

БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА СЕГОДНЯ

Сборник статей

Под редакцией
член-корреспондента РАН,
доктора химических наук,
профессора С.Д. Варфоломеева
(научный руководитель ИБХФ РАН)
и доктора химических наук,
профессора И.Н. Курочкина
(директор ИБХФ РАН)

Москва 2024

УДК 577.35

ББК 24.5

Б 63

DOI 10.36871/978-5-907954-06-9

Рецензенты:

А.А. Берлин — академик РАН, доктор химических наук,
профессор (научный руководитель ФИЦ ХФ РАН)

Н.Л. Клячко — доктор химических наук,
профессор (заведующая кафедрой химической энзимологии
химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова)

**Б 63 Биохимическая физика сегодня / М.: Издательский
дом «Научная Библиотека», 2024.—528 с.**

ISBN 978-5-907954-06-9

Книга представляет собой сборник обзорных статей, охватывающих различные грани современной биохимической физики, междисциплинарной области знания о физической природе химических процессов в биологических и молекулярно-организованных системах. Биохимическая физика оформилась как самостоятельное, целостное и хорошо структурированное научное направление в течение трех последних десятилетий со своими концепциями и отличительными особенностями в результате взаимодействия, взаимопроникновения и взаимообогащения физики, химии и биологии. В настоящем издании анализируются и обобщаются фундаментальные и прикладные аспекты функционирования биомолекулярных систем, создания высокочувствительных биоаналитических методов исследования, разработки новых методов клинической диагностики и терапии, создания принципиально новых материалов и технологий, развития фотоники и биофотоники.

УДК 577.35

ББК 24.5

ISBN 978-5-907954-06-9

© Издательский дом

«НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА» 2024

Содержание

Предисловие

БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА **ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ** **ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ БИОАНАЛИТИЧЕСКИХ** **ПРОЦЕССОВ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ** **БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СИСТЕМ**

1. Кинетическая модель глутаматной нейрон-астроцитарной системы. N-ацетиласпартилглутамат, глутаматкарбоксипептидаза
С. Д. Варфоломеев, В. И. Быков, С. Б. Цыбенова 13
2. Определение активности ферментов с использованием гигантского комбинационного рассеяния
И. Н. Курочкин, Е. Г. Евтушенко 40
3. Комбинированные методы квантовой и молекулярной механики в моделировании белковых систем
Поляков И. В., Хренова М. Г. 60
4. Механизм окислительной толерантности плазменных белков
М. А. Розенфельд, Л. В. Юрина, А. Д. Васильева 79
5. Масс-спектрометрические подходы в исследовании β -амилоида, главного маркера болезни Альцгеймера
Н. В. Захарова, М. И. Индейкина, А. Е. Бугрова, А. С. Кононихин 98
6. Роль межмолекулярных взаимодействий в формировании структуры и фазового поведения биополимеров в растворе
И. Г. Плащина 117
7. Молекулярное конструирование чувствительных биополимерных систем адресной пероральной доставки нутрицевтиков
М. Г. Семёнова 135
8. Спектроскопия электронного парамагнитного резонанса в современной биохимической физике
М. В. Мотякин 150

9. Фитотронные технологии в инженерии
метаболизма растений
Ю.Ц. Мартиросян, Л.Ю. Мартиросян, С. Д. Варфоломее . . . 167

АНТИОКСИДАНТЫ, ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ РАЗРАБОТКА НОВЫХ МЕТОДОВ ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ

10. Производные 3-гидроксипиридинов в качестве
адаптогенов к стрессовым воздействиям
И. В. Жигачева, Н. И. Крикунова А. Н. Голощапов 187
11. Молекулярно-генетические маркеры
в развитии и прогнозе социально значимых
заболеваний человека
Заварыкина Т. М., Носиков В. В. 203
12. Полимерные наноразмерные системы доставки
для терапии онкологических заболеваний
Е. Д. Никольская, Н. Г. Яббаров, М. Б. Сокол 229
13. Полиакрилаты золота и серебра как
потенциальные противоопухолевые препараты
*Л.А. Островская, Д.Б. Корман, ст. н. с. Н.В. Блюхтерова,
ст. н. с. В.А. Рыкова, ст. н. с., к. б. н. М.М. Фомина, н.с., к. б. н. А.К. Чигасова,
н. с., к. б. н. Е.И. Некрасова, инженер-исследователь Т.В. Шарова.
н. с. Ю.А. Хоченкова, н. с. О.О. Рябая, ст. н. с., к. х. н. К.А. Абзаева . . .* 258
14. Новые подходы к оценке воздействия
неблагоприятных экологических факторов
на биологические объекты
Л. Н. Шишкина, М. В. Козлов, В. А. Меньшов 259

МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ

КОМПОЗИТЫ, БИОКОМПОЗИТЫ, НАНОСТРУКТУРЫ, ПОЛИМЕРЫ, ФОТОЭНЕРГЕТИКА

15. Применение современных методов компьютерного
моделирования для предсказания новых
материалов и исследования структуры и свойств
Д. Г. Квашнин 274
16. Низкоразмерные магнетики с конкурирующими
обменными взаимодействиями
В. Я. Кривнов, Д. В. Дмитриев 288

17. Исследование микроструктуры и физико-химических свойств современных материалов (полимеров, композитов, наноматериалов) методами акустической микроскопии высокого разрешения. <i>В. М. Левин, Е. С. Морозов.</i>	306
18. Новые слоистые нано-материалы: атомные структуры и их свойства <i>Л. А. Чернозатонский</i>	323
19. Перспективы солнечной энергетики в свете развития перовскитной фотовольтаики <i>О. И. Шевалеевский</i>	343
20. Жизненный цикл полимерных материалов <i>А. А. Попов.</i>	365
21. Новый класс биоантипиренов на основе производных модифицированного возобновляемого растительного сырья <i>Ломакин С. М., Сахаров П. А., Хватов А. В.</i>	387
22. Математическая модель формирования россыпного золота <i>С. Д. Варфоломеев, В. Н. Калиниченко, Ю. А. Кузнецов, С. Б. Цыбенова</i>	410

ФОТОХИМИЯ. ФОТОБИОЛОГИЯ

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ФОТОХИМИЧЕСКИХ И ФОТОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ

23. Первичные процессы зрения как проблема биохимической физики: родопсин <i>М. А. Островский</i>	438
24. Химическая и биохимическая физика с участием электронного возбуждения <i>А. В. Трофимов, Ю. Б. Цаплев, О. И. Яблонская.</i>	463
25. Кинетика быстрых фотохимических процессов красителей <i>Кузьмин В. А.</i>	486
26. Новые фотоактивируемые метки и материалы для бionанofотоники <i>О. В. Демина, С. Д. Варфоломеев, А. А. Ходонов</i>	509

Предисловие

Биохимическая физика — удивительно многообразная область науки, фокусирующая своё внимание на наиболее острых вопросах современного естествознания. Интересы этой сферы знаний концентрируются вокруг проблем исследования молекулярных основ биопроцессов с использованием современных методов и возможностей математики, химии, физики, биохимии, молекулярной биологии. Специфической особенностью исследований, проводимых в Институте биохимической физики имени Н. М. Эмануэля, является базовый подход, заложенный основателями Института — количественное экспериментальное изучение процессов, развитие представлений о молекулярных механизмах, создание и анализ математических моделей и предложение использования этих результатов на практике. Данное издание, подготовленное к 30-летию Института, представляет собой «срез» научной активности сотрудников Института, иллюстрирующий современные интересы и достижения различных лабораторий.

В последние десятилетия произошёл качественный скачок в развитии и использовании математических вычислительных возможностей. Это открыло новые возможности в изучении сложных многокомпонентных и многостадийных процессов. Рост производительности вычислительной техники, создание новых методов описания и новых вычислительных технологий, развитие квантово-физических и квантово-химических методов описания процессов на атомном и молекулярном уровнях

обеспечили достижение целого ряда в высшей степени интересных результатов. Применение современных методов компьютерного моделирования создало основу предсказания новых наноматериалов с новыми свойствами, исследования их возможных структур (*Д. Г. Квашнин*). Исследования, выполненные *Л. А. Чернозатонским*, предсказали атомные структуры новых слоистых наноматериалов и их потенциальные свойства. Теоретическая работа, выполненная *В. Я. Кривновым и Д. В. Дмитриевым*, посвящена исследованию наноразмерных магнетиков с конкурирующими обменными взаимодействиями. Революционные возможности компьютерного исследования и моделирования открыли методы суперкомпьютерного моделирования белков, в первую очередь, ферментов. Описание белка как молекулярно-механической системы и каталитического центра, функционирование которого можно описать законами квантовой механики (QM/MM приближение), позволяет создать обоснованные представления о механизме каталитического цикла белкового катализатора. Основы этого подхода и результаты исследования многих ферментов представлены в работе *И. В. Полякова и М. Г. Хреновой*, в которой рассмотрены комбинированные методы квантовой и молекулярной механики в моделировании белковых систем.

Методология химической кинетики непрерывно расширяет сферы своего применения. В настоящее время сняты ограничения по анализу сложных нелинейных систем уравнений химической кинетики. В данном издании представлена работа *С. Д. Варфоломеева и С. Б. Цыбеновой* с соавторами, посвящённая математической модели формирования россыпного золота. Модель базируется на анализе сложных динамических закономерностей химических превращений наночастиц золота, формирования макрочастиц металла в открытой системе водного потока.

Исследования, проводимые в Институте биохимической физики, традиционно концентрируются вокруг исследования полимеров и полимерных систем, в том числе, биополимеров-нутрицевтиков. Проблема пересыщения современного общества полимерными материалами, большая часть которых в конечном итоге формирует коммунальные бытовые отходы, — одна из самых актуальных проблем современной экологии. Задачи и решения конверсии синтетических полимеров рассмотрены в работе *А. А. Попова «Жизненный цикл полимерных материалов»*.

Термоустойчивость, термодеструкция, механизмы горения полимеров — круг задач, решаемых в лаборатории *С. М. Ломакина*. Интумесцентная защита синтетических и природных полимерных материалов от горения — существенный теоретический и практический шаг в развитии этой области. В данном издании эти исследования представлены статьёй *С. М. Ломакина, П. А. Сахарова и А. В. Хватова*, посвящённой созданию нового класса биоантипиренов на основе каталитической модификации растительного сырья.

В высшей степени интересным представляется класс полимеров — веществ, которые мы потребляем в качестве продуктов питания. Исследования в области физико-химических закономерностей их поведения — традиционный круг интересов сотрудников Института. В данном издании этим проблемам посвящены работы *И. Г. Плащиной «Роль межмолекулярных взаимодействий в формировании структуры и фазового поведения биополимеров в растворе»* и *М. Г. Семёновой «Молекулярное конструирование стимул-чувствительных биополимерных систем адресной пероральной доставки нутрицевтиков»*.

Исследование механизмов фотофизических и фотохимических процессов — предмет устойчивого интереса химической и биохимической физики. Обобщающая работа *А. В. Трофимова*,

Ю. Б. Цаплева и О. И. Яблонской посвящена химической и биохимической физике с участием реакций электронно возбуждённых состояний молекул. В статье В. А. Кузьмина даётся анализ кинетики быстрых фотохимических процессов красителей. Новые фотоактивируемые метки и материалы для бионанопотоники рассмотрены в работе О. В. Дёминой А. А. Ходонова и С. Д. Варфоломеева.

Проблема создания новых эффективных методов использования солнечной энергии — одна из ключевых проблем современной возобновляемой энергетики. В Институте биохимической физики в течение многих лет функционирует лаборатория *О. И. Шевалеевского*, направленная на создание новых типов преобразователей солнечной энергии в электричество. Статья *О. И. Шевалеевского* посвящена перспективам солнечной энергетики в свете развития перовскитной фотовольтаики.

Современная биохимическая физика требует создания новых и совершенствования существующих экспериментальных методов исследования. Акустическая микроскопия — универсальный метод изучения разнообразных материалов. Исследование микроструктуры и физико-химических свойств современных материалов (полимеров, композитов, наноматериалов) методами акустической микроскопии высокого разрешения — работа, представленная *В. М. Левиным и Е. С. Мороковым*. Использованию спектроскопии электронного парамагнитного резонанса в современной биохимической физике посвящена статья *М. В. Мотякина*.

Методология генетической инженерии — одна из наиболее востребованных в современной бионауке. В настоящее время генно-инженерным модификациям подвергаются практически все основные биообъекты — от бактерий до человека. В высокой степени полезна в этом направлении технология культивирова-

ния и модификации растений на основе фитотронной техники без использования почвы. Фитотронным технологиям в инженерии метаболизма растений посвящена работа *Ю. Ц. Мартиросяна, Л. Ю. Мартиросяна и С. Д. Варфоломеева*.

Существенную роль играет биохимическая физика в медицине. Речь идёт о создании новых методов анализа и диагностики, изучении природы патологических процессов и создании методов влияния на них, разработке средств защиты и технологических процедур лечения.

Принципиально новые возможности в анализе и биомедицинской диагностике открывает использование эффекта гигантского комбинационного рассеяния. Работа *И. Н. Курочкина и Е. Г. Евтушенко* посвящена созданию методологии и применению этого вида колебательной спектроскопии для определения активности ферментов и созданию нового поколения молекулярно диагностических систем. Статья *Н. В. Захаровой, М. И. Индейкиной, А. Е. Бугровой и А. С. Кононихина* посвящена разработке метода масс-спектрометрии белков для определения β -амилоида — главного биомаркера болезни Альцгеймера. Принципиально важной представляется работа *Т. М. Завазыкиной и В. В. Носикова*, определяющая молекулярно-генетические маркеры в развитии и прогнозе социально значимых заболеваний человека.

Механизм окислительной устойчивости плазменных белков крови человека рассмотрен в работе *М. А. Розенфельда, Л. В. Юриной и А. Д. Васильевой*. Новые количественные подходы к оценке воздействия неблагоприятных факторов среды на человека анализируются в исследовании *Л. Н. Шишкиной, М. В. Козлова и В. А. Меньшова*. Соответственно, исследование, выполненное *И. В. Жигачёвой, Н. И. Крикуновой и А. Н. Голощаповым*, описывает новые адаптогены к стрессовым воздействиям на основе производных 3-гидроксипиридинов.

Традиционно в Институте биохимической физики проявляется высокий интерес к терапии онкологических заболеваний. *Е.Д. Никольской, Н.Г. Яббаровым и М.Б. Сокол* выполнены работы по созданию полимерных наноразмерных систем доставки лекарств для терапии онкологических заболеваний. Принципиально новые потенциальные противоопухолевые препараты, блокирующие рост раковых клеток, описаны в работе *Л.А. Островской и Д.Б. Кормана*.

Одна из самых сложных, вызывающих интерес проблем современного естествознания связана с механизмами функционирования центральной нервной системы. Совершенно очевидно, что биохимическая физика как наука о механизмах сложных биохимических явлений наиболее расположена к решению этих задач. Статья классика современной молекулярной физиологии *М.А. Островского* «Первичные процессы зрения как проблема биохимической физики: родопсин» посвящена одному из главных процессов функционирования нейросистемы — механизму зрения.

Химическая кинетика как эффективный инструмент исследования механизмов сложных процессов демонстрирует свои возможности при моделировании одного из наиболее сложных нейробиохимических процессов — функционирования глутаматного синаптического контакта, ответственного за механизм возбуждения и задействованного в механизме памяти (статья *С.Д. Варфоломеева, В.И. Быкова и С.Б. Цыбеновой* «Кинетическая модель глутаматной нейрон-астроцитарной системы»).

В 2024 году исполняется 30 лет со дня организации Института биохимической физики АН СССР. Институт возник как часть Института химической физики, специализированная для изучения сложных биологических процессов на молекулярном уровне. Идейными основателями Института являются академик *Н.Н. Семёнов*, академик *Н.М. Эмануэль*, акаде-

мик *А. Е. Шилов*, профессор *Е. Б. Бурлакова*. По своей природе биопроцессы — сложные многогранные явления. Следствием этого является необходимость исследования молекулярных процессов в биологических системах комбинацией современных естественнонаучных дисциплин, включая современные математико-вычислительные методы, методы физического описания и понимания, изучения сложных биохимических реакций, построения динамических моделей процессов. Представленные в данном издании статьи являются иллюстрацией возможностей и глубоких исследований на базе физики, химии и биологии.

С. Д. Варфоломеев
И. Н. Курочкин

БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА

Физико-химические основы высокочувствительных биоаналитических процессов и функционирования биомолекулярных систем

1. КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ГЛУТАМАТНОЙ НЕЙРОН-АСТРОЦИТАРНОЙ СИСТЕМЫ. N-АЦЕТИЛАСПАРТИЛГЛУТАМАТ, ГЛУТАМАТКАРБОКСИПЕПТИДАЗА

С. Д. Варфоломеев^{1,2,3}, В. И. Быков³, С. Б. Цыбенова³

*¹Институт физико-химических основ функционирования
сети нейронов и искусственного интеллекта, Московский
государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва*

*²Химический факультет, Московский государственный
университет им. М. В. Ломоносова, Москва*

*³Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля
Российской академии наук, Москва*

Механизм функционирования нейросистемы человека, как молекулярного биокомпьютера, представляет собой операционное взаимодействие большого числа ионно-молекулярных систем, главенствующую роль в которых играют системы синаптической передачи возбуждения от нейрона к нейрону с помощью специализированных синаптических структур. Синапсы являются «химическими полупроводниками», осуществляющими направленную одностороннюю передачу сигнала (передачу возбуждения) от одного нейрона другому. Кинетическое моделирование функционирования синапса — эффективный метод

анализа механизма функционирования синаптической передачи и основа создания методов управления нейросистемой. Нами разработана кинетическая модель холинергического синапса — одного из основных элементов функционирования нейронной системы мозга [1–3]. Принципиальную роль в механизме «работы» холинергического синапса играет ацетилхолинэстераза — фермент гидролиза нейромедиатора ацетилхолина с образованием холина и уксусной кислоты. Блокировка фермента протоном в результате образования уксусной кислоты — гипотеза, объясняющая механизм записи и хранения информации (молекулярный синаптический механизм памяти) в нейрональной системе. Известно, что холинергические синапсы — одни из ключевых элементов в системе памяти человека [4].

Не менее важную роль в мозге человека играет система глутаматных синапсов. Это наиболее представительная в мозге человека синаптическая система. Около 40% синапсов в нашем мозге — возбуждающие глутаматные синапсы, передающие возбуждение за счет инъекции в синаптическую щель везикул, содержащих глутаминовую кислоту [3]. Глутаматные синапсы являются основными возбуждающими синапсами и играют ключевую роль в нервной системе. Глутамат, как нейромедиатор, — исключительно важный компонент в механизме памяти [5–19] и чрезвычайно важен при развитии нейродегенеративных поражениях мозга [5–11]. Имеются все основания считать, что острые нервные патологии, такие как инсульт, шизофрения, черепно-мозговая травма, а также хронические нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона связаны с чрезмерно высокой внеклеточной концентрацией глутамата как возбуждающего нейротрансмиттера в головном мозге.

Механизм функционирования глутаматергической системы связан с участием наиболее представленного в мозге дипептида — N-ацетиласпартилглутамата (NAAG) [20–22]. В мозге человека детектируют концентрацию NAAG в диапазоне 10–50 мМ. Этот нейропептид имеет самую высокую концентрацию и, несомненно, является наиболее важным нейропептидом в мозге человека. Очевидно, что выяснение роли этого компонента в физиологии нейронной системы требует особого внимания. Существует обоснованное представление о значимой роли в механизме функционирования глутаматергической системы фермента N-ацетиласпартилглутамат гидролазы — пептидазы — глутаматкарбоксипептидазы (GCP II), «отщепляющей» от NAAG глутаминовую кислоту с образованием свободного глутамата и N-ацетиласпарагиновой кислоты (NAA). Роль NAA и механизм гидролиза NAA с образованием уксусной и аспарагиновой кислот нами детально рассмотрен в работах [23–28]. Молекулярный полиморфизм NAA-гидролазы является основной достаточно распространенной нейропатологией — болезни Канавана.

Ключевым вопросом функционирования нейросистемы мозга является проблема усиления первичного сенсорного сигнала. Первичный сенсорный сигнал (зрительный, звуковой, температурный, когнитивный) реализуется очень ограниченным числом сенсорных рецепторов и нейронов. Этот сигнал в конечном итоге вызывает мощный молекулярно-физиологический ответ, обеспечивающий возбуждение и инициирование функционирования целой физиологической зоны центральной нервной системы. Особенно, это наглядно видно на примере ответа нейрональной системы на зрительное возбуждение. Молекулярные изменения в зрительном родопсине при возбуждении зрительной коры головного мозга вызывает включение в механизм ответа сигнал большой зоны

нейронально-астроцитарной системы (диаметр зоны возбуждения до 3 см) с последующим усилением сигнала, приводящего к расширению микрососудов зоны возбуждения (BOLD эффект) [29–35]. При этом нейроваскулярное сопряжение является неотъемлемой и принципиально важной составляющей функционирования мозга. Нарушение этого сопряжения — основа многих нейропатологий.

Одна из наиболее реалистичных гипотез, объясняющей возможности усиления сигнала до молекулярно-физиологического ответа базируется на действии ферментов. Включение фермента за счет его каталитической активности способно в 10^2 – 10^6 раз усилить первичное физическое воздействие на систему. Впервые это было продемонстрировано на модельной системе в работе [36]. Активация фермента за счет разблокировки активного центра способна в 10^2 раз в секунду усилить сигнал за счет накопления продукта ферментативной реакции.

Нам представляется в высшей степени целесообразным разработать кинетическую модель глутаматергической системы с участием NAAG и описанием возможных механизмов амплификации возбуждения. Модель базируется на совокупности литературных данных взаимодействия глутаматных синапсов и астроцитарной системы.

Структурно-биохимическая модель глутаматергической системы

В настоящее время существует богатый экспериментальный материал, создающий представления о функционировании глутаматных синапсов. Важным результатом исследований является демонстрация взаимодействия глутаматных нейронных синапсов с астроцитами [37–42] (рис. 1).

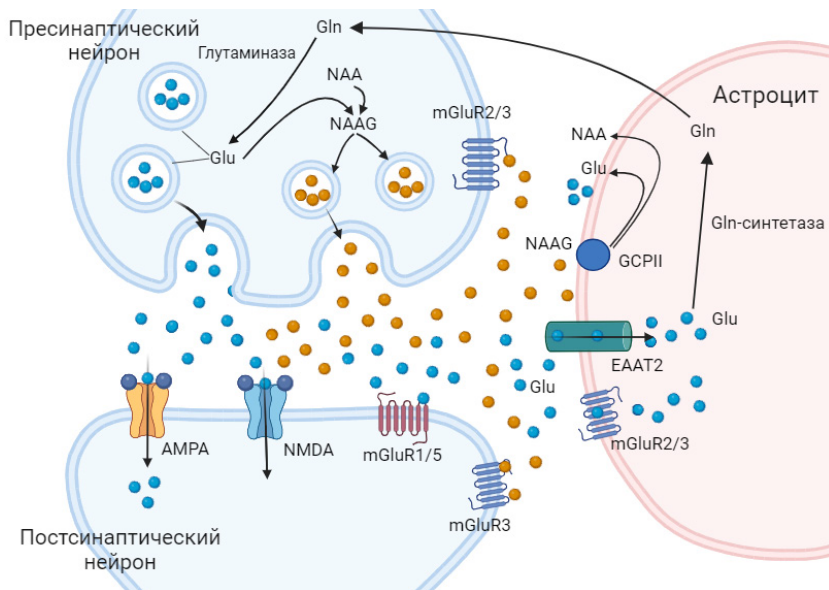


Рисунок 1. Схема функционирования глутаматной нейрон-астроцитарной системы

Функционирование системы обеспечивается взаимодействием сигнал-проводящей ионной среды нейрона, пресинаптических и постсинаптических мембран глутаматного синапса, «классических» рецепторных структур постсинаптической мембраны AMPA, NMDA, метаботропных рецепторов mGluR1/5, mGluR2/3 [43–49], ключевого фермента GCPII, локализованного на мембране астроцитов [5, 50–52].

Принято считать, что глутамат и NAAG освобождаются в синаптическую щель в результате электромеханического транспорта, инициированного возбуждением нейрона и сливанием синаптических везикул с пресинаптической мембраной в активной зоне синапса. Концентрация глутамата в синаптической щели составляет $0.6 \mu\text{M}$ в состоянии покоя и может

достигать до 1 mM во время передачи возбуждения при пре-синаптической деполяризации нейронов. Освобождение синаптической щели от избытка нейротрансмиттера осуществляется его эффективным удалением и переносом в зону действия астроцитарной системы транспортёрами глутамата (EAAT).

Принципиальной особенностью возбуждающих глутаматных синапсов является одновременная с глутаматом инъекция в синаптическую щель пептидного нейротрансмиттера NAAG. В рамках передачи возбуждения функция NAAG заключается в активации метаботропного рецептора mGluR3, расположенного на постсинаптической мембране. Ключевую роль в динамике развития ответа играет фермент глутаматкарбоксипептидаза (GCP II), гидролизующий NAAG с образованием NAA и свободной глутаминовой кислоты. Уровень активности этого фермента определяет уровень концентрации глутамата в системе. Важно отметить, что GCP II является мишенью для разрабатываемых лекарственных препаратов.

Кинетическая модель и минимальная система уравнений

Переменными концентрациями в процессе функционирования глутаматергической-астроцитарной системы являются Glu — концентрация глутаминовой кислоты, NAAG — концентрация нейротрансмиттера NAAG, NAA — концентрация N-ацетиласпарагиновой кислоты, D — концентрация продуктов функционирования метаботропных рецепторов, N — число возбуждённых (проводящих сигнал) нейронов.

Минимальная система уравнений включает:

$$\frac{dGlu}{dt} = \left(a_1(Glu_0) \cdot e^{-\alpha_1 t} - \beta \cdot Glu + \frac{V_m NAAG}{K_m + NAAG} + \chi_1 \cdot D \right) \cdot N. \quad (1)$$

Первый член уравнения (1) описывает динамику инъекции Glu в синаптическую щель (аналогичный подход применен нами при моделировании кинетических закономерностей функционирования холинергической системы [1-3]). Второй член уравнения описывает динамику рассеивания и поглощения Glu в синаптической щели, в том числе перенос нейромедиатора в систему действия астроцита. Третий и четвертый члены уравнения отражают ферментативное накопление нейромедиатора за счет гидролитической системы GСРІІ и функционирования метаботропных рецепторов. Множитель N в уравнении (1) отражает динамическое участие группы нейронов при возбуждении.

$$\frac{dNAAG}{dt} = a_2(NAAG_0) \cdot e^{-\alpha_2 t} - \delta NAAG - \frac{V_m NAAG}{K_m + NAAG} + \omega \cdot Glu. \quad (2)$$

Аналогичный смысл имеют члены в уравнении (2).

Динамика изменения концентрации продуктов активации метаботропных рецепторов описывается уравнением (3)

$$\frac{dD}{dt} = \xi \frac{R_2 NAAG}{K_2 + NAAG} - \lambda D. \quad (3)$$

Соответственно надо учесть, что число нейронов, находящихся в зоне возбуждения пропорционально концентрации возбуждающего нейромедиатора

$$N = \phi Glu + \chi_2 NAAG. \quad (4)$$

$$\frac{dNAA}{dt} = v + \frac{V_m NAAG}{K_m + NAAG} - \frac{V_{ma} (NAA)^3}{K_{ma} + (NAA)^4} - \rho \cdot NAA; \quad (5)$$

Кинетическая модель взаимодействия глутаматного сигнала с астроцитарной системой (1)-(5) описывает динамику процесса в двух режимах: быстром (в миллисекундах)

и медленном (в секундах). Вариация параметров модели (β , k_2 , R_2 , γ , V_m , δ , ξ и др.) позволяет найти наиболее значимые параметры, которые существенно могут влиять на характер процесса.

Глутаматергическая система — ключевая система для многих нейрофизиологических явлений. Двухфазный характер ответа, система амплификации возбуждения

Принципиально важными компонентами синаптического ответа нейросистемы на внешний возбуждающий сигнал являются нейромедиатор Glu, нейротрансмиттер NAAG, вбрасываемый в синаптическую щель одновременно с Glu, рецепторы постсинаптической мембраны AMPA, NMDA, метаботропные рецепторы mGluR1/5, mGluR2/3, принципиально важный фермент GCPII, локализованный на мембране астроцитов, гидролизующий NAAG с образованием нейромедиатора Glu и NAA. Значительная доля нейрофизиологических эффектов определяется динамическим взаимодействием этих компонентов системы. Взаимодействие синаптической передачи возбуждения и ферментативного процесса трансформации NAAG определяет явление двухфазного кинетического ответа, усиления ответа на импульсное возбуждение, распространение возбуждения с захватом большей области нейрональной системы и создания зоны возбуждения, наблюдаемой экспериментально по BOLD-эффекту. Явление амплификации сигнала заключается в переходе от возбуждения относительно небольшой группы нейронов за счет сенсорного сигнала к созданию макроскопической зоны возбуждения, которая в конечном итоге реализуется в BOLD-эффекте — импульсному, инициированному нейросигналом, расширению микрокапилляров в зоне возбуждения. Экспериментально наблюдаемые кинетические

эффекты BOLD-сигнала изложены в [31–34]. На рис. 2 представлены результаты интегрирования системы уравнений (1)–(5), демонстрирующие двухфазный характер функционирования глутаматергической нейронально-астроцитарной системы. Синаптический «разряд» реализуется в диапазоне 1 мс [54, 55], а мощный ответ нейросистемы имеет максимум ответа в диапазоне 1 с.

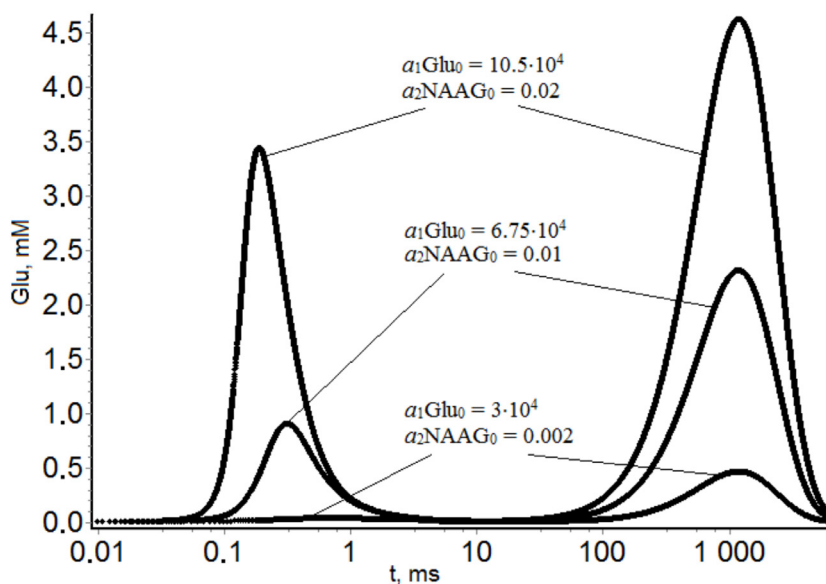


Рисунок 2. Двухфазный характер функционирования глутаматергической нейронально-астроцитарной системы (1)–(5) при значениях параметров: $\alpha_1 = 7 \cdot 10^3$, $\beta = 8 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$, $V_m = 4.5 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$, $K_m = 130 \text{ nM}$, $\chi_1 = 100 \text{ c}^{-1}$, $\alpha_2 = 1.8$, $\delta = 1.5 \text{ c}^{-1}$, $\omega = 0.2 \text{ c}^{-1}$, $\xi = 5 \cdot 10^5$, $K_2 = 2 \text{ mM}$, $R_2 = 0.8 \text{ M/s}$, $\lambda = 2 \text{ c}^{-1}$, $\varphi = \chi_2 = 1 \text{ s}^{-1}$, $v = 10^{-3} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$, $V_{ma} = 0.248 \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$, $K_{ma} = 1.8 \cdot 10^{-13} \text{ mM}$, $\rho = 5 \text{ c}^{-1}$.

Следует подчеркнуть, что данные рис. 2 представлены в логарифмической шкале времени. Для сравнения на рис. 3 представлены эти же данные в шкале реального времени.

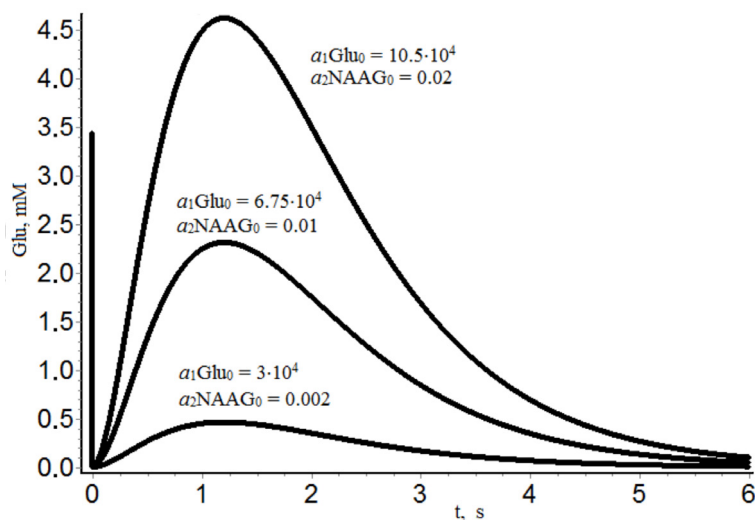


Рисунок 3. Результаты расчёта системы уравнений (1)–(5) в реальной шкале времени при варьировании $a_1(Glu_0)$ и $a_2(NAAG_0)$, отражающих силу выброса Glu и NAAG в синаптическую щель при экзоцитозе. Значения параметров те же, что и на рис. 2.

Устойчивые и неустойчивые режимы функционирования глутамат-астроцитарного синапса

Кинетический анализ поведения глутамат-астроцитарного синапса в рамках системы уравнений (1)–(5) показывает, что система может демонстрировать как устойчивые, так и неустойчивые (бифуркационные) режимы. В значительной степени это определяется скоростями «оттока» медиатора у реакционной зоны (параметры β и δ). Уменьшение скорости удаления глутаминовой кислоты из зоны реакции может привести к «взрывообразному» возбуждению системы. Это иллюстрирует рис. 4, демонстрирующий кинетическое поведение при вариации параметра β . При высоких значениях β ($\beta > 4 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$) первоначальный импульс, продолжительностью 1 мс,

вызывает вторичную усиленную волну возбуждения с диапазоном времени 10^3 – 10^5 секунд с переходом системы в устойчивое начальное состояние. При этом в начальное состояние возвращаются концентрации Glu (рис. 4, а) NAAG (рис. 4, б), и число возбуждённых нейронов (рис. 4, с). Однако в точке бифуркационного перехода уменьшение параметра β от $4 \cdot 10^6 \text{ с}^{-1}$ до $3.95 \cdot 10^6 \text{ с}^{-1}$ приводит к бифуркационному взрыву и неограниченному росту Glu, N и NAAG. Совершенно аналогично ведёт себя система при вариации скорости удаления второго медиатора NAAG (рис. 5).

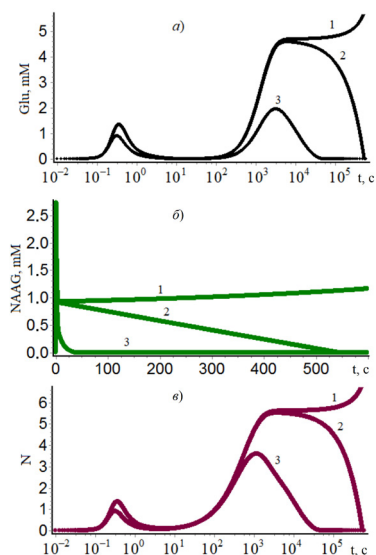


Рисунок 4. Кинетические ответы глутамат-астроцитарного синапса при вариации параметра β : 1 — $\beta = 3.95 \cdot 10^6$; 2 — $\beta = 4 \cdot 10^6$; 3 — $\beta = 8 \cdot 10^6$; (система (1)–(5)) а) — Glu, б) — NAAG, в) — N, параметры приведены в подписи к рис. 2

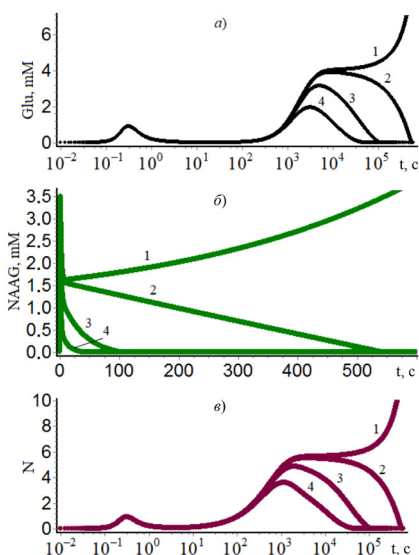


Рисунок 5. Кинетические ответы глутамат-астроцитарного синапса при вариации параметра δ : 1 — $\delta = 0.49$; 2 — $\delta = 0.5$; 3 — $\delta = 0.6$; 4 — $\delta = 1$; а) — Glu, б) — NAAG, в) — N, параметры приведены в подписи к рис. 2

Принципиальный интерес представляет исследование системы при вариации уровня экспрессии фермента гидролиза NAAG — GСРІІ (параметр V_m) и при ингибировании этого фермента препаратом, потенциальным лекарством I_0 . В последнем случае уравнение скорости ферментативной конверсии NAAG примет вид:

$$V_i = \frac{V_m NAAG}{(1 + I_0/K_i)(K_m + NAAG)}. \quad (6)$$

Анализ показывает, что влияние уровня активности фермента на кинетические ответы зависит от того, в какой зоне — устойчивой или близкой к бифуркационному процессу происходит вариация активности фермента.

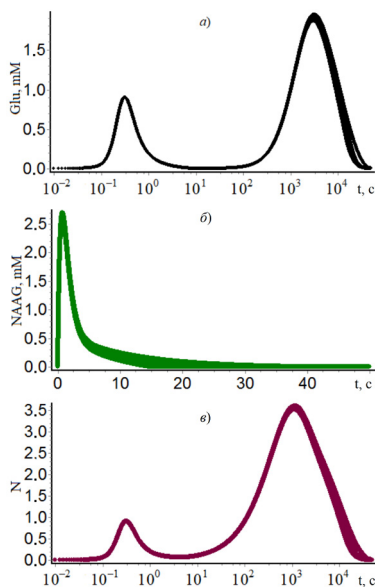


Рисунок 6. Кинетические ответы глутамат-астроцитарного синапса при вариации уровня экспрессии GСРІІ (параметр V_m): 1 — $V_m = 10^{-4}$; 2 — $V_m = 5 \cdot 10^{-5}$; 3 — $V_m = 10^{-5}$; а) — Glu, б) — NAAG, в) — N, в зоне устойчивости ($\delta = 1 \text{ c}^{-1}$)

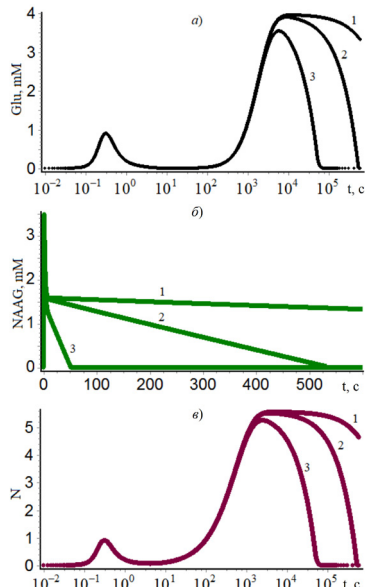


Рисунок 7. Кинетические ответы глутамат-астроцитарного синапса при вариации уровня экспрессии GСРІІ (параметр V_m): 1 — $V_m = 10^{-6}$; 2 — $V_m = 10^{-5}$; 3 — $V_m = 10^{-4}$; а) — Glu, б) — NAAG, в) — N, в зоне приближения к бифуркационному процессу ($\delta = 0.5 \text{ c}^{-1}$)

На рис. 6 приведены данные расчёта при вариации V_m в зоне устойчивости $\delta = 1 \text{ с}^{-1}$. Видно, что при достаточно широкой вариации V_m система практически не реагирует при изменении ключевых переменных. Однако при приближении к зоне неустойчивости уровень экспрессии фермента играет существенную роль (рис. 7) $\delta = 0.5 \text{ с}^{-1}$.

