГН изотропного взаимодействия (1) для смеси полимер + ЖК может быть записан в виде

$$\chi = A_\chi + B_\chi/T, \quad (13)$$

где постоянные A_χ и B_χ не зависят от температуры и состава смеси [34].

В рассматриваемой системе возможны следующие состояния: а) изотропная фаза, в которой имеет место полное смешение молекул ЖК и полимера; б) двухфазное состояние из сосуществующих изотропных фаз ($I_1 + I_2$), в одной из которых преобладают молекулы ЖК, в другой — полимера; в) двухфазное состояние из сосуществующих изотропной и нематических фаз ($I + N$); г) нематическая фаза, почти полностью состоящая из молекул ЖК.

Фазовая диаграмма рассматриваемой смеси “V-образный жидкий кристалл + гибкий полимер” может быть получена из условия равенства химических потенциалов компонентов в сосуществующих фазах [35], однако в настоящей работе удобнее воспользоваться непосредственной минимизацией свободной энергии двухфазной системы:

$$F_{ph} = \frac{X - X_2}{X_1 - X_2} F(X_1, p, s) + \frac{X - X_1}{X_2 - X_1} F(X_2, 0, 0), \quad (14)$$

где F — свободная энергия однофазного состояния (1), которая помимо явно указанных переменных зависит от различных внешних параметров: (X , T , N_1 , N_2 , χ , ω и т.д.). В выражении (14) X_1 и X_2 — доли звеньев типа A (т.е. жидкого кристалла) соответственно в первой и второй фазах ($X_1 \equiv X_A^{(1)}$, $X_2 \equiv X_A^{(2)}$). В силу несжимаемости системы выполняются соотношения

$$\begin{aligned} X_B^{(1)} &= 1 - X_A^{(1)} = 1 - X_1, \\ X_B^{(2)} &= 1 - X_A^{(2)} = 1 - X_2. \end{aligned} \quad (15)$$

Минимизация функции (14) позволяет получить набор равновесных значений переменных, которые определяют состояние системы на плоскости $X - T$ для заданных внешних параметров. Производные по X_1 и X_2 от функции (14):

$$\frac{\partial F_{ph}}{\partial X_1} = 0, \quad \frac{\partial F_{ph}}{\partial X_2} = 0, \quad (16)$$

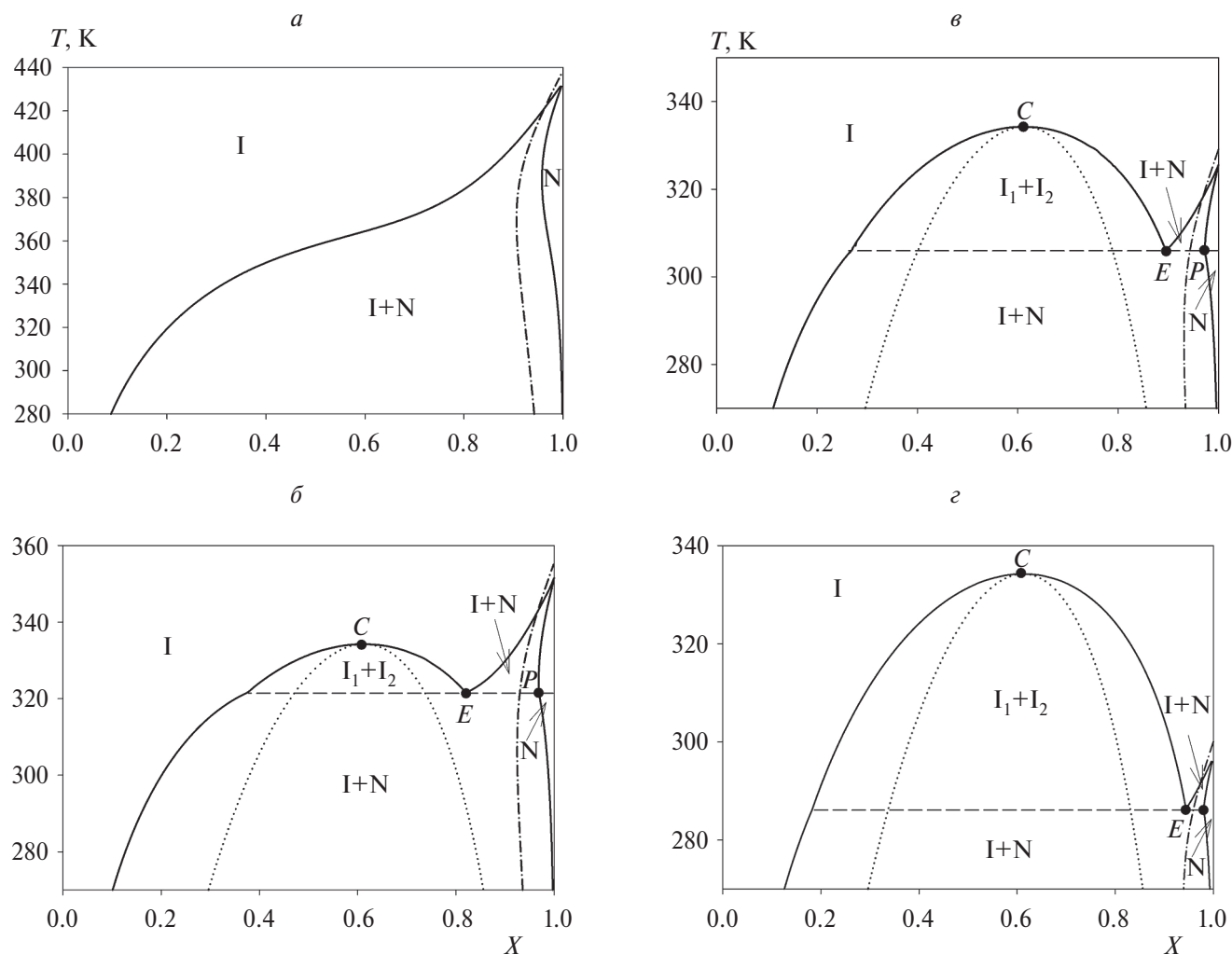


Рис. 2. Фазовые диаграммы смеси полимер/V-образный ЖК при $\phi = 1/2$ и различных внешних углах между сегментами ЖК: $a - \alpha = 0$, $б - \alpha = 0.524$ рад, $в - \alpha = 0.611$ рад, $г - \alpha = 0.6106$. Бинодали показаны сплошными линиями, спинодаль жидкость–жидкость – точечной линией, спинодаль жидкость – нематическая фаза – штрих-пунктирной линией. Буквы C , E и P обозначают соответственно критическую точку, точку эвтектики и точку, отвечающую наименьшему значению X состава смеси, при котором реализуется однофазное нематическое состояние N .

дают уравнения, отвечающие равенству химических потенциалов компонентов в сосуществующих фазах, в то время как уравнения

$$\frac{\partial F_{ph}}{\partial p} = 0, \quad \frac{\partial F_{ph}}{\partial s} = 0 \quad (17)$$

позволяют определить зависимость параметров порядка от долей компонент в смеси и параметров взаимодействия.

Критическая температура смешения и соответствующее значение состава компоненты A определяются следующими выражениями [18]:

$$\chi_c = \frac{(\sqrt{N_A} + \sqrt{N_B})^2}{2N_A N_B}, \quad X_c = \frac{\sqrt{N_B}}{\sqrt{N_A} + \sqrt{N_B}}. \quad (18)$$

Помимо бинодалей, определяемых в результате минимизации свободной энергии двухфазной системы (14), интерес представляет и положение спинодалей $I_1 + I_2$ и $I + N$. Спинодаль фазового разделения типа жидкость–жидкость ($I_1 + I_2$) определяет границу абсолютной неустойчивости однофазного раствора по отношению к образованию двухфазной системы и определяется известным соотношением [35]:

$$\frac{\partial^2 F}{\partial X^2} = 0, \quad (19)$$

где функция F определена в (1). В свою очередь, спинодаль $I + N$ отвечает пределу устойчивости однородного нематического состояния и может быть определена из условий [36, 37]

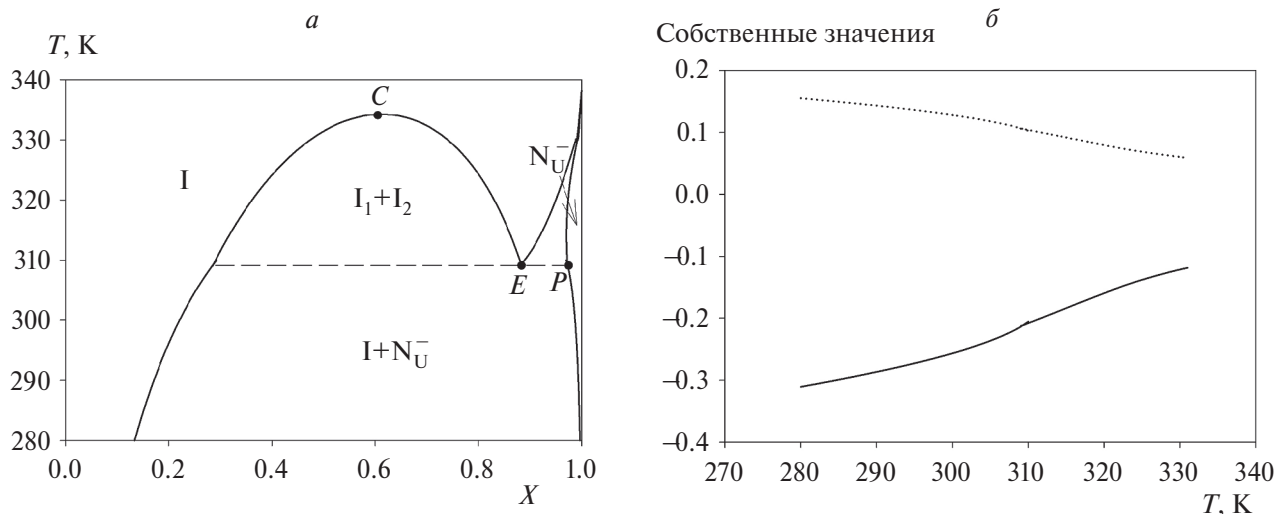


Рис. 3. *a* – Фазовая диаграмма для смеси симметричных V-образных молекул при $\alpha = 1.32$ рад, $N_A = 4$, $N_B = 10$; *б* – поведение собственных значений тензора (2) в зависимости от температуры. Сплошная линия отвечает наименьшему СЗ, отличному от двух других совпадающих СЗ (показаны точечной линией).