Близкие ответы мы получаем при вариации активности GСPII путём использования ингибиторов (рис. 8). В зоне приближения к бифуркационному процессу можно наблюдать существенное влияние ингибирования на кинетические ответы системы. Следует отметить, что сильное ингибирование фермента ($I_0/K_i = 5; 10$) может привести к высокому стационарному уровню NAAG.

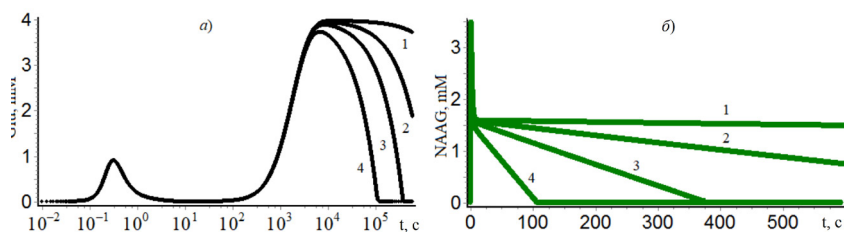


Рисунок 8. Кинетические ответы глутамат-астроцитарного сигнала при ингибировании GСPII (вариация параметра I_0/K_i : 1 — $I_0/K_i = 10^{-4}$; 2 — $I_0/K_i = 10$; 3 — $I_0/K_i = 2.5$; 4 — $I_0/K_i = 0$; уравнение (6) в зоне приближения к бифуркационному процессу, $\delta = 0.5 \text{ с}^{-1}$).

Важным результатом проведения анализа является демонстрация того факта, что система при некоторых параметрах, связанных с избыточным накоплением нейромедиаторов Glu и NAAG (малые параметры β и δ) может переходить в состояние гиперактивного возбуждения. Эти кинетические наблюдения могут объяснить возникновение приступов эпилепсии (см. ниже раздел «глутаматергическая система при нейропатологиях»).

Приведённые далее кинетические данные относятся к анализу кинетического поведения системы в режиме устойчивости высоких β и δ (режимы вдали от бифуркационного процесса).

Кинетическое поведение глутаматергической системы при минутных экспозициях освещения (световое возбуждение, кора головного мозга). Математическое описание экспериментальных данных

Развитие техники магнитно-резонансной спектроскопии *in vivo* позволило идентифицировать основные метаболиты, определяющие химические процессы в зоне возбуждения. Повышение разрешающей способности метода при переходе на спектроскопию в полях 7 Тесла дало возможность определить 19 химических агентов в зоне возбуждения, ограниченной BOLD эффектом [56]. Показано, что зрительное возбуждение в границах BOLD-сигнала с увеличением концентрации кислорода уменьшает концентрацию глюкозы как основного компонента, обеспечивающего энергетику процесса. Как следствие существенным образом растёт концентрация молочной кислоты (на $9 \pm 4\%$). Возбуждение реализуется ростом глутаминовой кислоты — основного возбуждающего нейротрансмиттера ($4 \pm 1\%$). Соответственно, элиминирование светового сигнала ведёт к возвращению концентрации глутамата на исходный уровень. На рис. 9 представлены экспериментальные данные [56] и математическое описание наблюдаемых эффектов. В качестве базы для моделирования экспериментальных данных использовалась система уравнений (1)–(5) при следующей модификации

$$\frac{dGlu}{dt} = \left(a_1 Glu_0 \cdot (1 - e^{-\alpha_1(t - n\Delta t)}) - \beta \cdot Glu + \frac{V_m \cdot NAAG}{K_m + NAAG} + \chi_1 \cdot D \right) \cdot N, \quad (7)$$

где n — число циклов инъекции; Δt — время между импульсами ($\Delta t = 6$ с).

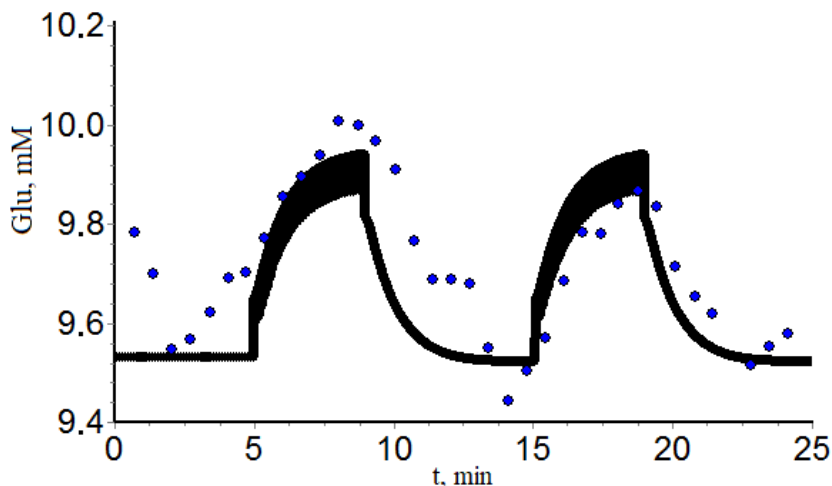


Рисунок 9. Кинетические изменения концентрации глутаминовой кислоты зоны зрительного возбуждения в рамках BOLD-эффекта (кора головного мозга) (экспериментальные данные [56] — точки и математическое описание процесса — черная кривая).

Приведённые экспериментальные данные однозначно иллюстрируют рост концентрации глутаминовой кислоты в зоне возбуждения и дают возможности оценить динамику процесса. Экспериментальные данные работы [56] были оцифрованы с помощью программы GetData Graph Digitizer 2.26.

Роль Glu-возбуждающей синаптической системы и NAAG в когнитивной функции. Механизмы управления когнитивностью

Известно, что уменьшение уровня NAAG ведёт к уменьшению стимулирования рецептора mGluR3 и к уменьшению функции

распознавания и обучения (когнитивной функции) [17–19]. С другой стороны ингибирование глутаматкарбоксипептидазы GCP II приводит к увеличению концентрации NAAG. При этом физиологический ответ заключается в улучшении рабочей памяти. Известно также, что увеличение экспрессии гена фермента GCP II у человека приводит к ухудшению когнитивной функции [19]. В рамках развиваемой модели активация mGluR3 рецептора связана с накоплением метаболита D. Таким образом, мы имеем несколько путей влияния на систему:

Ингибирование GCP II (уменьшение V_m) — рост концентрации NAAG, как следствие, рост метаболита D.

Увеличение каталитической активности метаботропного рецептора (увеличение параметра ξ).

Увеличение экспрессии гена метаботропного рецептора (увеличение параметра V_m), что приводит к ослаблению когнитивной функции.

Имеющиеся экспериментальные данные по влиянию уровня NAAG на когнитивность в рамках развиваемой модели позволяет идентифицировать точки и механизмы управления на уровне возбуждающей глутаматергической системы.

Вариация интенсивности (когнитивного) сигнала. Импульсный разряд глутаматного синапса определяется параметрами $a_1(\text{Glu}_0)$ и $a_2(\text{NAAG}_0)$ и кинетическим параметром α_1 и α_2 . В первую очередь это детерминировано количеством нейромедиаторов Glu и NAAG в пресинаптической зоне синапса, а также параметрами α_1 и α_2 , определяющими эффективность «тушения» синаптического разряда. На рис. 10 представлена динамика импульсного разряда и амплифицированного возбуждающего ответа (вторая волна) при вариации параметров $a_1(\text{Glu}_0)$ и $a_2(\text{NAAG}_0)$. Соответственно, «разряд» и амплификация

возбуждения вызывает ответ в концентрации NAAG, метаболита D, числа возбужденных нейронов N.

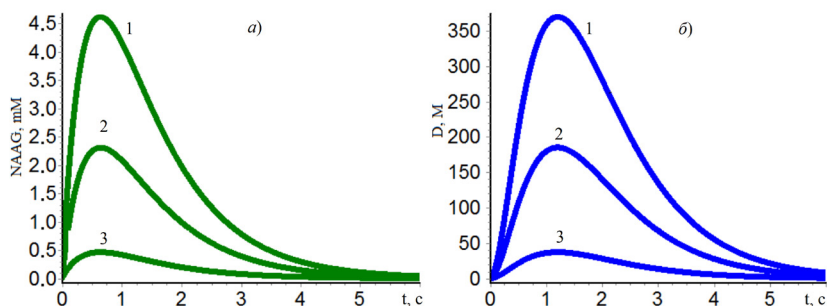


Рисунок 10. Динамика изменений концентрации NAAG (а) и концентрации продуктов функционирования метаботропных рецепторов D (б) в глутаматном синапсе при варьировании a_2NAAG_0 : 1–0.02 М с⁻¹; 2–0.01 М с⁻¹; 3–0.002 М с⁻¹. Значения остальных параметров те же, что и на рис. 2.

Эффективность функционирования метаботропных рецепторов *mGluR3*. Количественную эффективность «работы» метаботропных рецепторов в рамках модели определяет параметр ξ . В соответствии с уравнением (3) принципиально важным членом является концентрация пептидазы NAAG. На рис. 11 приведены результаты интегрирования системы уравнений (1)–(5) при вариации параметра ξ (активация метаботропных рецепторов).

Ингибирование глутаматкарбоксипептидазы *GCPII* как метод улучшения когнитивной функции. Экзогенное влияние на поведение системы может быть осуществлено путем ингибирования пептидазы, отщепляющей глутаматную кислоту от NAAG. В настоящее время активно разрабатываются лекарственные препараты — ингибиторы этого фермента [12]. Показано, что ингибирование *GCPII* положительно влияют на когнитивные функции.

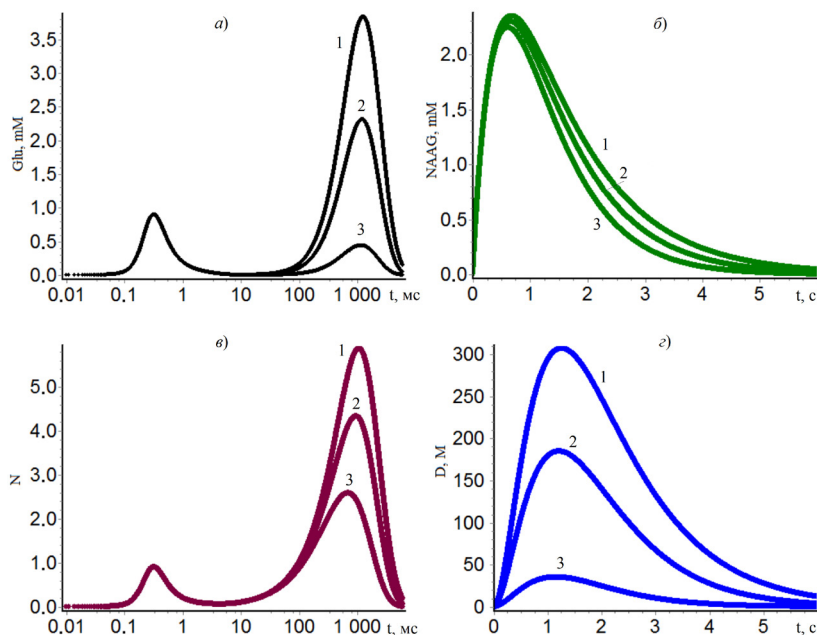


Рисунок 11. Динамический ответ системы по концентрации Glu (а), NAAG (б), D (в) и числа возбуждённых клеток N (г) при вариации параметра ξ : $1 \cdot 10^5$; $2 \cdot 10^5$; $8 \cdot 10^5$, характеризующего эффективность действия метаботропного рецептора mGluR3.

В рамках развиваемой модели ингибирование фермента (или уменьшение уровня его экспрессии) отражается уменьшением параметра V_m . На рис. 12 представлены расчётные данные переменных Glu, NAAG, D и N при вариации V_m . Следует отметить, что существенное уменьшение активности фермента может привести к блокировке синаптического ответа.

Таким образом, когнитивная функция мозга в определённой степени зависит от функционирования глутамат-астроцитарной системы, в которой фермент GCP II играет важную роль. В общем случае возникновение зоны возбуждения и амплификации

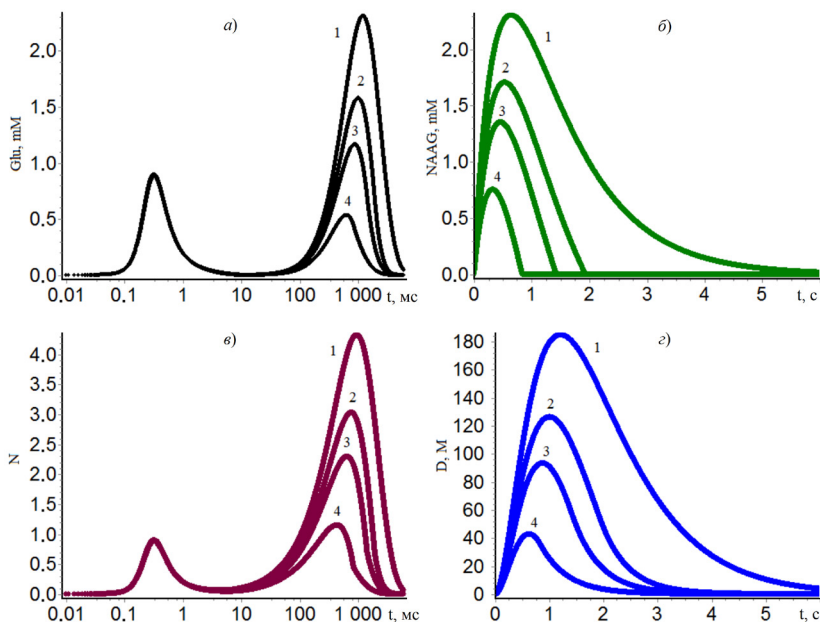


Рисунок 12. Влияние активности GCP II на динамические ответы глутаматергической системы. При варьировании максимальной скорости гидролиза (V_m) NAAG под действием GCP II может быть реализовано за счет ингибирования фермента или уровня его экспрессии. 1 — $V_m = 4.5 \cdot 10^{-6} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$; 2 — $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$; 3 — $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$; 4 — $4.5 \cdot 10^{-3} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$. Параметры расчётов те же, что и в подписи рис. 2.

глутаматного сигнала приводит к передаче возбуждения на систему записи и хранения информации, реализующей механизм нейрологической памяти. В рамках гипотезы записи информации по протонному механизму функционирования холинергической синаптической системы [4], возбуждение при амплифицированном расширении зоны возбуждения пересекается с холинергической системой и инициирует процесс активации памяти.

Динамические особенности поведения глутаматной синаптической системы при нейропатологиях

Глутаматные синапсы в силу своего наиболее широкого представительства в центральной нервной системе, а также в силу значительной роли в реализации когнитивных функций (память, обучение) играют большую роль в проявлении патологий нервной системы. Известны биохимические проявления основных компонентов системы (Glu, NAAG, NAA и др.) при развитии нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, деменция, рассеянный склероз), шизофрении, эпилепсии, инсульта, черепно-мозговой травмы [12].

Нейродегенеративные заболевания. При болезни Альцгеймера показано существенное падение уровня NAAG практически во всех органах мозга. Это может быть обусловлено увеличением активности (уровня экспрессии) глутаматкарбоксипертидазы GCP_{II}. В рамках рассматриваемой кинетической модели увеличение активности этого фермента понижает уровень NAAG, продукта активации метаботропного рецептора mGluR3 D, уменьшает число вовлеченных в ответ возбуждённых нейронов N. Эти результаты представлены на рис. 6. С другой стороны, увеличение уровня NAAG достигается применением ингибиторов глутаматкарбоксипептидазы. Экспериментально показано, что использование ингибиторов фермента, как важных экзогенных факторов влияния, положительно сказывается на когнитивных функциях [5, 12].

Неожиданным результатом кинетического анализа является тот факт, что уменьшение активности GCP_{II} увеличивает уровень глутамата в системе (см. рис. 5 а). Это является следствием большой роли mGluR3 и продукта его функционирования D (см. уравнения 1 и 3).

Шизофрения. Данная нейропатология является комплексным заболеванием с участием многих систем центральной нервной системы. Существенную роль в развитии заболевания играет глутаматергическая система [55, 57]. Показано, что молекулярный полиморфизм гена рецептор mGluR3 (см. рис. 2) ассоциируется с проявлением симптомов шизофрении [58, 59], при этом проявления заболевания купируются лигандами рецептора [60, 61] и ингибиторами глутаматкарбоксипептидазы [62]. Кинетическое моделирование при ингибировании фермента прогнозирует динамический рост NAAG, рост D и динамическое увеличение числа нейронов, участвующих в возбуждении в ответ на внешний сигнал.

Черепно-мозговая травма. Патология имеет комплексный характер, включая оксидативный стресс, митохондриальную дисфункцию, множественные воспалительные процессы. Очевидно, что данная патология затрагивает и дисфункцию глутаматной синаптической системы. Прямое нейропротекторное влияние ингибиторов GCP II при черепно-мозговой травме на животных показано в работах [63–65]. Кинетическое проявление эффектов такого рода представлено на рис. 5.

Эпилепсия. Нейрофизиологические исследования демонстрируют ключевую роль глутаматной синаптической системы, обеспечивающей основные механизмы возбуждения, в развитии и проявлении эпилепсии [66, 67]. Показано, что активация mGluR3 рецептора системы (в рамках развиваемой модели динамический рост компонента D) ведёт к уменьшению глутамата в синаптической щели [68] и снимает ряд патологических проявлений эпилепсии. Аналогично воздействует на систему ингибитор GCP II [69]. Возможный механизм этого эффекта иллюстрирует рис. 6, демонстрирующий увеличение NAAG при уменьшении (ингибировании) активности глутаматкарбоксипептидазы GCP II.

Приведенные примеры иллюстрируют одно общее важное явление — повышение концентрации NAAG в системе, прежде всего за счет ингибирования GСPII, благоприятно действует на общие свойства нейросистемы. А именно, положительно влияет на когнитивные функции, осуществляет нейропротекторное и лекарственное влияние на развитие классических нейропатологий. Совершенно очевидно, что за ингибиторами GСPII большое фармакологическое будущее.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 23-13-00011

Список литературы

1. С. Д. Варфоломеев, В. И. Быков, С. Б. Цыбенова, *Изв. АН. Сер. хим.* **2020**, 69, 1585–1593.
2. С. Д. Варфоломеев, В. И. Быков, С. Б. Цыбенова, *Докл. АН.* **2020**, 492, 305–309.
3. С. Д. Варфоломеев, В. И. Быков, С. Б. Цыбенова, *Докл. АН.* **2020**, 491, 189–193.
4. С. Д. Варфоломеев, *Вестн. МГУ.* **2022**, 77, 38–41.
5. S. Yang, D. Datta, E. Woo, A. Duque, Y. M. Morozov, J. Arellano, B. S. Slisner, M. Wang, A.F.T. Arnsten, *Mol. Psychiatry* **2022**, 27, 4252–4263.
6. J. R. Moffett, P. Ariyannur, P. Arun, A.M.A. Namboodiri, In: *Magnetic Resonance Spectroscopy*. (Eds: C. Stagg, and D. Rothman), **2014**, Academic Press, pp. 71–90.
7. E. Bratek, A. Ziembowicz, E. Salinska, *Antioxidants* (Basel). **2020**, 9 (9), 877.
8. C. Jiménez-Espinoza, F. Marcano Serrano, J. L. González-Mora, *Molecules*. **2021**, 26, 675.
9. T. M. Planas-Fontáñez, C. F. Dreyfus, K. S. Saitta, *Neurochem. Res.* **2020**, 45(3), 541–550.

10. C. C. Rudy, H. C. Hunsberger, D. S. Weitzner, M. N. Reed, *Aging Dis.* **2015**, 6(2), 131-148.
11. V. N. Bukke, M. Archana, R. Villani, A. D. Romano, A. Wawrzyniak, K. Balawender, S. Orkisz, S. Beggiato, G. Serviddio, T. Cassano, *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 7452.
12. C. Morland, K. Nordengen, *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23(3), 1268.
13. F. Jessen, N. Fingerhut, A. M. Sprinkart, K. Kühn, N. Petrovsky, W. Maier, H. H. Schild, W. Block, M. Wagner, F. Träber, *Schizophr. Bull.* **2013**, 39(1), 197-205.
14. L. M. Rowland, K. Kontson, J. West, R. A. Edden, H. Zhu, S. A. Wijtenburg, H. H. Holcomb, P. B. Barker, *Schizophr. Bull.* **2013**, 39(5), 1096-1104.
15. S. J. Tsai, *Med. Sci. Monit.* **2005**, 11(9), HY39-45.
16. M. Ublinskiy, N. Semenova, I. Lebedeva, T. Akhadov, *Eur. Psychiatry.* **2017**, 41, S629-S629.
17. J. H. Neale, R. Olszewski, *Neurobiol. Learn. Mem.* **2019**, 158, 9-13.
18. C. F. Zink, P. B. Barker, A. Sawa, D. R. Weinberger, M. Wang, H. Quillian, W. S. Ulrich, Q. Chen, A. E. Jaffe, J. E. Kleinman, T. M. Hyde, G. E. Pertyman, M. Giegerich, K. Karta, M. van Ginkel, K. L. Bigos, *Am. J. Psychiatry.* **2020**, 177(12), 1129-1139.
19. A. F. T. Arnsten, M. W. Wang, *Am. J. Psychiatry.* **2020**, 177(12), 1103-1106.
20. J. H. Neale, R. T. Olszewski, D. Zuo, K. J. Janczura, C. P. Profaci, K. M. Lavin, J. C. Madore, T. Bzdega, *J. Neurochem.* **2011**, 118, 490-498.
21. J. H. Neale, T. Bzdega, B. Wroblewska, *J. Neurochem.* **2000**, 75(2), 443-452.
22. G. L. Westbrook, M. L. Mayer, M. A. Namboodiri, J. H. Neale, *J. Neurosci.* **1986**, 6(11), 3385-3392.

23. M. G. Khrenova, E. D. Kots, S. D. Varfolomeev, S. V. Lushchekina, A. V. Nemukhin, *J. Phys. Chem. B*. **2017**, *121*, 9389–9397.
24. С. Д. Варфоломеев, Е. Д. Коц, М. Г. Хренова, С. В. Луцкина, А. В. Немухин, *Докл. АН*. **2017**, *474*, 89–92.
25. E. D. Kots, S. V. Lushchekina, S. D. Varfolomeev, A. V. Nemukhin, *J. Chem. Inf. Model*. **2017**, *57*, 1999–2008.
26. E. D. Kots, M. G. Khrenova, S. V. Lushchekina, S. D. Varfolomeev, B. L. Grigorenko, A. V. Nemukhin, *J. Phys. Chem. B*. **2016**, *120*, 4221–4231.
27. С. Д. Варфоломеев, К. Г. Гуревич, *Биокинетика*, Фаир-Пресс, Москва, **1999**. 720 pp.
28. Е. Д. Коц, М. Г. Хренова, А. В. Немухин, С. Д. Варфоломеев, *Успехи химии*. **2019**, *88*, 4221–4231. doi: 10.1070/RCR4842.
29. I. B. Ip, A. Berrington, A. T. Hess, A. J. Parker, U. E. Emir, H. Bridge, *Neuroimage*. **2017**, *155*, 113–119.
30. M. H. Baslow, D. N. Guilfoyle, *J. Glycomics and Metab.* **2016**, *1*(1), 25–36.
31. S. D. Varfolomeev, V. I. Bykov, N. A. Semenova, S. B. Tsybenova, *ACS Chem. Neurosci.* **2021**, *12*, 2202–2208.
32. S. D. Varfolomeev, V. I. Bykov, N. A. Semenova, S. B. Tsybenova, *ACS Chem. Neurosci.* **2020**, *11*(5), 763–771.
33. S. D. Varfolomeev, N. A. Semenova, M. V. Ublinskiy, V. I. Bykov, S. B. Tsybenova, *Chem. Phys. Lett.* **2019**, *729*, 84–91.
34. С. Д. Варфоломеев, В. И. Быков, Н. А. Семенова, С. Б. Цыбенова, *Докл. АН*. **2019**, *488*, 39–43.
35. С. Д. Варфоломеев, Н. А. Семенова, В. И. Быков, С. Б. Цыбенова, *Докл. АН*. **2019**, *484*, 441–446.
36. И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, *Докл. АН. СССР*. **1970**, *193*, 932–935.
37. J. Lorenzo, R. Vuillaume, S. Binczak, S. Jacquir, *J. Comput. Neurosci.* **2020**, *48*(1), 1–20.

38. U. Lalo, W. Koh, C.J. Lee, Y. Pankratov, *Neuropharmacol.* **2021**, *199*, 108758.
39. M. H. Baslow, D. N. Guilfoyle, *J. Mol. Genet. Med.* **2017**, *11*, 2.
40. M. H. Baslow, D. N. Guilfoyle, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2006**, *576*, 95–112.
41. M. H. Baslow, *Front. Behav. Neurosci.* **2011**, *5*, 1–7.
42. M. H. Baslow, *J. Neurochem.* **2000**, *75*(2), 453–459.
43. J. H. Neale, *J. Neurochem.* **2011**, *119*, 891–895.
44. C. M. Niswender, P. J. Conn, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2010**, *50*, 295–322.
45. S. J. Bradley, R. A. Chellis, *Biochem. Pharmacol.* **2012**, *84*, 249–259.
46. R. Crupi, D. Impellizzeri, S. Cuzzocrea, *Front. Mol. Neurosci.* **2019**, *12*, 20.
47. A. Bodzeta, N. Scheefhals, H. D. MacGillavry, *Neuropharmacol.* **2021**, *200*, 108799.
48. K. Li, M. Lu, M. Cui, X. Wang, Y. Zheng, *Cell Commun. Signal.* **2022**, *20*, 55.
49. L. E. Jin, M. Wang, V. C. Galvin, T. C. Lightbourne, P. J. Conn, A. F. T. Arnsten, C. D. Paspalas, *Cerebral Cortex*, **2018**, *28*, 974–987.
50. P. Sácha, J. Zámecník, C. Barinka, K. Hlouchová, A. Vícha, P. Mlcochová, I. Hilgert, T. Eckschlager, J. Konvalinka, *Neurosci.* **2007**, *144*(4), 1361–1372.
51. J. H. Neale, T. Yamamoto, *Progress in Neurobiol.* **2020**, *184*, 101722.
52. D. Datta, S. N. Leslie, E. Woo, N. Amancharla, A. Elmansy, M. Lepe, A. P. Mecca, B. S. Slusher, A. C. Nairn, A. F. T. Arnsten, *Front. Aging Neurosci.* **2021**, *13*, 760270.
53. M. Armbruster, C. G. Dulla, J. S. Diamond, *eLife*, **2020**, *9*, e54441.
54. J. D. Clements, R. A. Lester, G. Tong, C. E. Jahr, G. L. Westbrook, *Science*. **1992**, *258*(5087), 1498–501.

55. Y. Uno, J. T. Coyle, *Psychiatry Clin. Neurosci.* **2019**, 73, 204–215.
56. B. Schaller, R. Mekle, L. Xin, N. Kunz, R. Gruetter, *J. Neurosci. Res.* **2013**, 91, 1076–1083. doi: 10.1002/jnr.23194.
57. A. Egerton, A. A. Grace, J. Stone, M. G. Bossong, M. Sand, P. McGuire, *Schizophr. Res.* **2020**, 223, 59–70.
58. S. Saini, S. Mancuso, M. S. Mostaid, C. Liu, C. Pantelis, I. Everall, C. Bousman, *Transl. Psychiatry.* **2017**, 7, e1196.
59. M. F. Egan, R. E. Straub, T. E. Goldberg, I. Yakub, J. H. Callicott, A. R. Hariri, V. S. Mattay, A. Bertolino, T. M. Hyde, C. Shannon-Weickert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2004**, 101, 12604–12609.
60. J. Cartmell, J. A. Monn, D. D. Schoepp, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, 291(1), 161–170.
61. L. M. Rorick-Kehn, B. G. Johnson, K. M. Knitowski, C. R. Salhoff, J. M. Witkin, K. W. Perry, K. I. Griffey, J. P. Tizzano, J. A. Monn, D. L. McKinzie, *Psychopharmacol.* **2007**, 193, 121–136.
62. R. T. Olszewski, N. Bukhari, J. Zhou, A. P. Kozikowski, J. T. Wroblewski, S. Shamimi-Noori, B. Wroblewska, T. Bzdega, S. Vicini, F. B. Barton, *J. Neurochem.* **2004**, 89, 876–885.
63. J.-F. Feng, K. C. Van, G. G. Gurkoff, C. Kopriva, R. T. Olszewski, M. Song, S. Sun, M. Xu, J. H. Neale, P.-W. Yuen, *Brain Res.* **2011**, 1395, 62–73.
64. C. Zhong, X. Zhao, J. Sarva, A. Kozikowski, J. H. Neale, B. G. Lyeth, *J. Neurotrauma.* 2005, 22, 266–276.
65. J.-F. Feng, G. G. Gurkoff, K. C. Van, M. Song, D. A. Lowe, J. Zhou, B. G. Lyeth, *Brain Res.* **2012**, 1469, 144–152.
66. J. L. Green, W. F. Dos Santos, A. C. K. Fontana, *Biochem. Pharmacol.* **2021**, 193, 114786.
67. G. L. Sarlo, K. F. Holton, *Seizure.* **2021**, 91, 213–227.

68. R. Celli, I. Santolini, G. Van Luijtelaar, R. T. Ngomba, V. Bruno, F. Nicoletti, *Expert Opin. Ther. Targets*. **2019**, 23, 341-351.

69. J. M. Witkin, M. Gasior, C. Schad, A. Zapata, T. Shippenberg, T. Hartman, B. S. Slusher, *Neuropharmacol.* **2002**, 43, 348-356.

2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ

И. Н. Курочкин^{1,2}, Е. Г. Евтушенко^{1,2}

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

*²Химический факультет Московского государственного
университета имени М. В. Ломоносова, Москва*

Одной из особенностей биохимической физики является использование мощных физических методов исследования для решения молекулярно-биологических и химических задач. Впечатляющими примерами в этой области являются достижения магнитной и рентгеновской спектроскопии, масс-спектрологии, спектроскопии электрического импеданса, всех видов электронной микроскопии в изучении структуры биомакромолекул и интермедиатов химических реакций. Не менее значимым прикладным направлением является использование физических методов как систем регистрации в биоаналитике, в частности, в области, связанной с определением активности ферментов. Помимо широкого спектра разнообразных исследовательских методик, большую часть биоаналитических приложений можно отнести к одному из трех ключевых направлений. Первое включает в себя определение клинически значимых ферментов и ферментов в продуктах питания. Для этого класса задач, прежде всего, важны удобство методики, экспрессность и соответствие рабочего диапазона метода клиническим или производственным потребностям. Вторым направлением является разработка и контроль качества ферментных препаратов, применяемых в биотехнологии. Здесь зачастую не требуется высокой чувствительности, но критически важными становятся простота процедур, производительность и низкая

стоимость анализа. Третье обширное направление, связанное с определением активности ферментов — использование ферментных меток как систем усиления и генерации сигнала в аналитических методиках, прежде всего, в твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА), представляющем собой универсальную платформу для измерения концентраций широкого спектра антигенов. Особенностью данной области является использование ограниченного перечня ферментов, в частности пероксидазы из корней хрена [КФ 1.1.11.7], щелочной фосфатазы [КФ 3.1.3.1] и β -галактозидазы [КФ 3.2.1.23]. Эти ферменты обладают высокими каталитическими константами порядка 10^2 – 10^3 с⁻¹, для них разработаны промышленные методы получения, выделения и очистки, а также методики их конъюгации с антителами. Более того, готовые конъюгаты антител с этими ферментами зачастую коммерчески доступны. Интерес к использованию в этой области современных физических методов связан с постоянным запросом на снижение пределов обнаружения антигенов [1], открывающим новые возможности в клинической диагностике, обеспечении биобезопасности, экологическом мониторинге и других областях.

Спектроскопия комбинационного рассеяния (КР) является одним из типов колебательной спектроскопии. Эффект КР заключается в неупругом рассеянии фотонов, чаще всего от лазерного источника, на веществе с потерей части энергии на возбуждение колебательных мод. Спектр рассеянного излучения в длинноволновой (Стоксовой) области содержит набор полос, соответствующих колебаниям различных групп атомов молекулы, сопровождающимся изменением ее поляризуемости. Интенсивность выбранной полосы может использоваться в качестве аналитического сигнала, связанного с концентрацией вещества. Эффект гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР), в англоязычной литературе surface-enhanced

Raman scattering (SERS), возникает при получении спектров КР от молекул, находящихся в непосредственной близости от наноструктурированной металлической поверхности [2]. Открытый в 1974 году [3], он заключается в многократном, до нескольких порядков, усилении интенсивности регистрируемых полос КР, что позволяет получать сигнал от гораздо более низких концентраций интересующих соединений по сравнению с обычным КР. Для усиления используют наноструктуры из золота и серебра, реже меди, платины и других металлов [4]. Усиливающие наноструктуры принято называть ГКР субстратами, однако в настоящем обзоре термин «субстрат» для однозначности используется в отношении вещества, вступающего в катализируемую ферментом реакцию. Необходимыми условиями получения интенсивных сигналов ГКР является высокое сечение комбинационного рассеяния молекулы, а также ее близость к поверхности металла, например, за счет адсорбции или формирования ковалентной связи. Управление этими двумя факторами позволяет селективно и высокочувствительно регистрировать сигнал целевого соединения в смесях с типичными пределами обнаружения в диапазоне от 10^{-13} до 10^{-6} М, а в отдельных случаях — на уровне единичных молекул [2,5]. Еще одним практически значимым эффектом является так называемое резонансное комбинационное рассеяние (РКР). Оно проявляется при использовании длин волн возбуждения в области полосы электронного поглощения молекулы [6] и также приводит к повышению интенсивности части регистрируемых полос КР. Эффекты усиления РКР и ГКР можно сочетать, этот режим носит название резонансного гигантского комбинационного рассеяния (РГКР), в англоязычной литературе surface-enhanced resonance Raman scattering (SERRS) [7]. В дополнение к высокому сечению рассеяния, для РГКР характерна повышенная специфичность из-за преобладания в спектре ко-

лебательных мод, связанных с возбуждаемым электронным переходом. Кроме того, флуоресценция, которая обычно является ограничением для РКР, в режиме РГКР чаще всего потушена за счет взаимодействия с металлической поверхностью.

Важной особенностью определения активности ферментов является необходимость анализа смесей, состоящих из избытка субстрата (или субстратов) ферментативной реакции и малых количеств наработанного продукта. Скорость ферментативной реакции может быть измерена как по убыли субстрата, так и по накоплению продукта. Поскольку для проявления эффектов усиления в ГКР определяемое соединение должно взаимодействовать с металлической поверхностью, ключевой проблемой разработки методики является выбор ферментативной реакции и модификации поверхности, обеспечивающих условия для специфичного детектирования субстрата или продукта [8]. Это может быть достигнуто как напрямую, так и путем организации каскада химических реакций, приводящих к ГКР-активному соединению. Вторым важным критерием выбора ферментативной реакции является как можно более высокое сечение комбинационного рассеяния детектируемого соединения. Таким образом, данная область является мультидисциплинарной с преобладанием химической и физико-химической составляющей.

Благодаря многочисленным исследованиям эффекта ГКР в отношении различных соединений, накоплен значительный объем информации о химических группировках, имеющих сродство к поверхности благородных металлов. В частности, органические тиолы прочно взаимодействуют с золотыми и серебряными поверхностями [9,10] за счет образования ковалентной связи металл-сера. Различные производные азот-содержащих гетероциклических соединений адсорбируются за счет нековалентных взаимодействий, демонстрируя высокоинтенсивные

спектры ГКР [11–14]. Первый подход, применяемый для измерения активности ферментов методом ГКР, основан на целенаправленном создании таких группировок в ходе превращения субстрата в продукт, что обеспечивает селективную регистрацию его спектра (Рис. 1). В ряде работ такие субстраты получили название «замаскированных» [15].

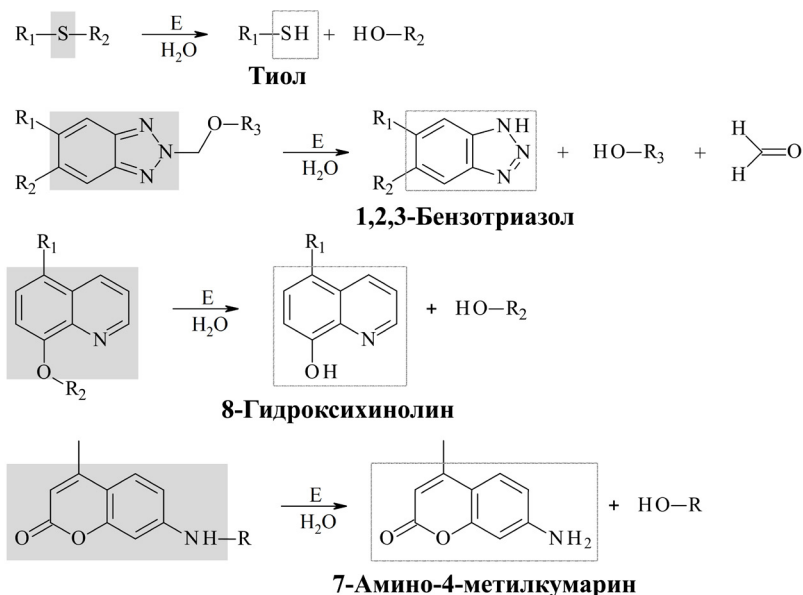


Рисунок 1. Схемы применения т. н. «замаскированных» субстратов для определения активности ферментов с использованием ГКР. Серым показаны «замаскированные» группировки, контуром — группировки, способные связываться с поверхностью благородных металлов.

Ферментативная генерация тиолов используется для определения активности гидролаз. Описано количественное определение бутирилхолинэстеразы [КФ 3.1.1.8] с использованием таких субстратов как ацетилтиохолин и бутирилтиохолин [16]. В ходе ферментативного гидролиза образуется тиохо-

лин, спектр ГКР которого регистрируется с использованием паст, содержащих многообразные серебряные диски, с пределом обнаружения на уровне 260 нМ. Подход с использованием тиольных продуктов описан также для определения активности β -глюкозидазы [КФ 3.2.1.21]. В качестве субстратов использовали 2-меркапто-3-цианопиридин- β -D-глюкозид или 2-меркапто-5-цианопиридин- β -D-глюкозид [17]. Ферментативный гидролиз этих соединений приводит к образованию соответствующих 2-меркапто-цианопиридинов, которые могут быть определены методом ГКР с использованием наночастиц серебра и золота с субнанолярной чувствительностью по полосе колебания нитрильной группы 2230 см⁻¹. Это позволяет более чем на порядок снизить предел обнаружения фермента по сравнению с существующими методами и использовать такой подход для определения β -глюкозидазы как биомаркера ряда заболеваний и в сырье пищевых производств. Мониторинг процесса ферментативного гидролиза модельных фосфорорганических соединения деметона-S и О-этил-S-этил-метилтиолфосфоната под действием органофосфат гидролазы [КФ 3.1.8.1] в микрофлюидном канале может быть проведен на основе регистрации ГКР сигнала продуктов 2-(этилтио)-этантиола и этантиола соответственно [18].

Серия значимых работ посвящена использованию субстратов с «замаскированной» 1,2,3-бензотриазольной группировкой. Модификация одного из атомов азота ферментативно расщепляемым остатком через оксиметиленовый мостик позволяет получить субстраты, обладающие низким сродством к поверхности серебра. Ферментативный гидролиз с последующим неферментативным отщеплением формальдегида высвобождает ГКР-активное бензотриазольное производное [15,19]. Для дополнительного усиления сигнала путем перевода его в режим РГКР в структуру молекулы вводили диазо краситель, эф-

фективно возбуждаемый лазерным источником с длиной волны 514.5 нм. Использование различных уходящих групп позволяет использовать описанный подход в качестве универсальной платформы для измерения активности ряда гидролаз. Была показана применимость субстратов, содержащих сложный эфир 3-фенилмасляной кислоты, для измерения активности 11 липаз, 2 протеаз и одной эстеразы 15. На примере липазы из *Pseudomonas cepacia* [КФ 3.1.1.3] была оценена чувствительность метода. Спектр РГКР регистрировался из объема порядка долей пиколитров, то есть оценочно от 500 молекул фермента, что потенциально открывает возможности измерения активности ферментов на уровнях, характерных для отдельных клеток. Этот же подход может быть использован для определения стереоселективности ферментов путем измерения скорости гидролиза субстратов, содержащих R- и S-энантиомеры 3-фенилмасляной кислоты. Аналогичные субстраты, содержащие сложный эфир фенилаланина, были использованы для измерения активности пяти различных протеаз [20]. Предел обнаружения субтилизина А из *Bacillus licheniformis* [КФ 3.4.21.62] составил 50 нг/мл при времени реакции 30 минут.

Дальнейшее развитие данный подход получил при использовании производных 8-гидроксихинолина. «Маскировка» осуществляется путем образования связей с различными уходящими группами через ОН-группу в восьмом положении. Получаемое при ферментативном гидролизе производное 8-гидроксихинолина образует прочные комплексы с поверхностью серебра. Регистрацию также проводили в режиме РГКР за счет введения в структуру субстрата различных диазо красителей. Предел обнаружения таких продуктов составляет 0.2 нг/мл, что на 1-2 порядка ниже, чем у соответствующих производных бензотриазола [21]. Уходящая группа в виде остатка 3-фенилмасляной кислоты позволяет измерять активность липаз [21],

остатка фосфорной кислоты — щелочной фосфатазы, остатка β -галактозы — β -галактозидазы [22].

Пуриновые азотистые основания также проявляют высокое сродство к поверхности серебра, демонстрируя интенсивные спектры ГКР, что можно использовать для прямого измерения активности ферментов, связанных с превращениями пуринов, например, ксантиноксидазы [КФ 1.17.3.2], катализирующей окисление под действием кислорода воздуха гипоксантина в ксантин, и далее — в мочевую кислоту. Все три пуриновых производных обладают различающимися спектрами ГКР. Применение математического метода проекции на латентные структуры позволяет автоматизированным образом получать абсолютные концентрации каждого из веществ при использовании ксантина или гипоксантина в качестве субстрата [23]. Полученные результаты демонстрируют высокую степень корреляции с арбитражным методом ВЭЖХ при значительном сокращении времени анализа, с 10 минут для хроматографии до 2 минут 20 секунд для ГКР. Предложенный подход может быть использован для повышения производительности скрининга активности генно-инженерных мутантных форм ксантиноксидазы.

Описана попытка использования аденина и его производных в качестве продуктов ферментативной реакции, имеющих высокое сродство к поверхности серебра [24]. Концепция заключалась в модификации аденина либо через N6-аминогруппу, либо через N1 с помощью этиленаминового мостика различными пептидами, гидролизующимися под действием протеаз с выделением свободного аденина или N1-этиленамин-аденина соответственно. К сожалению, различные стратегии синтеза N6-производного не приводили к требуемому соединению; синтез конъюгата через N1 был осуществлен успешно. Но, поскольку, остаток аденина в таком субстрате не является

в полной мере «замаскированным», субстрат имеет выраженный фоновый спектр. Его гидролиз под действием трипсина [КФ 3.4.21.4] приводил всего к четырехкратному повышению интенсивности спектра ГКР. Аналогичный подход с использованием конъюгата пептида с 7-амино-4-метилкумарином (АМК) через аминогруппу был опробован той же группой авторов [25] для измерения активности калликреин-родственной пептидазы 8 [КФ 3.4.21.118]. ГКР-активная группировка (АМК) в таком субстрате действительно является «замаскированной», сигнал ГКР для субстрата практически отсутствует. Одной из проблем работы является невозможность измерения концентраций АМК ниже 4 мкМ, что значительно уступает по чувствительности флуоресцентным измерениям. Это стало следствием, по-видимому, не вполне корректной оптимизации степени агрегации серебряных наночастиц, которая вызывалась, в основном, определяемым соединением, а не повышением ионной силы при добавлении агрегирующего агента. Вероятно, этот недостаток не позволил в полной мере продемонстрировать потенциал тестируемого подхода.

Второе обширное направление, которое можно выделить в области определения ферментативной активности посредством ГКР, основано на адаптации известных ферментативных реакций, используемых с другими системами регистрации (колориметрическими, электрохимическими и т. д.). Если в тестируемой реакции субстрат или продукт демонстрируют значительно более выраженный спектр ГКР, она может служить основой для измерения ферментативной активности. Наибольшее распространение этот подход получил для регистрации ферментных меток в ИФА [1] на основе ГКР (Рис. 2), т. к. за исключением одной рассмотренной ранее работы с производными 8-гидроксихинолина [21], «замаскированные» субстраты для таких ферментов не описаны. Большое внимание также

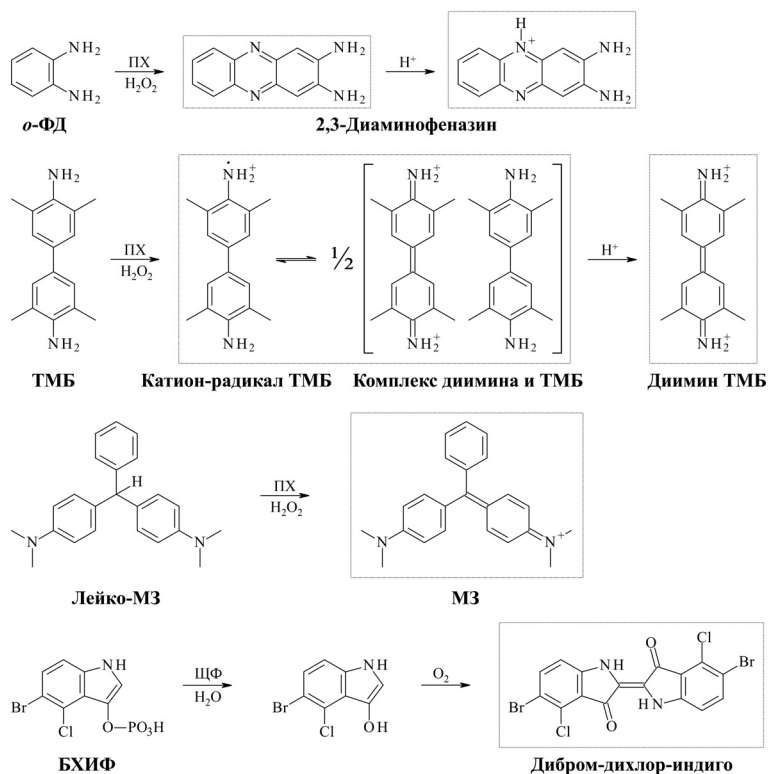


Рисунок 2. Ферментативные реакции, приводящие к образованию ГКР-активных продуктов (показаны контуром), используемые преимущественно в ИФА с ГКР регистрацией. Сокращения: PX — пероксидаза хрена, ЩФ — щелочная фосфатаза, o-ФД — o-фенилендиамин, ТМБ — 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, МЗ — малахитовый зеленый, БХИФ — 5-бром-4-хлор-3-индоксил фосфат.

уделяется подбору оптимальных условий ГКР-регистрации субстрата или продукта выбранной реакции. Среди перспективных субстратов пероксидазы хрена, приводящих к продукту с интенсивным спектром ГКР, можно выделить o-фенилендиамин [26,27], претерпевающий окислительную димеризацию

до 2,3-диаминофеназина, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин [28–30] и лейко-формы метиленового синего и малахитового зеленого [31]. Системы с аналогичным принципом детекции щелочной фосфатазы описаны для 5-бром-4-хлор-3-индоксил фосфата [32–35]. После ферментативного отщепления фосфатной группы, под действием кислорода воздуха происходит окислительная димеризация с образованием ГКР-активного производного индиго. Описана также модификация данной методики, основанная на добавлении в смесь нильского голубого А, окисляющего промежуточное соединение вместо кислорода воздуха и обладающего высокоинтенсивным спектром ГКР. Интенсивность полосы 592 см^{-1} красителя снижается с ростом концентрации щелочной фосфатазы [36]. Измерение активности пероксидазы по убыли субстрата возможно с использованием бензидина. Интенсивность его полос 1197 или 1609 см^{-1} применяли для регистрации результатов ИФА [37–39] с аналитическими характеристиками, эквивалентными ИФА в колориметрическом микропланшетном формате. Снижение интенсивности полос субстрата 2,6-дихлорофенолиндифенола может служить основой [40] для мониторинга активности митохондриальной сукцинатдегидрогеназы [КФ 1.3.99.1]. Полифенолоксидазная активность [КФ 1.10.3.1 / 1.10.3.2 / 1.14.18.1] в образцах яблок и картофеля может быть измерена по снижению интенсивности полос ГКР пирокатехина [41], ферментативно окисляющегося кислородом воздуха до о-бензохинона. Родственный подход с использованием каскада химических реакций и измерением убыли одного из реагентов описан для измерения активности щелочной фосфатазы [42]. В ходе ферментативной реакции из 2-фосфата-L-аскорбиновой кислоты генерируется аскорбат, восстанавливающий ионы Cu(II) до Cu(I) , которые, в свою очередь, катализируют «клик-реакцию» между азидом терефталевой кислоты и 4-ацетилен-бифенилом (4-АБ). Анали-

тическим сигналом является снижение интенсивности полосы 1596 см^{-1} 4-АБ. Работа является скорее демонстратором прототипа, поскольку методика сравнима по пределу обнаружения и длительности анализа с коммерческими наборами для колориметрического определения щелочной фосфатазы с использованием *n*-нитрофенилфосфата, однако значительно сложнее в экспериментальном исполнении.

Если для продукта ферментативной реакции не наблюдается ярко выраженного спектра ГКР, описаны несколько схем, в которых поверхность металла предварительно модифицируют группами, способными реагировать с ним, образуя ГКР-активное соединение. Например, золотые наночастицы с серебряным покрытием, модифицированные цистеамином, могут быть использованы [43] для регистрации активности моноаминоксидазы Б [КФ 1.4.3.4], катализирующей окисление фенилэтиламина в фенилацетальдегид. Последний реагирует с аминогруппами на поверхности частиц, формируя ГКР-активное основание Шиффа, детектируемое по интенсивности полосы 756 см^{-1} . Модификация поверхности металла диазониевым катионом позволяет захватывать в виде ГКР-активного диазокрасителя фенол, образующийся при гидролизе фенилфосфата под действием щелочной фосфатазы [44]. Продемонстрирована возможность использования таких усиливающих наноструктур как для измерения активности фермента, так и для регистрации результатов ИФА на холеротоксин с пределами обнаружения значительно ниже по сравнению с коммерческими колориметрическими наборами. Аскорбат, продукт ферментативного гидролиза 2-фосфата-L-аскорбиновой кислоты под действием щелочной фосфатазы, может быть связан иммобилизованным на поверхности тиольным производным *o*-фенилендиамина [45]. Получаемое полициклическое соединение может регистрироваться как флуорометрически, так и методом ГКР по интенсив-

ности полосы 1059 см^{-1} . Повышение селективности к продукту ферментативной реакции может достигаться не только за счет химического его превращения, но и за счет нековалентных электростатических взаимодействий. Этот принцип был продемонстрирован для определения активности протеинкиназы А (ПКА) [КФ 2.7.11.11]. Субстратом выступал положительно заряженный пептид, содержащий 2 остатка аргинина и модифицированный РГКР-активным красителем 5-карбокситетраметилпроламином. Поверхность золотых наночастиц для придания ей положительного заряда модифицировали спермином. В отсутствие ПКА субстрат не взаимодействовал с наночастицами по причине электростатического отталкивания. Введение отрицательного заряда в молекулу в ходе ферментативного фосфорилирования остатка серина способствовало его связыванию с поверхностью наночастиц и появлению в спектре РГКР при длине волны возбуждения 532 нм интенсивных полос красителя [46]. Предел обнаружения ПКА составил 30 мУ/мл, что сопоставимо с коммерческими ИФА наборами, при этом РГКР-методика является более экспрессной (75 минут). Продemonстрирована возможность использования методики для измерения ингибиторов ПКА и содержания фермента в клеточных лизатах.

Ввиду того, что наибольшее усиление в ГКР достигается для молекул, находящихся в непосредственной близости от поверхности металла, были предприняты попытки проведения ферментативной реакции с использованием субстрата, заранее иммобилизованного на поверхности металла. Прототип такой системы описан для скрининга активности протеаз [47] трипсина [КФ 3.4.21.4] и эндопротеиназы Glu-C [КФ 3.4.21.19]. Субстратами служили иммобилизованные модельные пептиды; их расщепление приводило к изменению в спектрах ГКР. Максимальная степень превращения составляла порядка 50%, что авторы связывают с ограниченной доступностью иммоби-

лизованного субстрата. Модификацией этого подхода может служить работа [48], посвященная определению активности плазмина [КФ 3.4.21.7] в молоке. Пептид, являющийся субстратом плазмина, иммобилизовали на золотой поверхности, и его свободный конец химически модифицировали золотыми наностержнями с ГКР-меткой (4-меркапто-2-нитробензойная кислота). В ходе ферментативной реакции происходило расщепление пептида, приводящее к снижению интенсивности полосы 1331 см^{-1} ГКР-метки.

Усиление полос в режиме ГКР является размерно зависимым. Если субстрат или продукт ферментативной реакции способен осуществлять рост или растворение металлических усиливающих наноструктур с иммобилизованной на их поверхности ГКР-меткой, интенсивность ее спектра может служить аналитическим сигналом, связанным с ферментативной активностью. Например, пероксид водорода может растворять агрегаты серебряных наночастиц, сигнал ГКР иммобилизованной на них 4-меркаптобензойной кислоты при этом снижается. Каталаза [КФ 1.11.1.6] вызывает разложение H_2O_2 , что приводит к сохранению сигнала ГКР. Как итог, интенсивность сигнала ГКР-метки возрастает с повышением концентрации фермента [49]. Генерация аскорбата под действием щелочной фосфатазы из 2-фосфата-L-аскорбиновой кислоты может быть использована для роста серебряных наночастиц. В зависимости от присутствия/отсутствия в системе металлических зародышей, это приводит к повышению или снижению интенсивности сигнала ГКР добавленного репортерного соединения [50–53]. Этот подход используется в качестве одного из вариантов реализации ИФА на основе ГКР.

Интересно отметить использование ГКР для тестирования активности теломеразы [КФ 2.7.7.49] как маркера пролиферативной активности клеток с использованием схемы усиления

сигнала от ДНК, синтезированной теломеразой. Предложена стратегия двойного усиления сигнала [54,55] при обнаружении теломеразы, связанная с генерацией интенсивных сигналов ГКР. Эта стратегия основана на встраивании теломеразных праймеров в структуру длинноцепочечной ДНК для запуска сопряженных циклических реакций типа амплификации со смещением нитей (SDA) или управляемой энтропией (EDCR) и каталитической сборки шпилек (CHA), что в итоге приводит к образованию комплексов ГКР активного соединения и усиливающего сигнал плазмонного субстрата. Количественное измерение теломеразы в лизатах нормальных клеток показывает предел обнаружения на уровне 7.6×10^{-6} МЕ/мл [55] или в экстрактах от 500 клеток [54], что значительно ниже соответствующих величин для описанных в литературе методов.

Использование фермента в качестве амплификатора в биоаналитической реакции описано и для анализа на основе аптамеров. Так в работе [56] предложено использовать экзонуклеазу III [КФ 3.1.11.2] в системе суперчувствительного определения охратоксина с использованием спектроскопии ГКР на основе сборки плазмонных агрегатов золотых наночастиц. В этом случае охратоксин взаимодействует с избытком физического аптамера. Затем смеси добавляют раствор специфичной к аптамеру к-ДНК в эквимольной аптамеру концентрации. В итоге, в растворе остается свободная к-ДНК в концентрации, равной исходной концентрации токсина. Свободная к-ДНК запускает амплификационный цикл: 1) гибридизация к-ДНК с предварительно собранным комплексом специального ДНК зонда и соответствующей ему матричной молекулой ДНК, который содержит помимо двухцепочечного фрагмента одноцепочечный фрагмент, специфически узнающий к-ДНК, так что остается не более трех оснований одноцепочечной ДНК;

2) экзонуклеаза III катализирует поэтапное удаление мононуклеотидов с 3'-конца матричной ДНК такого комплекса, приводя к высвобождению к-ДНК и специального ДНК зонда; 3) цикл повторяется, приводя к образованию все новых молекул специального ДНК зонда. Специальный ДНК зонд выступает в качестве линкера-компоновщика при сборке агрегатов золотых наночастиц двух типов, покрытых специфическими к различным участкам зонда фрагментами ДНК и содержащими ГКР активную метку. Агрегация наночастиц приводит к образованию «горячих точек» и генерации мощного сигнала ГКР. Предел обнаружения охратоксина этим методом составляет величину 0.83 фг/мл, что на 3 порядка ниже существующих флуоресцентных и других методов.

Таким образом, использование различных модификаций спектроскопии ГКР открывает широкие биоаналитические возможности, как при непосредственном определении активности ферментов, так и в сочетании с процессом ферментативного катализа. Особенно ярко эти возможности проявляются при биомедицинских исследованиях и позволяют фактически создавать новые поколения молекулярно-диагностических систем.

Ссылки

1. I. N. Kurochkin, A. D. Vasilyeva, E. G. Evtushenko, A. V. Eremenko, D. V. Pergushov, L. V. Sigolaeva, *Moscow Univ. Chem. Bull.* **2023**, 78, 201.

2. E. Le Ru, P. Etchegoin, *Principles of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: And Related Plasmonic Effects*, **2008**, Elsevier Science, Oxford, 688 p.

3. M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* **1974**, 26, 163.

4. T. Bora, In: *Noble and Precious Metals — Properties, Nanoscale Effects and Applications* (Eds. M. S. Seehra, A. D. Bristow), **2017**, IntechOpen, Rijeka, pp. 117-135.
5. K. Kneipp, H. Kneipp, H. G. Bohr, In: *Surface-Enhanced Raman Scattering: Physics and Applications* (Eds. K. Kneipp, M. Moskovits, H. Kneipp), **2006**, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, pp. 261-277.
6. Y. Yuan, N. Panwar, S.H.K. Yap, Q. Wu, S. Zeng, J. Xu, S. C. Tjin, J. Song, J. Qu, K.-T. Yong, *Coord. Chem. Rev.* **2017**, 337, 1.
7. G. McNay, D. Eustace, W.E. Smith, K. Faulds, D. Graham, *Appl. Spectrosc.* **2011**, 65, 825.
8. I. A. Larmour, K. Faulds, D. Graham, *Chem. Sci.* **2010**, 1, 151.
9. R. L. Garrell, C. Szafranski, W. Tanner, *Proc.SPIE*, **1990**, 1336, 264.
10. C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro, R. C. Salvarezza, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1805.
11. B. Pergolese, M. Muniz-Miranda, A. Bigotto, *J. Phys. Chem. B* **2004**, 108, 5698.
12. J. Chowdhury, M. Ghosh, T.N. Misra, *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 228, 372.
13. S. Kim, S.-W. Joo, *Vib. Spectrosc.* **2005**, 39, 74.
14. V. Ranc, J. Hruzikova, K. Maitner, R. Prucek, D. Milde, L. Kvítek, *J. Raman Spectrosc.* **2011**, 43, 971.
15. B. D. Moore, L. Stevenson, A. Watt, S. Flitsch, N.J. Turner, C. Cassidy, D. Graham, *Nat. Biotechnol.* **2004**, 22, 1133.
16. N. Nechaeva, T. Prokopkina, G. Makhaeva, E. Rudakova, N. Boltneva, C. Dishovsky, A. Eremenko, I. Kurochkin, *Sensors Actuators B Chem.* **2018**, 259, 75.
17. J. J. Morsby, R. L. Thimes, J. E. Olson, H. H. McGarraugh, J. N. Payne, J. P. Camden, B. D. Smith, *ACS Omega* **2022**, 7, 6419.
18. V. Liberman, K. Hamad-Schifferli, T. A. Thorsen, S. T. Wick, P. A. Carr, *Nanoscale* **2015**, 7, 11013.

19. A. M. Ingram, K. Stirling, K. Faulds, B. D. Moore, D. Graham, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 2869.
20. A. Ingram, L. Byers, K. Faulds, B. D. Moore, D. Graham, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 11846.
21. A. Ingram, R. J. Stokes, J. Redden, K. Gibson, B. Moore, K. Faulds, D. Graham, *Anal. Chem.* **2007**, 79, 8578.
22. A. Ingram, B. D. Moore, D. Graham, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 1569.
23. C. Westley, Y. Xu, A. J. Carnell, N. J. Turner, R. Goodacre, *Anal. Chem.* **2016**, 88, 5898.
24. N. Masurier, F. Soualmia, P. Sanchez, V. Lefort, M. Roué, L. T. Maillard, G. Subra, A. Percot, C. El Amri, *European J. Org. Chem.* **2019**, 2019, 176.
25. F. Soualmia, S. A. Touhar, L. Guo, Q. Xu, M. V. Garland, P. Colomban, A. Percot, C. El Amri, *J. Raman Spectrosc.* **2017**, 48, 82.
26. C. Fu, L. Zhang, M. Bao, Y. Zhang, Y. Li, Y. Wu, Y. M. Jung, *Analyst* **2022**, 147, 5718.
27. E. G. Evtushenko, E. S. Gavrilina, A. D. Vasilyeva, L. V. Yurina, I. N. Kurochkin, *Molecules* **2024**, 29, 793.
28. Z. Yu, L. Chen, Y. Wang, X. Wang, W. Song, W. Ruan, B. Zhao, Q. Cong, *J. Raman Spectrosc.* **2014**, 45, 75.
29. L. Zhan, S. J. Zhen, X. Y. Wan, P. F. Gao, C. Z. Huang, *Talanta* **2016**, 148, 308.
30. A. M. Kudryashova, A. G. Galstian, E. B. Faizuloev, A. Y. Olenin, G. V. Lisichkin, V. V. Zverev, O. V. Borisova, *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* **2018**, 95, 25.
31. W. Guo, Y. Hu, H. Wei, *Analyst* **2017**, 142, 2322.
32. C. Ruan, W. Wang, B. Gu, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 3379.
33. F. M. Campbell, A. Ingram, P. Monaghan, J. Cooper, N. Sattar, P. D. Eckersall, D. Graham, *Analyst* **2008**, 133, 1355.
34. Y. Chen, H. Cheng, K. Tram, S. Zhang, Y. Zhao, L. Han, Z. Chen, S. Huan, *Analyst* **2013**, 138, 2624.

35. A. G. Bozkurt, G. G. Buyukgoz, M. Soforoglu, U. Tamer, Z. Suludere, I. H. Boyaci, *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2018**, 194, 8.
36. J. Dong, Y. Li, M. Zhang, Z. Li, T. Yan, W. Qian, *Anal. Methods* **2014**, 6, 9168.
37. Y. Hu, J. Liao, D. Wang, G. Li, *Anal. Chem.* **2014**, 86, 3955.
38. J. Feng, H. Lu, Y. Yang, W. Huang, H. Cheng, H. Kong, L. Li, *Microchim. Acta* **2021**, 188, 280.
39. H. Lu, Y. Yang, R. Chen, W. Huang, H. Cheng, X. Liu, H. Kong, L. Li, J. Feng, *Microchem. J.* **2022**, 183, 108114.
40. K. A. Hollywood, I. T. Shadi, R. Goodacre, *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 7308.
41. T. Pan, D.-W. Sun, J. Paliwal, H. Pu, Q. Wei, *J. Agric. Food Chem.* **2018**, 66, 11180.
42. F. Cao, M. Wang, X. Yi, D. Sun, *Analyst* **2022**, 147, 2494.
43. X. Wu, Y. Li, J. Wang, H. Zhou, X. Tang, Y. Yang, Z. Wang, D. Chen, X. Zhou, J. Guo, H. Cai, J. Zheng, P. Sun, *Anal. Chem.* **2020**, 92, 15050.
44. N. Li, H. Chen, M. Zhang, Y. Zha, Z. Mu, Y. Ma, P. Chen, *Sensors Actuators B Chem.* **2020**, 315, 128135.
45. W. Wang, Y. Zhang, W. Zhang, Y. Liu, P. Ma, X. Wang, Y. Sun, D. Song, *Anal. Chim. Acta* **2021**, 1183, 338989.
46. R. Liu, C. Xie, Y. Yan, L. Hu, S. Wang, K. A. Alamry, H. M. Marwani, L. Chen, *Nanomaterials* **2020**, 10, 575.
47. P. C. Wuytens, H. Demol, N. Turk, K. Gevaert, A. G. Skirtach, M. Lamkanfi, R. Baets, *Faraday Discuss.* **2017**, 205, 345.
48. N. N. Yazgan, T. Bulat, A. Topcu, F. C. Dudak, I. H. Boyaci, U. Tamer, *Food Chem.* **2022**, 372, 131235.
49. J. Liang, H. Liu, C. Huang, C. Yao, Q. Fu, X. Li, D. Cao, Z. Luo, Y. Tang, *Anal. Chem.* **2015**, 87, 5790.
50. J. Chen, Y. Luo, Y. Liang, J. Jiang, G. Shen, R. Yu, *Anal. Sci.* **2009**, 25, 347.

51. L. Yang, M. X. Gao, L. Zhan, M. Gong, S. J. Zhen, C. Z. Huang, *Nanoscale* **2017**, 9, 2640.

52. Y. Zeng, J.-Q. Ren, S.-K. Wang, J.-M. Mai, B. Qu, Y. Zhang, A.-G. Shen, J.-M. Hu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, 9, 29547.

53. X.-H. Pham, E. Hahm, T. H. Kim, H.-M. Kim, S. H. Lee, S. C. Lee, H. Kang, H.-Y. Lee, D. H. Jeong, H. S. Choi, B.-H. Jun, *Nano Res.* **2020**, 13, 3338.

54. Y. Li, H. Han, Y. Wu, C. Yu, C. Ren, X. Zhang, *Biosens. Bioelectron.* **2019**, 142, 111543.

55. K. Shen, W. Hua, S. Ge, Y. Mao, Y. Gu, G. Chen, Y. Wang, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2023**, 10, 1124441.

56. D. Huang, J. Chen, L. Ding, L. Guo, P. Kannan, F. Luo, B. Qiu, Z. Lin, *Anal. Chim. Acta* **2020**, 1110, 56.

3. КОМБИНИРОВАННЫЕ МЕТОДЫ КВАНТОВОЙ И МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕХАНИКИ В МОДЕЛИРОВАНИИ БЕЛКОВЫХ СИСТЕМ

Поляков И. В.^{1,2}, Хренова М. Г.^{1,2}

*¹Московский государственный университет имени
М. В. Ломоносова, Москва*

*²Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля
Российской академии наук, Москва*

Более 10 лет назад — в 2013 году — Нобелевская премия по химии была присуждена Мартину Карплюсу, Майклу Левитту и Ари Уоршелу «за создание многоуровневых моделей сложных химических систем». Их основополагающие работы были опубликованы еще в конце 1970-х [1], тогда как широкое применение разработанные ими методы получили значительно позже в 1990-х с развитием вычислительной техники. Сейчас приближение комбинированной квантовой и молекулярной механики (КМ/ММ) является основным при моделировании процессов и реакций в биомакромолекулярных системах.

Сотрудники нашей лаборатории пользуются подобными методами для моделирования химических реакций в белковых системах уже последние 20 лет [2,3]. В чём же суть, зачем нужен и чем важен подход КМ/ММ? Реальные биомолекулярные системы часто состоят из многих миллионов атомов, очевидно, что чем более масштабный процесс хочется описать, тем более грубые методы приходится использовать, поскольку вычислительные ресурсы всегда ограничены, как, собственно, и само время счёта [4]. И если необходимо получить динамику системы из миллионов атомов на длине траектории в миллисекунду, то уже становятся недоступны даже атомистические подходы. В таком случае используются крупнозернистые модели, в которых уже группа атомов рассматривается как частица, а меж-

ду различными частицами прописаны потенциалы взаимодействия. Часто рассматриваемые системы всё же имеют меньший размер порядка сотен тысяч атомов, а интересующие исследователей процессы возможно описать траекториями длиной в микросекунду — это позволяет использовать такой атомистический подход как классическая молекулярная динамика, имеющая эффективную реализацию в современных программных пакетах, например, NAMD [5] и GROMACS [6].

В классической молекулярной динамике [7] атомистические потенциалы задаются в модели «шарики на пружинках», учитывая жёсткость связей, валентных углов, двугранных углов, электростатических взаимодействий частичных атомных зарядов, а также несвязных Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий. При этом существуют методы, которые ускоряют обход конфигурационного пространства в методе молекулярной динамики, такие как метод зонтичной выборки [8], метадинамика [9], метод адаптивной силы смещения [10], ускоренная молекулярная динамика, например, в реализации GAMD [11]. Классическая молекулярная динамика не позволяет рассчитывать химические реакции, а ведь они являются самой сутью существования белковой жизни.

Описание химических реакций требует уже не атомистического подхода, а рассмотрения молекулярной системы как совокупности ядер и электронов, то есть в рамках методов квантовой механики. Аналитическое решение уравнения Шредингера для волновой функции возможно лишь в случае одноэлектронной системы, поэтому прибегают к различным численным *ab initio* или полуэмпирическим приближениям, наиболее популярное из которых — метод функционала электронной плотности (ТФП) [12], который позволяет рутинно рассчитывать молекулярные системы из сотен атомов и тысяч электронов с приемлемой точностью. Хотя даже такое кванто-

вохимическое приближение не может моделировать большие белковые молекулы из многих тысяч атомов, поскольку методы ТФП масштабируются примерно как $O(N^{3.5})$, тогда как более точные подходы могут масштабироваться ещё хуже — как $O(N^5)$ — $O(N^6)$.

Тогда на помощь могут прийти методы, которые разделяют большую молекулу на подсистемы, описывают их отдельно, но согласованно, например, метод фрагментных молекулярных орбиталей (ФМО) [13]. В методе ФМО для каждого фрагмента системы решается квантовая задача в электростатическом поле других фрагментов итеративно до сходимости фрагментного поля, затем рассчитываются поправки от фрагментных пар, а в более точном варианте еще и троек. Опыт нашей лаборатории [14] показывает, что данный метод возможно успешно применять в описании ферментативных реакций, однако, это гораздо более сложно и вычислительно затратно по сравнению с более простым подходом — комбинированным методом квантовой и молекулярной механики, причём, метод КМ/ММ возможно широко применять как для расчёта стационарных точек, так и в молекулярной динамике.

Почему вообще можно выделить часть молекулярной системы в квантовую (КМ) часть, а остаток — в молекулярно-механическую (ММ)? Потому что, в основном, те превращения, для которых необходимо использование квантовой модели, достаточно локализованы — в реакции участвуют считанные атомы, которые вместе с ближайшим локальным окружением становятся КМ подсистемой, то есть это десятки или сотни атомов, что соответствует современным вычислительным возможностям для методов ТФП. Контрпримером здесь являются фотосинтетические системы, где возбуждение делокализовано по кольцу из 32 молекул бактериохлорофилла, однако, даже в этом случае возможно применение

квантовых методов, пусть и с некоторыми дополнительными ухищрениями [15].

При построении КМ/ММ молекулярной модели всегда встаёт вопрос о выборе КМ подсистемы. С одной стороны, чем больше молекулярных фрагментов описывать методами квантовой химии, тем точнее будет расчёт, но тем больше вычислительных ресурсов и времени он затратит. На эту тему существует много работ, но можно, например, выделить [16], где было показано, что, в целом, результат с равномерным увеличением квантовой части сходится медленно, поэтому необходимо отбирать те остатки, которые действительно важны, а не просто находятся в каком-то формальном радиусе отсечения. Такой отбор возможно осуществить, например, с помощью анализа переноса заряда, рассматривая различные расширенные квантовые системы.

Важным вопросом является учёт влияния молекулярно-механической подсистемы на квантовую: используется либо «механическое» внедрение (нет влияния зарядов) или «электронное» (учитываются вклады классических зарядов в одноэлектронный Гамильтониан квантовой подсистемы). Также существуют различные схемы расчёта полной энергии КМ/ММ системы — аддитивная и субтрактивная, что на практике оказывается не так важно [17], но субтрактивная схема требует знания всех ММ параметров и для квантовой части, что далеко не всегда удобно. В ММ подсистеме чаще всего используются силовые поля CHARMM [18] и AMBER [19]. Работ по систематическому сравнению влияния силового поля на получаемые энергетические профили в рамках одной и той же задачи в рамках идентичной программной реализации КМ/ММ практически нет. По всей видимости, это связано как с затратностью расчётов, ведь, по сути, одну и ту же работу необходимо было бы проделать дважды, другим фактором

являются особенности программной реализации, которые не позволяют работать с разными силовыми полями, а только лишь с каким-то одним определённым. Это не удивительно, особенно для самих программ AMBER и CHARMM, которые тоже реализуют КМ/ММ в сопряжении с различными квантовыми пакетами, но лишь в рамках соответствующих силовых полей. В нашей лаборатории на примере реакции протеолиза в активном центре матриксной металлопротеиназы второго типа показано, что замена силового поля для описания белковой макромолекулы незначительна и составляет около 1 ккал/моль [20]. Однако для более детального изучения, разумеется, необходим анализ большего количества ферментативных реакций.

Основной проблемой метода КМ/ММ является описание границы квантовой и молекулярной подсистем, поскольку в белковых системах эта граница проходит по ковалентным связям. По нашему опыту схема с так называемыми связующими или «линк» атомами, которые насыщают порванную валентность на границе квантовой подсистемы, является достаточно распространенной и удобной. Альтернативой является схема с замороженными локализованными орбиталями [1]. Допустим, граница проходит по связи СА-СВ боковой цепи аминокислотного остатка- что является достаточно распространенной ситуацией. Тогда атом СВ относится к квантовой подсистеме, а вместо связи с атомом СА, которого уже нет в квантовой подсистеме, связь насыщается атомом водорода. Со стороны же молекулярно-механической подсистемы необходимо что-то сделать с зарядом на атоме СА, поскольку иначе, находясь очень близко, он будет излишне поляризовывать квантовую подсистему, в таком случае существуют различные схемы обнуления или перераспределения таких зарядов.

Кажется, что этот нюанс — самая малость, которая ни на что значительно повлиять не может, если размер квантовой подсистемы большой, но с размером КМ части растёт и размер её границы. Мы показали, что игнорирование схемы перераспределения заряда на границе может значительно влиять на энергетический профиль реакции [21], отдельной проблемой становится воспроизводимость расчётом с помощью различных программных реализаций КМ/ММ, потому что, во-первых, у них могут быть установлены различные параметры по умолчанию, а во-вторых, может не быть возможности выбрать одну и ту же схему. Проблема с воспроизводимостью [21] КМ/ММ расчётов на самом деле стоит довольно остро, ведь есть огромное количество параметров как в КМ программах (те же решётки ТФП, например, точность интегрального скрининга, самосогласования и т. п.), так и в ММ, а также настройки КМ/ММ интерфейса. В случае поиска стационарных точек сильно влияют различные алгоритмы минимизации полной энергии. Также в настоящий момент есть понимание, что поиск стационарных точек — не лучшее решение для белковых систем с большим количеством степеней свободы, необходимо строить профиль свободной энергии через потенциал средней силы. Часто рецензенты напрямую указывают, что работа может быть и хорошая, но расчёта стационарных точек на поверхности потенциальной энергии недостаточно, и мы сами с этим сталкивались [22]. Расчёт таких профилей крайне затратен и требует сотен тысяч шагов МД траектории. Стоит отметить, что и решение ММ задачи, и функции интерфейса работают быстро, а львиную долю времени счёта задачи занимает именно расчёт энергии и её градиента в КМ подсистеме.

В целом, современные методы квантовой химии для описания молекулярных систем получили большое распространение в связи компьютерной революцией, произошедшей за послед-

ние десятки лет, ведь вычислительная мощность одной рабочей станции сейчас может быть гораздо выше, чем у мощнейшего суперкомпьютера 20 лет назад, а ведь за это время шагнули вперед и суперкомпьютерные технологии, а также специализированное программное обеспечение. Появились, например, новые программные пакеты, которые позволяют эффективно использовать мощности графических ускорителей (GPU) для задач квантовой химии, например, Terachem [23]; продолжают своё развитие и широко известные программные пакеты, такие как GAMESS [24]. К сожалению, добавление новых методов и опций расчёта не означает оптимизаций критических мест кода, и если матричные операции во всех современных квантовых пакетах отданы на реализацию оптимизированным библиотекам BLAS под соответствующее оборудование (Intel MKL для процессоров Intel; AOCL-BLAS для процессоров AMD; cuBLAS для графических ускорителей NVIDIA), то расчёт, например, одно- и двухэлектронных интегралов, обменно-корреляционной части функционала на решётке остаётся на совести разработчиков квантовых пакетов. Часто лицензии программного обеспечения напрямую запрещают проводить и публиковать какие-либо сравнения с другими кодами, поэтому в литературе вы практически не найдёте каких-либо масштабных и методичных сравнений. Мы тоже не будем ничего нарушать, но скажем лишь, что разница между различными популярными программами из списка (NWChem/GAMESS/ORCA/Q-Chem/Gaussian) на одном и том же центральном процессоре для одной и той же системы, используя метод ТФП с функционалом PBE0 и достаточно умеренным базисом 6-31G* составляет более 5 раз! А если сравнивать современный процессор с современным графическим ускорителем, то и более 40 раз в пользу Terachem на GPU NVIDIA. К сожалению, реализовать алгоритмы квантовой химии на GPU довольно сложно, поэтому разбег

между различными программами, которые могут использовать GPU, может составлять целый порядок, то есть медленная программа на GPU может работать даже хуже, чем средняя на центральном процессоре.

В последние годы секретом продуктивных расчётов биомолекулярных систем методом КМ/ММ в нашей лаборатории стало использования комбинации программ NAMD [25] и Terachem [23]. При этом используется модуль colvar [26] для работы с координатой реакции в методе зонтичной выборки и термодинамическое интегрирование [27] для получения «очищенных» профилей свободной энергии. Стоит также отметить, что мы модифицировали стандартный КМ/ММ интерфейс NAMD/Terachem для более точного учёта влияния КМ подсистемы на ММ, поскольку по умолчанию расчёты электростатических сил проводились приближенно, что создавало нескомпенсированную общую силу в молекулярной системе [28].

Далее будут представлены некоторые примеры успешного применения метода КМ/ММ для описания каталитических и фотонных процессов в белковых системах. Среди ферментативных систем в нашей лаборатории особое внимание уделяется изучению процессов разрыва Р-О связи и протеолиза. Среди фоторецепторных систем наибольшее внимание уделяется флуоресцентным белкам, их химическим и фотохимическим превращениям.