$$\frac{\partial F}{\partial p} = 0, \quad \frac{\partial F}{\partial s} = 0, \quad M_1 > 0, \quad M_2 > 0, \quad M_3 > 0, \quad (20)$$

где $M_k (k = 1, 2, 3)$ есть главные миноры следующей матрицы вторых производных:

$$M = \begin{pmatrix} \frac{\partial^2 F}{\partial p^2} & \frac{\partial^2 F}{\partial p \partial s} & \frac{\partial^2 F}{\partial p \partial X} \\ \frac{\partial^2 F}{\partial s \partial p} & \frac{\partial^2 F}{\partial s^2} & \frac{\partial^2 F}{\partial s \partial X} \\ \frac{\partial^2 F}{\partial X \partial p} & \frac{\partial^2 F}{\partial X \partial s} & \frac{\partial^2 F}{\partial X^2} \end{pmatrix}.$$

3. ФАЗОВЫЕ ДИАГРАММЫ

Фазовые диаграммы рассматриваемой смеси определяются решениями системы уравнений (16), (17) с учетом положительной определенности соответствующей матрицы вторых производных функции (14) по переменным X_1 , X_2 , p , s .

Для моделирования системы “V-образный ЖК + гибкий полимер” мы вначале выберем следующий набор внешних параметров $N_A = 4$, $N_B = 10$, $T_{IN} = 60$ °C, $A_\chi = -0.34$ и $B_\chi = 225$. Фазовые диаграммы для системы симметричный ($\phi = 1/2$) “V-образный ЖК + гибкий полимер” с указанными параметрами для различных значений внешнего угла α между сегментами представлены на рис. 2.

Для молекул стержнеобразной архитектуры ($\alpha = 0$) фазовая диаграмма, представленная на рис. 2а, содержит области устойчивости изотроп-

ной фазы нематической фазы N_U^+ и двухфазного состояния $I + N$. При увеличении угла α до $\alpha = 0.524$ рад (рис. 2б) происходит понижение температуры перехода из изотропного в нематическое состояние и появляется область устойчивости двух сосуществующих изотропных фаз: $I_1 + I_2$, а области, занятые состояниями N_U^+ и $I + N$, уменьшаются. При дальнейшем росте угла α до $\alpha = 0.61$ рад (рис. 2в) увеличивается область устойчивости двухфазного ($I_1 + I_2$)-состояния, в то время как области устойчивости состояния N_U^+ и $I + N$ продолжают уменьшаться. При достижении значения $\alpha = 0.7$ рад (рис. 2г) наблюдается значительный рост области двухфазного ($I_1 + I_2$)-состояния. Приведенные выше фазовые диаграммы (рис. 2) содержат области устойчивости каламитной нематической фазы (обозначенной символом N). Согласно фазовой диаграмме расплава V-образных молекул, приведенной в работе [32], в интервале углов $\alpha = 0.23 \dots 1.91$ рад имеется область устойчивости дискотической нематической фазы N_U^- . На рис. 3а приведена фазовая диаграмма для смеси полимера с симметричными V-образными молекулами при $\alpha = 1.32$ рад. Нематическая фаза в этом случае является дискотической, о чем свидетельствует поведение собственных значений тензора (2), показанное на рис. 3б.

Фазовые диаграммы, отвечающие увеличению длины N_B полимера или увеличению длины N_A жидкого кристалла при сохранении прочих внешних параметров неизменными, показывают, что значение критической температуры возрас-

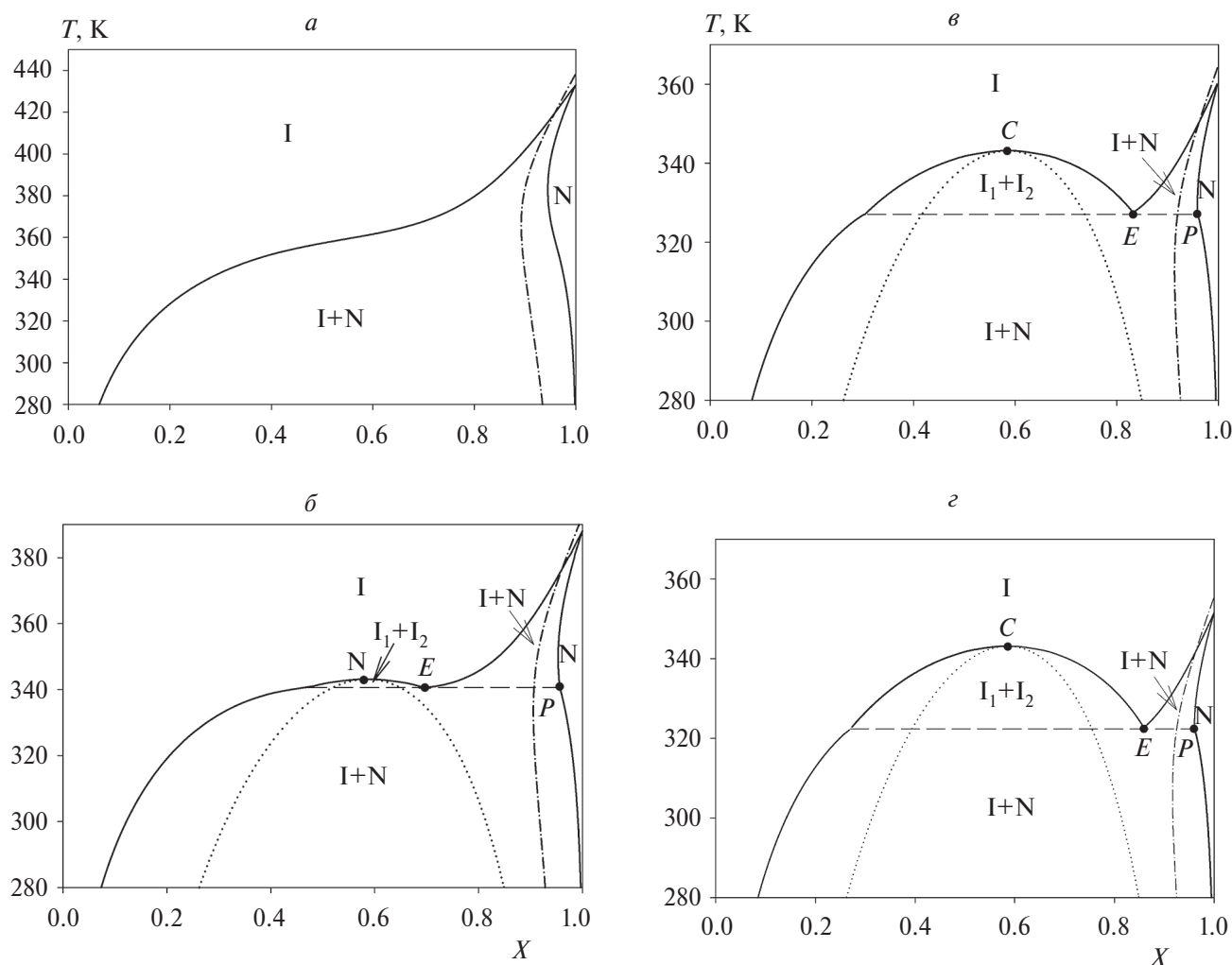


Рис. 4. Фазовые диаграммы смеси полимер/V-образный ЖК при фиксированном значении угла между сегментами ($\alpha = \pi/6$) для различных степеней асимметрии ϕ жидкого кристалла: (а) $\phi = 0$, (б) $\phi = 1/6$, (в) $\phi = 1/3$ и (г) $\phi = 1/2$. Обозначения те же, что и на рис. 2.

тает, область устойчивости двухфазных состояний увеличивается. Область однофазного нематического состояния уменьшается при росте длины полимера N_B и увеличивается при росте длины N_A жидкого кристалла.

Рассмотрим теперь, как асимметрия V-образных молекул (т.е. изменение доли ϕ мономерных звеньев одного из сегментов V-образной молекулы) влияет на фазовую диаграмму. Для этого мы рассмотрим модельную смесь полимер/V-образный ЖК, характеризуемую следующими внешними параметрами $N_A = 6$, $N_B = 12$, $T_A = 433$ К, $A_\chi = -0.34$, $B_\chi = 200$ и фиксированным внешним углом $\alpha = \pi/6$ между жесткими сегментами.