Начало пандемии коронавируса SARS-CoV-2 сместило фокусы исследования в сторону ферментов, связанных с развитием этого заболевания. В частности, важным объектом оказалась основная протеаза M^{pro} SARS-CoV-2. Эта протеаза обладает узкой субстратной специфичностью и способна гидролизовать только пептидную связь, перед которой находится остаток глутамина (Рис. 1). Более того, остаток перед глутамином также значительно влияет на каталитическую константу; в зависимо-

сти от конкретного аминокислотного остатка изменения константы скорости могут составлять более 50 раз. Это связано с биологической функцией фермента. Для функционирования вируса необходим набор белков, который образуется в ходе протеолиза неструктурированного полипептида именно основной протеазой и образования набора функциональных белков. Именно поэтому протеолиз должен проходить для строго определенных связей.

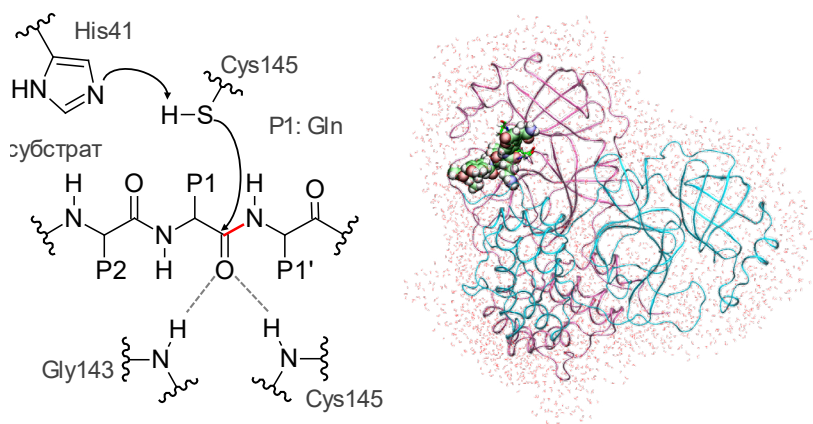


Рисунок 1. Строение активного центра основной протеазы (слева) и модель димерного белка с субстратом в одном из мономеров (справа). Белок показан лентами. Молекулы воды сольватной оболочки представлены красными угловыми линиями. Квантовая подсистема включает фрагмент субстрата (шаровое представление), оксианионный центр, нуклеофил и остаток гистидина каталитической диады (показаны стрелками). Здесь и далее углерод показан зеленым, кислород — красным, азот — синим, водород — белым, сера — желтым, фосфор — оранжевым.

Для определения молекулярных основ различий в наблюдаемых кинетических параметрах проводились расчёты методом молекулярной динамики с КМ/ММ потенциалами с различными

ми субстратами [29][30]. Было показано, что динамические особенности фермент-субстратных комплексов определяют скорость последующей реакции. Так, для более быстрых субстратов наблюдались меньшие значения расстояний нуклеофильной атаки и более короткие длины водородных связей в оксианионном центре. Последние обуславливают более эффективную поляризацию карбонильной группы основной цепи пептидного субстрата, что способствует формированию электрофильного сайта на атоме углерода.

Знание молекулярного механизма реакции, прежде всего, представляет фундаментальный интерес, а также может быть использовано для решения прикладных задач. В частности, на основании механизма реакции протеолиза в активном центре основной протеазы коронавируса были предложены механизмы образования ковалентных комплексов фермент-ингибитор, а также предложены новые ковалентные ингибиторы — потенциальные лекарственные препараты (Рис. 2) [22]. В работе рассмотрены два известных соединения — нирматрелвир и кармофур, а также два новых ингибитора — X77A и X77C. Согласно рассчитанным механизмам реакций, эти четыре соединения взаимодействуют с активным центром основной протеазы по трем различным механизмам. Все механизмы начинаются с нуклеофильной атаки каталитическим остатком цистеина Cys145 атома углерода ингибитора, сопровождающейся переносом протона на аминокислотный остаток гистидина His41 каталитической диады. В случае кармофура и соединения X77A образование ковалентного аддукта сопровождается отщеплением фтор-урацила. Реакция с X77C проходит по механизму нуклеофильного замещения по ароматическому кольцу S_NAr . Реакция с нирматрелвиром приводит к образованию ковалентного аддукта без отщепления фрагмента ингибитора.

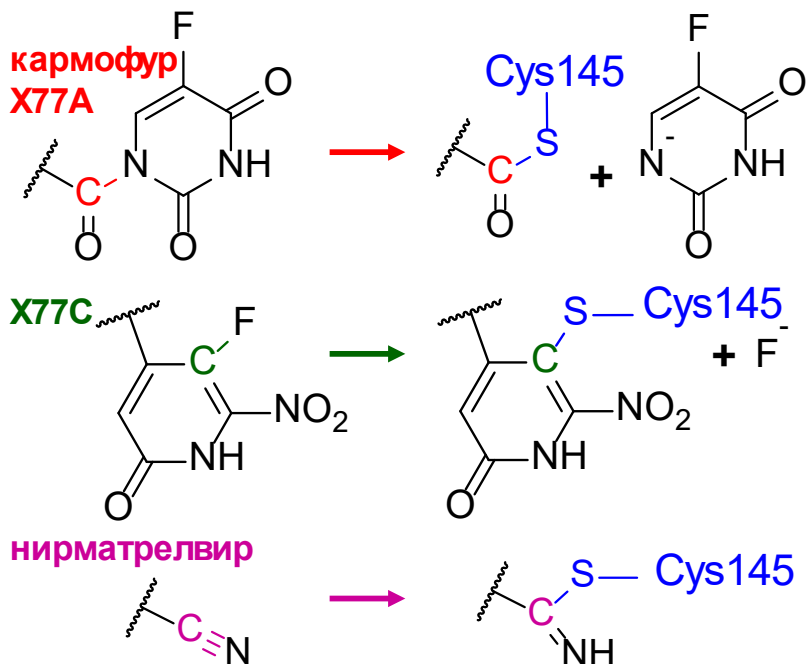


Рисунок 2. Реакции образования ковалентных комплексов ингибиторов с нуклеофильным остатком цистеина основной протеазы вируса SARS-CoV-2.

Другим важным примером реакции протеолиза является превращение N-ацетиласпартилглутамата в N-ацетиласпартат и L-глутамат в активном центре глутамат карбоксипептидазы II. Особенностью данной реакции является то, что активный центр содержит катионы цинка и нуклеофильной частицей является гидроксид-анион. Помимо механизма ферментативной реакции, интерес представляет связка структурных данных, получаемых из КМ/ММ динамических траекторий и анализа электронной плотности в различных кадрах траектории [31]. Помимо геометрических критериев, в работе также проводится анализ электронной плотности в рамках метода натураль-

ных связевых орбиталей NBO [32] и квантово-топологической теории атомов в молекулах QTAIM [33]. Метод NBO позволяет разделить всю электронную плотность системы на понятные с точки зрения химии элементы электронной структуры, такие как неподеленные электронные пары и двухцентровые связи. Квантово-топологическая теория позволяет проанализировать электронную плотность как функцию от трех пространственных координат и определить ее критические точки. Важным для химии является то, что такой анализ позволяет охарактеризовать межатомные взаимодействия. Также топологический анализ позволяет определить оболочечную структуру атомов и определить области концентрации и деконцентрации электронной плотности, а также многие другие более тонкие эффекты. Помимо стационарных состояний на поверхности потенциальной энергии эти подходы можно применять и для анализа многих кадров молекулярно-динамических траекторий, что и было проведено для глутамат карбоксипептидазы в комплексе с субстратом. На Рис. 3 представлены результаты, полученные двумя разными методами — NBO и QTAIM. Методы дают согласованную картину и позволяют продемонстрировать, что динамика фермент-субстратного комплекса позволяет эффективно реализовывать состояния, стимулирующие протекание химической реакции за счет поляризации карбонильной группы субстрата.

Другим важным направлением, которое в течение многих лет развивается в лаборатории, является определение механизмов разрыва P–O связи в активных центрах ферментов. Наиболее значимые результаты достигнуты в изучении реакции гидролиза гуанозинтрифосфата (ГТФ) до гуанозиндифосфата (ГДФ) и фосфата малыми ГТФазами, в том числе, в комплексе с белками ускорителями. Очень наглядно можно наблюдать технически прогресс как раз на примере расчета механизма

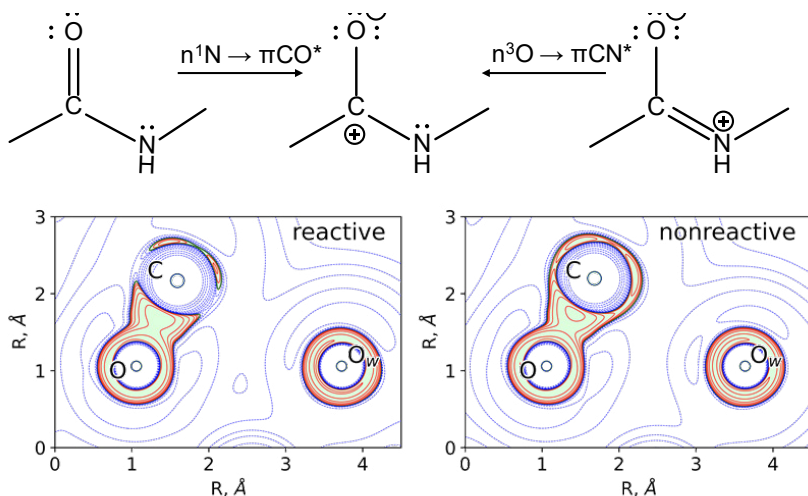


Рисунок 3. Сверху: результаты NBO анализа области разрываемой пептидной связи субстрата. Структура слева соответствует нереакционному состоянию, когда ещё не произошла поляризация карбонильной группы. В средней и правой структурах наблюдается поляризация, приводящая к накоплению отрицательного заряда на карбонильном кислороде. Наиболее реакционноспособной является средняя структура с положительным зарядом на атоме углерода, который становится выраженным электрофильным сайтом. Снизу: карты лапласиана электронной плотности, построенные в плоскости карбонильной группы субстрата и атома кислорода нуклеофила. Синие пунктирные линии соответствуют положительным значениям (областям деконцентрации), сплошные красные линии отвечают областям концентрации (отрицательные значения), зеленая линия — нулевое значение. Слева видна область деконцентрации электронной плотности на атоме углерода в направлении нуклеофильной атаки, что отвечает реакционной структуре. На правой структуре атом углерода полностью окружен областью концентрации электронной плотности, что препятствует реакции [32].

гидролиза ГТФ комплексом малой ГТФазы HRAS с белком-ускорителем p120GAP [34–36] (Рис. 4). При этом даже начальные модели помогли с качественным описанием механизма реакции, в котором молекула воды, атакующая концевую фосфатную группу, присоединяется не напрямую, а через образование таутомерной формы каталитического остатка Gln61, при

этом так называемый «аргининовый палец» белка GAP вносит значительный вклад в стабилизацию интермедиата реакции при отщеплении концевой фосфатной группы.

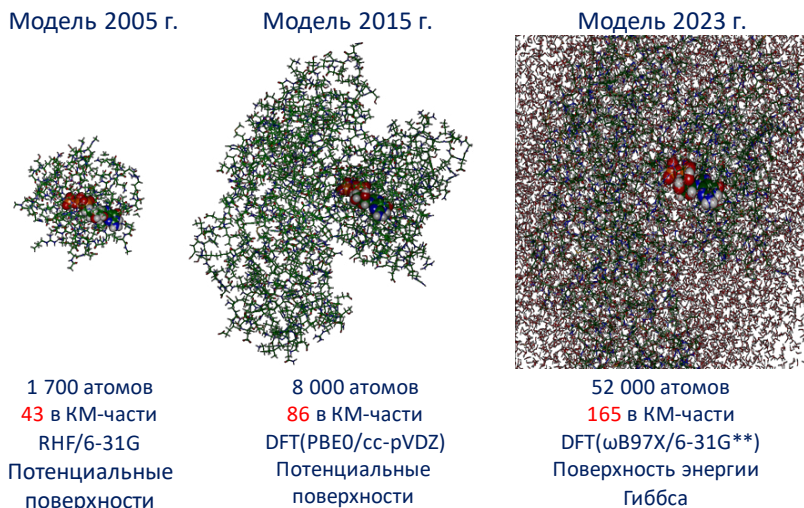


Рисунок 4. Размеры модельных систем и методы расчёта, использованные в разные годы для определения механизма реакции гидролиза малой ГТФазы с белком ускорителем.

Помимо ферментативных реакций, большой интерес представляют фоторецепторные системы, изучение которых также невозможно без применения методов квантовой химии. Одним из основных маркеров в живых системах, применяемых как в клеточных культурах, так и в тканях живых организмов являются флуоресцентные белки семейства зеленого флуоресцентного белка и его красные аналоги (Рис. 5). Хромофоры этих белков образуются автокаталитически из трех аминокислотных остатков. Обширные экспериментальные исследования позволили добиться расширения палитры цветов этих белков от синей до ближней инфракрасной области как за счёт специфических взаимодействий, так и за счет изменения сопряжен-

ной системы двойных и одинарных связей хромофора. С помощью методов молекулярного моделирования удалось описать механизмы формирования и разрушения хромофоров, а также объяснить изменения фотофизических и фотохимических свойств при введении аминокислотных замен [37–43].

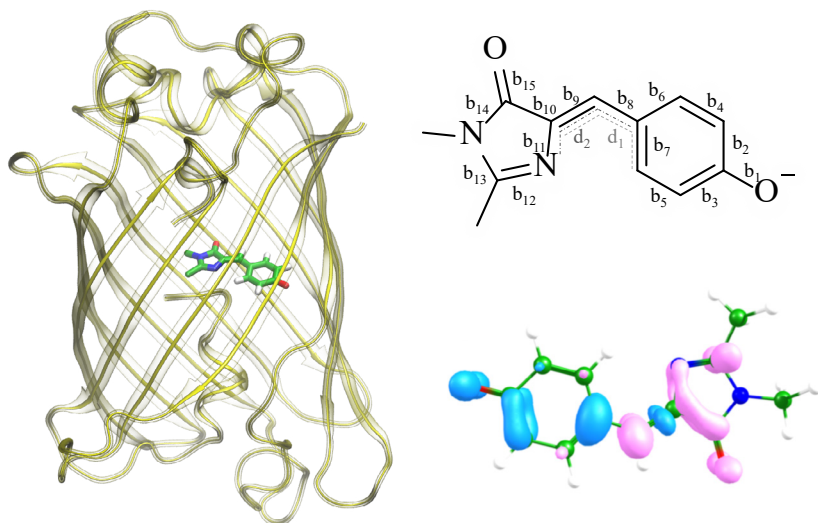


Рисунок 5. Слева — зеленый флуоресцентный со структурой бета-бочонка. Справа сверху — химическая структура хромофора и геометрические параметры, важные для описания хромофора. Справа снизу — перераспределение электронной плотности при электронном возбуждении хромофора, синим показаны области уменьшения электронной плотности, розовым — увеличения.

Накопление большого объема данных молекулярно-динамических траекторий с потенциалами КМ/ММ открывает возможности для их анализа с помощью методов искусственного интеллекта. В частности, такие исследования позволяют определить взаимосвязи геометрических параметров активных центров ферментов или хромофоров с макроскопическими параметрами. Эти исследования, вероятнее всего определяют вектор развития применения методов КМ/ММ в ближайшем будущем.

Ссылки

1. A. Warshel, M. Levitt, *Journal of Molecular Biology*, 1976, **103**, 227–249.
2. A. V. Nemukhin, B. L. Grigorenko, I. A. Topol, S. K. Burt, *Journal of Computational Chemistry*, 2003, **24**, 1410–1420.
3. М. Г. Хренова, Т. И. Мулашкина, А. М. Кулакова, И. В. Поляков, А. В. Немухин, *Вестник Московского Университета. Химия*, 2024, **65**, 87–95.
4. T. Schlick, S. Portillo-Ledesma, *Nature Computational Science*, 2021, **1**, 321–331.
5. J. C. Phillips, D. J. Hardy, J. D. C. Maia, J. E. Stone, J. V. Ribeiro, R. C. Bernardi, R. Buch, G. Fiorin, J. Hénin, W. Jiang, R. McGreevy, M. C. R. Melo, B. K. Radak, R. D. Skeel, A. Singharoy, Y. Wang, B. Roux, A. Aksimentiev, Z. Luthey-Schulten, L. V. Kalé, K. Schulten, C. Chipot, E. Tajkhorshid, *The Journal of Chemical Physics*, 2020, **153**, 044130.
6. M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J. C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, *SoftwareX*, 2015, **1–2**, 19–25.
7. S. Hug, In: *Biomolecular Simulations. Methods in Molecular Biology* (Eds. L. Monticelli, E. Salonen), **2013**, Humana Press, Totowa, NJ, pp. 127–152.
8. G. M. Torrie, J. P. Valleau, *Journal of Computational Physics*, 1977, **23**, 187–199.
9. A. Laio, F. L. Gervasio, *Reports on Progress in Physics*, 2008, **71**, 126601.
10. E. Darve, D. Rodríguez-Gómez, A. Pohorille, *The Journal of Chemical Physics*, 2008, **128**, 144120.
11. Y. Miao, V. A. Feher, J. A. McCammon, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2015, **11**, 3584–3595.
12. N. Mardirossian, M. Head-Gordon, *Molecular Physics*, 2017, **115**, 2315–2372.
13. D. G. Fedorov, T. Nagata, K. Kitaura, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, **14**, 7562.

14. I. V. Polyakov, B. L. Grigorenko, A. A. Moskovsky, V. M. Pentkovski, A. V. Nemukhin, *Chemical Physics Letters*, 2013, **556**, 251–255.
15. I. V. Polyakov, M. G. Khrenova, A. A. Moskovsky, B. M. Shabanov, A. V. Nemukhin, *Chemical Physics*, 2018, **505**, 34–39.
16. M. Karelina, H. J. Kulik, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2017, **13**, 563–576.
17. L. Cao, U. Ryde, *Frontiers in Chemistry*, 2018, **6**, 89.
18. A. D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, M. Karplus *et al.*, *The Journal of Physical Chemistry B*, 1998, **102**, 3586–3616.
19. J. W. Ponder, D. A. Case, *Advances in Protein Chemistry*, 2003, **27**, 27–85.
20. T. Vasilevskaya, M. G. Khrenova, A. V. Nemukhin, W. Thiel, *Journal of Computational Chemistry*, 2015, **36**, 1621–1630.
21. G. Giudetti, I. Polyakov, B. L. Grigorenko, S. Faraji, A. V. Nemukhin, A. I. Krylov, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2022, **18**, 5056–5067.
22. B. L. Grigorenko, I. V. Polyakov, M. G. Khrenova, G. Giudetti, S. Faraji, A. I. Krylov, A. V. Nemukhin, *Journal of the American Chemical Society*, 2023, **145**, 13204–13214.
23. S. Seritan, C. Bannwarth, B. S. Fales, E. G. Hohenstein, C. M. Isborn, S. I. L. Kokkila-Schumacher, X. Li, F. Liu, N. Luehr, J. W. Snyder, C. Song, A. V. Titov, I. S. Ufimtsev, L. Wang, T. J. Martínez, *WIREs Computational Molecular Science*, 2021, **11**, e1494.
24. F. Zahariev, P. Xu, B. M. Westheimer, S. Webb, J. Galvez Vallejo, A. Tiwari, V. Sundriyal, M. Sosonkina, J. Shen, G. Schoendorff, M. Schlinsog, T. Sattasathuchana, K. Ruedenberg, L. B. Roskop, A. P. Rendell, D. Poole, P. Piecuch, B. Q. Pham, V. Mironov, J. Mato, S. Leonard, S. S. Leang, J. Ivanic, J. Hayes, T. Harville, K. Gururangan, E. Guidez, I. S. Gerasimov, C. Friedl,

K. N. Ferreras, G. Elliott, D. Datta, D.D.A. Cruz, L. Carrington, C. Bertoni, G.M.J. Barca, M. Alkan, M. S. Gordon, *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2023, **19**, 7031–7055.

25. M.C.R. Melo, R. C. Bernardi, T. Rudack, M. Scheurer, C. Riplinger, J. C. Phillips, J.D.C. Maia, G. B. Rocha, J. V. Ribeiro, J. E. Stone, F. Neese, K. Schulten, Z. Luthey-Schulten, *Nature methods*, 2018, **15**, 351–354.

26. G. Fiorin, M. L. Klein, J. Hénin, *Molecular Physics*, 2013, **111**, 3345–3362.

27. J. Kästner, W. Thiel, *The Journal of Chemical Physics*, 2005, **123**, 144104.

28. М. Г. Хренова, И. В. Поляков, А. В. Немухин, *Химическая физика*, 2022, **41**, 65–71.

29. M. G. Khrenova, V. G. Tsirelson, A. V. Nemukhin, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2020, **22**, 1906919079.

30. M. G. Khrenova, V. G. Tsirelson, A. V. Nemukhin, *Supercomputing Frontiers and Innovations*, 2020, **7**, 10.14529/jsfi200304.

31. A. V. Krivitskaya, M. G. Khrenova, A. V. Nemukhin, *Molecules*, 2021, **26**, 6280.

32. F. Weinhold, *Israel Journal of Chemistry*, 2021, ijch.202100026.

33. R.F.W. Bader, *Chemical Reviews*, 1991, **91**, 893–928.

34. I. Polyakov, A. Kulakova, A. Nemukhin, *Biophysica*, 2023, **3**, 252.

35. M. G. Khrenova, B. L. Grigorenko, A. B. Kolomeisky, A. V. Nemukhin, *Journal of Physical Chemistry B*, 2015, **119**, 12838–12845.

36. B. L. Grigorenko, A. V. Nemukhin, I. A. Topol, R. E. Cachau, S. K. Burt, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2005, **60**, 495–503.

37. T. Sen, Y. Ma, I. V. Polyakov, B. L. Grigorenko, A. V. Nemukhin, A. I. Krylov, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2021, **125**, 757–770.

38. B. L. Grigorenko, I. V. Polyakov, A. I. Krylov, A. V. Nemukhin, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2019, 123, 8901–8909.
39. A. V. Nemukhin, B. L. Grigorenko, M. G. Khrenova, A. I. Krylov, *Journal of Physical Chemistry B*, 2019, 123, 6133–6149.
40. M. G. Khrenova, I. V. Polyakov, B. L. Grigorenko, A. I. Krylov, A. V. Nemukhin, *The Journal of Physical Chemistry B*, 2017, 121, 10602–10609.
41. B. L. Grigorenko, A. I. Krylov, A.V.A. V. Nemukhin, *Journal of the American Chemical Society*, 2017, 139, 10239–10249.
42. A. Acharya, A. M. Bogdanov, B. L. Grigorenko, K. B. Bravaya, A. V. Nemukhin, K. A. Lukyanov, A. I. Krylov, *Chemical Reviews*, 2017, 117, 758–795.
43. K. B. Bravaya, B. L. Grigorenko, A. V. Nemukhin, A. I. Krylov, *Accounts of Chemical Research*, 2012, 45, 265–275.

4. МЕХАНИЗМ ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ ПЛАЗМЕННЫХ БЕЛКОВ

М. А. Розенфельд, Л. В. Юрина, А. Д. Васильева

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

1. Введение

В живом организме происходит постоянная генерация активных форм кислорода (АФК). Однако, когда вырабатывается избыточное количество АФК или снижается антиоксидантная активность, равновесие между окислением и восстановлением нарушается, вызывая окислительный стресс.

Чрезмерное образование АФК ставит под угрозу целостность структуры, атакуемыми ими мишеней. Почти 70% всех окисленных молекул в клетках, подвергшихся окислительному стрессу, имеют белковую природу [1], свидетельствующее, что белки являются наиболее важными мишенями для окислителей *in vivo*. Окислительно-модифицированные формы белков накапливаются при старении, окислительном стрессе и целом ряде патологических состояниях.

Эволюционно живые организмы выработали механизмы, препятствующие окислительному повреждению белков. Множество ферментативных и не ферментативных эндогенных антиоксидантов обеспечивают первую линию защиты организма от АФК. Их регуляция зависит главным образом от оксидантного статуса клетки, поскольку оксиданты являются их основными модуляторами. Существует множество различных механизмов, с помощью которых антиоксиданты оказывают защитное действие против окислительного повреждения. Они могут удалять свободные

радикалы и другие реакционноспособные соединения, останавливая инициирование или распространение цепных реакций свободных радикалов в системе, ингибируя действие про-окислительных ферментов, таких как липоксигеназы [2].

Другой линией защиты внутриклеточных белков является энзим-опосредованное обратимое окисление серосодержащих аминокислотных остатков цистеина и метионина, которые проявляют максимальную чувствительность ко всем видам АФК по сравнению со всеми другими аминокислотными остатками (АКО). Обратимое окисление остатков метионина обеспечивает надежный механизм, способный удалять реактивные частицы, создавая тем самым цикл с каталитической эффективностью для противодействия или смягчения вредного действия АФК на другие функционально важные аминокислотные остатки. Другими словами, остатки метионина во внутриклеточных белках могут служить эндогенными антиоксидантами, защищающими структуру белка от повреждений при окислительном стрессе [3-6].

Окисление всех других АКО, отличных от цистеина и метионина, носит необратимый характер. Чтобы удалить эти белки из клетки, такие белки необходимо разрушить. Здесь следует отметить, что деградация с энергетической точки зрения рассматривается как неблагоприятное решение, поскольку новый синтез белков (а иногда и деградация) требует большого количества энергии, которая может быть ограничена в условиях окислительного стресса. Однако из-за множества существующих модификаций белков потребуются такое большое количество ферментов репарации, что с точки зрения эволюции разрушение модифицированных белков кажется более предпочтительным. Поэтому деградация поврежденных белков является наиболее релевантным способом борьбы

с невозстанавливаемыми поврежденными белками. Важную роль в процессах деградации поврежденных внутриклеточных белков играет система убиквитин-протеасома [7]. В клиренсе окисленных белков, как клеточного ответа на окислительный стресс, важная роль, в последнее время, отводится селективному нацеливанию белков на лизосомы для их последующей деградации посредством так называемой шаперон-опосредованной аутофагии. Все больше данных указывает на то, что изменения в этих основных протеолитических механизмах приводят к нарушению протеостаза, способствуя развитию различных возрастных нейродегенеративных заболеваний [7,8].

Присутствие и концентрации модифицированных белков, циркулирующих в плазме, зависят от скорости синтеза, концентрации и реактивности АФК и клиренса белков. В отличие от внутриклеточных белков, белки плазмы крови защищены от АФК-опосредованного повреждения в значительно меньшей степени. Уровни антиоксидантных ферментов в крови значительно ниже, чем во внутриклеточном компартменте, хотя белки крови не в меньшей, если не в большей степени подвергаются окислительному стрессу [9]. Кроме того, до настоящего времени не появилось ни одного сообщения об обратимом окислении остатков метионина во внутриклеточных белках [10]. Это подразумевает, что те из остатков метионина, встроенных в первичную структуру белков плазмы крови, которые могут служить врожденными перехватчиками АФК [5,6], в отличие от внутриклеточных белков лишены возможности ферментативным способом быть восстановленными обратно в неокисленную форму. Таким образом, компенсаторные механизмы, нейтрализующие или смягчающие токсическое действие АФК на белки плазмы крови, в значительной степени ограничены.

В данной статье на примере трех белков гемостаза: коагуляционного фактора XIII, фибриногена и плазминогена, кардинальным образом различающихся в структуре и функции, будет показано, что наличие антиоксидантных метионинов в этих белках является общим механизмом защиты этих белков при окислительном стрессе

2. Антиоксидантные метионины в структуре плазминогена

Плазминоген (ПГ) и его активная форма плазмина, принадлежащего к широкому классу сериновых протеиназ, играют важную роль во многих физиологических и патологических процессах, которые помимо фибринолиза включают деградацию внеклеточного матрикса, воспаление, иммунный ответ, ангиогенез, ремоделирование тканей, миграцию клеток и заживление ран.

ПГ человека, известный как Glu-ПГ, циркулирует в плазме крови в виде одноцепочечного белка, полипептидная цепь которого свернута в семь глобулярных доменов. Поскольку Glu-ПГ содержит структурные модули, не являющиеся уникальными для этого белка и присутствующие в других белках, связанных с гемостазом, идентификация пост-трансляционных сайтов в молекуле Glu-ПГ, подвергающейся окислительному стрессу, способствует пониманию общего механизма нарушения структуры и функции других сериновых ферментов при действии на них различных видов АФК.

ПГ долгое время был полностью не исследованной молекулой с точки зрения его АФК-опосредованной окислительной модификации. Нами было исследовано влияние гипохлорит (HOCl/OCl)- и пероксид (H₂O₂)-индуцированного окисле-

ния Glu-ПГ на модификацию отдельных участков первичной структуры профермента и активность плазмина, образующегося из окисленного Glu-П Г. Данные tandemной масс-спектрометрии высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС), полученные для различных образцов Glu-ПГ, обработанного 25, 50 и 100 μM HOCl/OCl или 100 и 300 μM H_2O_2 , показали, что белок претерпевает множественные химические модификации [11]. При этом было обнаружено, что основной вклад в общее число сайтов окисления вносят остатки метионина и триптофана, тогда как вклад остатков тирозина был незначительным (Рис. 1).

Структурная модификация Glu-ПГ, обработанного 25 μM HOCl/OCl или 100 μM H_2O_2 , не влияла на функциональные свойства белка. Это позволяет предположить, что модифицированные в таких окислительных условиях легко окисляемые остатки метионина Met57, Met182, Met385, Met404 и Met788, принадлежащие разным структурным доменам ПГ (Рис. 2), обеспечивают эффективную антиоксидантную защиту, и их окисление не влияет на биологическую активность белка. Тот факт, что Met585 сохранял нативную форму в ПГ, обработанном 25 μM HOCl/OCl , легко окисляясь либо 50 и 100 μM HOCl/OCl , либо 100 и 300 μM H_2O_2 , также позволяет предположить, что этот остаток наделен антиоксидантной активностью. Вероятнее всего, при окислении Glu-ПГ остаток Met585, первоначально находящийся в интерьере белковой глобулы, мигрирует в гидрофильную область, становясь, таким образом, ловушкой для окислителей. В определенной степени это может быть отнесено и к остатку Met463. В широком диапазоне концентраций HOCl/OCl этот остаток сохранял свою нативную структуру, окисляясь только при 300 μM H_2O_2 .

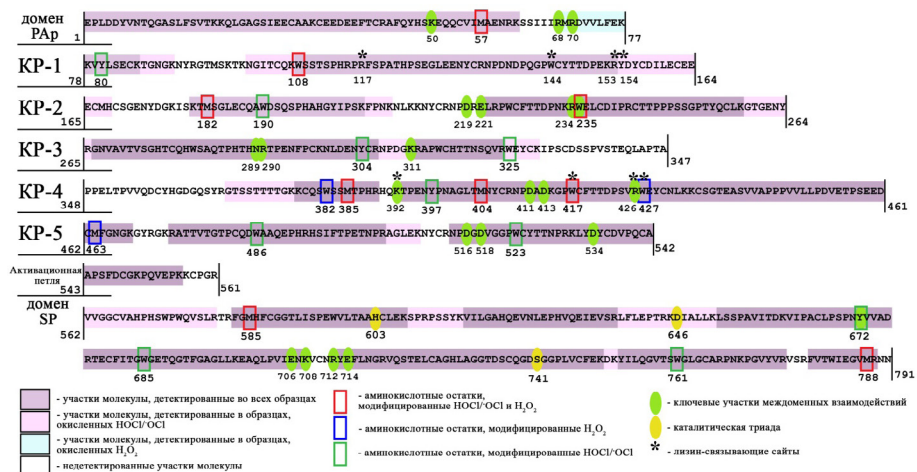


Рисунок 1. Покрытие первичной структуры молекулы ПГ, окисленной HOCl/OCI и H₂O₂, с отмеченными сайтами окислительной модификации аминокислотных остатков и сайтами, ответственными за ключевые меж- и внутримолекулярные взаимодействия Glu-П Г.

Тот факт, что реактивность отдельных метионинов к окислению, может быть не связанной непосредственно с их пространственной локализацией в молекуле Glu-ПГ, свидетельствуют о конформационных превращениях в молекуле окисленного Glu-П Г. Окисление остатков метионина обычно увеличивает гидрофобность поверхности белков [12]. С другой стороны, превращение метионина в сульфоксид метионина должно было бы привести к снижению поверхностной гидрофобности белков, поскольку сульфоксид метионина является менее гидрофобным, чем неокисленный метионин. Однако внутри белка добавление кислорода к метионинам, по-видимому, нарушает естественное сворачивание полипептидной цепи, способствуя экспонированию все большего количества гидрофобных АКО. Поскольку окисление поверхностно-локализованных метионинов увеличивает гидрофобность белка, окисление одного

метионина может изменить стабильность второго метионина, расположенного в другом месте структуры белка и тем самым облегчить его участие в окислительном процессе [13]. Поэтому можно предположить, что окисление остатков метионина в белках протекает как процесс, близкий к кооперативному.

Возможный механизм снижения биологической активности ПГ, обработанного 50, 100 мкМ HOCl/OCl или 300 мкМ H_2O_2 , может быть обусловлен истощением антиоксидантного ресурса белка, имеющего результатом окислительное повреждение некоторых из обнаруженных функционально значимых ароматических остатков, Trp235 и Trp417 [11].

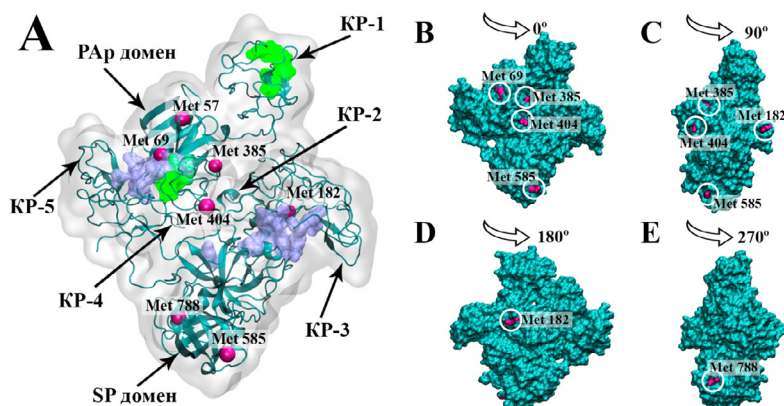


Рисунок 2. Общая структура Glu-плазминогена с антиоксидантами метионинами [6]. Glu-ПГ состоит из N-концевого домена (PAp), пяти крингл-доменов, KP-1-KP-5 и каталитического домена (SP). Окисление, индуцированное HOCl/OCl или H_2O_2 , приводит к окислительным модификациям легко окисляемых остатков метионина, расположенных в различных структурных доменах молекулы ПГ: Met57 (домен PAp); Met182 (KP-2); Met385 и Met404 (KP-4); Met585 и Met788 (домен SP), не влияющие на биологическую активность белка, т. е. эти остатки выполняют роль антиоксидантов [11]. В структуре ПГ плазмы крови у пациентов с острой тромбоэмболией легочной артерии идентифицировано семь остатков метионина: Met57, Met69, Met182, Met385, Met404, Met585 и Met788 [14], из которых шесть метиониновых остатков являются общими с остатками ПГ, модифицированного *in vitro* [11].

А. Вторичная структура Glu-ПГ с остатками метионина, изображенных в виде пурпурных шариков. Сайты связывания лизина выделены зеленым цветом, сайты междоменного взаимодействия — синим. **В-Е.** Поверхность Glu-ПГ с остатками метионина, расположенными на поверхности белковой глобулы. Поверхность белка показана непрозрачным голубым цветом; открытые остатки метионина — пурпурные включения. Изображение сделано с помощью программы VMD1.9.3 (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA).

Таким образом несмотря на то, что Glu-ПГ содержит значительное количество антиоксидантных метионинов, структура белка повреждается как при умеренном окислении *in vitro* [11], так и при окислительном стрессе *in vivo* [14]. Физиологический смысл такого воздействия АФК на молекулу ПГ остается не вполне ясным. Можно предположить, что это является следствием компенсаторного механизма регуляции функциональной активности белков, участвующих в поддержании динамики коагуляции и фибринолиза при окислительном стрессе в живом организме [15].

3. Роль метионинов в антиоксидантной адаптации фактора свертывания крови XIII

Коагуляционный фактор свертывания крови XIII (FXIII) играет решающую роль в коагуляции и фибринолизе благодаря как ковалентному сшиванию полимеров фибрина, делая их устойчивыми к лизису плазмина, так и сшиванию фибрина с белками фибринолитической системы.

Тетрамерная структура плазменного FXIII образована двумя каталитическими субъединицами FXIII-A и двумя регуляторными субъединицами FXIII-B, удерживаемыми вместе нековалентными связями. Каталитическая субъединица FXIII-A

образует структурные домены (Рис. 3), гомологичные другим белкам, относящимся к семейству транслугтаминаз. Ступенчатая активация FXIII под действием тромбина и ионов кальция ведет к образованию активной формы фермента FXIII-A*.

Проведенные нами масс-спектрометрические исследования озон- и гипохлорит-индуцированного окисления белка [16,17] показали, что метионины являются преобладающей мишенью для обоих окислителей. Озонирование FXIII вызывало модификацию ряда остатков метионина: Met159 в β -сэндвич домене; Met265, Met350, Met474, Met475 и Met499 в каталитическом домене и Met646, Met676 и Met709 в β -barrel 2 домене. Эти остатки обладали повышенной восприимчивостью к озон-опосредованному окислению белка [16] при сравнении с идентифицированными двумя другими остатками метионина: Met247, Met380 в каталитическом домене.

Гипохлорит-опосредованное окисление FXIII вызывало окислительную модификации 12 остатков метионина, локализованных во всех структурных доменах белка за исключением β -сэндвич домена: Met242, Met350, Met406, Met474, Met475, Met499 и Met512 в каталитическом домене; Met520, Met595 в β -баррель 1 домене; Met646, Met676 и Met709 в β -баррель 2 домене (Рис. 3). Семь модифицированных остатков метионина в структуре FXIII оказались общими для обоих окислителей. Окисление метионинов, локализованных на поверхности белковой глобуле белка, Met406, Met474, Met475, Met499, Met512, Met520, Met595 и Met676 (Рис. 3), не влияло на ферментативную активность FXIII-A*. Это является доказательством антиоксидантной роли этих аминокислотных остатков, защищающих функционально значимые сайты белка от окислительного повреждения.

Полученные нами совокупные данные как по озон-, так и гипохлорит-индуцированному окислению FXIII, показали, что ферментативная активность FXIII-A*, зависела от стадии

превращения FXIII в FXIII-A*, на которой осуществлялось окисление [17,18]. FXIII-A*, образующийся из окисленного FXIII, в значительной степени сохранял свою ферментативную активность независимо от вида окислителя, тогда как фермент, обработанный озоном или гипохлоритом, был наиболее уязвим к гипохлориту [17]. Очевидно, что это связано с тем, что структура профермента является наиболее компактной и максимально резистентной к действию АФК. В процессе активации FXIII происходят крупномасштабные перестройки в белке, обуславливающие доступность каталитической триады остатков Cys314, His373 и Asp396 для субстратов и способствующие повышенной уязвимости FXIII-A* к окислению.

Следует отметить, что результаты исследований были получены при использовании изолированного FXIII, тогда как в кровотоке FXIII, будучи минорным белком, циркулирует вместе со многими другими белками, присутствующими в значительно больших количествах, чем сам FXIII. Каждый из белков плазмы крови так или иначе способен перехватывать молекулы АФК, снижая тем самым эффективную «поражающую» концентрацию АФК для молекул FXIII. По этой причине будущие исследования должны быть направлены на выявление сайтов FXIII, выделенного из плазмы крови пациентов, страдающих тромботическими расстройствами, сердечно-сосудистыми заболеваниями и другими, напрямую связанными как с функциональной ролью FXIII в этих видах патологии, так и с окислительным стрессом.