Фазовые диаграммы для смесей с указанными параметрами при различных значениях параметра ϕ представлены на рис. 4. Фазовая диаграмма на

рис. 4а отвечает стержнеобразному ($\phi = 0$) ЖК и содержит области устойчивости изотропного, однофазного нематического и двухфазного (I + N)-состояний. Для сильно асимметричной ($\phi = 1/6$) V-образной молекулы на фазовой диаграмме дополнительно появляется небольшая область устойчивости двухфазного ($I_1 + I_2$)-состояния, увеличивается область устойчивости двухфазного (I + N)-состояния, понижается температура перехода в однофазное нематическое состояние (рис. 4б). Уменьшение асимметрии молекул ЖК до $\phi = 1/3$ приводит к дальнейшему понижению температуры перехода в однородное нематическое состояние и увеличению области устойчивости двухфазного ($I_1 + I_2$)-состояния, в то время как область устойчивости нематической фазы уменьшается (рис. 4в). В симметричном случае ($\phi = 1/2$), представленном на рис. 4г, область устойчивости

двухфазного состояния $I_1 + I_2$ продолжает расти, а область устойчивости нематической фазы — уменьшаться.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе исследовано фазовое поведение смеси V-образного жидкого кристалла и гибкого полимера в зависимости от архитектуры молекул ЖК, которая, в рамках данной модели, определяется внешним углом α между жесткими сегментами V-образной молекулы и долей мономерных звеньев ϕ в одном из сегментов. В исследовании использовалась комбинация теории полимерных растворов Флори—Хаггинса и теории ориентационного упорядочения Ландау — де Жена. Коэффициенты разложения свободной энергии Ландау — де Жена расплава V-образных молекул были ранее найдены из микроскопической модели V-образной частицы. Настоящий подход упрощает расчеты фазовых диаграмм по сравнению с традиционно используемым сочетанием теорий Флори—Хаггинса и теории нематического упорядочения Майера—Заупе. Полученные фазовые диаграммы свидетельствуют, что как при увеличении внешнего угла между сегментами в симметричной ($\phi = 1/2$) V-образной молекуле, так и при уменьшении асимметрии молекул при фиксированном значении α область устойчивости двухфазного ($I_1 + I_2$)-состояния растет, в то время как области устойчивости однофазного нематического состояния N_U^+ и двухфазного состояния $I + N$ уменьшаются. Эти изменения в архитектуре молекул ЖК также приводят к снижению температуры перехода из изотропного в однофазное нематическое состояние.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках госзадания (тема №122041400110-4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mucha M. // Prog. Polym. Sci. 2003. V. 28. №10. P.837. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(02\)00117-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(02)00117-X)
2. Чалых А.Е., Жаворонок Е.С., Кочнова З.А., Киселев М.Р. // Хим. физика. 2009. Т. 28. № 6. С.91.
3. Карпова С.Г., Милушкина Э.Г., Люсова Л.Р., Наумова Ю.А., Попов А.А. // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 3. С. 40.
4. Карпова С.Г., Наумова Ю.А., Луканина Ю.К. и др. // Хим. физика. 2014. Т. 33. № 5. С. 89.
5. Воротников А.П. // Хим. физика. 2015. Т. 34. № 11. С. 16.
6. Подзорова М.В., Тертышная Ю.В., Храмова А.В. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 35.
7. Колыванова М.А., Климович М.А., Дементьева О.В. и др. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 64.
8. Тертышная Ю.В., Кривандин А.В., Шаталова О.В. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 43.
9. Ливанова Н.М., Правада Е.С., Ковалева Л.А., Попов А.А. // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 5. С. 43.
10. Мединцева Т.И., Сергеев А.И., Шилкина Н.Г., Прут Э.В. // Хим. физика. 2023. Т. 42, № 5. С. 61.
11. Тертышная Ю.В., Хватов А.В., Попов А.А. // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 86.
12. Brochard F., Jouffroy J., Vinson P. // J. Phys. France. 1984. V. 45. № 7. P. 1125; <https://doi.org/10.1051/jphys:019840045070112500>
13. Hardouin F., Sigaud G., Achard M. // Liquid Crystalline and Mesomorphic Polymers. Eds. Shibaev V.P., Lam L., Springer-Verlag, 1993. P. 121.
14. Kronberg B., Patterson D. // J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2. 1976. V. 72. P. 1686; <http://dx.doi.org/10.1039/F29767201686>
15. Kelkar V.K., Manohar C. // Mol. Cryst. Liq. Cryst. 1986. V. 133. № 3—4. P. 267; <https://doi.org/10.1080/00268948608080818>
16. Ballauff M. // Ibid. 1986. V. 136. № 2—4. P. 175; <https://doi.org/10.1080/00268948608074726>
17. Shen C., Kyu T. // J. Chem. Phys. 1995. V. 102. № 1. P. 556; <https://doi.org/10.1063/1.469435>
18. Benmouna F., Bedjaoui L., Maschke U., Coqueret X., Benmouna M. // Macromol. Theory Simul. 1998. V. 7. № 6. P. 599; [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3919\(19981101\)7:6<599::AID-MATS599>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3919(19981101)7:6<599::AID-MATS599>3.0.CO;2-3)
19. Amoskov V., Birshtein T. // Polym. Sci. Ser. C. 2010. V. 52. № 1. P. 44.
20. Matsuyama A., Kato T. // J. Chem. Phys. 1996. V. 105. № 4. P. 1654; <https://doi.org/10.1063/1.472024>
21. Matsuyama A., Kato T. // Phys. Rev. E. 1999. V. 59. P. 763; <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.59.763>
22. Flory P.J. Principles of polymer chemistry. N. Y.: Cornell University Press, 1953.
23. Maier W., Saupe A. // Zeitschrift Naturforschung. A. 1959. V. 14. № 10. P. 882.
24. Soule E.R., Rey A.D. // Liq. Cryst. 2011. V. 38. № 2. P. 201; <https://doi.org/10.1080/02678292.2010.539303>
25. Katriel J., Kvetsel G.F., Luckhurst G.R., Sluckin T.J. // Ibid. 1986. V. 1. № 4. P. 337; <https://doi.org/10.1080/02678298608086667>
26. Matsuyama A., Evans R.M.L., Cates M.E. // Phys. Rev. E. 2000. V. 61. P. 2977; <https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.61.2977>

27. *Das S.K., Rey A.D.* // Computational Materials Science. 2004. V. 29. № 2. P. 152;
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927025603001824>
28. *Rey A.D.* // Soft Matter. 2010. V. 6 P. 3402;
<http://dx.doi.org/10.1039/B921576J>
29. *de Gennes P., Prost J.* The Physics of Liquid Crystals. Oxford: Clarendon Press, 1993.
30. *Jakli A.* // Liq. Cryst. Rev. 2013. V. 1. №. 1. P. 65;
<https://doi.org/10.1080/21680396.2013.803701>
31. Biaxial Nematic Liquid Crystals Theory, Simulation, and Experiment. Eds. Luckhurst G.R., Sluckin T.J. Chichester, UK: Wiley, 2015.
32. *Aliev M.A., Ugolkova E.A., Kuzminyh N.Y.* // J. Chem. Phys. 2016. V. 145. № 8. P. 084908;
<https://doi.org/10.1063/1.4961662>
33. *Edwards S.F.* // Proc. Phys. Soc. 1966. V. 88. № 2. P. 265;
<https://dx.doi.org/10.1088/0370-1328/88/2/301>
34. *Gramsbergen E.F., Longa L., de Jeu W.H.* // Phys. Rep. 1986. V. 135. № 4. P. 195;
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0370157386900074>
35. *Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М.* Статистическая физика. Ч. 1. 5-е изд. М.: Физматлит, 2005. ISBN 5-9221-0054-8
36. *Dorgan J.R.* // Liq. Cryst. 1991. V. 10. № 3. P. 347;
<https://doi.org/10.1080/02678299108026281>
37. *Riccardi C.C., Borrajo J., Williams R.J.J.* // J. Chem. Phys. 1998. V. 108. № 6. P. 2571;
<https://doi.org/10.1063/1.475641>

PHASE BEHAVIOUR OF V-SHAPED LIQUID CRYSTAL/POLYMER MIXTURE

M. A. Aliev*, S. B. Bibikov

Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

**E-mail: maasept@yandex.ru*

The phase behavior of mixtures of linear flexible polymers and V-shaped liquid crystals is inspected using a combination of Flory – Huggins theory of polymer solutions and Landau – de Gennes theory of nematic ordering. The influence of the architecture of V-shaped molecules on the system's phase diagrams is examined.

Keywords: V-shaped liquid crystals, linear polymers, liquid crystal/polymer mixtures, nematic phase, phase diagrams.

REFERENCES

1. M. Mucha, Prog. in Polymer Science **28**, 837 (2003).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007967000200117X>
2. A.E. Chalykh, E.S. Zhavoronok, Z. A. Kochnova, et al., Russian Journal of Physical Chemistry B, **3**, 507 (2009).
<https://doi.org/10.1134/S1990793109030269>
3. S.G. Karpova, E.G. Milyushkina, L.R. Lusova, et al., Russ. J. of Phys. Chem. B, **12**, 285–292 (2018).
<https://doi.org/10.1134/S1990793118020070>
4. S.G. Karpova, Yu.A. Naumova, Yu.K. Lukanina, et al., Russ. J. of Phys. Chem. B **8**, 403 (2014)
<https://doi.org/10.1134/S1990793114030063>
5. A.P. Vorotnikov, Russ. J. of Phys. Chem. B **9**, 866 (2015)
<https://doi.org/10.1134/S1990793115050139>
6. M.V. Podzorova, Yu. V. Tertyshnaya and A.V. Khramkova, Russ. J. of Phys. Chem. B, **17**, 163 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123010098>
7. M. A. Kolyvanova, M. A. Klimovich, O. V. Dement'eva, et al., Russian Journal of Physical Chemistry B **17**, 206 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123010062>
8. Y.V.Tertyshnaya, A. V. Krivandin and O. V. Shatalova, Russ. J. Phys. Chem. B **17**, 171–176 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123010128>
9. N.M. Livanova, E.S.Pravada, L.A. Kovaleva, et al., Russ. J. Phys. Chem. B **17**, 738–744 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123030077>
10. T.I. Medintseva, A.I.Sergeev, N.G. Shilkina et al., Russ. J. Phys. Chem. B **17**, 755–763 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123030090>
11. Y.V.Tertyshnaya, A.V. Khvatov and A.A. Popov, Russ. J. Phys. Chem. B **16**, 162–166 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122010304>
12. F. Brochard, J. Jouffroy and P. Levinson, J. Phys. France **45**, 1125 (1984).
<https://doi.org/10.1051/jphys:019840045070112500>
13. F. Hardouin, G. Sigaud, M. Achard. In: Shibaev, V.P., Lam, L., eds. Liquid Crystalline and Mesomorphic Polymers. Springer-Verlag, 121–148 (1993).
14. B. Kronberg and D. Patterson, J. Chem. Soc., Faraday Trans. **72**, 1686 (1976).
<http://dx.doi.org/10.1039/F29767201686>
15. V. K. Kelkar and C. Manohar, Molecular Crystals and Liquid Crystals **133**, 267 (1986).
<https://doi.org/10.1080/00268948608080818>
16. M. Ballauff, Molecular Crystals and Liquid Crystals **136**, 175 (1986).
<https://doi.org/10.1080/00268948608074726>
17. C. Shen, T.Kyu. The Journal of Chemical Physics **102**, 556 (1995).
<https://doi.org/10.1063/1.469435>
18. F. Benmouna, L. Bedjaoui, U. Maschke, et al., Macromolecular Theory and Simulations **7**, 599 (1998).
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3919\(19981101\)7:6<599::AID-MAT5599>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3919(19981101)7:6<599::AID-MAT5599>3.0.CO;2-3)
19. V. Amoskov and T. Birshtein, Polymer Science Series C; **52**, 44 (2010).
20. A. Matsuyama and T. Kato, The Journal of Chemical Physics **105**, 1654 (1996).
<https://doi.org/10.1063/1.472024>
21. A. Matsuyama and T. Kato, Phys Rev E **59**, 763 (1999).
<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.59.763>
22. P.J. Flory. *Principles of polymer chemistry*. New York: Cornell University Press; 1953.
23. W. Maier and A. Saupe, Zeitschrift fur Naturforschung A, **14**, 882 (1959).
24. E.R. Soule and A.D. Rey, Liquid Crystals, **38**, 201 (2011).
<https://doi.org/10.1080/02678292.2010.539303>
25. J. Katriel, G.F. Kvetsel, G.R. Luckhurst. and T.J. Sluckin. Liquid Crystals **1**, 337 (1986).
<https://doi.org/10.1080/02678298608086667>
26. A. Matsuyama, R. M. L. Evans and M. E. Cates, Phys. Rev. E **61**, 2977 (2000).
<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.61.2977>
27. S.K. Das and A.D. Rey, Computational Materials Science, **29**, 152 (2004).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927025603001824>
28. A.D. Rey. Soft Matter, **6**, 3402 (2010).
<http://dx.doi.org/10.1039/B921576J>

29. P.G. de Gennes, J. Prost, *The Physics of Liquid Crystals*. Oxford: Clarendon Press; 1993.
30. A. Jakli. *Liquid Crystals Reviews*, **1**, 65 (2013).
<https://doi.org/10.1080/21680396.2013.803701>
31. G.R. Luckhurst, T.J. Sluckin, eds. *Biaxial Nematic Liquid Crystals Theory, Simulation, and Experiment*. Chichester, UK: Wiley; (2015).
32. M.A. Aliev, E.A. Ugolkova and N.Y. Kuzminyh, *The Journal of Chemical Physics* **145**, 084908 (2016).
<https://doi.org/10.1063/1.4961662>
33. S.F. Edwards. *Proceedings of the Physical Society* **88**, 265 (1966).
<https://dx.doi.org/10.1088/0370-1328/88/2/301>
34. E.F. Gramsbergen, L. Longa and W.H. de Jeu, *Physics Reports* **135**, 195 (1986).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0370157386900074>
35. L.D. Landau, E.M. Lifshitz. *Statistical Physics: 2nd ed.* Pergamon, Oxford. 1969.
36. J.R. Dorgan. *Liquid Crystals* **10**, 347 (1991).
<https://doi.org/10.1080/02678299108026281>
37. C.C. Riccardi, J. Borrajo and R.J.J. Williams, *The Journal of Chemical Physics* **108**, 2571 (1998).
<https://doi.org/10.1063/1.475641>

УДК 577 : 541.124 : 544.77 : 544.723.2

НАНОРАЗМЕРНАЯ ПЛАТФОРМА НА ОСНОВЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ В ОНКОЛОГИИ

© 2024 г. А. В. Бычкова^{1*}, А. А. Маркова¹, М. Т. Нгуен¹,
М. А. Градова², М. Г. Горобец¹, М. В. Мотякин¹,
М. И. Абдуллина¹, А. В. Торопцева¹, В. А. Кузьмин¹

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

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

*E-mail: anna.v.bychkova@gmail.com

Поступила в редакцию 26.03.2024;
после доработки 24.04.2024;
принята в печать 20.05.2024

Синтезированы гибридные наносистемы на основе магнитных наночастиц оксидов железа (НЧОЖ) и человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Полученные наносистемы ЧСА@НЧОЖ были охарактеризованы по размеру и составу с помощью спектрофотометрии УФ-видимой области (в частности, с использованием метода Брэдфорда), динамического светорассеяния и электронного магнитного резонанса. Выполнено исследование темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности данных систем с использованием метиленового синего как модельного фотосенсибилизатора. Проведенный анализ выживаемости культивируемых опухолевых клеток линии MCF-7 аденокарциномы молочной железы человека показал увеличение фотоиндуцированной цитотоксичности при возбуждении фотосенсибилизатора, накопленного клетками при доставке наносистемами, по сравнению со свободным фотосенсибилизатором в эквивалентных концентрациях. Обсуждается применение наносистем ЧСА@НЧОЖ в качестве перспективной платформы для направленной доставки фотосенсибилизатора в опухолевые клетки.

Ключевые слова: человеческий сывороточный альбумин, наночастицы оксидов железа, магнитные наночастицы, фотодинамическая терапия, гибридные наносистемы, метиленовый синий, клеточная линия MCF-7.

DOI: 10.31857/S0207401X24110134

1. ВВЕДЕНИЕ

Гибридные наносистемы на основе магнитных наночастиц (МНЧ), в том числе наночастиц оксидов железа и/или сывороточного альбумина, активно исследуются для целей современной терапии. Наночастицы с биосовместимыми функциональными покрытиями, в частности из сывороточного альбумина, синтезируются и исследуются для диагностики различных заболеваний, в первую очередь онкологических, а также в качестве платформ для доставки терапевтических веществ в клетки-мишени [1–16]. Магнитные наночастицы в составе наносистем влияют на контрастность при визуализации опухолей, могут аккумулироваться (в том числе за счет своих магнитных свойств) в целевой области и обеспечивают локальный нагрев под действием СВЧ, а

сывороточный альбумин способствует повышению биосовместимости и увеличению длительности нахождения нагруженных препаратом наносистем в организме для достижения достаточной дозы препарата в биологической мишени.

На рис. 1 представлено изменение числа публикаций по годам в базе PubMed с 1996 года по наночастицам оксидов железа, являющихся объектом нашего интереса, и/или сывороточному альбумину. Как видно из этого рисунка, несмотря на значительное количество исследований в области интересующих нас наночастиц (рис. 1, заштрихованные столбцы) и исследований, посвященных одновременно наночастицам и сывороточному альбумину (рис. 1, белые столбцы), количество работ, посвященных одновременно использованию наночастиц оксидов железа и

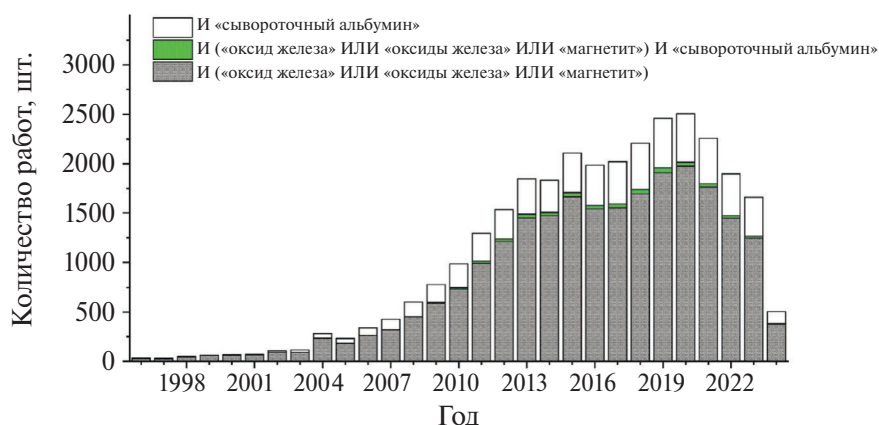


Рис. 1. Количество публикаций в базе данных PubMed по годам, по ключевому слову “наночастицы” (“nanoparticles”) и дополнительным ключевым словам, указанным на рисунке: “сывороточный альбумин” (“serum albumin”), “оксид железа” (“iron oxide”), “оксиды железа” (“iron oxides”), “магнетит” (“magnetite”).

сывороточного альбумина, относительно невелико. Стоит отметить, что такие исследования могут быть посвящены не только синтезу гибридных наносистем на основе МНЧ и альбумина, но и исследованию формирования белковой короны на наноразмерных материалах, в состав которой входит сывороточный альбумин как наиболее представленный белок плазмы крови [17–19].