4. Антиоксидантные метионины в структуре фибриногена как новое понимание функционирования белка

Фибриноген (ФГ) играет важную, многогранную роль в образовании фибрина, заживлении ран, воспалении, ангиогенезе

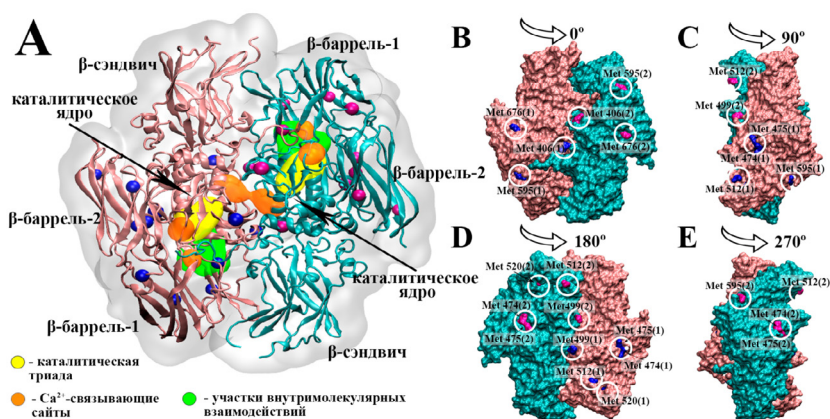


Рисунок 3. Структура гомодимера FXIII-A₂ [6], цепи А (розовый) и В (голубой): β -сэндвич (Gly38–184Phe), каталитический домен (Asn185–515Arg) с активным центром (остатки Cys314, His373 и Asp396), расположенным в каталитическом ядре, β -баррель 1 (Ser516–628Thr) и β -баррель 2 (Ile629–731Met). Опосредованное гипохлоритом окисление FXIII показало, что Met242, Met350, Met406, Met474, Met475, Met512, Met520, Met595, Met646, Met676 и Met709 превращались в сульфоксид метионина [16]. Окисление метионинов: Met406 Met474, Met475, Met499 и Met512 в каталитическом домене; Met520 и Met595 в β -баррель 1 и Met676 в β -баррель 2 не влияло на ферментативную активность FXIII-A* [17]. (А) Вторичная структура FXIII-A₂ с остатками метионина (в виде пурпурных шариков). (В-Е) — Поверхность FXIII-A₂ с поверхностью экспонированными остатками метионина. Поверхность белка показана как непрозрачная розовая и голубая поверхность; поверхностно-локализованные остатки метионина — синие и пурпурные включения. Изображение было сделано с помощью программы VMD1.9.3 (University of Illinois at Urbana-Champaign, USA). Цепь FXIII-B не показана, поскольку она не была кристаллизована и отсутствует достоверная информация о ее трехмерной структуре.

и других важных физиологических и патологических процессах. ФГ проявляет наибольшую восприимчивость к вредному действию АФК среди всех основных белков плазмы крови. На основании этого сложилась общераспространенная точка зрения, что ФГ является «жертвенным» белком,

способным перехватывать реактивные частицы в крови, защищая, тем самым, другие плазменные белки от окислительных повреждений. Пост-трансляционные модификации, которые повреждают структуру и функцию ФГ, были выявлены как при индуцированном окислении различными оксидантами [19-21] и др., так и в результате окислительного стресса в организме [22].

Однако в какой степени фибриноген способен противостоять окислительному стрессу без потери функциональной активности и какую роль в этом защитном механизме играют остатки метионина, оставалось полностью не исследованным. Чтобы ответить на этот чрезвычайно важный вопрос, было изучено влияние очень низких (10 мкМ) и умеренно низких (25 мкМ) концентраций HOCl/OCl^- на повреждение как первичной структуры ФГ, так и на конверсию ФГ в фибрин, плазмин-опосредованный гидролиз фибрина, а также на морфологию фибриновой сети.

Данные ВЭЖХ-МС/МС показывают (Рис. 4), что метионины были преобладающей мишенью для окислителя. Сравнение модифицированных аминокислотных остатков, полученных в результате 10 и 25 мкМ HOCl/OCl^- -индуцированного окисления ФГ, выявило интересную особенность. В обоих случаях модифицированные сайты различаются преимущественно уровнем окисления. Из выявленных в общей сложности 22 сайтов, общими оказались: 14 сайтов, принадлежащих остаткам метионина, один остаток лизина, Lys125, три остатка триптофана, $\text{A}\alpha\text{Trp}317$, $\text{A}\alpha\text{Trp}424$, $\text{A}\alpha\text{Trp}511$ и два остатка пролина, $\text{A}\alpha\text{Pro}511$, $\gamma\text{Pro}235$. Только два дополнительных модифицированных остатка: $\text{A}\alpha\text{Lys}129$ и $\text{A}\alpha\text{Trp}276$ были обнаружены в ФГ окисленным 25 мкМ HOCl/OCl^- [23]. Роль этих остатков в самосборке альтернативной фибриновой сети остается неизвестной.

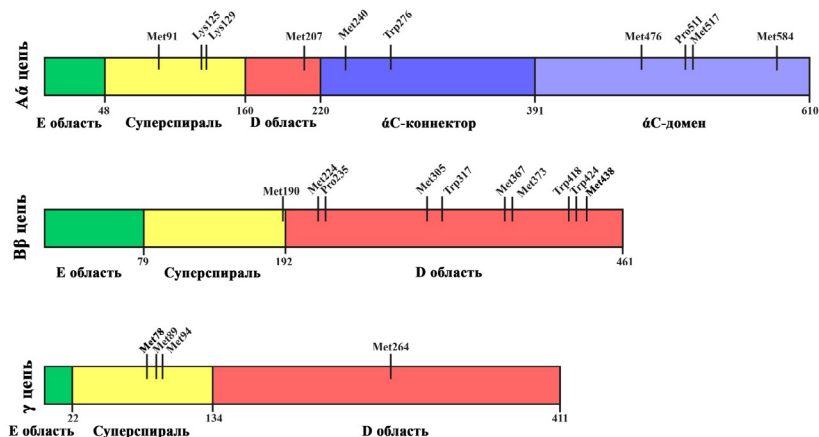


Рисунок 4. Схема полипептидных цепей фибриногена с идентифицированными окислительными модификациями [23].

В то время как 25 мкМ HOCl/OCl^- вызывал замедленную самосборку фибриновой сети с более тонкими волокнами и большей устойчивостью к протеолитической деградации, воздействие 10 мкМ HOCl/OCl^- на ФГ не оказывало никакого влияния на биологическую активность ФГ (Рис. 5). Следовательно, высокочувствительные к окислению остатки $\text{A}\alpha\text{Met476}$, $\text{A}\alpha\text{Met517}$, $\text{A}\alpha\text{Met584}$, $\text{B}\beta\text{Met367}$, γMet264 и γMet94 (Рис. 6) действуют как поглотители АФК, играя важную роль в антиоксидантной защите белка. Необратимое превращение антиоксидантных метионинов в сульфоксид метионина является индикатором истощения антиоксидантного ресурса ФГ, что неотвратно приводит к последующей химической модификации жизненно важных участков молекулы белка.

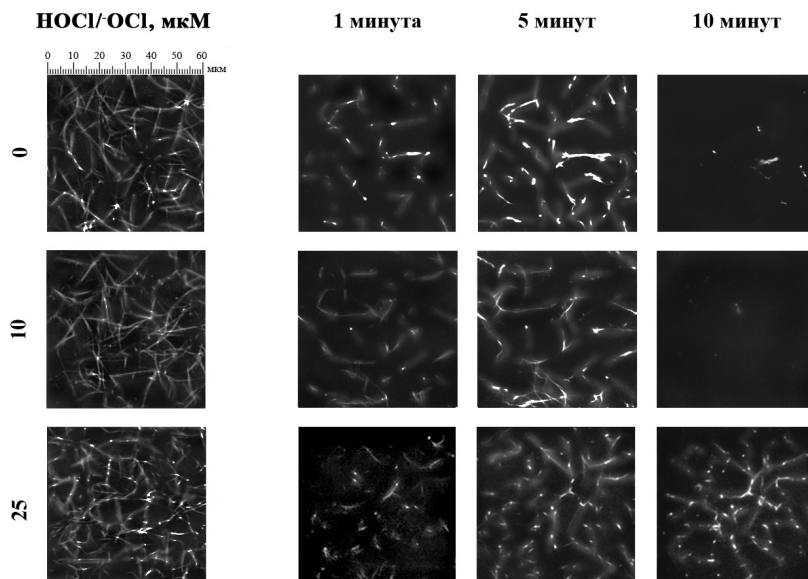


Рисунок 5. Архитектура фибринового сгустка (столбец 1) и динамика распределения плазмينا(огена) при плазминовом лизисе сгустка (столбцы 2-4), визуализированные с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [23]. Как видно (левый столбец 1), фибриновый гель, полученный из необработанного ФГ, представляет собой структуру, состоящую из фибрилл, находящихся на больших расстояниях друг от друга, что приводит к образованию больших пор в геле. Нативный и окисленный 10 мкМ гипохлоритом ФГ демонстрируют сходную динамику: визуализация фибриновой сети происходит уже с конца первых минут, к 5 минутам сетка визуализируется полностью, а к 10 минутам она практически полностью гидролизует. Структура фибрина, образованного из ФГ, окисленного 25 мкМ HOCl/OCl , характеризуется более тонкими фибриновыми волокнами и маленькими порами по сравнению с контролем, а процессы самосборки геля и его гидролиза существенно замедляются (столбцы 2-4).

Более того, поскольку в структуре фибриногена нет свободных остатков цистеина, окислительные модификации ФГ являются полностью не восстанавливаемыми. Таким образом, можно

предположить, что превращение фибриноген-связанных метионинов, наделенных антиоксидантной активностью, в сульфоксид метионина становится основным, если не единственным, эффективным механизмом, способным защитить ФГ от функционального нарушения при окислительном стрессе.

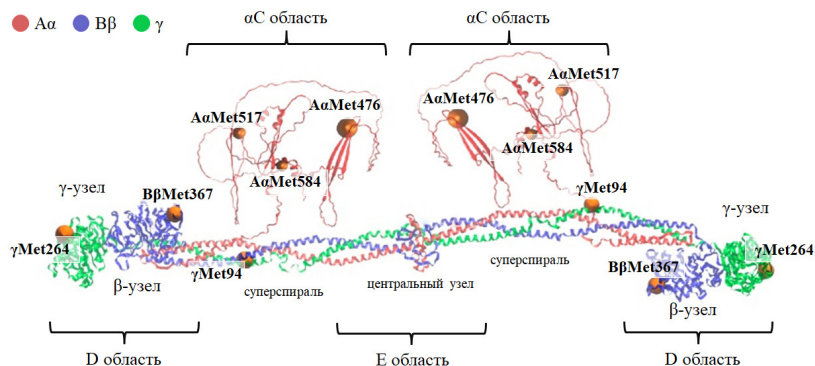


Рисунок 6—3D-структура молекулы фибриногена с отмеченными остатками метионинов — перехватчиков АФК. Молекула фибриногена состоит из двух идентичных пар полипептидных αA , βB и γ цепей (синий, зеленый и красный цвет, соответственно). Центральный узел (Е область), образованный NH₂-концевыми частями всех шести цепей, соединен с дистальными β - и γ -узлами (D области), образованными COOH-концевыми частями цепей βB и γ , соответственно, с помощью суперспиральных коннекторов. Каждый из коннекторов сформирован медиальными участками αA , βB и γ цепей. Области, которые не были идентифицированы в кристаллической структуре, являются взаимодействующие αC -домены, которые прикреплены к телу молекулы с помощью гибких αC -коннекторов, и NH₂-концевые участки βB -цепей, образующие BbN области (BbN домен). Для создания рисунка использована модель кристаллической структуры фибриногена PDB:3GHG и спрогнозированная AlphaFold структура αC -области P02671-F1

Появляется все больше данных о том, что многочисленные как внутри-, так и внеклеточные белки содержат антиоксидантные метионины, способные поддерживать функциональную активность белков в окислительной среде. Список таких

белков постоянно увеличивается [4,6,24]. Мы полагаем, что присутствие антиоксидантных метионинов в функционально разнообразных белках, в том числе, рассмотренных в данной работе, отражает часть общего эволюционного процесса адаптации структуры белков в ответ на окислительный стресс.

Заключение

Из-за отсутствия метионин сульфоксид редуктаз (MSR) в плазме крови окисление метионинов во внеклеточных белках полностью необратимо, поэтому способность метионинов служить перехватчиками молекул-окислителей без нарушения структуры и функции белков плазмы по-прежнему остается предметом дискуссий. Антиоксидантная способность метионин-содержащих внутриклеточных белков *in vivo* в большей степени зависит от активности MRS, нежели от количества остатков метионина в этих белках. В этом состоит принципиальное различие между метионин-зависимой антиоксидантной защиты внутри- и внеклеточных белков.

Функциональные последствия окисления метионина в белках были выявлены главным образом в ходе исследований *in vitro* и, в очень ограниченной степени, *in vivo*. Следовательно, в большей части, механизм сохранения функциональной активности белков плазмы, постоянно подвергающихся окислительному стрессу, остается крайне мало изученным и требует дальнейших исследований, чтобы понять эволюционные закономерности роли окисления метионина в белках для поддержания гомеостаза и факторов риска, влияющих на развитие АФК-ассоциированных патологий.

В данной работе было рассмотрено несколько примеров индуцированного окисления плазменных белков под действием АФК, дающие представление о защитном действии антиокси-

дантных метионинов. По данным масс-спектрометрии, белки плазмы крови, проанализированные в настоящей работе, содержат сильно различающиеся в их количестве антиоксидантные метионины. Можно предположить, что этот феномен обусловлен адаптацией структуры белков к действию АФК в реальных, физиологических условиях, т. е., чтобы каждый из белков был способным противостоять «парциальной» окислительной атаке. Общее количество метионинов в первичной структуре белка существенно превышает число антиоксидантных метионинов. Это кажется достаточно очевидным, поскольку функция метионинов — разнообразна и не ограничивается только антиоксидантной. В процессе эволюции последовательность аминокислот в цепи формировалась в том числе таким образом, чтобы при ее сворачивании в уникальную третичную структуру на поверхности оказывалось строго определенное как по положению, так и по числу остатков метионина, которое имело результатом наиболее эффективный механизм антиоксидантной защиты белка.

Многое из того, что связано с обнаружением и локализацией сульфоксидов метионина в белках, еще предстоит выяснить в последующих исследованиях. С ростом знаний, касающихся антиоксидантной защиты белков, регуляторная роль специфических реакций окисления метионина в живых организмах становится все более и более очевидной.

Ссылки

1. A. Corcoran, T. G. Cotter, *FEBS J.* **2013**, 280, 1944–1965.
2. A. M. Rizzo, P. Berselli, S. Zava, G. Montorfano, M. Negroni, P. Corsetto, B. Berra, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2010**, 698, 52–67.
3. R. Levine, J. Moskovitz, E. Stadtman, *IUBMB Life* **2000**, 50, 301–307.

4. J. M. Lim, G. Kim, R. L. Levine, *Neurochem. Res.* **2019**, *44*, 247–257.
5. M. A. Rosenfeld, A. D. Vasilyeva, L. V. Yurina, A. V. Bychkova, *Free Radic. Res.* **2018**, *52*, 14–38.
6. M. A. Rosenfeld, L. V. Yurina, A. D. Vasilyeva, *Biophys. Rev.* **2023**, *15*, 367–383.
7. G. Çetin, S. Klafack, M. Studencka-Turski, E. Krüger, F. Ebstein, *Biomolecules* **2021**, *11*, 60.
8. S. Kaushik, A. M. Cuervo, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2018**, *19*, 365–381.
9. M Bruschi, G. Candiano, L. Santucci, G. M. Ghiggeri, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1830*, 5473–5479.
10. H. R. Griffiths, I. H. Dias, R. S. Willetts, A. Devitt, *Redox Biol.* **2014**, *2*, 430–435.
11. A. Vasilyeva, L. Yurina, V. Ivanov, D. Azarova, E. Gavrilina, M. Indeykina, A. Bugrova, A. Kononikhin, E. Nikolaev, M. Rosenfeld, *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *206*, 64–73.
12. C. C. Chao, Y.S. Ma., E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 2969–2974.
13. E. J. Walker, J. Q. Bettinger, K. A. Welle, J. R. Hryhorenko, S. Ghaemmaghami, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2019**, *116*, 6081–6090.
14. A. H. Bryk-Wiązania, D. Cysewski, E. Ocioń, A. Undas, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2022**, *621*, 53–58.
15. М. А. Розенфельд, Л. В. Юрина, Е. С. Гаврилина, А. Д. Васильева, *Успехи биол. хим.* **2024**, *64*, 29–72.
16. A. Vasilyeva, L. Yurina, M. Indeykina, A. Bychkova, A. Bugrova, M. Biryukova, A. Kononikhin, E. Nikolaev, M. Rosenfeld, *Biochim. Biophys. Acta* **2018**, *1866*, 875–884.
17. A. Vasilyeva, L. Yurina, A. Shchegolikhin, M. Indeykina, A. Bugrova, A. Kononikhin, E. Nikolaev, M. Rosenfeld, *Biomolecules* **2020**, *10*, 914.

18. M. A. Rosenfeld, A. V. Bychkova, A. N. Shchegolikhin, V. B. Leonova, M. I. Biryukova, E. A. Kostanova, *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, 1834, 2470-2479.
19. K. M. Weigandt, N. White, D. Chung, E. Ellingson, Y. Wang, X. Fu, D. C. Pozzo, *Biophys. J.* **2012**, 103, 2399-2407.
20. L. Yurina, A. Vasilyeva, M. Indeykina, A. Bugrova, M. Biryukova, A. Kononikhin, E. Nikolaev M. Rosenfeld, *Free Radic. Res.* **2019**, 53, 430-455.
21. Sovová Ž, ovová Ž., Štikarová J., Kaufmanová J., Májek P., Suttner J., Šácha P., Malý M., Dyr J. E. Impact of posttranslational modifications on atomistic structure of fibrinogen. *PLoS One* **2020**, 15, e0227543.
22. N. J. White, Y. Wang, X. Fu, J. C. Cardenas, E. J. Martin, D. F. Brophy et al. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, 96, 181-189.
23. L. V. Yurina, A. D. Vasilyeva, E. S. Gavrilina, V. S. Ivanov, S. I. Obydenny, I. A. Chabin, M. I. Indeykina, A. S. Kononikhin, E. N. Nikolaev, M. A. Rosenfeld, *Biochim. Biophys. Acta* **2024**, 1872, 141013.
24. S. X. Gu, J. W. Stevens, S. R. Lentz, *Blood* **2015**, 125, 3851-3859.

5. МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ β -АМИЛОИДА, ГЛАВНОГО МАРКЕРА БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Н.В. Захарова, М.И. Индейкина, А.Е. Бугрова, А.С. Кононихин

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

Резюме

Бета-амилоидные пептиды ($A\beta$) являются ключевыми маркерами болезни Альцгеймера (БА), социально значимой нейродегенеративной патологии пожилых людей. Анализ эндогенных вариаций $A\beta$ имеет особое значение для выяснения патогенеза БА, прогнозирования риска развития заболевания и разработки эффективной терапии. Масс-спектрометрические (МС) подходы не имеют альтернативы для исследования сложных образцов, включающих большое разнообразие протеоформ $A\beta$. Подходы, основанные на времяпролетной МС (MALDI-TOF) и МС с жидкостной хроматографией наиболее распространены в исследованиях $A\beta$. Однако анализ изомеров/рацематов по Asp и Ser требует применения особых условий разделения и сверхселективных методов обнаружения. В данной работе представлены результаты МС исследований разнообразия $A\beta$ пептидов в клинических образцах, а также обсуждаются перспективы дальнейших исследований.

Ключевые слова: β -амилоид, масс-спектрометрия (МС), $A\beta$ пептиды, протеоформы

2. Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) — самое распространенное нейродегенеративное заболевание пожилых людей во всем мире

с неуклонно растущим числом пациентов, которое может превысить 115 млн к 2050 году [1]. Патогенез БА связан с гомеостазом β -амилоидных пептидов ($A\beta$) в головном мозге [2], а образование амилоидных бляшек считается ключевым патологическим изменением, являющимся причиной деструкции нейронов [3–5].

$A\beta$ образуется из повсеместно распространенного белка-предшественника амилоида (APP) с помощью β - и γ -секретаз [6,7] и может далее подвергаться патологическому процессингу [8]. Внеклеточное накопление агрегатов $A\beta$ (амилоидных бляшек) в тканях мозга является одним из признаков БА. Это может происходить из-за дисбаланса между выработкой и удалением $A\beta$ [2]. Кроме того, несколько мутаций в гене APP связаны с ранним началом БА [9,10]. В зависимости от стадии заболевания схема терапевтического вмешательства может включать блокировку β - или γ -секретаз, ингибирование агрегации $A\beta$, а также удаление агрегатов $A\beta$ и/или нейтрализацию их токсического действия [11,12]. Однако молекулярный механизм амилоидоза все еще требует дальнейшего осознания; и обширные исследования в этой области остаются крайне актуальными [5,6,13].

Масс-спектрометрические (МС) исследования внесли значительный вклад в получение данных о разнообразии протеоформ $A\beta$ при БА и способствовали существенному прогрессу, как при выяснении механизмов амилоидоза в тканях мозга, так и при создании методов анализа ранних маркеров БА в спинно-мозговой жидкости (СМЖ) и крови [7,14–16]. Самые передовые современные МС подходы позволяют одновременно анализировать широкий спектр форм $A\beta$, различающихся длиной, первичной структурой и модификациями [17–20]. В данной работе обобщены современные знания о структурных трансформациях $A\beta$ при БА, изученных с применением различных МС подходов.

2. Протеоформы Аβ

Пути образования различных видов Аβ во многом зависят от ткани, в которой они продуцируются и/или локализуются. Ряд усеченных по N- и/или C-концу протеоформ Аβ был идентифицирован в исследованиях образцов мозга, СМЖ и плазмы крови [21,22] (Таблица 1). Большинство N-усеченных форм обнаружено в плохорастворимой фракции ткани мозга, полученной после удаления мягкой мозговой оболочки и лептоменингеальных/ интрапаренхиматозных сосудов. В ней N-усеченные формы составляют >73%, а канонический Аβ не превышает 15,3% [23], что указывает на ключевую роль N-усечений в стабилизации сенильных бляшек. Обнаруженные в СМЖ и плазме крови различные варианты C-концевых усечений отражают характерные закономерности деградации Аβ [21].

Пост-трансляционные модификации (ПТМ) могут играть еще более важную роль в образовании нерастворимых агрегатов, поскольку они могут снижать протеолиз Аβ и способствовать накоплению его патогенных протеоформ. Большинство ПТМ Аβ исследованы методами МС (Таблица 2). Только гликозилирование Tyr-10 и окисление Met-35 не усиливают агрегацию Аβ, хотя последнее увеличивает нейротоксичность Аβ [24]. ПТМ Ser-26 и Asp-23 выявлены только в тканях мозга, и важная роль центральной области молекулы в амилоидозе подтверждается рядом характерных для ранних форм БА мутаций в позициях 21-23 [10]. Эти изменения — более типичны для сосудистых отложений Аβ, чем для сенильных бляшек [10]. Все остальные ПТМ касаются остатков Asp-1, Glu-3, Asp-7, Ser-8, Tyr-10 и Glu-11 N-концевой области и, напротив, более характерны для сенильных бляшек; хотя ПТМ Glu-3, Ser-8 и Tyr-10 обнаруживаются не только в головном мозге, но и в СМЖ (Таблица 2). Примечательно, что подавляющее большинство ПТМ сосредоточено в цинк-связывающем домене и относится к ше-

сти полярным аминокислотным остаткам в N-концевой области 1-11. И характерные укорочения N-конца также согласуются с повышенной модификацией этой области [23].

Таблица 1

Полноразмерные и усеченные формы A β , идентифицированные МС методами в образцах мозга, СМЖ и плазмы крови человека [18,21-23]

А β пептиды	Мозг	СМЖ	Плазма
Неусеченные формы			
1-42, 1-40	nLC-MS/MS, MALDI-TOF	MALDI-TOF, nLC-MS/MS, SELDI-TOF	MALDI-TOF/TOF, nLC-MS/MS
1-43	MALDI-TOF, nLC-MS/MS	n.d.	n.d.
С-концевые усечения			
1-39, 1-38, 1-37, 1-34, 1-20	nLC-MS/MS, MALDI-TOF	MALDI-TOF, nLC-MS/MS, SELDI-TOF	MALDI-TOF/TOF, nLC-MS/MS
1-33, 1-19, 1-18, 1-17, 1-15, 1-14	n.d.	MALDI-TOF, nLC-MS/MS, SELDI-TOF	MALDI-TOF/TOF, nLC-MS/MS
1-35	n.d.	n.d.	MALDI-TOF/TOF
1-30, 1-28, 1-16, 1-13	n.d.	MALDI-TOF, nLC-MS/MS	n.d.
1-31	nLC-MS/MS	n.d.	n.d.
N- концевые усечения			
3-40	MALDI-TOF, nLC-MS/MS	nLC-MS/MS	MALDI-TOF/TOF, nLC-MS/MS
11-40	n.d.	nLC-MS/MS	MALDI-TOF/TOF
6-40	n.d.	n.d.	MALDI-TOF/TOF
5-40	MALDI-TOF, nLC-MS/MS	n.d.	MALDI-TOF/TOF
2-42, 3-42, 4-42, 5-42, 7-42, 8-42, 9-42, 10-42, 11-42, 4-40, 8-40, 9-40	nLC-MS/MS, MALDI-TOF	n.d.	n.d.
N, С- концевые усечения			
6-39, 6-38	n.d.	n.d.	MALDI-TOF/TOF
2-14, 2-17,3-19, 3-17, 3-15, 11-30	n.d.	nLC-MS/MS, SELDI-TOF	n.d.
2-38, 11-34	nLC-MS/MS, MALDI-TOF	n.d.	n.d.

n.d. — не выявлено

В целом, Pyro-Glu-3, Pyro-Glu-11, *iso*Asp-1 и *iso*Asp-7 являются наиболее распространенными ПТМ Аβ и они были изучены с использованием различных МС методов [8,18,20,22,25-29]. Из всех известных ПТМ Аβ только модификации Ser-8 и Ser-26 и нитрование Tyr-10 пока не наблюдали МС методами.

3. МС подходы для исследований Аβ

МС подходы оказались эффективными при анализе широкого спектра протеоформ эндогенных пептидов Аβ (Таблицы 1 и 2). Наибольшее разнообразие с характерными различиями для сенильных бляшек и сосудистых отложений было показано для тканей мозга. СМЖ и плазма крови представляют особый интерес для клинических исследований.

Подходы, основанные на времяпролетной МС с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) и жидкостной хроматографии (ЖХ) с tandemной МС и ионизацией электро-распылением (ESI) — наиболее популярны в исследованиях Аβ и фактически позволяют идентифицировать большую часть нативных протеоформ, а также почти все ПТМ. Однако изучение изомеризации и рацемизации остатков Asp и Ser является особой задачей, которая требует применения специальных методов для разделения эпимеров с одинаковой молекулярной массой и сходными физико-химическими свойствами, а также использования высокочувствительных и селективных методов обнаружения.

3.1 MALDI-TOF

Времяпролетная МС с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF-MS) является одним из наиболее эффективных подходов для анализа широко-

го спектра протеоформ $A\beta$ (Таблицы 1 и 2). Исследование $A\beta$ из СМЖ с использованием в качестве матриц α -циано-4-гидроксикоричной (CHCA) и метандифосфоновой (MDPNA) кислот выявило корреляцию между соотношением $A\beta_{1-40}/A\beta_{1-42}$ (а также $APP_{669-711}/A\beta_{1-42}$) и амилоидозом головного мозга [16]. Анализ олигомеров $A\beta$ с $n > 12$ оказался возможным при послойном осаждении олигомеризованных $A\beta$ с синапиновой кислотой и минимизации интенсивности лазера [30]. Использование в качестве матрицы наночастиц серебра позволило для $A\beta_{1-40}$ увеличить интенсивность молекулярных ионов в 2–5 раз по сравнению с 2,5-дигидроксibenзойной или гидроксикоричной кислотой [31]. Кроме того, чувствительность и воспроизводимость матрицы могут быть улучшены при использовании ряда агентов, таких как HFIP, DMSO, NH_4OH , FA, TFA и H_3PO_4 [30,32,33], а также понижением температуры пластины при кристаллизации до $+4^\circ C$ [34].

Актуальность исследований ПТМ $A\beta$ с помощью MALDI-TOF не теряет актуальности [35–37]. С использованием MALDI-TOF/TOF и фрагментации при высокоэнергетической столкновительной диссоциации (CID), которая позволяет различать остатки Asp и *iso*Asp (Рис. 1), а также оценивать их процентное соотношение [38], был разработан подход для быстрой оценки степени изомеризации остатков Asp-7 в $A\beta$ [39].

3.2 ВЭЖХ-МС

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, HPLC) в сочетании с МС высокого разрешения предоставляет наибольшие возможности для изучения различных форм $A\beta$. С помощью нано-ЖХ-МС/МС наиболее полно охарактеризован состав нативных протеоформ $A\beta$ с N- и C-усечениями [17,23]. Гидрофобные полноразмерные формы $A\beta$ можно разделять

на неполярных колонках C8 или C18, с улучшением в щелочных условиях [40,41]. Использование различных комбинаций мобильных фаз позволяет оптимизировать условия для одновременной идентификации укороченных гидрофильных и полноразмерных гидрофобных пептидов [18]. Гидрофильные гидролитические фрагменты Aβ — более удобны для анализа, в том числе при использовании колонок с обращенной фазой [42].

Таблица 2

Пост-трансляционные модификации Aβ пептидов в образцах человека [22]

Позиция	ПТМ (олигомеризация Aβ)	Методы идентификации	Ткани
Asp-1	Изомеризация (↑) Рацемизация (↑)	MS (PD, MALDI, CCD-UPLC, UHPLC-ESI-IMS), IHC SCA, MS (CCD-UPLC)	Мозг (СБ>СО) Мозг
Glu-3	Пироглутамат ^a (↑)	MS (PD, MALDI, LC-ESI-FTICR), IHC	Мозг (СБ), СМЖ
Asp-7	Изомеризация (↑) Рацемизация (↑)	MS (PD, MALDI, IMS), IHC IMS-MS, IS-RP-HPLC	Мозг (СБ>СО) Мозг (СБ>СО)
Ser-8	Фосфорилирование ^b (↑) Рацемизация ^b (↑)	IP, WB, IHC, EQ IS-RP-HPLC	Мозг (СБ), СМЖ Мозг
Tyr-10	Нитрование ^b (↑) Дитиозин (↑) Гликозилирование (↓)	IP, WB, IHC IP, WB, IHC, nLC-MS/MS IP, MS (LC-ESI-FTICR)	Мозг (СБ ядро), СМЖ Мозг (СБ ядро), СМЖ СМЖ
Glu-11	Пироглутамат ^a (↑)	WB, IHC, MS (MALDI, ESI)	Мозг (СБ>СО)
Asp-23 ^a	Изомеризация (↑)	CD, IRS, IP, WB, ICH, MS (MALDI)	Мозг (СБ<СО)
Ser-26	Фосфорилирование ^b (↑) Рацемизация ^b (↑)	IHC, IP, WB, ELISA IHC, WB, ELISA, IS-RP-HPLC	Мозг Мозг
Met-35	Окисление (↓)	MS (MALDI, LC-ESI-FTICR)	Мозг, СМЖ, плазма

^a Превращение в пироглутамат возможно только на N-концевом остатке.

^b ПТМ Aβ, неподтвержденные МС методами.

^a Образование *iso*Asp-23 достоверно показано при мутации Iowa (Asn→*iso*Asp), тогда как указания на образование *iso*Asp из Asp-23 были получены только методами ИМС и CD [27].

Сокращения: СБ — сенильные бляшки; СО — сосудистые отложения; CD — круговой дихроизм; CCD-UPLC — ковалентная хиральная дериватизированная ультраэффективная жидкостная хроматография; EQ — электрохимическое количественное определение; FTICR — метод ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье; ИМС — иммуногистохимия; IMS — масс-спектрометрия ионной подвижности; IP — иммунопреципитация; IS-RP-HPLC — изократическое разделение аминокислот методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с обратной фазой; IRS — инфракрасная спектроскопия; LC — жидкостная хроматография; PD — плазменная десорбция; SCA — анализ стереоконфигурации; WB — Вестерн блоттинг.

Получение характерных спектров фрагментации при использовании тандемной МС позволяет идентифицировать большое количество протеоформ в одном образце. Ряд методов фрагментации, включая CID, диссоциацию с захватом электрона (ECD), диссоциацию с переносом электрона (ETD) и радикально-направленную диссоциацию (RDD) были использованы для различения в том числе диастереомеров [43,44]. Такие изомеры не имеют различий в массе, однако разница в структуре приводит к изменениям в вероятности фрагментации связей, что, соответственно, отражается на профиле интенсивностей ионов в спектрах фрагментов. Например, при ECD фрагментации для пептидов $A\beta_{1-16}$ и $A\beta_{1-42}$ с *iso*Asp-7 в спектре наблюдаются ионы c_6+57 и $z_{10}-57$ или $z_{36}-57$, соответственно (Рис. 1А) [45], то есть можно однозначно определять как наличие, так и положение остатков *iso*Asp [46,47]. Фрагментация CID также позволяет оценивать соотношение *iso*Asp/Asp содержащих форм пептидов, как в тандемных исследованиях с помощью ESI-FTICR, так и MALDI-TOF/TOF по маркерным изменениям интенсивностей фрагментов (Рис. 1А, Б) [39,45].

Разделение эпимеров $A\beta$ с помощью ВЭЖХ с модифицированными хиральными стационарными фазами (Q-Shell и NicoShell) еще больше расширяет возможности МС [43,48] и позволяет различить 20 возможных комбинаций изомеризованных остатков Ser и Asp в 4-х триптических пептидах $A\beta_{1-42}$ [48].

3.3 Спектрометрия ионной подвижности — МС

Спектрометрия ионной подвижности (IMS) в сочетании с МС детектором позволяет различать пептиды с рацемизованными и изомеризованными остатками. В частности, исследование смеси 4 изомерных по Asp-7 (L/D/*iso*-Asp) форм пептида $A\beta_{6-16}$ с использованием IMS-МС платформы сверхвысокого разрешения привело к эффективному разделению пептидов с порядком обнаружения L-*iso*Asp < D-*iso*Asp < L-Asp < D-Asp [19]. При изучении изомеризации $A\beta$ в тканях мозга [20] возможные L/D- и *iso*L/*iso*D-формы $A\beta_{1-15}$ детектировали и идентифицировали на основании времени хроматографического удержания и времени дрейфа (среднего поперечного сечения иона). Согласно проведенному анализу, 85% $A\beta_{1-15}$ в образцах от пациентов с БА оказались изомеризованными со статистически значимым увеличением изоформ, содержащих L-*iso*Asp-1 и L-*iso*Asp-7 [20].

3.4 Количественные МС подходы

Количественное определение различных протеоформ $A\beta$ и их профилирование также имеют особое значение для понимания механизмов амилоидоза, а методы МС предоставляют хорошую возможность для количественных оценок.

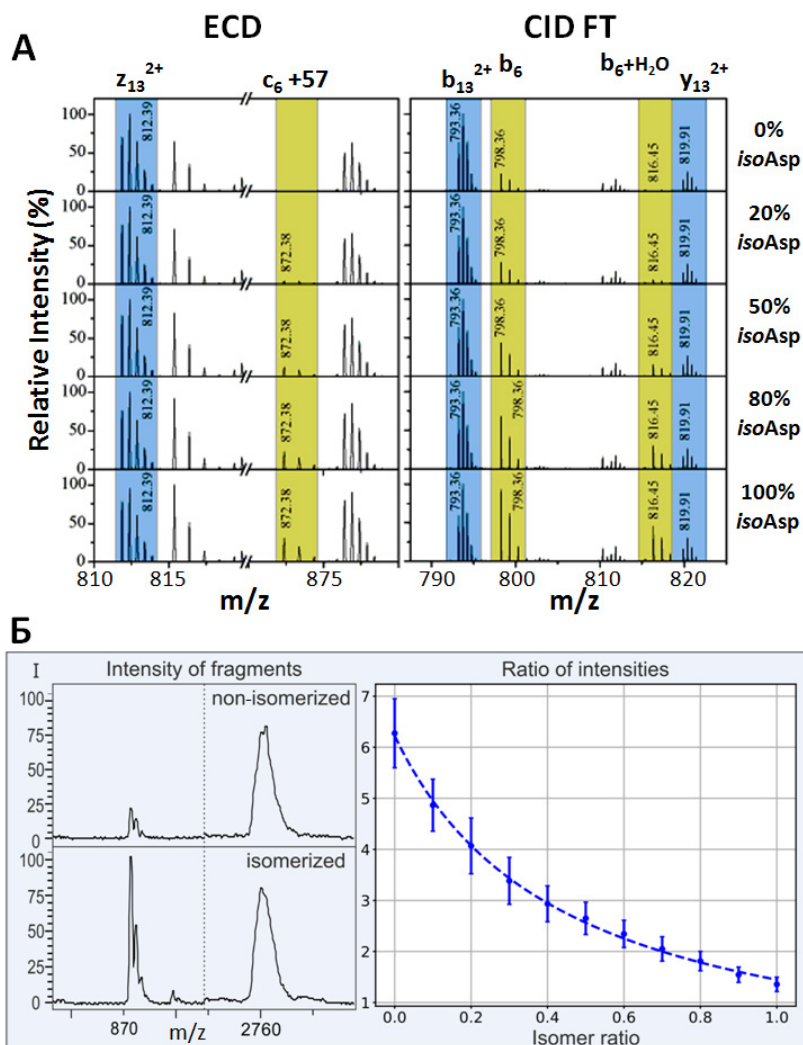


Рисунок 1. Определение соотношения протеоформ Asp-7 и *iso*Asp-7 A β с использованием МС/МС спектров [22]. (А) ВЭЖ-МС спектры фрагментации пептидных смесей с различным содержанием Asp/*iso*Asp [45]. (Б) MALDI-TOF спектры CID фрагментации пептидных ионов (слева) и калибровочная кривая (справа) для определения соотношения изоформ A β_{1-16} [39].

Использование изотопно-меченных внутренних стандартов является общепринятой стратегией количественного МС-анализа для определения реальной концентрации аналитов. Используя MALDI и меченные изотопами ($\text{Arg}^{13}\text{C}^{15}\text{N}$) пептиды $\text{A}\beta_{1-15}$ и $\text{A}\beta_{1-34}$, были определены концентрации пептидов $\text{A}\beta_{1-40}$ и $\text{A}\beta_{1-42}$ в СМЖ при БА (5 ± 3 и $0,2\pm 0,2$ нг/мл, соответственно) [49]. А методом ЖХ-МС/МС с использованием внутренних стандартов $\text{A}\beta$ были оценены абсолютные концентрации пептидов $\text{A}\beta_{1-38}$, $\text{A}\beta_{1-40}$ и $\text{A}\beta_{1-42}$ в плазме крови (27,40/23,81, 288,0/272,4 и 37,13/30,13 пг/мл для $\text{A}\beta$ -отрицательных/положительных групп, соответственно), а также кинетика их оборота (период полураспада ~ 3 часа) [50].