В настоящее время интенсивно проводятся исследования, направленные на использование магнитных наночастиц в качестве средств доставки фотосенсибилизаторов (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ) [13, 20–23]. В большинстве случаев ФС ковалентно связывают с поверхностью доставляющих его наночастиц [24–27], тем самым обеспечивая высокую стабильность полученных гибридных наносистем. Однако в последнее время подходам к нековалентной функционализации МНЧ стали уделять большее внимание, поскольку нековалентное связывание позволяет гибко управлять процессом доставки фотосенсибилизатора к клеточным мишеням в соответствии с константами связывания с ними и с носителем, стабильностью наносистем при изменениях pH и температуры или других воздействиях окружающей среды. Используя специальные платформы доставки, можно доставить фотосенсибилизатор в большее количество клеточных компартментов, обеспечив более масштабные повреждения опухолевой клетки при ФДТ [28–33]. Так, некоторые гидрофобные и заряженные ФС эффективно связываются с альбумином [34–38], что позволяет использовать покрытые альбу-

мином МНЧ для иммобилизации ФС на их поверхности. В литературе описано увеличение эффективности доставки фотоактивной молекулы для тераностики в опухолевые клетки и ткани с помощью магнитных наночастиц и сывороточного альбумина за счет принципа направленной доставки красителей в клетку на примере как коммерчески доступного цианинового красителя IR-780 для фотовизуализации опухолевых клеток [39], так и новых синтезированных бактериохлоринов и фталоцианинов с последующей ФДТ [28, 40, 41]. Повышение эффективности доставки красителя с помощью таких систем по сравнению с его свободной формой зависит от выбора конкретного состава и технологии получения наноразмерной композиции. В настоящей работе в качестве модельной системы впервые описано применение для ФДТ *in vitro* иммобилизации известного катионного фотосенсибилизатора метиленового синего (МС) на поверхность покрытых альбумином магнитных наночастиц оксидов железа с отрицательным поверхностным зарядом.

Метиленовый синий является широко изученным и коммерчески доступным ФС с отличными фотохимическими и фотофизическими свойствами для фотодинамической терапии опухолевых клеток за счет высокой квантовой эффективности выхода синглетного кислорода и интенсивного поглощения света в красной области спектра, соответствующей наибольшей проницаемости биологических тканей [42]. В исследованиях *in vitro*, *in vivo* и в клинической практике МС проявлял себя как эффективный и безопасный ФС для ФДТ, вызывая селективную гибель опухоле-

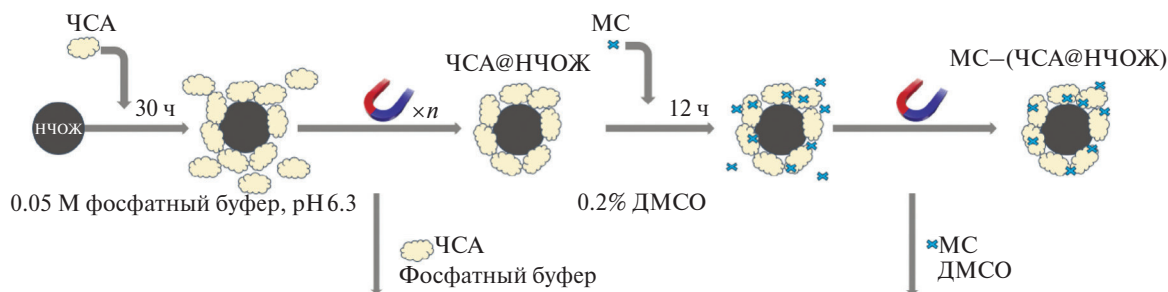


Рис. 2. Схематическое отображение стадий подготовки образцов гибридных наносистем MC-(ЧСА@НЧОЖ): получение наночастиц в альбуминовом покрытии и нековалентное связывание наночастиц с метиленовым синим.

вых, но не здоровых клеток [42, 43]. Метиленовый синий вводили в составе различных наносистем, включая частицы мезопористого диоксида кремния, покрытые бычьим сывороточным альбумином (БСА) [44], и наночастицы оксидов железа (НЧОЖ), покрытые оболочкой из диоксида кремния [45–47]. В зависимости от структуры и компонентов наносистем на основе НЧОЖ фотохимические свойства МС могут изменяться, приводя к усилению [47], ослаблению [45] или аналогичной способности к генерации синглетного кислорода [46]. Цели настоящей работы – синтез и определение свойств гибридной наносистемы на основе НЧОЖ, покрытых человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) и функционализированных МС. На наш взгляд, отрицательный заряд молекул ЧСА и поверхности НЧОЖ должен способствовать нековалентному связыванию положительно заряженной молекулы МС с формированием фотоактивной гибридной наносистемы MC-(ЧСА@НЧОЖ), и такой подход может быть перспективен при разработке фотоактивных гибридных наноразмерных носителей в ФДТ.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение наносистемы ЧСА@НЧОЖ

Магнитные НЧОЖ были синтезированы методом соосаждения и электростатически стабилизированы 0.1 М фосфатно-цитратным буфером (0.05 М NaCl) с pH 4.3, как описано в предыдущих исследованиях [12,43]. Гидрозо́ль НЧОЖ хранили в герметично закрытой посуде. Для приготовления образцов гидрозо́ль НЧОЖ разбавляли в 20 раз в 0.05 М фосфатном буфере с pH 6.3 и инкубировали на магнитах Nd–Fe–B для удаления наиболее крупных частиц, после чего к НЧОЖ с концентрацией 0.4 мг/мл в буфере при перемешивании на приборе Vortex V-1 plus производства

компании Biosan (Latvia) добавляли водный раствор ЧСА (каталожный номер A1653, Sigma-Aldrich(USA)) в количестве 10 об.% до конечной концентрации 3 мг/мл и инкубировали смесь в течение 30 ч при температуре 25 °C на ротаторе Multi Bio RS-24 (Biosan, Latvia). После инкубации для отделения буфера и несвязавшегося с НЧОЖ белка использовали процедуру магнитной сепарации. Вода для инъекций с 5 мМ NaCl была использована в качестве дисперсионной среды для наночастиц ЧСА@НЧОЖ (рис. 2). Удаление избытка белка подтверждали и количество белка на поверхности НЧОЖ оценивали с применением метода Бредфорда, как было описано ранее [6]. Спектры в УФ- и видимой области регистрировали на планшетном спектрофотометре SPECTROstar Nano производства компании BMG (Germany) в 96-луночном планшете фирмы Greiner. Устойчивость покрытия из ЧСА на НЧОЖ подтверждали в соответствии с методикой, описанной ранее [6, 48, 49], с применением раствора иммуноглобулина G производства НПО “Микроген” (Россия). Данные о размере частиц в образцах на различных стадиях приготовления определяли с использованием динамического светорассеяния на оборудовании Zetasizer Nano-ZS производства компании Malvern (Great Britain) при температуре 25 °C. Метод электронного магнитного резонанса (ЭМР) был использован для оценки концентрации НЧОЖ в различных образцах в сравнении с эталоном с известной концентрацией МНЧ. Сигналы ЭМР образцов регистрировали на спектрометре EMX-8/2.7 X-диапазона производства компании Bruker (Germany). Математическую обработку спектров ЭМР проводили с применением программного обеспечения WINEPR и SimFonia фирмы Bruker (Germany).

Приготовление наносистемы МС–(ЧСА@НЧОЖ)

Метиленовый синий растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) для приготовления раствора с концентрацией $5 \cdot 10^{-3}$ М. Затем 1 мкл этого раствора добавляли к 500 мкл коллоидного раствора ЧСА@НЧОЖ и смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 12 ч. После этого дисперсии МС–(ЧСА@НЧОЖ) и контрольного образца (т.е. образца без МС) были получены методом магнитной сепарации частиц для удаления несвязанного МС и редиспергированием выделенных частиц в воде для инъекций (рис. 2).

Эффективность инкапсуляции (ЕЕ, %) и загрузочная способность (LC, %) полученных наночастиц рассчитывались по следующим формулам:

$$ЕЕ = [(A_{input} - A_{supernatant}) \div A_{input}] \cdot 100\%,$$

$$LC = ЕЕ \times (m_{input} \div m_{IONPs}),$$

где A_{input} — оптическая плотность МС во введенной концентрации, $A_{supernatant}$ — оптическая плотность МС в надосадочном растворе после магнитной сепарации (рис. 3), m_{input} — масса добавленного к наночастицам МС, m_{IONPs} — масса наночастиц оксидов железа. Оптическая плотность растворов МС была измерена при длине волны $\lambda = 660$ нм на спектрофотометре UV3101RS производства компании Shimadzu (Japan).

Культивируемые клеточные линии

Для экспериментов использована клеточная линия человека MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), протестированная в American Type Culture Collection (USA). Клетки MCF-7 культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). В культуральную среду добавляли следующие компоненты до конечных концентраций: 5%-ной эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (среды и добавки производства компании ПанЭко, Россия). Инкубацию проводили при 37 °С 5%-ной CO₂ в увлажненной атмосфере. В экспериментах использована культура в логарифмической фазе роста. Для профилактики микоплазменного заражения использовался препарат Мусокилл (GE, USA). Перед началом экспериментов проводили не менее трех пассажей на свободной от антимикоплазменного препарата среде.

Оптическая плотность

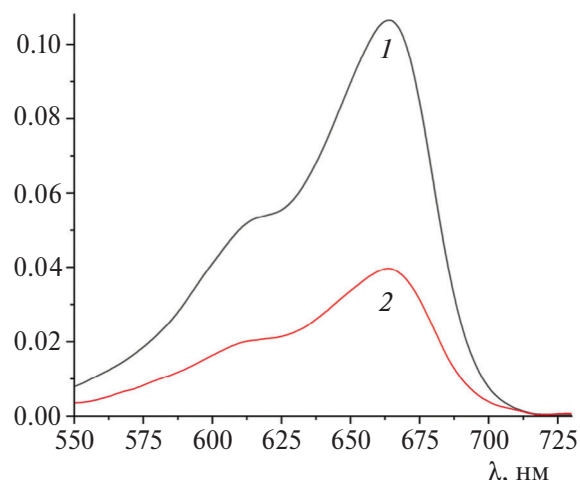


Рис. 3. Спектры поглощения метиленового синего в воде (1) и в надосадочном растворе после магнитной сепарации МС–(ЧСА@НЧОЖ) (2).

Исследование цитотоксичности синтезированных НЧОЖ

Клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 в 96-луночных планшетах марки Nunc (Denmark) в количестве 5000 клеток в 190 мкл клеточной среды были обработаны 20 мкл ЧСА@НЧОЖ и МС–(ЧСА@НЧОЖ) с конечной концентрацией МС $6 \cdot 10^{-7}$ М в течение 3 ч при 37 °С. В качестве контрольного раствора фотосенсибилизатора был использован водный раствор МС, добавленный в клеточную среду в эквивалентной концентрации. В конце инкубации клеточную среду убирали и заменяли на 200 мкл новой порции культуральной среды. Для исследования фотоиндуцированной цитотоксичности клетки были облучены лазером с $\lambda = 660$ нм (АФС Полироник, Москва, Россия) с плотностью мощности облучения 21 мВт/см² до конечной дозы облучения в 120 Дж/см² и инкубированы дополнительно в течение 24 ч при 37 °С.

Затем 20 мкл раствора МТТ с концентрацией 5 мг/мл, ПанЭко, Россия вносили в каждую лунку и инкубировали 1 ч при 37 °С. По окончании инкубации культуральную среду отбирали и добавляли 100 мкл ДМСО для солюбилизации формазана. Оптическую плотность растворов формазана измеряли при длине волны $\lambda = 540$ нм на микропланшетном спектрофотометре MultiscanFC (ThermoScientific, USA). Выживаемость клеток A рассчитывали как $A_{expt}/A_{control} \cdot 100\%$. Результаты приведены как среднеарифметическое значение

$\pm$ стандартное отклонение по трем независимым экспериментам.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика полученных гибридных наночастиц

Средние гидродинамические диаметры частиц, вносящих максимальный вклад в численные распределения частиц по размеру составляют $\sim (33 \pm 2)$ нм для НЧОЖ без покрытия и $\sim (52 \pm 5)$ нм для ЧСА@НЧОЖ. Толщина белкового покрытия на НЧОЖ, рассчитанная по средним гидродинамическим диаметрам частиц (при условии, что покрытие формируется на НЧОЖ, не вызывая их дополнительной агрегации), составляет ~ 10 нм (рис. 4).

Согласно оценке методами Бредфорда и ЭМР, в результате 30-часовой инкубации с поверхностью 1 мг НЧОЖ исходно связывается ~ 530 мкг ЧСА. Затем, в результате смены дисперсионной среды при неоднократном редиспергировании, происходит снижение детектируемого количества ЧСА до ~ 110 мкг на 1 мг НЧОЖ, что может объясняться частичной десорбцией ЧСА с поверхности НЧОЖ в процессе приготовления гибридных наносистем. Концентрация НЧОЖ в образце ЧСА@НЧОЖ составляла около 340 мкг/мл.

Исследование темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности гибридных наносистем

Для исследования возможности гибридных наносистем доставлять ФС в клетки *in vitro* мы выбрали известный фотосенсибилизатор — метиленовый синий с высоким квантовым выходом синглетного кислорода ($\Phi_{\Delta} = 0.50$ в воде [50]). Катионная природа МС позволяет ввести его в покрытые альбумином наночастицы, обладающие отрицательным зарядом [51], поскольку большую роль в связывании (в частности, в случае МС и ЧСА) играют электростатические взаимодействия [52, 53]. Возможность введения метиленового синего в качестве модельного ФС также обусловлена его способностью связываться с ЧСА в сайтах I (субдомен IIA) и II (субдомен IIIA) [54, 55] с константой связывания $(4 \div 5) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ [52, 54, 55], что сопоставимо с константами связывания для перспективных классов гидрофобных ФС — бискарбоцианинов, BODIPY, фталоцианинов [34–36]. Реакцию связывания МС с гибридными

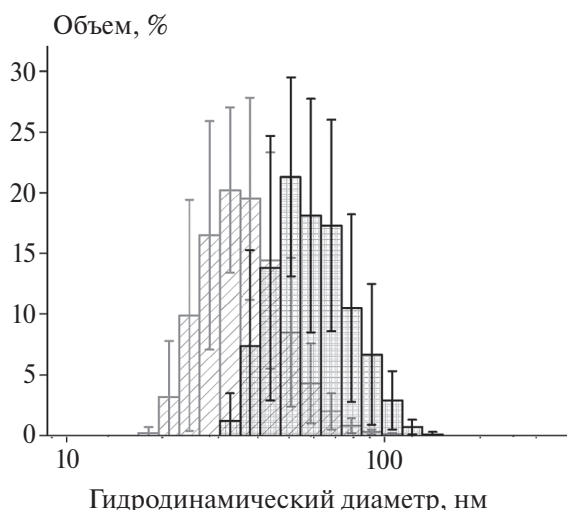


Рис. 4. Объемные распределения частиц по размеру, полученные методом динамического светорассеяния в контрольном образце НЧОЖ (слева) и опытном образце ЧСА@НЧОЖ (справа).

наночастицами ЧСА@НЧОЖ мы проводили по модифицированной методике [56] с использованием магнитной сепарации. Согласно расчетам синтезированные частицы содержали (5.8 ± 0.6) мкг МС на 1 мг НЧОЖ (ЕЕ составляет $(61.5 \pm 1.5)\%$, LC — $(0.58 \pm 0.06)\%$) или около 11 молекул МС на 1 молекулу ЧСА гибридной системы, что в 10 раз превышает известные из литературы данные по количеству сайтов связывания МС с ЧСА при комнатной температуре [52, 55]. Это может свидетельствовать о значительном вкладе электростатического взаимодействия в связывание МС с белковой оболочкой МНЧ.

Мы анализировали темновую и фотоиндуцированную цитотоксичность гибридных наночастиц с нековалентно связанным метиленовым синим после их накопления клетками линии MCF-7 в течение 3 ч с дальнейшей заменой клеточной среды и последующим фотовозбуждением остаточного внутриклеточного фотосенсибилизатора. По результатам МТТ-теста выявлено, что синтезированные наносистемы не обладают темновой цитотоксичностью на клетках MCF-7 (рис. 5). Наносистема МС–(ЧСА@НЧОЖ) и МС в равной степени повреждали клетки MCF-7, тем самым подтверждая возможность введения фотосенсибилизатора в гибридную наносистему для ФДТ. Было обнаружено увеличение фотоиндуцированной цитотоксичности при возбуждении фотосенсибилизатора, связанного с наносистемами, по сравнению со свободным фотосенсибилизатором.

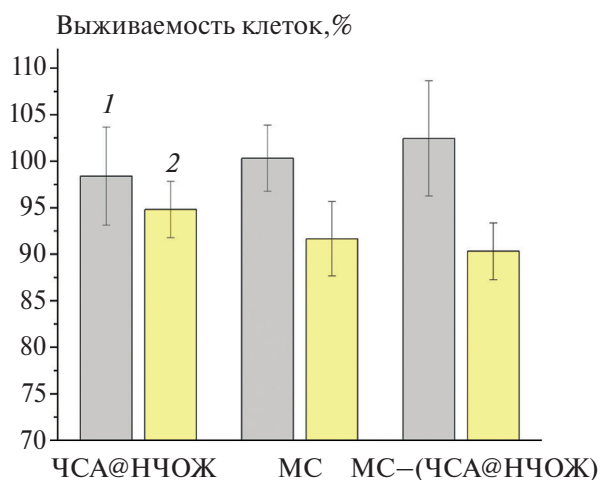


Рис. 5. Темновая (1) и фотоиндуцированная цитотоксичность (2) ЧСА@НЧОЖ, МС-(ЧСА@НЧОЖ) и МС на клетках MCF-7.

тором в эквивалентных концентрациях (см. рис. 5).

В клеточных экспериментах наносистема МС-(ЧСА@НЧОЖ) вызывала аналогичную свободному МС гибель опухолевых клеток при облучении лазером с $\lambda = 660$ нм. Последнее говорит о том, что фотосенсибилизатор эффективно поглощал свет при данной длине волны, так как связался с белковым покрытием и не находился в агрегированных формах, которые наблюдались при синтезе МНЧ без белкового покрытия [45, 46] и на спектре поглощения которых наблюдается существенный гипсохромный сдвиг. Таким образом, полученные результаты подтверждают возможность введения фотосенсибилизатора в гибридную наносистему ЧСА@НЧОЖ и использования ее в ФДТ.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена технология синтеза гибридных наносистем на основе магнитных наночастиц оксидов железа с альбуминовым покрытием для направленной доставки ФС к опухолевым клеткам. Состав гибридных наносистем был охарактеризован физико-химическими методами, такими как спектрофотометрия УФ-видимой области, динамическое светорассеяние, электронный магнитный резонанс. Показано, что использование белкового покрытия на магнитных наночастицах оксидов железа обеспечивает эффективное связывание молекул фотоактивного соединения с гибридными наночастицами. Пред-

ложенный подход прямого нековалентного связывания требует значительно меньше времени и реагентов по сравнению с ковалентной пришивкой флуорофоров на поверхность наночастиц, а мягкие условия реакции не позволяют молекулам ФС разрушаться под воздействием агрессивных реагентов. В эксперименте на опухолевых клетках линии MCF-7 показано, что за короткое время инкубации магнитные наночастицы способны доставить в клетки модельный фотосенсибилизатор, что ослабляет темновую цитотоксичность таких систем и дает возможность сохранить и несколько увеличить эффективность ФДТ по сравнению со свободным ФС. Полученные данные позволяют применить технологию нековалентного связывания подобных наносистем с другими фотосенсибилизаторами, обладающими сниженной биодоступностью, для более эффективной их доставки в клетки-мишени для реализации ФДТ и рассматривать синтезированные гибридные наносистемы в качестве перспективных наноразмерных платформ для фотодинамической терапии в онкологии.