Сочетание ВЭЖХ с тройным квадрупольным МС предоставляет особые возможности для целевого количественного анализа в режимах мониторинга одиночной и множественных или параллельных реакций (SRM/MRM/PRM). Ионы заданной массы выделяются в первом квадруполе, фрагментируются во втором, а в третьем — ионы-продукты контролируются для количественного определения. MRM подходы были использованы для чувствительного количественного мониторинга 20 комбинаций пептидных эпимеров $\text{A}\beta_{1-5}$, $\text{A}\beta_{6-16}$ и $\text{A}\beta_{7-28}$ (со всеми изо/стереоизомерами Asp и Ser) [43].

Для ряда задач измерения абсолютных концентраций пептидов может не требоваться и они могут быть решены полуколичественными методами. Для этого используют внутреннюю нормировку, когда сравнивают площади МС пиков для различных протеоформ $\text{A}\beta$ [27,40]. Такое сравнение не отражает реального преобладания какой-либо протеоформы из-за различий в эффективности ионизации (например, пиковая интенсивность $\text{A}\beta_{1-17}$ в 8 раз выше, чем у $\text{A}\beta_{1-42}$

[49]), однако можно отслеживать относительные изменения в пептидном профиле. Спектры фрагментации ECD, EID и CID также можно использовать для полу-количественных оценок (Рис. 1) [39,45,46]. В целом полуколичественные подходы существенно доступнее по сравнению с изотопно-мечеными стандартами, и их применение представляется особенно целесообразным при изучении динамических изменений [51].

4. Дальнейшие перспективы МС исследований А β

Дальнейшие исследования видов А β в нативных биологических образцах, по-видимому, не имеют альтернативы МС для выяснения ряда аспектов. Среди них изучение фосфорилированных протеоформ является одной из наиболее актуальных задач, которая может пролить свет на роль путей фосфорилирования при амилоидозе. А β обладает тремя потенциальными сайтами фосфорилирования: Ser-8, Ser-26 и Tyr-10. Было показано фосфорилирование Ser-26 киназой cdc2 в нейронах NT-2 в мозге при БА [52]. Показано, что P-Ser-26-А β собираются в специфические олигомеры, которые проявляют повышенную токсичность в нейронах [53]. Для P-Ser-8, с одной стороны, были показаны корреляция с клиническими симптомами БА [54] и быстрое образование стабильных фибриллярных агрегатов в отсутствие ионов Zn^{2+} [55]. С другой стороны, имеются убедительные доказательства того, что P-Ser-8-А β_{1-42} и P-Ser-8-А β_{1-16} резко снижают индуцированную цинком агрегацию А β *in vitro* [56,57], а инъекции P-Ser-8-А β_{1-42} уменьшали образование амилоидных бляшек в гиппокампе мышей [57].

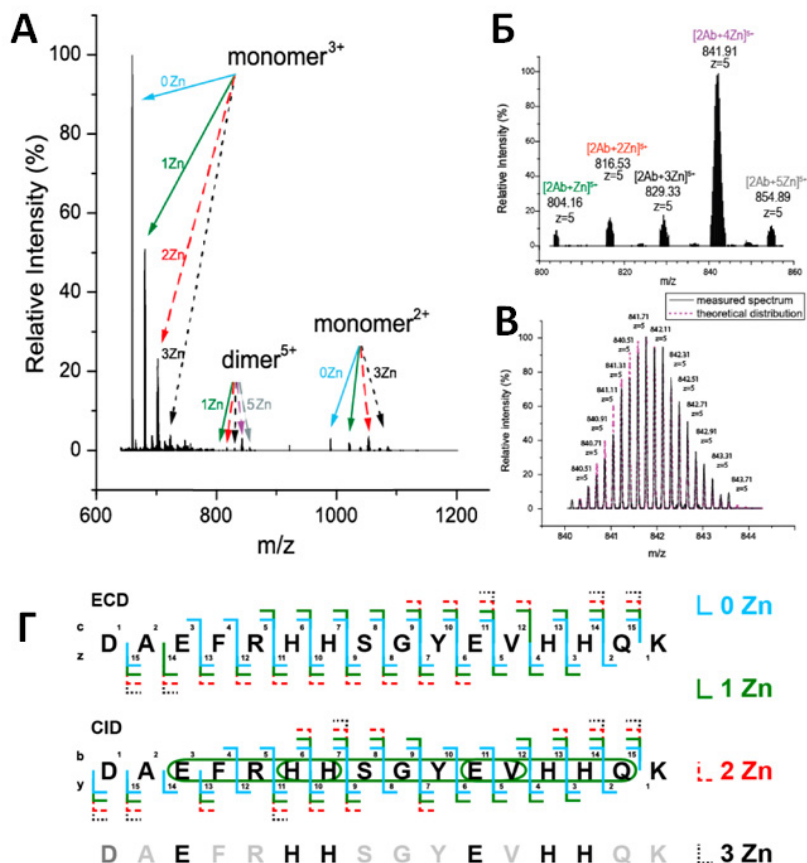


Рисунок 2. МС/МС анализ связывания ионов Zn^{2+} пептидом D7H-A β_{16} [67]. **(А)** Масс-спектр мономерных и димерных комплексов с различным количеством ионов. **(Б)** Область масс-спектра димерных комплексов. **(В)** Согласованность теоретического и измеренных изотопных распределений. **(Г)** Выявленные главные хелаторы Zn^{2+} (показаны черным).

Рацемизация обоих серинов Аβ также недостаточно изучена. Считается, что образование D-Ser-26 повышает токсичность Аβ [58]. Рацемизация Ser-8 еще более сомнитель-

на, однако может протекать с такой же вероятностью, что и у Ser-26 [26].

Хотя повышенные уровни нитрованных белков в тканях мозга и СМЖ при БА в целом являются характерной чертой БА [59], роль активных форм азота в амилоидозе требует дальнейшего уточнения. Выбор МС подходов для этого ограничен: ультрафиолетовое облучение может вызывать фотохимическую фрагментацию нитротирозина, поэтому использование MALDI-МС возможно только с инфракрасным лазером [60].

Измененная локализация ионов меди, железа, цинка и алюминия при взаимодействии с А β также может играть ключевую роль в патогенезе БА [61,62]. Исследования с помощью ESI-МС подтвердили, что способ связывания Cu^{2+} сильно зависит от pH, а Tyr-10 важен для координации ионов в дополнение к остаткам His-6, His-13 и His-14 [63]. А в хелатировании ионов Zn^{2+} при наследственной мутации D7H-А β преимущественно принимают участие Glu-3, His-6, His-7, Glu-11, His-13 и His-14, образующие до 3-х сайтов связывания (Рис. 2) [64].

Дальнейшие МС исследования различных видов А β остаются весьма актуальными в поиске эффективных стратегий терапевтического вмешательства. Применительно к моделям животных МС исследования могут уточнить динамику и структурные переходы при формировании патогенных форм А β в головном мозге, что может способствовать выявлению новых терапевтических мишеней. Популярным направлением исследований является активная и пассивная антиамилоидная иммунизация [65]. Было показано, что антитела к N-концу А β способны проходить через гематоэнцефалический барьер и воздействовать на отложения амилоида в тканях мозга [66,67]. При поиске стратегий хелатирования

металлов была выявлена эффективность некоторых соединений в снижении взаимодействий А β с металлами у пациентов с БА [68,69]. В целом, дальнейшие МС-исследования молекулярных особенностей А β также могут способствовать появлению новых терапевтических стратегий, что очень важно ввиду особой актуальности разработки эффективных методов терапии болезни Альцгеймера.

Ссылки

1. J. Gaugler, B. James, T. Johnson, et al., *Alzheimers Dement.* **2016**, *12*, 459-509.
2. J. Wang, B.J. Gu, C. L. Masters, Y.J. Wang, *Nat. Rev. Neurol.* **2017**, *13*, 612-623.
3. A.E. Roher, J. D. Lowenson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **1993**, *90*, 10836-10840.
4. D.J. Selkoe, J. Hardy, *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 595-608.
5. S.J.C. Lee, E. Nam, H.J. Lee, et al., *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 310-323.
6. D.J. Selkoe, *Physiol Rev.* **2001**, *81*, 741-766.
7. S. Galozzi, K. Marcus, K. Barkovits, *Expert Rev. Proteomics* **2015**, *12*, 343-354.
8. M.P. Kummer, M. T. Heneka, *Alzheimer's Res. Ther.* **2014**, *6*, 28.
9. S.X. Zhang-Nunes, M.L.C. Maat-Schieman, et al., *Brain Pathol.* **2006**, *16*, 30-39.
10. Y. Tomidokoro, A. Rostagno, et al., *Am.J. Pathol.* **2010**, *176*, 1841-1854.
11. T.E. Golde, S. T. DeKosky, D.Galasko, *Science* **2018**, *362*, 1250-1251.
12. L.K. Huang, S. P. Chao, C.J. Hu, *J. Biomed. Sci.* **2020**, *27*, 18.

13. E. Tamagno, M. Guglielmotto, et al., *J. Alzheimer's Dis.* **2018**, 62, 1241-1245.
14. S. Janelidze, E. Stomrud, et al., *Sci. Rep.* **2016**, 6, 26801.
15. H. Hampel, S.E. O'Bryant, et al., *Nat. Rev. Neurol.* **2018**, 14, 639-652.
16. A. Nakamura, N. Kaneko, et al., *Nature* **2018**, 554, 249-254.
17. G. Grasso, *Mass Spectrom. Rev.* **2019**, 38, 34-48.
18. G. Brinkmalm, E. Portelius, et al., *J. Mass Spectrom.* **2012**, 47, 591-603.
19. X. Zheng, L. Deng, et al., *Chem. Commun.* **2017**, 53, 7913-7916.
20. S. Mukherjee, K. A. Perez, et al., *Brain Commun.* **2021**, 3, fcab028.
21. N.V. Zakharova, A. E. Bugrova, et al., *Expert Rev. Proteomics.* **2018**, 15, 773-775.
22. N.V. Zakharova, A. S. Kononikhin, et al., *Mass Spectrom. Rev.* **2022**, e21775.
23. N.C. Wildburger, T.J. Esparza, et al., *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1-9.
24. A.M. Brown, J.A. Lemkul, et al., *Arch. Biochem. Biophys.* **2014**, 545, 44-52.
25. H. Mori, K. Takio, et al., *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 17082-17086.
26. J. Näslund, A. Schierhorn, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1994**, 91, 8378-8382.
27. E. Portelius, M. K. Gustavsson, et al., *Acta Neuropathol.* **2010**, 120, 185-93.
28. K. Inoue, D. Hosaka, et al., *Anal. Chem.* **2014**, 86, 797-804.
29. A.E. Roher, T. A. Kokjohn, et al., *Neurochem. Int.* **2017**, 110, 1-13.
30. J.S.H. Wang, S. N. Whitehead, K.K.C. Yeung, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2018**, 29, 786-795.

31. F. Ding, Y. Qian, et al., *Nanoscale* **2021**, 13, 7862.
32. J. Bastrup, S. Birkelund, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2019**, 33, 1711-1721.
33. J.N. Anker, W. P. Hall, et al., *J. Phys. Chem. C Nanomater Interfaces* **2009**, 113, 5891-5894.
34. M. Stoeckli, D. Staab, et al., *Anal. Biochem.* **2002**, 311, 33-39.
35. M.L. Moro, A. S. Phillips, et al., *Acta Neuropathol. Commun.* **2018**, 6, 3.
36. A.R. Kelley, S.B.H. Bach, G. Perry, *Biochim. Biophys. Acta — Mol. Basis Dis.* **2019**, 1865, 2040-2047.
37. E.V.Kugaevskaya, A. V. Veselovsky, et al., *Sci. Rep.* **2018**, 8, 298.
38. D.G. Ivanov, M. I. Indeykina, et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2020**, 31, 164-168.
39. S.I. Pekov, D. G. Ivanov, et al., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, 30, 1325-1329.
40. P. Bros, V. Delatour, et al., *Clin. Chem. Lab. Med.* **2015**, 53, 1483-1493.
41. T.R. Lambeth, D. L. Riggs, et al., *ACS Cent. Sci.* **2019**, 5, 1387-1395.
42. A.E. Roher, J. D. Lowenson, et al., *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 3072-3083.
43. S. Du, E. R. Readell, M. Wey, D. W. Armstrong, *Chem. Commun.* **2020**, 56, 1537-1540.
44. P.P. Hurtado, P.B. O'Connor, *Mass Spectrom. Rev.* **2012**, 31, 609-625.
45. M.I. Indeykina, I. A. Popov, et al., *Anal. Chem.* **2011**, 83, 3205-3210.
46. N.P. Sargaeva, C. Lin, P.B. O'Connor, *Anal. Chem.* **2009**, 81, 9778-9786.
47. N. DeGraan-Weber, J. Zhang, J. P. Reilly, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2016**, 27, 2041-2053.

48. I. Kaya, H. Zetterberg, et al., *ACS Chem. Neurosci.* **2018**, 9, 1802–1817.
49. E. Portelius, A.J. Tran, et al., *J. Proteome Res.* **2007**, 6, 4433–4439.
50. V. Ovod, K.N. Ramsey, et al., *Alzheimer's Dement.* **2017**, 13, 841–849.
51. A.E. Bugrova, P.A. Strelnikova, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 27.
52. N.G.N. Milton, *Neuroreport* **2001**, 12, 3839–3844.
53. S. Kumar, O. Wirths, et al., *Acta Neuropathol.* **2016**, 131, 525–537.
54. A. Rijal Upadhaya, I. Kosterin, et al., *Brain* **2014**, 137, 887–903.
55. E. Jamasbi, F. Separovic, et al., *Mol. Biosyst.* **2017**, 13, 1545–1551.
56. A.A. Kulikova, P.O. Tsvetkov, et al., *Mol. Biosyst.* **2014**, 10, 2590–2596.
57. E.P. Barykin, I.Y. Petrushanko, et al., *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, 11, 302.
58. T. Kubo, S. Nishimura, Y. Kumagae, I. Kaneko, *J. Neurosci. Res.* **2002**, 70, 474–483.
59. H. Tohgi, T. Abe, et al., *Neurosci. Lett.* **1999**, 269, 52–54.
60. B.A. Petre, N. Youhnovski, et al., *Eur. J. Mass Spectrom.* **2005**, 11, 513–518.
61. P.A. Adlard, A.I. Bush, *J. Alzheimers Dis.* **2018**, 62, 1369–1379.
62. L. Wang, Y.L. Yin, et al., *Transl. Neurodegener.* **2020**, 9, 10.
63. L. Habasescu, M. Jureschi, et al., *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2020**, 26, 2529–2546.
64. O.I. Kechko, A.A. Adzhubei, et al., *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 11241.
65. H. Hampel, L.S. Schneider, et al., *Expert Rev. Neurother.* **2015**, 15, 83–105.

66. S. Schroeter, K. Khan, et al., J. Neurosci. 2008, 28, 6787-93.
67. F. Bard, C. Cannon, et al., Nat. Med. 2000, 6, 916-919.
68. E.L. Sampson, L. Jenagaratnam, R. McShane, Cochrane Database Syst. Rev. 2014, CD005380.
69. L. Lannfelt, K. Blennow, et al., Lancet Neurol. 2008, 7, 779-786.

6. РОЛЬ МЕЖМОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ФОРМИРОВАНИИ СТРУКТУРЫ И ФАЗОВОГО ПОВЕДЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ В РАСТВОРЕ

И.Г. Плящина

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

Биополимеры (белки и полисахариды), благодаря способности стабилизировать дисперсные системы и образовывать гели различной природы (термо-, крио- и ионотропные), служат основными структурообразующими компонентами сложных композиций, используемых в производства традиционного, функционального и лечебного питания, а также в фармакологии и косметологии. Эти композиции представляют собой многокомпонентные гетерофазные системы (гели, эмульсии, суспензии, пены). Типичными характеристиками этих систем является квазиравновесный характер превращений и превалирование неспецифических взаимодействий при формировании структуры.

Фундаментальными явлениями, определяющими структуру и свойства биополимерных смесей в растворе являются ограниченная термодинамическая совместимость и комплексобразование. Вследствие малого вклада конфигурационной энтропии в свободную энергию смешения полимеров, для обеспечения устойчивости системы необходимо, чтобы полимеры взаимодействовали экзотермически, либо процесс смешения сопровождался существенным повышением энтропии вследствие высвобождения молекул растворителя (дегидратации) или противоионов.

Формирование структуры подобных систем, их стабилизация и дестабилизация происходит путем самоорганизации

биополимеров в растворе (конформационных и фазовых переходов, ассоциации и фазового разделения, комплексообразования, гелеобразования и др.) как в объеме раствора, так и на границе раздела фаз, Определяющую роль при этом играет характер взаимодействий между компонентами системы. Установление взаимосвязи между строением биополимеров, характером их взаимодействия друг с другом и процессами самоорганизации в смешанных растворах имеет фундаментальное значение.

Цель исследований лаборатории физико-химической модификации биополимеров заключается в создании научных подходов и практических приемов регулирования структуры, состава и стабильности многокомпонентных систем, содержащих биополимеры, в частности, белки и полисахариды.

Один из развиваемых подходов заключается в целенаправленном изменении характера и интенсивности взаимодействий биополимеров разного строения друг с другом и растворителем и изучении изменений фазового состояния системы, состава и структуры образовавшихся фаз. Второй подход — в создании новых функциональных макрокомпонентов путем модификации их структуры. Исследование фазовых равновесий в условиях ассоциативных и сегрегативных взаимодействий в растворах биополимеров имеет приоритетное значение, так как позволяет в широких пределах регулировать структуру и свойства многокомпонентных систем.

Для регулирования фазового состояния, структуры и реологических свойств смешанных растворов биополимеров Ю. А. Антоновым предложены новые подходы, в частности, индуцирование фазового разделения в однофазной системе высоко совместимых биополимеров за счет введения малых количеств сильного полиэлектролита или повышения скорости сдвига. С использованием рео-оптической методологии охарактеризо-

ваны процессы фазового разделения и изменения структуры в области концентраций вблизи и вдали от критической точки ряда систем и установлены ключевые физико-химические параметры, определяющие фазовое состояние и структуру полученных систем.

Для характеристики энергетики кооперативных конформационных и фазовых переходов порядок-беспорядок (клубок-глобула, двойная спираль-клубок, мицеллообразование, жидкофазное расслоение и коллапс гелей) в процессе самоорганизации биополимеров в бинарных и смешанных растворах и установления влияния на нее других компонентов системы (био- и синтетических полимеров), а также — установления молекулярных механизмов взаимодействия макрокомпонентов, использовали термодинамический анализ данных дифференциальной адиабатной сканирующей микрокалориметрии и изотермической калориметрии смешения. Это направление развивается В. Я. Гринбергом с сотрудниками группы термохимии макромолекул (ИНЭОС РАН) и нашей лаборатории.

Практически значимыми следствиями процессов фазового разделения в смешанных растворах биополимеров являются: фракционирование и концентрирование биополимеров, получение гелей различных типов (смешанных, наполненных, комплексных); стабилизация и дестабилизация дисперсных систем (концентрирование эмульсий и дисперсий) и др.

Вторым развиваемым направлением исследований лаборатории является непосредственно модификация структуры биополимеров (запасных белков и полисахаридов) семян зернобобовых и масличных культур для создания новых эссенциальных ингредиентов с высокими функциональными свойствами (Поляков А. В., Вассерман Л. А., Плащина И. Г.).

Семена зернобобовых культур (гороха, кормовых бобов, чечевицы, нута и др.) являются ценными источниками пищевого белка и крахмала. Запасные белки (глобулины) семян обладают сбалансированным АК- составом, но недостаточно высокими био- и техно-функциональными свойствами, обусловленными особенностями молекулярной структуры: высокой конформационной стабильностью и низкой поверхностной гидрофобностью. Наряду с ценными микро- и макрокомпонентами, семена содержат антиалиментарные факторы питания (ингибиторы ферментов, гликозиды, фитиновую кислоту, фенольные соединения и др.), что отрицательно влияет на атакуемость белков ферментами ЖКТ.

В лаборатории развиваются два направления модификации структуры, физико-химических и функциональных свойств растительных глобулинов: 1) ограниченный протеолиз изолятов глобулинов под действием экзогенных ферментов, в частности, папина; 2) ограниченный протеолиз глобулинов под действием эндогенных папаиноподобных протеаз в процессе прорастания семян с последующим фракционированием. Оба процесса протекают с качественно похожими результатами, а именно, сопровождаются понижением молекулярной массы и гидродинамического размера молекул глобулинов, повышением их поверхностной гидрофобности и понижением конформационной стабильности. Следствием изменений структуры белков является повышение растворимости, пенообразующей, эмульгирующей и стабилизирующей способности, а также — атакуемости ферментами желудочно-кишечного тракта. Преимущество процесса прорастания заключается в относительной простоте и невысокой стоимости, так как он основан на использовании катаболического потенциала сырья и, одновременно с модификацией структуры, позволяет понизить действие антиалиментарных факторов питания.

Вассерман Л. А. развивает исследования крахмалов различного ботанического происхождения в зависимости от генотипа растений, условий культивирования и видов технологической обработки семян, включая прорастание. Методология исследований, включающая структурные и термодинамические методы, развита В. П. Юрьевым и сотрудниками. Работа проводится в содружестве со многими профильными институтами. Исследования направлены на повышение эффективности селекции растений, содержащих крахмал, технологии хранения и переработки крахмалсодержащего сырья

Ниже будут приведены отдельные примеры работ, иллюстрирующие развиваемые подходы и полученные результаты.

Комплексообразование и ассоциативное фазовое разделение

*Глобулярный белок — заряженный полисахарид
с разветвленной цепью*

Методами конфокальной лазерной микроскопии, фазового анализа, динамического светорассеяния, турбидиметрии, кругового дихроизма и флюоресцентной спектроскопии исследован процесс комплексообразования и ассоциативного фазового разделения (комплексной коацервации) в водном растворе лизоцима куриного яйца (Lys) и гуммиарабика (GA) в зависимости от состава смеси (Lys/GA). [1].

Впервые продемонстрировано образование мультиламелярной структуры капель коацерватной фазы, подобной структуре мультиламелярных липосом. Количество концентрических вязких слоев максимален при составе, соответствующем максимальному выходу коацервата. Концентрация GA в слоях возрастает от периферии к центру коацерватной капли (рисунок 1).

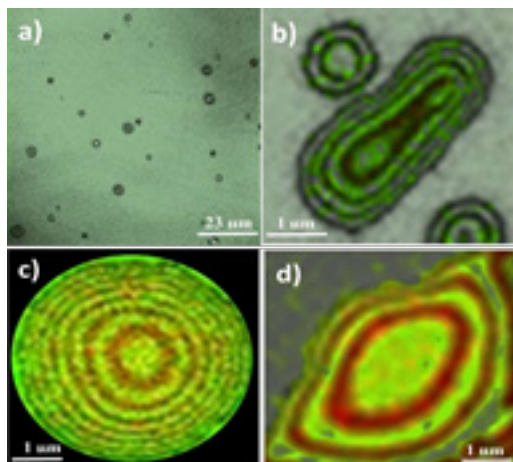


Рисунок 1. Изображения системы гуммиарабик-лизоцим с конфокального микроскопа. pH7.0, ионная сила 0,01 М. (a) $q=0.3$. (b) $q=0.5$, (c) $q=0.7$, (d) $q=1.1$ [1].

Глобулярный белок — белок

с клубкообразной или мицелярной структурой

Изучено влияние молекулярной организации казеина (молекулярно-дисперсная казеината натрия (SC) или мицелярная казеина) на ассоциативные взаимодействия с малым глобулярным основным белком — лизоцимом куриного яйца и ассоциативные фазовые равновесия в растворе.[2]. Установлено, что наряду с основными детерминантами процесса комплексообразования ($[Cat+]/[An-]$, pH, ионная сила), существенную роль в формировании структуры и морфологии комплексов играет молекулярная организация казеина. Комплексообразование в обоих случаях протекает по кооперативному механизму, характеризуется близкими константами связывания, однако, структура, эффективный заряд и морфология образованных комплексов существенно различаются. Локализация белков в комплексных частицах изучена методом конфокальной ми-

кроскопии с использованием двух флуоресцентных красителей, отдельно для каждого из белков (Рисунок 2).

При $[Cat+]/[An-] > 1$, т. е. избытке лизоцима, частицы комплексов SC имеют гидрофобное ядро и гидрофильное окружение из молекул лизоцима (рисунок 2с). Наличие данной структуры комплекса не установлено для системы лизоцим-мицеллярный казеин даже в условиях большого избытка лизоцима в смеси. В случае мицеллярного казеина лизоцим равномерно распределен в составе частиц комплексов.

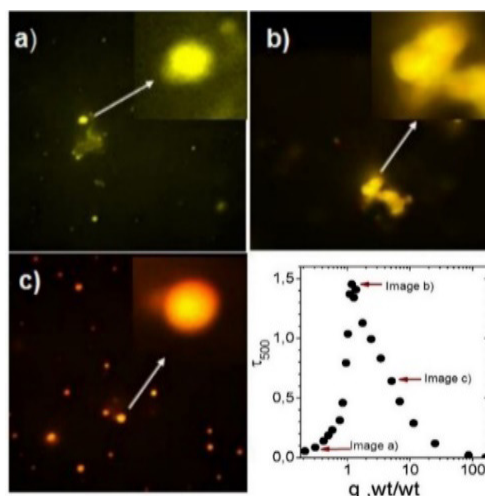


Рисунок 2. Изображение с конфокального микроскопа для системы лизоцим /казеинат натрия (lys/sc) с разными величинами отношения зарядов lys/sc.(a) 0.41, (b) 1.0, (c)3.9. Суммарная концентрация белков в смеси 0.02%. lys представлен оранжевым цветом, sc зеленым цветом. нейтальное ядро (комплекс lys+sc)-желтым цветом [2].

Повышение совместимости, индуцированное сильным полиэлектролитом

Показана возможность увеличения совместимости биополимеров в концентрированных эмульсиях типа «вода в воде»

вплоть до перехода из двухфазного в однофазное состояние, на примере смесей BSA/декстран [3] и желатина/декстран [4], в присутствии малых добавок сильного полиэлектролита (декстран сульфата (DS), λ и κ -каррагинана) (рисунок 3а, б). Полученный эффект увеличения совместимости и фазового перехода является обратимым. Увеличение ионной силы приводит к падению совместимости и обратному фазовому переходу.

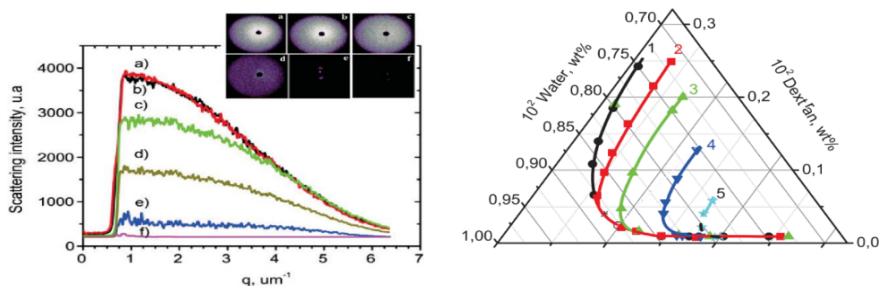


Рисунок 3. а). Интенсивность светорассеяния эмульсии вода (83.72%) желатина (3.6%) декстран (12.7%). (Точка а) на рисунке 7а, после добавления к ней разного количества DS, %: (b) 0.01, (c) 0.03, (d) 0.05, (e) 0.065, (f) 0.14. **б)** Изотермические фазовые диаграммы той же системы. Концентрация DS (wt %): (1) 0, (2) 0.01, (3) 0.03, (4) 0.05, (5) 0.065, (6) 0.14 [4].

Повышение совместимости под действием сил сдвига

На примере системы желатина/декстран установлено, что сдвиговое течение может вызывать в концентрированных эмульсиях типа «вода в воде» переход из двухфазного в однофазное состояние [5]. Эволюцию структуры (фазовый переход) регистрировали методом малоуглового светорассеяния в потоке одновременно с характеристикой структуры методом оптической микроскопии в потоке с приставкой Linkam. Определены изотермические фазовые диаграммы эмульсий в условиях фиксированных скоростей сдвига (рисунок 4)

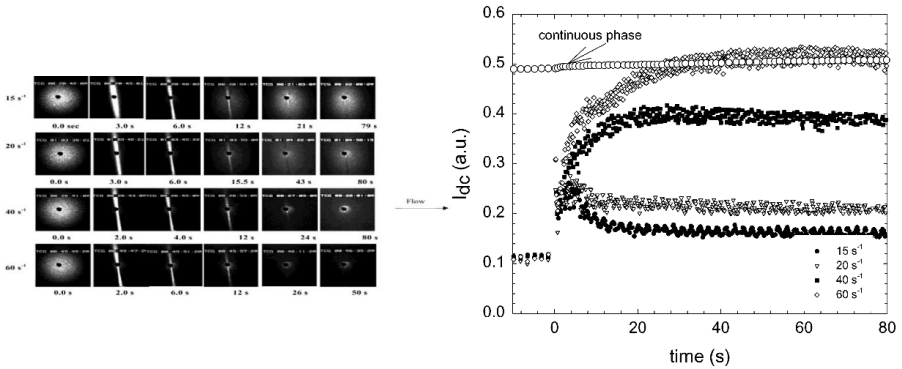


Рисунок 4. (левый) Эволюция SALS образов как функция времени при различных скоростях сдвига. Секунды относятся ко времени после приложения сдвигового течения. (Правый) Эволюция интенсивности пропускания (I_{dc}) как функции времени при различных скоростях сдвига [5].

Исследование модельных эмульсий (белок 1-белок 2, белок-полисахарид, полисахарид 1-полисахарид 2) [6] позволило сделать вывод, что в условиях сдвигового течения уровень активности обоих биополимеров является ключевым фактором при определении способности эмульсии подвергаться сдвиговой компатибилизации, в то время как межфазное натяжение и вязкости фаз оказывают меньшее влияние на фазовое поведение эмульсий [7].

Малый глобулярный белок-полисахарид с высокой плотностью заряда

На примере исследования комплексообразования в растворе ряда систем (β -лактоглобулин-олигохитозан, β -лактоглобулин-фукуидан, β -лактоглобулин-декстран сульфат) установлены закономерности изменения конформационной стабильности белка и его четвертичной структуры, индуцированные процессом комплексообразования [8–10]. Путем регулирования 2-х параметров:

рН раствора и отношения концентраций макрокомпонентов можно изменить тип взаимодействий («заряд-диполь» вблизи рI β-лактоглобулина и «заряд-заряд» вдали от рI) и, как следствие, повысить или понизить конформационную стабильность белка и изменить его четвертичную структуру (рисунок 5). Сужение конформационного перехода у связанного белка по сравнению со свободным указывает на изменение четвертичной структуры белка в составе комплекса.

а) DIPOLE-CHARGE рН 5.5

б) CHARGE-CHARGE рН 6.0

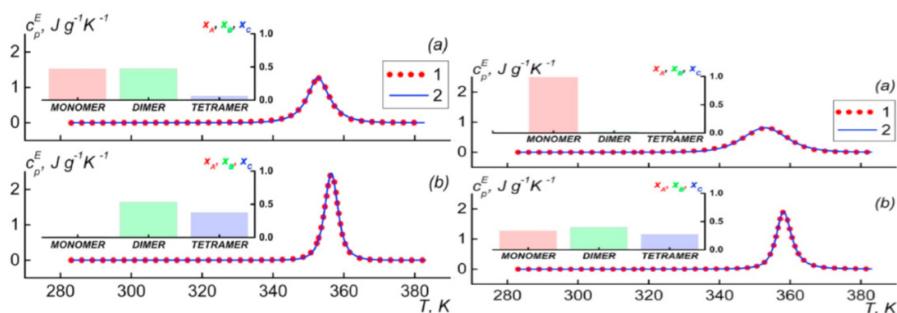


Рисунок 5. а) слева — **рН 5.5** Термограммы растворов свободного BLG (а) и в смеси BLG-OCS (б) в 25 mM ацетатном буфере при (а) $q_w = 0$, (б) $q_w = 4$.

а) справа-рН 6,0 Термограммы свободного BLG (а) и в смеси BLG-OCS (б) при рН 6.0 в 100 mM ацетатном буфере при (а) $q_w = 0.4$; (б) $q_w = 7.5$. Аппроксимация термограмм моделью трех независимых переходов «все или ничего». Молярные доли различных форм BLG, рассчитанные в результате фиттинга, даны в соответствующих вставках Красным цветом обозначен свободный белок, синим — белок в составе комплекса [10].

Анализ термограмм позволил заключить, что изменения конформационной стабильности белка, индуцированные комплексобразованием с заряженным полисахаридом, определяются типом взаимодействий белок-полисахарид и составом смеси макрокомпонентов. Заряженный полисахарид не влияет на конформационную стабильность белка, когда оба биополимера

одноименно заряжены и термодинамически несовместимы. Диполь-заряд (вблизи pI белка) и заряд-заряд ассоциативные взаимодействия промотируют образование стабильных, преимущественно растворимых комплексов. В этом случае сродство полисахарида к белку имеет энтальпийную природу и высокую константу связывания (порядка 10^6 M^{-1}). Обратимое связывание имеет место в условиях низкой ионной силы, тогда как необратимая стохиометрическая интерполиэлектrolитная реакция наиболее вероятно реализуется при довольно высокой ионной силе. Комплексообразование промотирует изменения четвертичной структуры белка в направлении образования димерных и тетрамерных форм. Результаты фиттинга показывают, что свободный белок и при низком содержании полисахарида в смеси ($qw \sim 0.4$), представлен исключительно в форме мономера, а димеры и тетрамеры доминируют при избытке полисахарида. ($qw \sim 8$). Третичная структура связанного белка дестабилизирована при низких концентрациях полисахарида и стабилизирована при высоких. Эти изменения в стабильности белка имеют энтропийную природу. Вариабельность конформационных и структурных изменений белка, связанного заряженной матрицей, необходимо учитывать при дизайне нанокомплексов для доставки конформационно-лабильных лигандов, в частности, терапевтических белков.

Энергетика и механизм фазового перехода в растворе олигозитозана

Ранее была установлена способность β -глицерофосфата предотвращать осаждение хитозана при $pH > 6,2$, что имеет важное значение для его биомедицинского применения. Механизм термочувствительного поведения олигохитозана под действием β -глицерофосфата натрия (GP) исследован методами ИТС,

DSC и DLS [11]. Установлено, что при нагревании олигохитозан в водном растворе претерпевает кооперативный переход микрофазового расслоения, приводящий к образованию стабильных наночастиц (рисунок 6). Процесс связывания GP с олигосахаридом характеризуется положительным значением энтальпии, что указывает на значительный вклад дегидратации и связанной с ней реорганизации гидратной оболочки олигосахарида. Энергетика термического фазового перехода олигохитозана исследована методом DSC в зависимости от концентрации GP и диэлектрической постоянной растворителя (рисунок 7).

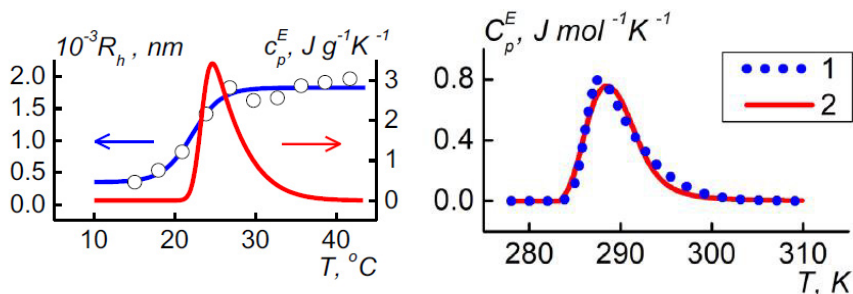


Рисунок 6. Средний гидродинамический радиус и термограмма смеси наночастиц олигосахарида и GP. GP/олигохитозан молярное отношение $r=10.6$.

Рисунок 7. Функция избыточной теплоемкости фазового перехода олигохитозана при молярном отношении GP/олигохитозан $r=20$ концентрации олигохитозана 5 мг мл⁻¹.

Кривая 1- экспериментальная и кривая 2 — расчетная по модели Okada — Tanaka при $\Delta tH_o=6.2 \pm 0.2$ кДж мол⁻¹, $\Delta tH_{vh}=0.60 \pm 0.03$ кДж мол⁻¹, $T^*=290.3 \pm 0.1$ K, $\sigma=(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-6}$. Стандартная ошибка фитинга и корреляционный коэффициент ± 0.04 кДж мол⁻¹ K⁻¹ и 0.987, соответственно.

Ключевые характеристики термограмм растворов количественно описываются теорией Okada-Tanaka, характеризующей кооперативную гидратацию макромолекул. Зависимости термодинамических параметров перехода от этих переменных использованы для установления механизма термочувствительно-

сти олигохитозана, Охарактеризована способность наночастиц олигохитозана к контролируемому температурой связыванию и высвобождению лекарства (ибупрофена) в условиях, близких к физиологическим, для оценки потенциала олигохитозана как средства доставки стимулчувствительных лекарств.

Модификация структуры и свойств растительных глобулинов

Установлены закономерности изменения структуры растительных глобулинов (легуминов бобов *Glycine max* и *Vicia faba*) — основных запасных белков зернобобовых и масличных культур — в ходе ограниченного протеолиза под действием папаина и их связь с термодинамической стабильностью, гидродинамическим и адсорбционным поведением белков [12–13]. Для сравнительной характеристики структуры и свойств интактных и модифицированных легуминов использовали методы статического и динамического светорассеяния, малоуглового рентгеновского рассеяния, электрофорез по Допплеру, SDS-PAGE электрофорез, скоростную седиментацию, ультрафиолетовую и флуоресцентную спектроскопию, дифференциальную сканирующую микрокалориметрию, динамическую тензиометрию, и двумерную динамическую дилатометрию.

Показано, что отщепление в процессе ограниченного протеолиза слабоструктурированных С-концевых фрагментов α -цепей приводит к понижению молекулярной массы, гидродинамического размера, радиуса инерции и степени асимметрии молекул легуминов, а также — понижению термодинамического сродства молекул легуминов к воде, понижению поверхностного заряда и увеличению доступной для растворителя гидрофобной поверхности за счет экспонирования дополнительного числа остатков ароматических аминокислот β -цепей. Протеолиз вызывает

понижение конформационной стабильности молекул легуминов и уровня кооперативности процесса их термической денатурации; процесс денатурации как интактных, так и модифицированных легуминов имеет многостадийный характер, включающий стадию диссоциации молекулы на субъединицы и последовательное плавление двух энергетически неэквивалентных доменов; процесс ограниченного протеолиза не вызывает потерю четвертичной и третичной структуры легуминов, а проявляется лишь в понижении их стабильности. Повышение скорости диффузии модифицированных молекул в результате уменьшения молекулярной массы и гидродинамического размера, а также понижение конформационной стабильности и поверхностного заряда легуминов приводят к уменьшению энергетического барьера адсорбции и повышению скорости формирования адсорбционных слоев легуминов на границе воздух/раствор. Рост комплексного дилатационного модуля вязкоупругости адсорбционных слоев обусловлен повышением поверхностной гидрофобности в сочетании с большей конформационной подвижностью по сравнению с интактным состоянием, обеспечивая большее число контактов адсорбируемых молекул с межфазной границей. Таким образом, установленная причинно-следственная связь изменений структуры глобулинов в условиях ограниченного протеолиза с изменением их конформационной стабильности и адсорбционного поведения, позволила прогнозируемо повысить их функциональные свойства (пенообразующую и эмульгирующую способность), а также увеличить атакуемость ферментами ЖКТ *in vitro*

Установленные закономерности имеют общий характер. Полученный опыт использовали для разработки нового подхода к модификации структуры и свойств запасных белков семян зернобобовых методом прорастания. Результаты показали, что модификация глобулинов под действием эндогенных папаиноподобных протеаз в процессе прорастания в строго контроли-

руемых условиях сопровождается аналогичными изменениями структуры и физико-химических свойств глобулинов, следствием чего является улучшение их технофункциональности и биологической ценности.

Структура, морфология и термодинамические свойства крахмалов

Методами сканирующей электронной микроскопии, широкоугольного рентгеновского рассеяния и дифференциальной сканирующей микрокалориметрии изучены структура, морфология и термодинамические параметры плавления гранул крахмалов различного происхождения.

В случае крахмалов, выделенных из 11 практически значимых сортов кукурузы (*Zea mays L.*) четырех различных генотипов (*wx*, «*ae*», *su* и переходный от *wx* к *ae*») установлено, что гены, участвующие в биосинтезе кукурузного крахмала, обладают многофакторным действием, которое проявляется в изменении биохимических показателей зерна, химического состава крахмалов (в частности, содержания амилозы), гранулометрических показателей и термодинамических параметров плавления гранул. Установлено, что увеличение содержания амилозы сопровождается накоплением дефектных структур крахмалов, что отражается в понижении термодинамических параметров их плавления. Динамическая вязкость гелей изученных крахмалов уменьшается при увеличении содержания в них амилозы и не зависит от генотипа растений. При этом общая полиморфная структура кукурузного крахмала (В-тип) не изменяется. Работа направлена на повышение эффективности селекции крахмалсодержащих растений [14,15] При исследовании структуры и термодинамических свойств крахмалов, экстрагированных из клубней трансгенных растений картофеля с измененным гормональным статусом

под действием гена синтеза ауксина *tms1* установлено увеличение их термостабильности, а также — образование более упорядоченной молекулярной структуры [16]. Впервые обнаружены характерные изменения структуры крахмала в процессе различных сроков пребывания в покое (при 2–4 °С) клубней картофеля, полученных *in vivo* и *in vitro*, степень выраженности которых коррелировала со сроками хранения. Доля энтальпии плавления низкотемпературных переходов в общей энтальпии плавления гранул возрастала с увеличением длительности хранения клубней. Наблюдаемый эффект был существенно выше у *AtPhyB*-трансформантов по сравнению с контролем, но мало зависел от условий выращивания растений (*in vivo* или *in vitro*). Доля гранул нерегулярной формы и накопление дефектных структур в гранулах крахмала возрастали с увеличением времени хранения, причем в большей степени у *PhyB*-трансгенных, чем у контрольных образцов. [17].

Изучено влияние продолжительности процесса проращивания на выход и состав крахмала на примере 4-х сортов гороха, 2-х сортов нута и 1 сорта ячменя голозерного. Установлено, что с увеличением времени проращивания до определенного предела общей закономерностью является понижение выхода крахмала и изменение его состава в сторону повышения содержания амилозы. Установленные закономерности играют важную роль при выборе сырья и параметров технологического процесса переработки семян с получением крахмала с повышенной резистентностью, а также — проростков, являющихся ценным источником физиологически активных веществ для функционального питания и биомедицины [18]. Предложен новый способ производства и модификации крахмала при переработке зерновых и зернобобовых культур, заключающийся в переработке пророщенного зерна, обеспечивающий кроме традиционных побочных продуктов, получение нового продукта — проростков зерна. Получен патент на изобретение [19].

Показано, что крахмал, подвергнутый механической обработке, характеризуется более низкими значениями температуры, энтальпии и уровня кооперативности процесса плавления. В то же время механически модифицированный крахмал обладает более высокими показателями водорастворимости, водопоглощения, ферментативной доступности для глюкоамилазы по сравнению с нативным [20].

Публикации

1. Y. A. Antonov, I. L. Zhuravleva *Food Hydrocolloids*, **2020**, 105, 05749.
2. Y. A. Antonov, Paula Moldenaers, Ruth Cardinaels, *Food Hydrocolloids*, **2017**, 62, 102–118.
3. Y. A. Antonov, Bernhard A. Wolf, Paula Moldenaers, *Food Hydrocolloids* **2015**, 43, 243–251.
4. Y. A. Antonov, P. Moldenaers, *Food Hydrocolloids*, **2012**, July, 213–223.
5. Y. A. Antonov P. Van Puyvelde, P. Moldenaers, *Food Hydrocolloids*, **2012**, 264–268.
6. Y. A. Antonov, P. Moldenaers, *Biomacromolecules*, **2009**, 10(12), 3235–45.
7. Y. A. Antonov, Van Puyvelde, P. Moldenaers, *Food Hydrocolloids*, **2009** 23 (2), 262–270.
8. T. V. Burova, N. V. Grinberg, A. S. Dubovik, I. G. Plashchina, A. I. Usov, V.Y Grinberg, *Food Hydrocolloids* **2022**, 122, 107027.
9. T. V. Burova, N. V. Grinberg, A. S. Dubovik, I. G. Plashchina, A. I. Usov, V.Y Grinberg, *Food Hydrocolloids* **2022**, 129, 107666.
10. T. V. Burova, N. V. Grinberg, V.E Tikhonov, A. S. Dubovik, V. N. Orlov, I. G. Plashchina, A. I. Usov, A. R. Khokhlov, *Food Hydrocolloids* **2023**, 134, 108021.

11. V. Y. Grinberg, T. V. Burova, N. V. Grinberg, A. S. Dubovik, V. E. Tikhonov, V.N Orlov, I. G. Plashchina, Alvarez-Lorenzo C., A. R. Khokhlov *International journal of biological macromolecules*, **2020**, 164, 1451–1460.
12. А. В. Поляков, А. Н. Даниленко, А. В. Кривандин, С. В. Рудаков, А. С. Рудакова, А. Д. Шутов, И. Г. Плащина, *Вестник Казанского Технологического Университета*, **2013**, № 9, 184–189.
13. А. В. Поляков, А. Н. Даниленко, С. В. Рудаков, А. С. Рудакова, А. Д. Шутов, И. Г. Плащина, *Вестник Казанского Технологического Университета*, **2014**, 17, 203–208; **2014**, 17, 21. 0–215; **2014**, 17, 239–242.
14. E. B. Khatefov, V. G. Goldstein, A. V. Krivandin, L. A. Wasserman, *Polymers*, **2023**, 15, 1976.
15. Л. А. Вассерман, А. Г. Филатова, Э. Б. Хатефов, В. Г. Гольдштейн, И. Г. Плащина, *Хим. физика*, **2021**, 40(2), 74–83.
16. L. A. Wasserman, A. I. Sergeev, V. G. Vasil'ev, I. G. Plashchina, N. P. Aksenova, T. N. Konstantinova, S. A. Golyanovskaya, L. I. Sergeeva, G. A. Romanov, *Carbohydrate Polymers* **2015**, **125**, 214–223.
17. L. A. Wasserman, O. O. Kolachevskaya, A. V. Krivandin, A. G. Filatova, O. V. Gradov, I. G. Plashchina, G. A. Romanov, *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 8397.
18. Н. Р. Андреев, В. Г. Гольдштейн, Л. А. Вассерман, Л. П. Носовская, Л. В. Адикаева, *Достижения науки и техники АПК* **2020**, 34(12), 74–78.
19. В. Г. Гольдштейн, Л. А. Вассерман, Л. П. Носовская, Л. В. Адикаева, Е. О. Голионко, И. Г. Плащина. Патент РФ № 2725253, **2020**.
20. Л. А. Вассерман, А. А. Папахин, А. В. Кривандин, А. Г. Филатова, З. М. Бородина, И. Г. Плащина, *Хим. Физика* **2022**, 41 (2), 62–69.

7. МОЛЕКУЛЯРНОЕ КОНСТРУИРОВАНИЕ СТИМУЛ- ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ БИОПОЛИМЕРНЫХ СИСТЕМ АДРЕСНОЙ ПЕРОРАЛЬНОЙ ДОСТАВКИ НУТРИЦЕВТИКОВ

М.Г. Семёнова

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

Введение

Сбережение здоровья человека ставит широкий круг задач, связанных с профилактикой и лечением социально-значимых заболеваний как хронических неинфекционных (ХНИЗ: сердечно-сосудистых, сахарного диабета 2 типа, онкологии, нейродегенеративных, а также респираторных заболеваний), так и инфекционно-воспалительных — вирусной и бактериальной этиологии. К настоящему времени общепризнанно, что развитие ХНИЗ в большой степени обусловлены несбалансированным и неполноценным питанием, вызванным дефицитом незаменимых биологически активных веществ, так называемых нутрицевтиков, обладающих как питательной, так и фармацевтической ценностью [1–3]. В то же время для поддержания иммунитета и сопротивляемости организма инфекционным заболеваниям, кроме потребления лекарственных веществ, также нужна поддержка организма адекватным количеством нутрицевтиков [4,5].

Большинство известных низкомолекулярных нутрицевтиков делятся на эссенциальные, т. е. незаменимые, и на неэссенциальные, т. е. заменимые. К незаменимым нутрицевтикам относят определённые аминокислоты, полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК: омега-3 и омега-6), различные минералы

и витамины (D₃, E, K и др.) [6]. В то время, как к заменимыми нутрицевтиками относят, например, различные фенольные соединения, выполняющие функции антиоксидантов: эпигаллокатехин галлат, силибин, ресвератрол, куркумин, β-каротин, кверцетин и др. [6]. По своей природе, многие из незаменимых и заменимых нутрицевтиков являются гидрофобными соединениями. По этой причине, они обычно не растворимы в воде и биологических жидкостях организма, что приводит к их низкой биодоступности и плохому биоусвоению в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ), и, как следствие, низкой эффективности *in vivo*. Кроме того, нутрицевтики, как правило, обладают низкой химической стабильностью при обработке и хранении под воздействием кислорода воздуха, света и высоких температур, а также нестабильностью и неконтролируемой биодоступностью в ЖКТ.

Таким образом, большой научный и практический интерес вызывает молекулярное конструирование инновационных стимул-чувствительных биополимерных микро- и нанокапсул для нутрицевтиков с целью их защиты от неблагоприятных факторов окружающей среды и адресной пероральной доставки в клетки «мишени» ЖКТ без потерь их биологической активности и в адекватном для оздоровительного эффекта количестве [7–9]. В частности, при пероральной доставке нутрицевтиков такими клетками-мишенями могут быть клетки эпителия пищеварительного тракта (ротовой полости, желудка и кишечника). В то же время разрабатываемые системы доставки, на основе природных биополимеров (белков и полисахаридов), могут выполнять функции физиологически активных ингредиентов нового поколения в составе обогащённых, функциональных, лечебных или специализированных пищевых систем различной структуры [10,11].

1. Преимущества природных биополимеров при создании пероральных систем доставки нутрицевтиков

В настоящее время наблюдается возрастающий интерес к новым возможностям и перспективам использования биополимеров (белков и полисахаридов), выделяемых из возобновляемого природного сырья. Это обусловлено как потребностью создания биологически совместимых функциональных полимерных материалов для улучшения здоровья и профилактики ХНИЗ с помощью диетотерапии [12,13], так и растущими требованиями потребителей к «натуральности» продуктов пищевого и фармацевтического назначения [14].

Кроме того, к настоящему времени раскрыт значительный терапевтический потенциал природных биополимеров, который основывается на следующих их свойствах: антигипертензивных [10]; антидиабетических [15]; гиполипидемических и кардиозащитных [16]; антимикробных [17]; пребиотических [18]; профилактических в канцерогенезе, вызванном окислительным стрессом [10,19–21]. При этом, белки и полисахариды обладают водорастворимостью, наноразмерами, амфифильностью, поверхностной активностью, стимул-чувствительностью и гидролизуются ферментами пищеварительного тракта [22,23]. Все эти свойства делают природные биополимеры незаменимыми при создании инновационных ингредиентов, содержащих нутрицевтики, таргетного профилактического и терапевтического действия (антиоксидантного, антидиабетического или антиракового), для широкой линейки функциональных, специализированных и лечебных продуктов питания и напитков.

2. Потенциальные возможности и перспективы использования природных биополимеров в создании комплексных и гибридных систем доставки нутрицевтиков

2.1 Роль ассоциативных взаимодействий биополимеров в создании систем доставки нутрицевтиков

К настоящему времени установлено, что использование отдельных природных биополимеров, для создания систем доставки нутрицевтиков, является менее эффективным, чем их совместное использование в составе гибридных или комплексных частиц [10,24,25]. При этом особое внимание уделяется использованию ассоциативных взаимодействий между белками и полисахаридами в целенаправленном конструировании комплексных микро- и наноразмерных коллоидных частиц, как систем доставки нутрицевтиков. Отличительной особенностью этих взаимодействий является их большое разнообразие [26,27]. Они включают как нековалентные физические силы притяжения (электростатические между противоположными зарядами, гидрофобные, Ван-дер-Ваальса и водородные связи), так и ковалентное (химическое) связывание, что определяется наличием широкого разнообразия как функциональных групп (ионных, полярных, гидрофобных), так и конформаций (глобулярной, случайного клубка, жёсткого стержня, спирали и др.), размеров и молярных масс взаимодействующих белков и полисахаридов [22,28]. Такое разнообразие предлагает много возможностей в молекулярном конструировании биополимерных микро- и наноразмерных систем доставки нутрицевтиков, биодоступность и биоусвоение которых в пищеварительном тракте может также целенаправленно контролироваться выбором определённых белок-полисахаридных взаимодействий [28-33].

Хочется отметить, что характерная чувствительность ассоциативных взаимодействий белков и полисахаридов к изменению pH, температуры и ионного окружения может представлять определённую сложность, но может быть также и очень полезной в конструировании стимул-чувствительных (так называемых «умных») систем доставки (электростатических наноккомплексов, комплексных коацерватов, смешанных гидрогелевых частиц) [30–33]. Такие системы доставки незаменимых нутрицевтиков, могли бы быть включены, как «физиологически функциональные ингредиенты», в производство пищевых продуктов с повышенной питательной ценностью и оздоровительным эффектом [34–36].

Кроме того, ассоциативные взаимодействия белков с полисахаридами вызывают всё больший интерес для создания пероральных систем доставки терапевтических белков/пептидов, таких как инсулин, гормоны желудочно-кишечного тракта (лептин или вазоактивные кишечные пептиды и др.) [37].

При этом, достижение более глубокого понимания природы и силы межмолекулярных взаимодействий (биополимер-биополимер и биополимер-инкапсулированное низкомолекулярное биологически активное вещество) в различных условиях окружающей среды, включая модельные условия пищеварительного тракта, может способствовать более рациональному молекулярному конструированию таких систем доставки [31–33], а также регулированию биодоступности и биоусвоения инкапсулированных в них профилактических нутрицевтиков или лекарственных веществ [31,32,33,38].

2.2 Мукоадгезивность биополимерных систем доставки нутрицевтиков

Особый интерес в настоящее время вызывает также решение проблемы регулирования мукоадгезивности разрабатываемых

систем доставки [39]. В основе явления мукоадгезивности также лежат ассоциативные взаимодействия между муцином (основным гликопротеином слизистой ткани организма (мукозы), выстилающей, в частности, ротовую полость и желудочно-кишечный тракт) и гидрофильными полимерами [40], к которым можно отнести целый ряд природных полисахаридов (хитозан, пектин, альгинат) [41,42]. В настоящее время считается общепризнанным, что использование мукоадгезивных полимеров является многообещающей стратегией для повышения проницаемости эпителия и преодоления барьеров для всасывания различных лекарственных веществ [43].

Однако, к недостаткам исследований мукоадгезивности полимеров *in vitro*, проведённых к настоящему времени, можно отнести то, что, как правило, они проводились в упрощённых условиях достаточно далёких от физиологических, не позволяя тем самым достичь полного понимания механизмов, лежащих в основе повышения биоусвоения доставляемых биологически активных веществ. Это приводило к получению противоречивых результатов и тем самым сдерживало эффективную разработку биополимерных систем доставки биологически активных веществ, как фармацевтического, так и пищевого назначения [39,43]. При этом важно отметить, что к концу 2014 года был разработан международный стандартизированный протокол для исследований трансформации пищевых веществ и их биоусвоения в пищеварительном тракте *in vitro*, описывающий состав модельных биологических жидкостей в ротовой полости, желудке и в тонком кишечнике [44]. Детали данного протокола были в дальнейшем уточнены и дополнены [45]. В связи с этим, можно полагать, что использование этого протокола в исследованиях мукоадгезии *in vitro* позволит приблизиться наиболее близко к физиологическим условиям пищеварительного тракта и учесть влияние дополнительных факторов, ранее не прини-

мавшихся во внимание. В результате этого может быть достигнуто более полное понимание механизмов, лежащих в основе повышения биоусвоения доставляемых биологически активных веществ за счёт явления мукоадгезии.

2.3 Вспомогательная роль липосом фосфолипидов

Липосомы фосфолипидов, широко используемые в медицине, могут внести ценный вклад в повышение загрузочной способности и в защитные свойства гидрофобных и гидрофильных нутрицевтиков при разработке систем их пероральной доставки [7]. Липосомы фосфолипидов — это сферические наноразмерные везикулы, состоящие из водного ядра, окруженного одним или несколькими бислоями фосфолипидов. Их размеры варьируются от 20 нм (если они однослойные — униламеллярные) до микрон (если многослойные — мультиламеллярные). Благодаря своей уникальной структуре липосомы способны инкапсулировать как гидрофильные, так и гидрофобные нутрицевтики в их водном ядре и в фосфолипидном бислое, соответственно.

Было установлено, что в результате взаимодействия липосом, нагруженных нутрицевтиками, с биополимерами происходила выраженная ассоциация последних в супрамолекулярные комплексные наночастицы (250–390 нм), что сопровождалось их значительным сжатием, приводящим к существенному увеличению их плотности (в 3–19 раз) по сравнению с плотностью исходных биополимерных наночастиц. При этом была установлена, долгосрочная защита (до 21 дня) инкапсулированных в них нутрицевтиков, таких как, например, длинноцепочечных ПНЖК от окисления и деградации [30–33, 38] (Рис. 1). Этот результат, объяснялся значительным замедлением диффузии кислорода к ненасыщенным углеводородным цепочкам инкапсулированных ПНЖК как за счет увеличения локальной микровязкости бислоя липосом, так и увеличения плотности комплексных частиц в целом.

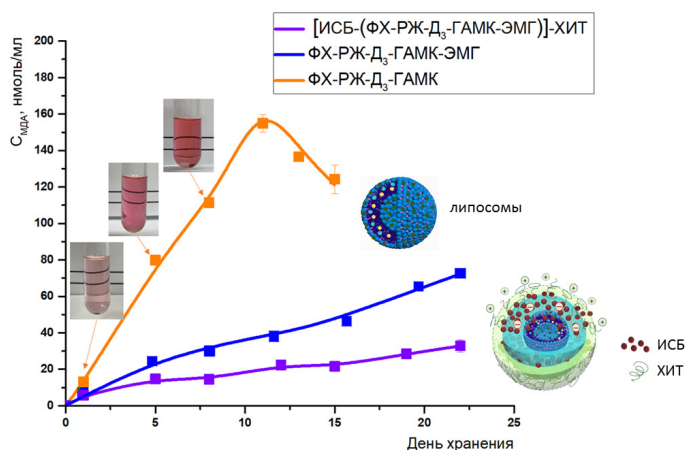


Рисунок 1. Концентрация малонового диальдегида (МДА) в растворах липосом фосфатидилхолина (ФХ), загруженных триглицеридами рыбьего жира (РЖ), витамином Д3 и гидрофильным нейромедиатором (ГАМК, γ -аминомасляной кислотой) ФХ-РЖ-Д3-ГАМК (рН 7.0) в отсутствии и в присутствии эфирного масла гвоздики (ЭМГ), а также в растворе их супрамолекулярного комплекса с изолятом сывороточных белков молока (ИСБ) и хитозаном (ХИТ) [ИСБ-(ФХ-РЖ-Д3-ЭМГ-ГАМК)]-ХИТ (рН 5.1) при хранении растворов на свету и при комнатной температуре (ацетатный буфер, $I = 0.001$ М) адаптированная русская версия рисунка из статьи [33].

Недавно было установлено, что липосомы фосфолипидов обеспечивают преимущества как для биодоступности нутрицевтиков из гибридных систем доставки на основе биополимеров, так и для их биоусвоения *in vivo* в кишечнике. Поскольку липосомы фосфолипидов способствуют образованию смешанных мицелл с желчными солями в тонком кишечнике, тем самым регулируя скорость и степень высвобождения (биодоступность), а также биоусвоение нутрицевтиков из их биополимерных системы доставки [32,33,37,38].

Например, была показана вспомогательная роль фосфолипидных липосом в увеличении биодоступности *in vivo* такого нутрицевтика, как лютеин, из его пероральных систем доставки (твердые желатиновые капсулы, наполненные эмульсиями, основными компонентами которых были: суспензия лютеина в подсолнечном масле, фосфолипиды, Tween 80, глицерин, альфа-токоферол и пропиленгликоль каприлат) [46]. Авторы этой работы отмечали, что концентрация в плазме крови лютеина, эмульгированного фосфолипидами, была выше в 4-11 раз по сравнению с его концентрациями, обнаруженными, в отсутствии фосфолипидов или в случае неэмульгированного лютеина. Эти данные объяснялись способностью фосфолипидов облегчать переход лютеина из липидной фазы в смешанные мицеллы фосфолипидов с желчными солями, легко поглощаемые энтероцитами.

2.4 Биополимерные системы доставки пробиотиков

В последние годы также возросло понимание ключевой роли микробиоты кишечника в поддержании здоровья человека [47,48]. В связи с этим активно изучаются возможности использования некрахмальных полисахаридов/олигосахаридов морского происхождения и клеточной оболочки растений для регуляции метаболизма микробиоты кишечника [49-51]. В частности, всё большее внимание уделяется пероральным системам доставки пробиотических бактерий на основе комплексов природных биополимеров [52,53].

3. Примеры эффективности биополимерных систем пероральной доставки нутрицевтиков

Сохранение структуры и биологической активности нутрицевтиков до их попадания в пищеварительный тракт является

основным и необходимым условием их эффективной биологической активности *in vivo*. Широкий спектр природных белков и полисахаридов может выступать в качестве систем доставки нутрицевтиков, обеспечивая последним эффективную инкапсуляцию и, таким образом, защиту их биологической активности в неблагоприятных условиях окружающей среды (экстремальные pH; воздействие кислорода и света; термическая обработка и т. д.) и при длительном хранении [8,10,11,30–33,38].

Одними из наиболее эффективных природных биополимеров в плане инкапсулирования и формирования микро- и наноразмерных систем доставки нутрицевтиков можно считать молочные белки и их агрегаты [38,46,53], а также их комплексы с липосомами фосфолипидов и полисахаридами [30–33].

Например, основные сывороточные белки молока (β -лактоглобулин и α -лактальбумин) были способны инкапсулировать липофильные нутрицевтики (полифенолы, фолиевая кислота, витамин D₂, жирные кислоты и ретинол) преимущественно по гидрофобному механизму [54]. Связывающая способность белков увеличивалась при их тепловой и кислотной денатурации. Очевидно, что это было связано с наличием большего числа гидрофобных участков этих изначально глобулярных белков для взаимодействия с липофильными нутрицевтиками.

Soukoulis & Bohna в своем обзоре [46] отметили, что инкапсуляция каротиноидов в различные типы природных биополимеров (концентрат сывороточного белка, казеинат натрия, β -лактоглобулин, химически модифицированный крахмал, желатин и др.) многократно повышало их стабильность при хранении.

Также, например, наноконкомплекс зеин-хитозан одновременно инкапсулировавший куркумин и ресвератрол с высокой эф-

фективностью инкапсуляции (91.3% и 82.1%, соответственно), увеличивал время полураспада куркумина и ресвератрола в 4.5 и 1.9 раза в процессе фотодеградаци [55].

На сегодняшний день исследователи уже определили ряд физико-химических факторов, знание которых может позволить контролировать и регулировать как биодоступность, так и биоусвоение нутрицевтиков из их систем доставки на основе природных биополимеров в ЖКТ. Основными из них являются следующие: (i) водорастворимость; (ii) размер; (iii) свойства поверхности, включая подверженность гидролизу пищеварительными ферментами и мукоадгезию; (iv) кинетика высвобождения из систем доставки [11].

Однако, что касается роли размеров систем доставки, в работе [37] отмечают, что «несмотря на усилия ученых по разработке наноразмерных систем доставки для улучшения биодоступности нутрицевтиков, прохождение желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) может спровоцировать их агрегацию и образование 10–20 мкм агрегатов в желудке независимо от их исходного размера», и что «усилия ученых должны быть направлены не только на разработку новых наноразмерных систем доставки, но и на придание им соответствующих поверхностных свойств для повышения стабильности в неблагоприятной для них физиологической среде ЖКТ». Одним из перспективных подходов к решению этой проблемы может стать формирование стимул-чувствительной поверхности наноразмерных систем доставки, которая предохраняет их от нежелательной агрегации на определенном участке ЖКТ. Например, для формирования таких стимул-чувствительных биополимерных поверхностей могут быть использованы ковалентное и нековалентное покрытие фосфолипидных липосом биополимерами, или их загрузка в частицы биополимерного микрогеля [30–33,56,57].

ССЫЛКИ

1. M. K. Ahmmed, F. Ahmmed, H. Tian, A. Carne, A.E.D. Bekhit, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, 19, 64–123.
2. H. O. Kalkman, M. Hersberger, S. Walitza, G. E. Berger, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 4393.
3. J. W. Pike, S. Christakos, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **2017**, 46, 815–843.
4. Z. Szabó, T. Marosvölgyi, É. Szabó, P. Bai, M. Figler, Z. Verzar, *Front. Physiol.* **2020**, 11, 752.
5. M. Alam, R. Parra-Saldivar, M. Bilal, C. A. Afroze, M. Ahmed, H. Iqbal, J. Xu, *Molecules* **2021**, 26, 2134.
6. J. Lewis, *Codex nutrient reference values*. **2019**, Rome. FAO and WHO, p. 95.
7. M.R.I. Shishir, L. Xie, C. Sun, X. Zheng, W. Chen, *Trends Food Sci Technol.* **2018**, 78, 34–60.
8. A. Taheri, S. M. Jafari, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, 269, 277–295.
9. J. Grgić, G. Šelo, M. Planinić, M. Tišma, A. Bucić-Kojić, *Antioxidants*. **2020**, 9, 923–958.
10. M. Manzoor, J. Singh, J. D. Bandral, A. Gani, R. Shams, *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 165, 554–567.
11. D.J. McClements, *Food Hydrocoll.* **2021**, 111, 106404.
12. E. Nowak, Y. D. Livney, Z. Niu, H. Singh, *Trends Food Sci Technol.* **2019**, 91, 557–573.
13. M. G. Semenova, A. S. Antipova, E. I. Martirosova, D.V., Zelikina, N. P. Palmira, S. A. Chebotarev, *Food Hydrocoll.* **2021**, 120, 106890.
14. W. Lu, K. Nishinari, S. Matsukawa, Y. Fang, *Food Hydrocoll.* **2020**, 103, 105713.
15. H. D. Goff, N. Repin, H. Fabek, D.El Khoury, M.J. Gidley. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre.* **2018**, 14, 39–53.
16. J.J. Ferguson, E. Stojanovski, L. MacDonald-Wicks, M. L. Garg, *Clin. Nutr.* **2020**, 39, 80–89.

17. M. Bilal, T. Rasheed, H.M.N. Iqbal, H. Hu, W. Wang, X. Zhang, *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *103*, 554–574.
18. M. Ajanth Praveen, K. R. Karthika Parvathy, R. Jayabalan, P. Balasubramanian. *Food Hydrocoll.* **2019**, *96*, 343–353.
19. P. R. Hussain, S. A. Rather, P. P. Suradkar, *Radiat. Phys. Chem.* **2018**, *144*, 218–230.
20. S. Patel, *J. Funct. Foods.* **2015**, *19*, 308–319.
21. R. Falsafi, A. C. Karaca, L. Deng, Y. Wang, He. Li, A. Gholamreza, H. Rostamabadi, *Food Hydrocoll.* **2022**, *133*, 108002.
22. M. G. Semenova, E. Dickinson, *Biopolymers in food colloids: thermodynamics and molecular interactions*, **2010**, Brill, Boston, p. 356.
23. B. Ozturk, D. J. McClements, *Curr. Opin. Food Sci.* **2016**, *7*, 1–6.
24. L. Maldonado, S. Chough, J. Bonilla, K. H. Kim, J. Kokini, *Food Hydrocoll.* **2019**, *93*, 293–307.
25. B. M. Shah, S. S. Palakurthi, T. Khare, S. Khare, S. Palakurthi, *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *165*, 722–737.
26. Z. Wei, Q. Huang, *J. Agric. Food Chem.* **2019**, *67*, 1344–1352.
27. A. K. Anal, S. Shrestha, M. B. Sadiq, *Food Hydrocoll.* **2019**, *87*, 691–702.
28. M. G. Semenova, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2017**, *28*, 15–21.
29. M. G. Semenova, *Food Hydrocoll.* **2017**, *68*, 114–121.
30. D. Zelikina, S. Chebotarev, A. Komarova, E. Balakina, A. Antipova, E. Martirosova, M. Anokhina, N. Palmina, N. Bogdanova, E. Lysakova, M. Borisova, M. Semenova, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2022**, *651*, 129630.
31. D. Zelikina, S. Chebotarev, A. Antipova, E. Martirosova, M. Anokhina, N. Palmina, N. Bogdanova, A. Khvatov, Y. Tsaplev, A. Trofimov, M. Sokol, N. Yabbarov, E. Nikolskaya, M. Semenova, *Int. Dairy J.* **2024**, *154*, 105923.

32. D. Zelikina, S. Chebotarev, A. Antipova, E. Martirosova, M. Anokhina, N. Palmina, N. Bogdanova, M. Semenova, *Int. Dairy J.* **2024**, *154*, 105924.
33. M. G. Semenova, A. S. Antipova, E. I. Martirosova, N. P. Palmina, D. V. Zelikina, S. A. Chebotarev, N. G. Bogdanova, M. S. Anokhina, V. V. Kasparov, *Food Funct.* **2024**, *15*, 2008–2021.
34. Y. Yuan, Z. Y. Kong, Y. E. Sun, Q. Z. Zeng, X. Q. Yang, *LWT-Food Sci Technol.* **2017**, *75*, 171–179.
35. I. J. Joye, D. J. McClements, *Curr Top Med Chem.* **2016**, *16*, 1026–39.
36. D. J. McClements, C. E. Gumus, *Adv Colloid Interface Sci.* **2016**, *234*, 3–26.
37. M. J. Santander-Ortega, M. Plaza-Oliver, V. Rodríguez-Robledo, L. Castro-Vázquez, N. Villaseca-González, J. González-Fuentes, P. Marcos, M. M. Arroyo-Jiménez, M. V. Lozano, *J Drug Deliv Sci Technol.* **2017**, *42*, 193–206.
38. M. G. Semenova, A. S. Antipova, E. I. Martirosova, S. A. Chebotarev, N. P. Palmina, N. G. Bogdanova, N. I. Krikunova, D. V. Zelikina, M. S. Anokhina, V. V. Kasparov, *Food Funct.* **2022**, *13*, 2354–2371.
39. S. L. Cook, S. P. Bull, L. Methven, J. K. Parker, V. V. Khutoryanskiy, *Food Hydrocoll.* **2017**, *72*, 281–296.
40. G. P. Andrews, T. P. Laverty, D. S. Jones, *Eur J Pharm Biopharm.* **2009**, *71*, 505–518.
41. E. Meng-Lund, C. Muff-Westergaard, C. Sander, P. Madelung, J. Jacobsen, *Int. J. Pharm.* **2014**, *461*, 280–285.
42. T. Klemetsrud, H. Jonassen, M. Hiorth, A.-L. Kjoniksen, G. Smistad, *Colloids Surf B Biointerfaces.* **2013**, *103*, 158–165.
43. Е. А. Киржанова, В. В. Хуторянский, Н. Г. Балабушевич, А. В. Харенко, Н. Б. Демина, *Разработка и регистрация лекарственных средств.* **2014**, *3*, 67–82.
44. M. Minekus, M. Alminger, P. Alvito, S. Balance, T. Bohn, C. Bourlieu,... A. Brodtkorb, *Food Funct.* **2014**, *5*, 1113–1124.

45. A. Brodkorb, L. Egger, M. Alminger, P. Alvito, R. Assunção, S. Ballance, ...I. Recio, *Nat Protoc.* **2019**, *14*, 991–1014.
46. C. Soukoulis, T. Bohna, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 1–36.
47. A. Pascale, N. Marchesi, S. Govoni, A. Coppola, C. Gazzaruso, *Curr Opin Pharmacol.* **2019**, *49*, 1–5.
48. M. H. Raza, K. Gul, A. Arshad, N. Riaz, U. Waheed, A. Rauf, F. Aldakheel, S. Alduraywish, Ma. Ur. Rehman, M. Abdullah, M. Arshad, *J Cancer Res Clin Oncol.* **2019**, *145*, 49–63.
49. M. Asadpoor, C. Peeters, P.A.J. Henricks, S. Varasteh, R.J. Pieters, G. Folkerts, S. Braber, *Nutrients.* **2020**, *12*, 1789.
50. T. Rocio Aguirre-Calvo, S. Molino, M. Perullini, J. Á. Rufián-Henares, P. R. Santagapita, *Food Chem.* **2020**, *333*, 127483.
51. P. Sredkova, T. Batsalova, D. Moten, B. Dzhambazov, *Cent. Eur. J. Immunol.* **2020**, *45*, 248–255.
52. S. Sohrab, M. Rezazad-Bari, M. Alizadeh, H. Almasi, S. Amiri, *Food Hydrocoll.* **2021**, *113*, 106496.
53. М. Г. Семёнова, *Успехи современной биологии.* **2022**, *142*, 365–372.
54. F. Kimpel, J. J. Schmitt, *J. Food Sci.* **2015**, *80*, R2361–R2366.
55. S. Chen, Y. Han, L. Jian, W. Liao, Y. Zhang, Y. Gao, *Carbohydr. Polym.* **2020**, *236*, 116090.
56. M. Lemaalem, N. Hadrioui, S. El Fassi, A. Derouiche, H. Ridouane, *RSC Adv.* **2021**, *11*, 1503–1516.
57. A. A. Yaroslavov, A. V. Sybachin, *Pure Appl. Chem.* **2020**, *92*, 919–939.

8. СПЕКТРОСКОПИЯ ЭЛЕКТРОННОГО ПАРАМАГНИТНОГО РЕЗОНАНСА В СОВРЕМЕННОЙ БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКЕ

М. В. Мотякин

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

Взаимодействие электронных спинов лежит в основе многочисленных биохимических и физических процессов, что делает спины уникальным инструментом как для научных исследований, так и для разработки технологий нового поколения, включая зондирование, квантовые вычисления и связь. Воздействуя на спиновую систему, можно целенаправленно влиять на химическую реакцию, управлять электромагнитными и оптическими свойствами материалов. Одним из прямых методов исследования спиновых состояний является спектроскопия электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), иногда также называемая электронным спиновым резонансом. В настоящее время существует множество модификаций импульсной и стационарной спектроскопии ЭПР. Сведения, получаемые методами ЭПР, позволяют извлекать информацию о состояниях и структуре отдельных носителей спина и их кластеров, динамике и поляризации их окружения, расстояниях между спинами на основе измерений спин-спинового взаимодействия, химических и магнитных взаимодействиях в исследуемых системах, обуславливая их широкое применение в физике, химии, биологии и медицине. В настоящей работе рассмотрены некоторые интересные, на наш взгляд, направления функциональной спектроскопии ЭПР, которые интенсивно используются в последнее время для решения проблем биохимической физики.

Магнитные центры в наноматериалах. В последние десятилетия динамично развиваются области науки, связанные

с разработкой и использованием функциональных материалов с пониженной размерностью. Наноматериалы широко применяются в микроэлектронике, оптике, информационных технологиях, катализе и биомедицине [1,2]. Многие из них либо содержат магнитные центры, либо наноматериалы допируют в процессе синтеза для изменения/улучшения их физико-химических свойств. Наличие магнитных центров в наноматериалах предоставляет еще один параметр, связанный со спином, для управления их свойствами, а, следовательно, делает возможным их контроль с помощью спектроскопии ЭПР.

Одними из интересных объектов исследований являются полупроводниковые флуоресцентные нанокристаллы, так называемые квантовые точки. Квантовые точки обладают длиной волны излучения, определяемой размером кристалла, высоким квантовым выходом, химической и фотостабильностью [3]. Допирование магнитными ионами квантовых точек приводит к увеличению квантового выхода и яркости люминесцентного наноматериала [3,4]. Среди допантов наиболее широко используются Mn^{2+} и Cu^{2+} [3,5–8]. Первый ион легко обнаруживается и идентифицируется методом ЭПР из-за характерного сверхтонкого расщепления, обусловленного взаимодействием электронного спина с ядерным спином Mn ($I=5/2$). Константа сверхтонкого взаимодействия зависит от локализации Mn^{2+} в решетке нанокристалла (внутри или на поверхности) [9,10]. Создание оболочек для химической стабилизации ведет к сжатию квантовых точек и сближению магнитных ионов, локализованных на их поверхности, изменяя при этом яркость и квантовый выход люминесценции [11]. Отметим, что многие вопросы, связанные с влиянием магнитного иона на оптические свойства квантовых точек, на сегодняшний день являются дискуссионными и находятся на переднем крае развития современной науки.

Другим интересным объектом исследований являются магнитные наночастицы (МНЧ) на основе оксидов железа. МНЧ широко применяются для магнитной гипертермии при терапии рака, целевой и локализованной доставки лекарств, в магнитно-резонансной томографии с контрастным усилением, магнитной сепарации и др. [12,13]. Интерес к ним на протяжении уже нескольких десятилетий обусловлен возможностью целенаправленного изменения физико-химических свойств с помощью манипуляции их магнитными моментами. Сигнал от МНЧ, регистрируемый на спектрометре ЭПР, является следствием того, что МНЧ оксидов железа обладают, как суперпарамагнитными, так и ферромагнитными свойствами [14,15]. По магнитно-резонансным параметрам этого сигнала можно контролировать размер наночастиц и их белковых покрытий, расстояние между частицами [16,17].

Спектроскопия ЭПР привлекается также для исследования свойств наноразмерных кристаллов алмазов. В настоящее время наноалмазы рассматриваются многими исследователями как перспективные материалы для использования в биологии, медицине и электронике [18–20]. Они обладают комплексом уникальных физико-химических свойств: большой удельной площадью поверхности, стабильной флуоресценцией, биосовместимостью, способностью к адсорбции или конъюгированию с лекарственными веществами. Наноалмазы характеризуются высокой концентрацией парамагнитных центров, обусловленных, в основном, неспаренными электронами на азотно-вакансионных центрах (NV дефекты). Именно наличие NV дефектов определяет уникальные магнитооптические свойства наноалмаза [19,20]. Основным методом создания NV дефектов является высокоэнергетическое облучение с последующим высокотемпературным 800–900 °С отжигом для содействия диффузии вакансий. С помощью спектроскопии ЭПР установлено,

что высокотемпературный отжиг может приводить к формированию анизотропной проводящей структуры, росту и укрупнению кристаллов, высокой когерентности электронных спинов, усилению контраста магнитноиндуцированной флуоресценции NV дефектов [20–22].

Зондовая спектроскопия. Спектроскопия ЭПР спинового зонда и метки хорошо известна и широко применяется для определения молекулярной подвижности, локальной организации и полярности окружения спинового зонда/метки. В последние десятилетия синтез новых радикалов с улучшенными функциональными свойствами, достижения в инструментарии и программном обеспечении предоставили новые возможности для решения «старых» задач с помощью зондовой спектроскопии. Рассмотрим некоторые из них.