Работа по синтезу гибридных наносистем и их физико-химическому анализу была проведена за счет гранта Российского Научного Фонда (РНФ) № 22-75-10150 (<https://rscf.ru/project/22-75-10150/>).

Определение размеров гибридных систем и регистрация спектров ЭМР, получение спектральных характеристик и анализ цитотоксичности *in vitro* были осуществлены с использованием оборудования ЦКП “Новые материалы и технологии” ИБХФ РАН (проекты №№ 122041400114-2, №122041300210-2, №122041300207-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aires A., Ocampo S.M., Cabrera D. et al. // J. Mater. Chem. B. 2015. V. 3. № 30. P. 6239.
2. Thao L.Q., Byeon H.J., Lee C. et al. // Pharm. Res. 2016. V. 33. № 3. P. 615.
3. Nosrati H., Salehiabar M., Manjili H.K. et al. // Intern. J. Biol. Macromol. 2018. V. 108. P. 909.
4. Chubarov A.S. // Magnetochemistry. 2022. V. 8. № 2. P. 13.
5. Israel L.L., Galstyan A., Holler E. et al. // J. Control. Release. 2020. V. 320. P. 45.
6. Bychkova A.V., Yakunina M.N., Lopukhova M.V. et al. // Pharmaceutics. 2022. V. 14. № 12. P. 2771.
7. Vismara E., Bongio C., Coletti A. et al. // Molecules. 2017. V. 22. № 7. P. 1030.

8. *Estelrich J., Busquets M.* // Ibid. 2018. V. 23. № 7. P. 1567.
9. *Pominova D.V., Romanishkin I.D., Plotnikova E.A. et al.* // Biomed. Photonics. 2021. V. 10. № 4. P. 44.
10. *Baki A., Remmo A., Löwa N. et al.* // Intern. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 12. P. 6235.
11. *Tao C., Zheng Q., An L. et al.* // Nanomaterials. 2019. Vol. 9. № 2. P. 170.
12. *Tzameret A., Ketter-Katz H., Edelshtain V. et al.* // J. Nanobiotechnol. 2019. V. 17. № 1. P. 3.
13. *Liang X., Chen M., Bhattarai P. et al.* // ACS Nano. 2021. V. 15. № 12. P. 20164.
14. *Sleep D.* // Expert Opin. Drug Deliv. 2015. V. 12. № 5. P. 793.
15. *Шуршина А.С., Галина А.Р., Кулиш Е.И.* // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 4. С. 63; doi: 10.31857/S0207401X22040082
16. *Колыванова М.А., Климович М.А., Дементьева О.В. и др.* // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 1. С. 64; doi: 10.31857/S0207401X23010065
17. *Li H., Wang Y., Tang Q. et al.* // Acta Biomater. 2021. V. 129. P. 57.
18. *Baimanov D., Wang J., Zhang J. et al.* // Nat. Commun. 2022. V. 13. № 1. P. 5389.
19. *Pederzoli F., Tosi G., Vandelli M.A. et al.* // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2017. V. 9. № 6. P. 1.
20. *Seabra A.B.* // Metal Nanoparticles in Pharma. Cham: Springer International Publishing, 2017. P. 3.
21. *Naftuijman M., Revuri V., Nurunnabi M., et al.* // Chem. Commun. 2015. V. 51. № 26. P. 5687.
22. *Amirshaghaghi A., Yan L., Miller J. et al.* // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 2613.
23. *Yao H., Zhou J.-Y.* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2023. V. 11. P. 1248283.
24. *Henriques C.A., Pinto S.M.A., Pina J. et al.* // Dalt. Trans. 2016. V. 45. № 41. P. 16211.
25. *Thandu M., Rapozzi V., Xodo L. et al.* // Chempluschem. 2014. V. 79. № 1. P. 90.
26. *Nowostawska M., Corr S.A., Byrne S.J. et al.* // J. Nanobiotechnol. 2011. V. 9. № 1. P. 13.
27. *Mbakidi J.-P., Brégier F., Ouk T.-S. et al.* // Chempluschem. 2015. V. 80. № 9. P. 1416.
28. *Ostroverkhov P., Semkina A., Naumenko V. et al.* // Pharmaceutics. 2018. V. 10. № 4. P. 284.
29. *Suvorov N. V., Grin M.A., Popkov A.M. et al.* // Macroheterocycles. 2016. V. 9. № 2. P. 175.
30. *Ashkbar A., Rezaei F., Attari F. et al.* // Sci. Rep. 2020. V. 10. № 1. P. 21206.
31. *Deng Z., Qiao G., Ma L. et al.* // ACS Appl. Nano Mater. 2021. V. 4. № 12. P. 13523.
32. *Kwon N., Kim H., Li X. et al.* // Chem. Sci. 2021. V. 12. № 21. P. 7248.
33. *Климович М.А., Сажина Н.Н., Радченко А.Ш., и др.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. P. 33; doi: 10.31857/S0207401X21020084
34. *Kostyukov A.A., Mestergazi M.G., Egorov A.E. et al.* // Dye. Pigment. 2023. V. 210. P. 111043.
35. *Бурцев И.Д., Егоров А.Е., Костюков А.А. и др.* // Хим. физика. 2022. Т. 41. № 2. С. 41; doi: 10.31857/S0207401X22020029
36. *Zaitsev A. V., Kononova E.G., Markova A.A. et al.* // Dye. Pigment. 2022. V. 207. P. 110711.
37. *Luo J., Miao Z., Huang X. et al.* // Front. Bioeng. Biotechnol. 2023. V. 11. P. 1132591.
38. *Татиколов А.С.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 11; doi: 10.31857/S0207401X21020163
39. *Capistrano G., Sousa-Junior A.A., Silva R.A. et al.* // ACS Biomater. Sci. Eng. 2020. V. 6. № 8. P. 4523.
40. *Ostroverkhov P. V., Semkina A.S., Naumenko V.A. et al.* // J. Colloid Interface Sci. 2019. V. 537. P. 132.
41. *Simioni A.R., Rodrigues M.M.A., Primo F.L., et al.* // J. Nanosci. Nanotechnol. 2011. V. 11. № 4. P. 3604.
42. *Tardivo J.P., Del Giglio A., de Oliveira C.S. et al.* // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2005. V. 2. № 3. P. 175.
43. *dos Santos A.F., Terra L.F., Wailemann R.A.M., et al.* // BMC Cancer. 2017. V. 17. № 1. P. 194.
44. *Zhang Y., Ye Z., He R., et al.* // Colloids Surf. B. 2023. V. 224. P. 113201.
45. *Tada D.B., Vono L.L.R., Duarte E.L. et al.* // Langmuir. 2007. Vol. 23. № 15. P. 8194.
46. *Toledo V.H., Yoshimura T.M., Pereira S.T., et al.* // J. Photochem. Photobiol., B. 2020. V. 209. P. 111956.
47. *Zhao X., Chen Z., Zhao H. et al.* // RSC Adv. 2014. V. 4. № 107. P. 62153.
48. *Bychkova A. V., Lopukhova M. V., Wasserman L.A., et al.* // Biochim. Biophys. Acta — Proteins Proteomics. 2020. V. 1868. № 1. P. 140300.
49. *Bychkova A. V., Lopukhova M. V., Wasserman L.A., et al.* // Int. J. Biol. Macromol. 2022. V. 194. P. 654.
50. *Usui Y.* // Chem. Lett. 1973. V. 2. № 7. P. 743.
51. *Najafi P., Kouchakzadeh H.* // Nanomedicine J. 2019. V. 6. № 1. P. 55.
52. *Hu Y.-J., Li W., Liu Y., et al.* // J. Pharm. Biomed. Anal. 2005. V. 39. № 3–4. P. 740.
53. *Поволоцкий А.В., Солдатова Д.А., Лукьянов Д.А., Соловьёва Е.В.* // Хим. физика. 2023. Т. 42. № 12. С. 70; doi: 10.31857/S0207401X23120087
54. *Alarcón E., Edwards A.M., Aspee A. et al.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2010. V. 9. № 1. P. 93.
55. *He L.-L., Wang Y.-X., Wu X.-X. et al.* // Luminescence. 2015. V. 30. № 8. P. 1380.
56. *Hsu C.-W., Cheng N.-C., Liao M.-Y., et al.* // Nanomaterials. 2020. Vol. 10. № 7. P. 1351.

NANOSIZED PLATFORM BASED ON MAGNETIC NANOPARTICLES FOR PHOTODYNAMIC THERAPY IN ONCOLOGY

A. V. Bychkova^{1*}, A. A. Markova¹, M. T. Nguyen¹, M. A. Gradova², M. G. Gorobets¹,
M. V. Motyakin¹, M.I. Abdullina¹, A. V. Toroptseva¹, V. A. Kuzmin¹

¹ Emanuel Institute of Biochemical Physics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Semenov Federal Research Center for Chemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*E-mail: anna.v.bychkova@gmail.com

Hybrid nanosystems based on iron oxide nanoparticles (IONPs) and human serum albumin (HSA) have been synthesized. Size and composition of HSA@IONPs nanosystems were characterized using UV/visible spectrophotometry (particularly, using the Bradford protein assay), dynamic light scattering and electron magnetic resonance. Methylene blue, as a model photosensitizer, was non-covalently bound to the nanosystems (5.8 µg per 1 mg of IONPs). The nanosystems were subjected to phototoxicity studies to confirm their suitability for photodynamic therapy, and the survival of cultured human breast adenocarcinoma MCF-7 tumor cells was analyzed. An increase in photoinduced cytotoxicity was observed when the photosensitizer was accumulated by cells upon delivery by the nanosystems, compared with a free photosensitizer at equivalent concentrations. HSA@IONPs are discussed as a promising platform for targeted delivery of a photosensitizer to tumor cells.

Keywords: human serum albumin, iron oxide nanoparticles, magnetic nanoparticles, photodynamic therapy, hybrid nanosystems, methylene blue, MCF-7.

REFERENCES

1. A. Aires, S.M. Ocampo, D. Cabrera, et al., J. Mater. Chem. B **3**, 6239 (2015).
<https://doi.org/10.1039/C5TB00833F>
2. L.Q. Thao, H.J. Byeon, C. Lee, et al., Pharm. Res. **33**, 615 (2016).
<https://doi.org/10.1007/s11095-015-1814-z>
3. H. Nosrati, M. Salehiabar, H.K. Manjili, et al., Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V. **108**, 909 (2018).
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.180>
4. A.S. Chubarov, Magnetochemistry **8**, 13 (18 pages) (2022).
<https://doi.org/10.3390/magnetochemistry8020013>
5. L.L. Israel, A. Galstyan, E. Holler, et al., J. Control. Release **320**, 45 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.009>
6. A. V. Bychkova, M.N. Yakunina, M. V. Lopukhova, et al., Pharmaceutics **14**, 2771 (2022).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122771>
7. E. Vismara, C. Bongio, A. Coletti, et al., Molecules **22**, 1030 (2017).
<https://doi.org/10.3390/molecules22071030>
8. J. Estelrich, and M. Busquets, Molecules **23**, 1567 (2018).
<https://doi.org/10.3390/molecules23071567>
9. D.V. Pominova, I.D. Romanishkin, E.A. Plotnikova, et al., Biomed. Photonics **10**, 44 (2021).
<https://doi.org/10.24931/2413-9432-2021-10-4-44-58>
10. A. Baki, A. Remmo, N. Löwa, et al., Int. J. Mol. Sci. **22**, 6235 (2021).
<https://doi.org/10.3390/ijms22126235>
11. C. Tao, Q. Zheng, L. An, et al., Nanomaterials **9**, 170 (2019).
<https://doi.org/10.3390/nano9020170>
12. A. Tzameret, H. Ketter-Katz, V. Edelshtain, et al., J. Nanobiotechnology **17**, 3 (2019).
<https://doi.org/10.1186/s12951-018-0438-y>
13. X. Liang, M. Chen, P. Bhattarai, et al., ACS Nano **15**, 20164 (2021).
<https://doi.org/10.1021/acsnano.1c08108>
14. D. Sleep, Expert Opin. Drug Deliv. **12**, 793 (2015).
<https://doi.org/10.1517/17425247.2015.993313>
15. A.S. Shurshina, A.R. Galina, and E.I. Kulish, Russ. J. Phys. Chem. B **16**, 353 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122020221>
16. M.A. Kolyvanova, M.A. Klimovich, O. V. Dement'eva, et al., Russ. J. Phys. Chem. B **17**, 206 (2023).
<https://doi.org/10.1134/S1990793123010062>
17. H. Li, Y. Wang, Q. Tang, et al., Acta Biomater. **129**, 57 (2021).
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.019>
18. D. Baimanov, J. Wang, J. Zhang, et al., Nat. Commun. **13**, 5389 (2022).
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-33044-y>
19. F. Pederzoli, G. Tosi, M.A. Vandelli, et al., Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology **9**, 1 (2017).
<https://doi.org/10.1002/wnan.1467>
20. A.B. Seabra, Metal Nanoparticles in Pharma Cham: Springer International Publishing 3 (2017).
https://doi.org/10.1007/978-3-319-63790-7_1
21. M. Nafuijman, V. Revuri, M. Nurunnabi, et al., Chem. Commun. **51**, 5687 (2015).
<https://doi.org/10.1039/C4CC10444G>
22. A. Amirshaghghi, L. Yan, J. Miller, et al., Sci. Rep. **9**, 2613 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39036-1>

23. H. Yao, and J.-Y. Zhou, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **11**, (2023).
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1248283>
24. C.A. Henriques, S.M.A. Pinto, J. Pina, et al., *Dalt. Trans.* **45**, 16211 (2016).
<https://doi.org/10.1039/C6DT02428A>
25. M. Thandu, V. Rapozzi, L. Xodo, et al., *Chempluschem* **79**, 90 (2014).
<https://doi.org/10.1002/cplu.201300276>
26. M. Nowostawska, S.A. Corr, S.J. Byrne, et al., *J. Nanobiotechnology* **9**, 13 (2011).
<https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-13>
27. J.-P. Mbakidi, F. Brégier, T.-S. Ouk, et al., *Chempluschem* **80**, 1416 (2015).
<https://doi.org/10.1002/cplu.201500087>
28. P. Ostroverkhov, A. Semkina, V. Naumenko, et al., *Pharmaceutics* **10**, 284 (2018).
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040284>
29. N. V. Suvorov, M.A. Grin, A.M. Popkov, et al., *Macroheterocycles* **9**, 175 (2016).
<https://doi.org/10.6060/mhc160645s>
30. A. Ashkbar, F. Rezaei, F. Attari, et al., *Sci. Rep.* **10**, 21206 (2020).
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-78241-1>
31. Z. Deng, G. Qiao, L. Ma, et al., *ACS Appl. Nano Mater.* **4**, 13523 (2021).
<https://doi.org/10.1021/acsanm.1c02929>
32. N. Kwon, H. Kim, X. Li, et al., *Chem. Sci.* **12**, 7248 (2021).
<https://doi.org/10.1039/D1SC01125A>
33. M.A. Klimovich, N.N. Sazhina, A.S. Radchenko, et al. **15**, 93 (2021).
<https://doi.org/10.1134/S1990793121010206>
34. A.A. Kostyukov, M.G. Mestergazi, A.E. Egorov, et al., *Dye. Pigment.* **210**, 111043 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.111043>
35. I.D. Burtsev, A.E. Egorov, A.A. Kostyukov, et al., *Russ. J. Phys. Chem. B* **16**, 109 (2022).
<https://doi.org/10.1134/S1990793122010195>
36. A. V. Zaitsev, E.G. Kononova, A.A. Markova, et al., *Dye. Pigment.* **207**, 110711 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110711>
37. J. Luo, Z. Miao, X. Huang, et al., *Front. Bioeng. Biotechnol.* **11**, (2023).
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1132591>
38. A.S. Tatikolov, *Russ. J. Phys. Chem. B* **15**, 33 (2021).
<https://doi.org/10.1134/S1990793121010280>
39. G. Capistrano, A.A. Sousa-Junior, R.A. Silva, et al., *ACS Biomater. Sci. Eng.* **6**, 4523 (2020).
<https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c00164>
40. P. V Ostroverkhov, A.S. Semkina, V.A. Naumenko, et al., *J. Colloid Interface Sci. Elsevier Inc.* **537**, 132 (2019).
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.087>
41. A.R. Simioni, M.M.A. Rodrigues, F.L. Primo, et al., *J. Nanosci. Nanotechnol.* **11**, 3604 (2011).
<https://doi.org/10.1166/jnn.2011.3724>
42. J.P. Tardivo, A. Del Giglio, C.S. de Oliveira, et al., *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2**, 175 (2005).
[https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00097-9)
43. A.F. dos Santos, L.F. Terra, R.A.M. Wailemann, et al., *BMC Cancer* **17**, 194 (2017).
<https://doi.org/10.1186/s12885-017-3179-7>
44. Y. Zhang, Z. Ye, R. He, et al., *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **224**, 113201 (2023).
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113201>
45. D.B. Tada, L.L.R. Vono, E.L. Duarte, et al., *Langmuir* **23**, 8194 (2007).
<https://doi.org/10.1021/la700883y>
46. V.H. Toledo, T.M. Yoshimura, S.T. Pereira, et al., *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **209**, 111956 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111956>
47. X. Zhao, Z. Chen, H. Zhao, et al., *RSC Adv.* **4**, 62153 (2014).
<https://doi.org/10.1039/C4RA10801A>
48. A. V. Bychkova, M. V. Lopukhova, L.A. Wasserman, et al., *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1868**, 140300 (2020).
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140300>
49. A. V. Bychkova, M. V. Lopukhova, L.A. Wasserman, et al., *Int. J. Biol. Macromol. Elsevier B.V.* **194**, 654 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.110>
50. Y. Usui, *Chem. Lett.* **2**, 743 (1973).
<https://doi.org/10.1246/cl.1973.743>
51. P. Najafi, and H. Kouchakzadeh, *Nanomedicine J.* **6**, 55 (2019).
<https://doi.org/10.22038/NMJ.2019.06.008>
52. Y.-J. Hu, W. Li, Y. Liu, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **39**, 740 (2005).
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.04.009>
53. A. V. Povolotskiy, D.A. Soldatova, D.A. Lukyanov, et al., *Russ. J. Phys. Chem. B* **17**, 1398 (2023).
54. E. Alarcón, A.M. Edwards, A. Aspee, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **9**, 93 (2010).
<https://doi.org/10.1039/b9pp00091g>
55. L.-L. He, Y.-X. Wang, X.-X. Wu, et al., *Luminescence* **30**, 1380 (2015).
<https://doi.org/10.1002/bio.2910>
56. C.-W. Hsu, N.-C. Cheng, M.-Y. Liao, et al., *Nanomaterials* **10**, 1351 (2020).
<https://doi.org/10.3390/nano10071351>