Влияние протонирования на спектры ЭПР нитроксильных радикалов наблюдалось еще в 70-х годах [23]. Было установлено, что протонированный и непротонированный радикал обладает разными магнитными параметрами, такими как изотропная константа сверхтонкого взаимодействия на атоме азота и g -фактор, что показало возможность контролировать рН растворов с помощью спектроскопии ЭПР. Однако нитроксильные радикалы пиперидинового типа легко восстанавливаются в гидроксилламины, являющиеся диамагнитными соединениями [24]. Для практического использования данного эффекта потребовался синтез новых нитроксильных радикалов, обладающих не только диагностируемыми изменениями магнитных параметров, но и стабильностью в условиях эксперимента. На сегодняшний день самыми успешными рН-чувствительными нитроксильными радикалами признаются радикалы имидазолинового и имидазолидинового типов, основные функциональные группы которых показаны на схеме 1.

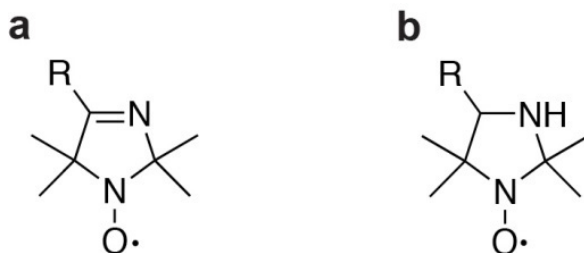


Схема 1.

Методы их получения описаны в работах [25,26]. Наличие объемных заместителей в гетероцикле приводит к увеличению стабильности радикала и уменьшению константы его восстановления в гидроксиламин. В то же время атом азота в цикле обеспечивает возможность обратимого протонирования в зависимости от pH среды. Разница в магнитных параметрах протонированного и непротонированного нитроксильных радикалов составляет порядка 10^{-3} для g-фактора и 1.0–1.5 Гс для изотропной константы сверхтонкого взаимодействия. К настоящему времени синтезировано большое количество разнообразных pH-чувствительных нитроксильных радикалов с разными заместителями в гетероцикле и обладающих чувствительностью к pH в разных диапазонах, которые широко применяются в биомедицинских исследованиях для мониторинга pH в разных тканях и органах животных [26–28], для оценки кислотных и электростатических свойств пористых и слоистых материалов [29–31]. Отметим, что нитроксильные радикалы имидазолинового и имидазолидинового типов могут также использоваться в контролируемой радикальной полимеризации [32]. Присоединение имидазолинового или имидазолидинового радикальных фрагментов к фосфолипидам позволяет их приме-

нять как метки и получать информацию о кислотности в липидных слоях мембран [33,34].

Необходимо отметить, что большинство спектров ЭПР pH-чувствительных нитроксильных радикалов в исследуемых системах сложны для их анализа «на глаз». Они представляют собой суперпозицию сигналов от радикалов, вращающихся в разных локальных окружениях с разной полярностью и вязкостью. Кроме того, протонированные и непротонированные нитроксильные фрагменты радикалов имеют разную вращательную динамику, их времена корреляции могут отличаться в 6 раз [34]. Все эти нюансы следует учитывать при интерпретации результатов. Анализ спектров проводят с использованием специального программного обеспечения, например, EasySpin для Matlab [35], ODFR4 [36], NLSL [37].

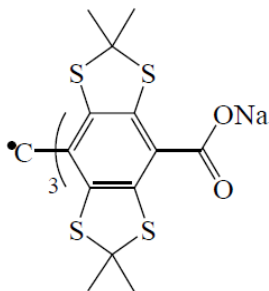


Схема 2.

В последние десятилетия в спектроскопии ЭПР в качестве спиновых зондов и меток, кроме нитроксильных радикалов, нашли широкое распространение триарилметильные (ТАМ) радикалы, также известные как тритильные радикалы [38,39]. Наиболее распространённой структурой ТАМ для дальнейших химических модификаций является радикал, представленный на схеме 2 [40]. Тритильные радикалы чрезвычайно удобны для

ЭПР-спектроскопических и томографических приложений из-за исключительной стабильности и чрезвычайно узкой ширины линии ЭПР. Стабильность данных радикалов обеспечивает экранирование реакционного центра арильными заместителями. Дейтерирование метильных групп в этих заместителях помогает в достижении максимально узкой ЭПР линии до 60 мГс. Так как концентрация кислорода в исследуемых системах с помощью ЭПР спектроскопии контролируется по уширению линий ЭПР радикального датчика, то ТАМ радикалы являются уникальными сенсорами молекулярного кислорода.

Применение тритильных радикалов разнообразно. Их используют в ЭПР-томографии, в качестве сенсоров уровня кислорода (оксиметрия) для определения поврежденных при гипоксии тканей живых организмов [41], измерения вязкости человеческой крови и интерстициальной жидкости в различных органах мышей *ex vivo* и *in vivo* [42]. ТАМ радикалы с аминогруппами позволяют одновременно оценивать как уровень кислорода в поврежденных тканях, так и pH [43–45], что делает их перспективными зондами для исследований в данной области. С помощью тритильных радикалов можно детектировать наличие супероксидных радикалов и неорганического фосфата в исследуемой системе [46, 47]. ТАМ радикалы, как метки, широко используются для изучения структуры и динамики биологических макромолекул с помощью разных импульсных методов [48].

Необходимо отметить, что динамика биологических макромолекул и их взаимодействие в естественном физиологическом окружении является одним из приоритетных направлений в мировой современной структурной биологии. Применяемые в настоящее время методы молекулярной биологии позволяют встраивать спиновую метку или несколько меток в заданные места биологических макромолекул [49,50]. В этой связи одним из интенсивно развивающихся направлений современной

функциональной ЭПР- спектроскопии является метод адресного введения спиновых меток (site-directed spin labeling, SDSL). Для исследования SDSL спин-меченых макромолекул разработан набор спектральных методов, основанных на ЭПР [51–53]. Они предоставляют информацию о расстояниях в биологических макромолекулах в нанометровом диапазоне, способствуют оценке пространственного строения и подвижности исследуемой молекулы или комплекса, определению локальных значений физических параметров среды, таких как полярность и вязкость [51–59]. Все это делает спектроскопию ЭПР одним из наиболее многообещающих методов исследования биологических процессов.

Спиновые ловушки. Свободнорадикальные процессы играют важную роль при функционировании организма. Одним из основных источников радикалов в клетках является процесс одноэлектронного восстановления молекулярного кислорода, приводящий к образованию супероксид анионрадикала $O_2^{\bullet-}$. Он запускает реакции в организме, в результате которых в клетках образуются так называемые активные формы кислорода (АФК). АФК обладают высокой реакционной способностью и играют решающую роль в регуляции различных клеточных процессов. Однако обнаружение АФК в живых системах является сложной задачей из-за их короткого периода полураспада и низких концентраций. Одним из методов их детектирования является метод спиновых ловушек ЭПР-спектроскопии. Данный метод основан на реакции спиновой ловушки с короткоживущим радикалом, в результате которой образуется стабильный радикальный продукт (спиновый аддукт) [60]. По g-фактору и изотропным константам сверхтонкого взаимодействия образующегося аддукта определяется структура присоединенного короткоживущего радикала. В настоящее время существует большое разнообразие спиновых ловушек, которые широко используются в химических, биофизи-

ческих и медицинских исследованиях [61,62]. Выбор спиновой ловушки во многом определяется ее реакционной способностью к захвату радикалов определенной структуры. Среди ловушек наиболее популярными для идентификации АФК [59] и коммерчески доступными являются 5,5-диметилпирролин-N-оксид (DMPO), 5-диэтоксифосфорил-5-метил-1-пирролин N-оксид (DEPMPO) и α -(4-пиридил-1-оксид)-N-трет-бутилнитрон (POBN). Сегодня ЭПР метод спиновых ловушек интенсивно применяется для получения информации о типах АФК, которые образуются в биологических процессах, и о том, как АФК участвуют в клеточных процессах [63-65].

Другой высокоактивный свободный радикал, имеющий не меньшее значение для функционирования организма, — это оксид азота, NO, образуемый NO-синтазами. Оксид азота является эндогенным регулятором многих метаболических и физиологических процессов. NO регулирует тонус мелких и средних кровеносных сосудов, способствует расслаблению гладкой мускулатуры, участвует в различных функциях нервной системы [66,67]. Биосинтез и метаболизм оксида азота в организме человека являются одними из актуальнейших проблем современной медицины.

В живых системах NO находится в наномолярной концентрации. Для его детектирования в 80-х годах был предложен ЭПР метод спиновых ловушек на основе комплексов двухвалентного железа с производными дитиокарбамата [68]. Эти комплексы, связываясь с молекулами NO, образуют стабильные мононитрозильные комплексы железа, которые являются парамагнитными и могут быть зарегистрированы методом ЭПР. И сегодня данный метод широко используется для детектирования уровня оксида азота в головном мозгу крыс при моделировании ишемического и геморрагического инсультов [69,70], в мышцах при моделировании невесомости [71], для получения информации о возможных механизмах трансформации NO в организме [72].

Инструментарий ЭПР. Современные серийные спектрометры ЭПР для регистрации спектров универсальны, обладают высокой чувствительностью и могут использоваться в широком температурном диапазоне — от нескольких градусов Кельвина, при которых выражены квантовые эффекты, до комнатной температуры и выше. С их помощью можно извлекать научную информацию, которая недоступна другим методам. Однако и есть и ограничения использования спектроскопии ЭПР. В первую очередь это относится к клинической медицине. Несмотря на высокую чувствительность, спектроскопия ЭПР не получила широкого распространения в клинической медицине, как, например, спектроскопия ЯМР. Это обусловлено рядом причин, таких как отсутствие достаточной концентрации парамагнитных веществ в биологических системах, короткое время релаксации незаполненных электронов, а также, необходимостью использования микроволнового излучения в качестве источника возбуждения.

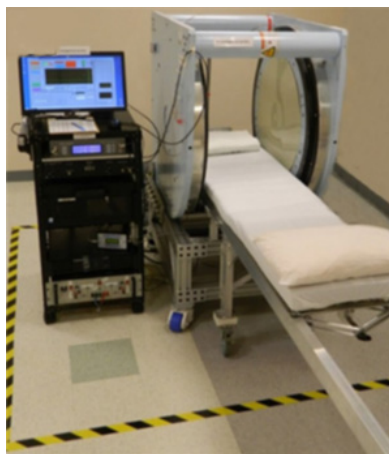


Рисунок 1.

Преодолевая эти ограничения, за последнее десятилетие разработана и протестирована уникальная технология для ЭПР

измерений в живых системах, как в животных, так и в людях, *in vivo*. Данная технология включает низкочастотное оборудование (L-диапазона спектрометр ЭПР), методику регистрации, обработки сигналов и молекулярные зонды [73,74]. Фото экспериментальной установки представлено на рисунке 1. Данная технология используется для определения терапии отдельных пациентов с опухолями или сосудистыми заболеваниями, путем мониторинга оксигенации тканей. Пациент помещается между полюсами магнита. Глубина проведенных измерений *in vivo* в тканях с помощью имплантированного детектора-резонатора примерно до 2 см. Установка находится в Dartmouth Medical Centre в США.

Спектроскопия ЭПР адаптируется к современным научным требованиям и постоянно расширяет области своего применения. Надеемся, что в дальнейшем эта уникальная технология будет усовершенствована и внедрена в повседневную клиническую практику.

В заключении хотелось бы отметить, что благодаря современному экспериментальному оборудованию, обладающему высокой чувствительностью, синтезу новых функциональных радикалов, разработке новых теоретических и экспериментальных методик ЭПР-спектроскопия остается одним из основных и уникальных методов исследования физико-химических процессов с участием спинов в современной науке.

Ссылки

1. B. Mekuye, B. Abera, *Nano Select* **2023**, 4, 486-501.
2. N. Baig, I. Kammakakam, W. Falath, *Mater. Adv.* **2021**, 2, 1821-1871.
3. T. Maxwell, M. G. N. Campos, S. Smith, M. Doomra, Z. Thwin, S. Santra, In: *Nanoparticles for Biomedical Applications* (Ed.

E.J. Chung, L. Leon, C. Rinaldi), **2020**, Elsevier, Amsterdam, Chapter 15, pp. 243–265.

4. L. Jing, S. V. Kershaw, Y. Y. Li, X. Huang, A. L. Rogach, M. Gao, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 10623–10730.

5. K. Y. Zhang, Q. Yu, H. Wei, S. Liu, Q. Zhao, W. Huang, *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 1770–1839.

6. A. Guler, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2019**, 1–8.

7. R. Begum, A. Chattopadhyay, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2014**, *5*, 126–130.

8. Y. Chen, D. H. Son, *Isr. J. Chem.* **2012**, *52*, 1016–1026.

9. D. Cherepanov, A. Kostrov, F. Gostev, I. Shelaev, M. Motyakin, S. Kochev, Y. Kabachii, V. Nadtochenko, *Nanomaterials* **2021**, *11*, 3007–3025.

10. T. Debnath, H. N. Ghosh, *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123*, 10703–10719.

11. V. Nadtochenko, D. Cherepanov, S. Kochev, M. Motyakin, A. Kostrov, A. Golub, O. Antonova, Yu. Kabachii, S. Rtimi, *J. Photochem. Photobiol. A* **2022**, *429*, 113946.

12. S. Savliwala, A. Chiu-Lam, M. Unni, E. Fuller, K. Sen, C. Rinaldi, In: *Nanoparticles for Biomedical Applications* (Ed. E.J. Chung, L. Leon, C. Rinaldi), **2020**, Elsevier, Amsterdam, Chapter 13, pp. 195–221.

13. L. L. Israel, A. Galstyan, E. Holler, J. Y. Ljubimova, *J. Control. Release* **2020**, *320*, 45–62.

14. V. A. Atsarkin, N. Noginova, *Appl. Magn. Reson.* **2020**, *51*, 1467–1480.

15. M. M. Can, M. Coskun, T. Firat, *J. Alloys Compd* **2012**, *542*, 241–247.

16. A. V. Bychkova, M. N. Yakunina, M. V. Lopukhova, Y. N. Degtyarev, M. V. Motyakin, V. S. Pokrovsky, A. L. Kovarski, M. G. Gorobets, V. M. Retivov, D. S. Khachatryan, *Pharmaceutics* **2022**, *14* (12), 2771.

17. V. L. Kirillov, D. A. Balaev, S. V. Semenov, K. A. Shaikhutdinov, O. N. Martyanov, *Mater. Chem. Phys.* **2014**, *145*, 75–81.

18. J.-C. Arnault, In: *Handbook of Carbon-Based Nanomaterials* (Eds. S. Thomas, C. Sarathchandran, S. A. Ilangovan, J. C. Moreno-Pirajan), **2021**, Elsevier, Amsterdam, Chapter 4, pp. 209-246.
19. F. Gorrini, A. Bifone, *Biosensors*, **2023**, 13, 691-704.
20. N. Nunn, S. Milikisiyants, M. Torelli, R. Monge, T. Delord, A. Shames, C. Meriles, A. Ajoy, A. Smirnov, O. Shenderova, *J. Vac. Sci. Technol., B* **2023**, 41, 042206.
21. В. Ю. Осипов, Ф. М. Шахов, Н. Н. Ефимов, В. В. Минин, С. В. Кидалов, А. Я. Вуль, *Физика твердого тела* **2017**, 59, с. 1125-1132.
22. Н. Т. Т. Бинь, В. Ю. Долматов, Н. М. Лапчук, *Журнал прикладной спектроскопии* **2017**, 84, с. 921-926.
23. E. F. Ullman, L. Call, J. H. Osiecki, *J. Org. Chem.* **1970**, 35, 3623-3631.
24. A. A. Bobko, E. G. Bagryanskaya, V. A. Reznikov, N. G. Kolosova, T. L. Clanton, V. Khramtsov, *Free Radical Bio. Med.* **2004**, 36, 248-258.
25. Synthetic Chemistry of Stable Nitroxides. (Eds L. B. Volodarsky, V. A. Reznikov, V. I. Ovcharenko). CRC Press, Boca Raton, **1994**, p. 236.
26. A. A. Gorodetsky, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov, D. A. Komarov, *Magn. Reson. Med.*, **2016**, 76, 350-358.
27. A. Samouilov, O. V. Efimova, A. A. Bobko, Z. Sun, S. Petryakov, T. D. Eubank, D. G. Trofimov, I. A. Kirilyuk, I. A. Grigor'ev, W. Takahashi, J. L. Zweier, V. V. Khramtsov, *Anal. Chem.* **2014**, 86, 1045-1052
28. D. A. Komarov, Y. Ichikawa, K. Yamamoto, N. J. Stewart, S. Matsumoto, H. Yasui, I. A. Kirilyuk, V. V. Khramtsov, O. Inanami and H. Hirata, *Anal. Chem.* **2018**, 90, 13938-13945
29. E. G. Kovaleva, L. S. Molochnikov, E. L. Golovkina, M. Hartmann, I. A. Kirilyuk and I. A. Grigoriev, *Microporous Mesoporous Mater.* **2015**, 203, 1-7.

30. E. G. Kovaleva, L. S. Molochnikov, D. O. Antonov, D. P. T. Stepanova, M. Hartmann, A. N. Tsmokalyuk, A. Marek and A. I. Smirnov, *J. Phys. Chem. C* **2018**, 122, 20527–20538.
31. T. S. Yankova, N. A. Chumakova, *Appl. Magn. Reson.* **2023**, 54, 311–320.
32. М.В. Еделева, S.R.A. Marque, Е.Г. Багрянская, *Успехи химии* **2018**, 18, 328–349.
33. M. A. Voinov, C. T. Scheid, I. A. Kirilyuk, D. G. Trofimov, A. I. Smirnov, *J. Phys. Chem. B* **2017**, 121, 2443–2453.
34. M. A. Voinov, N. Nunn, R. Rana, A. Davidsson, A. I. Smirnov, T. I. Smirnova, *Org. Biomol. Chem.* **2024**, 22, 3652–3667.
35. S. Stoll, A. Schweiger, *J. Magn. Reson.* **2006**, 178, 42–55.
36. A. Vorobiev, A.V. Bogdanov, T.S. Yankova, N.A. Chumakova, *Phys. Chem. B* **2019**, 123, 5875–5891.
37. D.E. Budil, S. Lee, S. Saxena, J.H. Freed, *J. Magn. Resonance, Series A* **1996**, 120, 155–189.
38. O. Krumkacheva, E. Bagryanskaya, Trityl radicals as spin labels, *Electron Paramagnetic Resonance* **2016**, 35–60.
39. В.М. Тормышев, Е.Г. Багрянская, Тритильные радикалы: синтез, свойства и применение, *Известия Академии наук. Серия химическая* **2021**, 12, 2278–2297.
40. I. Dhimitruka, M. Velayuthama, A. Bobko, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 6801–6805.
41. A. A. Gorodetsky, V.V. Khramtsov, D.A. Komarov, *Magn. Reson. Med.* **2016**, 6, 350–358.
42. M. Velayutham, M. Poncelet, J.A. Perini, J.T. Kupec, M.J. Dietz, B. Driesschaert, V.V. Khramtsov, *Appl. Magn. Reson.* **2023**, 54, 779–791.
43. T.D. Gluth, M. Poncelet, M. Gencheva, E.H. Hoblitzell, V.V. Khramtsov, T.D. Eubank, B. Driesschaert, *Anal. Chem.* **2023**, 95, pp. 946–954.

44. Y. Feng, X. Tan, Z. Shi, F. A. Villamena, J. L. Zweier, Y. Song, Y. Liu, *Anal. Chem.* **2023**, 95, 1057–1064.
45. C. Buyse, L. Mignon, N. Joudiou, S. Melloul, B. Driesschaert, B. Gallez, *Free Radical Biol. Med.* **2024**, 213, 11–18.
46. V. K. Kutala, N. L. Parinandi, J. L. Zweier, *Arch. Biochem. Biophys.* **2004**, 424, 81–88.
47. A. A. Bobko, I. Dhimitruka, J. L. Zweier, V. V. Khramtsov, *Angew Chem Int Ed Engl.* **2014**, 53, 2735–2738.
48. Z. Armstrong, A. MacRae, M. Lenertz, Q. Li, Grace Blair, W. Brown, Li Feng, P. Zhao, Z. Yang, *Appl. Magn. Reson.* **2024**, 55, 29–44.
49. W. L. Hubbell, C. J. Lopez, C. Altenbach, Z. Y. Yang, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2013, 23, 725–733.
50. S. A. Shelke, S. Th. Sigurdsson, *Eur. J. Org. Chem.* 2012, **2012**, 2291–2301
51. M. Pannier, S. Veit, A. Godt, G. Jeschke, H. W. Spiess, *J. Magn. Reson.* **2011**, 213, 316–325.
52. G. Jeschke, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2012**, 63, 419–446.
53. A. J. Fielding, M. G. Consilio, G. Heaven, *Molecules* **2014**, 19, 16998–17025
54. P. Z. Qin, I. S. Haworth, Q. Cai,; A. K. Kusnetzow, G. P. G. Grant, E. A. Price, G. Z. Sowa, A. Popova, B. Herreros, H. He, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 2354–2365
55. C. Gmeiner, D. Klose, Elisabetta Mileo, V. Belle, S. R. A. Marque, G. Dorn, F.H.T. Allain, B. Guigliarelli, G. Jeschke, M. Yulikov, *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, 8, 4852–4857.
56. A. Pierro, M. Drescher, *Chem. Commun.* **2023**, 59, 1274–1284.
57. E. Bordignon, S. Bleicken, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2018**, 1860, 841–853.

58. M. Granz, N. Erlenbach, P. Spindler, D.B. Gophane, L.S. Stelzl, S.T. Sigurdsson, T.F. Prisner, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 10540–10543.
59. V. Meyer, M. Swanson, L. Clouston, P. J. Boratynski, R. A. Stein, H. S. Mchaourab, A. Rakca, S.S. Eaton, G. R. Eaton, *Biophys. J.* **2015**, 108, 1213–1219.
60. M.J. Davies, *Methods* **2016**, 109, 21–30.
61. J.P. Gotham, R. Li, T.E. Tipple, J.R. Lancaster, T. Liu, Q. Li, *Free Radic. Biol. Med.* **2020**, 154, 84–94.
62. F. Peyrot, S. Lajnef, D.-L. Versace, *Catalysts*, **2022**, 12, 772.
63. F.A.F. Menezes, J.G. Oliveira, A.O. Guimarrès, *Appl. Magn. Reson.* **2024**, 55, 335–355.
64. I. Ashur, R. Goldschmidt, I. Pinkas, Y. Salomon, G. Szewczyk, T. Sarna, A. Scherz, *J. Phys. Chem. A* **2009**, 113, 8027–8037.
65. C.L. Hawkins, M.J. Davies, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, 1840, 708–721.
66. A.F. Vanin, *Nitric Oxide* **2016**, 54, 15–29.
67. V.L. Lakomkin, A.F. Vanin, A.A. Timoshin, V.I. Kapelko, E.I. Chazov, *Nitric Oxide Biol. Chem.* **2008**, 16, 413–418.
68. A. F. Vanin, L. N. Kubrina, I. S. Kurbanov, P. I. Mordvintsev, N. V. Khrapova, M. E. Galagan, E. I. Matkhanov, *Biochemistry (Moscow)* **1989**, 54, 1609–1613.
69. V. V. Andrianov, G. G. Yafarova, S. G. Pashkevich, Y. P. Tokalchik, M. O. Dosina, A. S. Zamaro, T. Kh. Bogodvid, V. S. Iyudin, L. V. Bazan, V. A. Kulchitsky, Kh. L. Gainutdinov, *Appl. Magn. Reson.* **2020**, 51, 375–387.
70. V. V. Andrianov, V. A. Kulchitsky, G. G. Yafarova, A. S. Zamaro, Y. P. Tokalchik, L. V. Bazan, T. K. Bogodvid, V. S. Iyudin, S. G. Pashkevich, M. O. Dosina, K. L. Gainutdinov, *Appl. Magn. Reson.* **2021**, 52, 1657–1669.

71. K.A. Sharlo, I.I. Paramonova, I.D. Lvova, N.A. Vilchinskaya, A.E. Bugrova, T.F. Shevchenko, G.R. Kalamkarov, B.S. Shenkman, *Frontiers in Physiology* **2020**, 11, 814.

72. A.F. Vanin, *Appl. Magn. Reson.* **2020**, 51, 851-876.

73. H.M. Swartz, B.B. Williams, B.I. Zaki, A.C. Hartford, L.A. Jarvis, E.Y. Chen, R.J. Comi, M.S. Ernstoff, H. Hou, N. Khan, S.G. Swartz, A.B. Flood, P. Kuppusamy, *Acad. Radiol.* **2014**, 21, 197-206.

74. W. Schreiber, S.V. Petryakov, M.M. Kmiec, A.B. Flood, H.M. Swartz, P.E. Schaner, B.B. Williams, *Appl. Magn. Reson.* **2022**, 53, 123-143.

9. ФИТОТРОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ИНЖЕНЕРИИ МЕТАБОЛИЗМА РАСТЕНИЙ

Ю.Ц. Мартиросян^{1,2}, Л.Ю. Мартиросян^{1,2}, С. Д. Варфоломеев^{1в}

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

²ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной
биотехнологии, г. Москва,

Технология выращивания сельскохозяйственных и технических культур в условиях фитотрона, методом аэропоники имеет большие экономические перспективы. С помощью аэропонной технологии уже получают различные пищевые продукты. В ближайшем будущем эти технологии будут применяться промышленно для получения вакцин растительного происхождения, лекарственных субстанций, ферментов и биополимеров. В настоящее время нами разработана аэропонные технологии культивирования растений картофеля, хрена обыкновенного, куркумы, табака, томата, каучуконосного растения кок-сагыза и др. Принципиальное преимущество разработанных нами технологий заключается в том, что они могут обеспечить непрерывное, надежное и масштабируемое производство растений, из которых можно экстрагировать ценные вторичные метаболиты.

Получение биологически активных метаболитов в изолированных органах, тканях или клетках растений

Растения являются уникальным источником для получения продуктов, имеющих фармацевтическое назначение. Сегодня множество химических веществ, полученных из растений, являются важными лекарствами, которые в настоящее время активно используются во многих странах мира. Многие из продаваемых сегодня лекарств представляют собой простые синтетические модификации или аналоги химических соединений, полученных естественным путем. Растущая коммерческая значимость

вторичных метаболитов в последние годы привела к взрывному интересу к этим продуктам, особенно к возможности осуществления производства биологически активных растительных метаболитов с помощью технологии культуры клеток и тканей [1]. Технологии культивирования растительных клеток и тканей можно создавать в стерильных условиях, для экстракции вторичных метаболитов из эксплантов, таких как листья, стебли, корни, ткани меристемы растений [2]. Культуры растительных клеток и тканей открывают большие перспективы для контролируемого производства множества полезных вторичных метаболитов [3].

Получение клеточных культур, способных производить определенные соединения (фармацевтическая субстанция), ускорилось в последние несколько лет [4]. Производство метаболитов *in vitro* выгодно тем, что оно не зависит от климата и окружающей среды. Однако производство растительной биомассы в биореакторах обходится гораздо дороже, чем выращивание естественным путем. Для экономической целесообразности производства *in vitro* необходимо повышать концентрацию целевых метаболитов в биомассе, уменьшать количество и стоимость потребляемой питательной среды, а также сокращать время культивирования. [5].

Культуры генетически модифицированных корней («волосовидные корни» или «*hairy roots*») произвели революцию в производстве вторичных метаболитов. Культуры «*hairy roots*» особенно востребованы для производства соединений, которые биосинтезируются в основном в корнях. Они уникальны своей генетической и биосинтетической стабильностью, быстрее растут и их легче поддерживать. Технологии получения биомассы для исследования процессов метаболизма с помощью платформы «*hairy roots*») интенсивно развиваются [6]. Культуры изолированных корней ряда лекарственных растений, полученные с использованием почвенной бактерии *Agrobacterium rhizogenes*, длительное время сохраняют клеточную и тканевую специализацию и под-

держивают постоянный уровень биосинтеза вторичных метаболитов. Такие измененные генетически и, следовательно, с измененными физиолого-биохимическими свойствами культуры позволяют производить биомассу корней со стабильным выходом целевых соединений. Уровень биосинтеза вторичных метаболитов в этих системах часто превышает их уровень в интактных растениях [7]. Последние достижения в области молекулярной биологии, в сочетании с технологиями ферментации культур растительных клеток предполагают, что эти системы станут жизнеспособным источником важных вторичных метаболитов [8]. Большое количество исследований по производству биологически активных растительных соединений *in vitro*, опубликованных за последние несколько лет, указывает на неослабевающую важность соответствующих исследований [9].

В этом контексте нами были получены культуры корней кок-сагыза, *Taraxacum kok-saghyz* R. с фенотипом «hairy roots», с целью изучения биосинтеза натурального каучука (НК) и инулина. Фундаментальное изучение механизма синтеза и регулирования качества полимера в растениях необходимо как при подборе альтернативных культур для производства НК, так и для создания материалов с новыми потребительскими свойствами. При изучении биофизических аспектов метаболизма кок-сагыза важно было понять, будет ли возрастать скорость биосинтеза и содержание НК и инулина с увеличением биомассы корней. Трансформировали экспланты кок-сагыза агробактериями *Agrobacterium rhizogenes* (рис. 1). Полученные культуры с фенотипом «hairy roots» исследовали на содержание НК. Периодическая замена питательной среды также способствовала увеличению скорости синтеза НК и инулина. В дальнейшем эти культуры корней использовались для получения т. н. композитных растений, у которых корни имели выраженный фенотип «hairy roots», а надземная часть представляла собой исходные растения дикого типа.

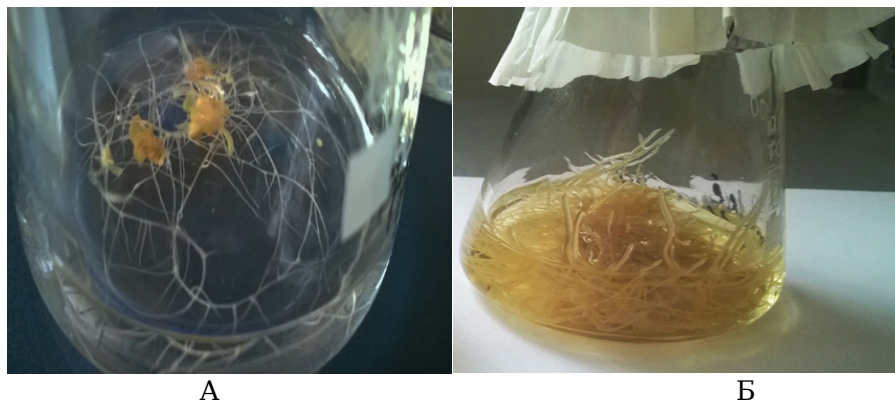


Рисунок 1. Рост трансформированных корней кок-сагыза в жидкой среде, с фенотипом «hairy roots». А -инициация роста и развития корней из эксплантов, 14 суток. Б — Рост корней, 70 суток.

При изучении ростовых характеристик полученных трансформированных корней полный цикл культивирования составлял 70 суток (рис. 2). Индекс роста культуры трансформированных корней кок-сагыза представлен на рисунке 2 А.

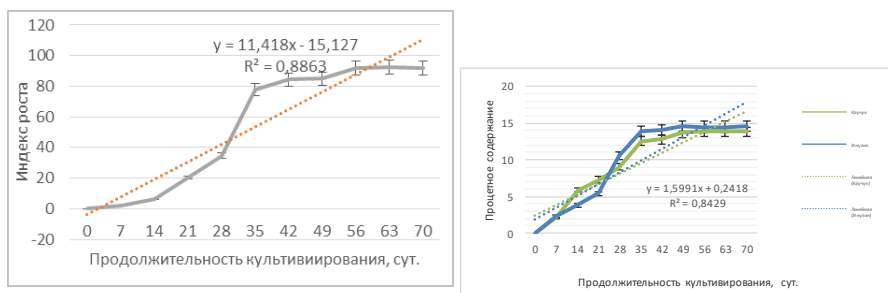


Рисунок 2А. Индекс роста трансформированных корней кок-сагыза при культивировании в течение 70 суток.

Рисунок 2Б. Динамика изменения удельного содержания каучука и инулина в процессе роста трансформированных корней кок-сагыза при культивировании в течение 70 суток.

Лаг-фаза длилась первые две недели культивирования. Затем наступала семидневная фаза ускоренного роста, (индекс роста от 4 до 11), затем фаза экспоненциального роста, (21–35 суток), с резким увеличением индекса роста, с 20 до 89. Далее рост культуры выходил на плато, соответствующее стационарной фазе роста. На этой стадии индекс роста был максимальным и составил 89–94.

Динамика накопления каучука и инулина в процессе культивирования трансформированных корней кок-сагыза представлена на рисунке 2 Б.

Накопление НК и инулина наблюдали во всех трех фазах роста, причем трансформированные корни кок-сагыза за 35–49 суток наращивали биомассу в 89 раз большую, по сравнению с исходным корневым эксплантом, и накапливали НК и инулин до 13,8% и 14,6%, соответственно. В период от 56 до 70 суток роста изменений содержания НК и инулина не происходило, что, возможно, связано со старением культуры корней, накоплением внутриклеточных вторичных метаболитов, влияющих на ростовые процессы.

Разработка технологии выращивания растений кок-сагыза в фитотронных условиях, методом аэропоники. Получение биополимеров — каучука и инулина.

Производство стратегически важного полимера, НК, основано на биосинтезе каучука в растениях. Альтернативные каучуковые культуры, в свою очередь, необходимы для покрытия прогнозируемого дефицита в мировом производстве НК, вызванного бурно развивающейся экономикой Китая и Индии и производственными потерями, вызванными болезнями гевеи бразильской. Несмотря на существенный прогресс в поиске

и разработке альтернативных источников НК, серьезным препятствием остается эффективность потенциальных продуцентов. Основным альтернативным источником НК, подходящим для культивирования на территории РФ, является кок-сагыз, *T. kok-saghyz* R. Достижения в изучении генетики кок-сагыза [10,11] и агробактериальная генетическая трансформация каучуконосов направлены на увеличение выхода НК и инулина. Для разработки условий выращивания кок-сагыза методом аэропоники нами были сконструированы и изготовлены оригинальные аэропонные фитотроны, с автоматическим поддержанием всех необходимых условий выращивания растений [12]. Созданное программное обеспечение для контроля и управления технологическими параметрами роста, с помощью чувствительной системы непрерывного взвешивания интактных растений [13] в процессе развития, без изъятия из среды выращивания, позволяет проводить исследования и определять отзывчивость растений на динамически изменяющиеся параметры минерального питания, обработку растений экзогенными стимуляторами, реакцию на изменение световых условий [14]. Разрабатываемая технология позволит получать НК в промышленных масштабах, круглогодично, конвейерным способом.

В лаборатории биохимической физики и инженерии растений проводятся работы по получению генно-модифицированных растений, с целью увеличения скорости биосинтеза каучука. Нами получены трансформированные композитные растения кок-сагыза с многократно увеличенной корневой системой. Также нами разработана технология круглогодичного, непрерывного выращивания кок-сагыза в контролируемых условиях фитотрона, методом аэропоники [15]. Данная технология позволяет в разы увеличить полезную биомассу корней. Разработанный нами технологический приём, периодическая срезка корней, позволяет в течение года получать в 5–10 раз больше

корней, чем если бы растения выращивали в природных условиях, в почве. Показано существенное увеличение содержания целевых продуктов, каучука и инулина.

Важным технологическим решением при отборе высокопродуктивных экземпляров кок-сагыза, для определения эффективности выбранного метода влияния на содержание целевого продукта является экспресс-оценка количественного содержания каучука в растении [16,17]. Это анализ содержания НК в растениях (кок-сагызе) методом ЭПР спиновое зонда. Методы ИК-спектроскопии и ЯМР анализа НК являются качественными. Количественный химический анализ трудоемок, требует длительного времени и значительного количества образца. Для решения данной проблемы нами запатентован метод по применению ЭПР метода спиновое зонда определения содержания НК в сухих корнях кок-сагыза [18].

Было установлено, что нитроксильный радикал, 2,2,6,6-тетраметил-пиперидин-1-оксил (ТЕМПО), введенный в порошок сухого корня кок-сагыза из газовой фазы, адсорбируется только в каучуконосных доменах растения. По магнитно-резонансным параметрам введенного нитроксильного радикала оценивали процентное содержание каучуковых доменов как в интактных, так и в генно-модифицированных растениях [18].

Реакция растений хрена обыкновенного, *Armoracia rusticana*, на облучение светодиодами облучателями преимущественно красного или синего света.

Использование комплекса монохроматических светодиодных источников света удобно для определения оптимального спектрального состава облучения растений для улучшения роста и увеличения содержания биологически активных соединений в тканях растений [19]. Пероксидаза хрена (*Horseradich*

peroxidase) является хорошо охарактеризованным ферментом, и определение ее активности в корнях удобно использовать для мониторинга физиологического состояния растений в тех или иных условиях культивирования. Поэтому, а также из-за практической ценности пероксидазы хрена для фарм- и хим-индустрии, в качестве объекта исследования нами были взяты растения хрена обыкновенного.

Выращивание растений методом аэропоники, в условиях фитотрона позволяет создавать и поддерживать все необходимые параметры способствующие индукции биосинтеза и увеличения активности пероксидазных ферментов хрена. В данном случае преимуществом также является возможность постоянного доступа к корневой системе растения для отбора проб. Несмотря на ряд исследований, посвященных изучению влияния света на активность фотосинтетического аппарата и функционирование антиоксидантной системы растений хрена [20], до сих пор влияние спектрального состава облучения на физиологические процессы, критически важные для роста и развития растений — скорость фотосинтетических реакций, окислительно-восстановительный баланс и др., оставалось не выясненным.

Интенсивность и спектральный состав света — важные факторы регуляции активности физиологических и биохимических процессов в растениях [21]. Изменение спектрального состава света приводит к изменению структуры и активности фотосинтетического аппарата, содержания хлорофиллов, каротиноидов и их соотношению [22]. Исследования по выращиванию культурных растений под светодиодными источниками облучением (СД) показали повышение содержания фотосинтетических пигментов и антиоксидантной активности у ряда растений [23]. При облучении растений СД красного света отмечены более высокие значения активности аскорбатпе-

роксидазы, супероксиддисмутазы, каталазы. У растений, выращенных в условиях преимущественно синего света, наблюдалось снижение активности ферментов либо отсутствие изменений [24].

Нами впервые были определены особенности влияния повышенной доли красного и синего спектра облучения в области всей фотосинтетически активной радиации на активность фотосинтетического аппарата растений хрена, содержание хлорофиллов и каротиноидов, а также активность пероксидазы. Полученные результаты показывают механизм адаптации фотосинтетического аппарата растений к световым условиям внешней среды. Изучение влияния различного спектрального облучения на активность пероксидазы в корнях растений полезно при разработке технологий получения многих целевых вторичных метаболитов.

Фитотронные аэропонные технологии выращивания растений для развития агропромышленного комплекса полярных регионов, с целью обеспечения потребителей продовольственной продукцией собственного производства.

В настоящее время оптимизация технологии выращивания растений в искусственных агроценозах, в том числе, в условиях замкнутых пространств, приобретает все большую актуальность. Это связано с длительным пребыванием людей на постоянно действующих обитаемых станциях в экстремальных условиях Арктики и Антарктики, реально существующих космических станциях, с планируемыми космическими полетами человека, и даже с планами создания постоянно действующей станции на Луне. Для работы в Арктике нами предлагается инновационная технология, выращивание продовольственных

растений в контролируемых условиях аэропонного фитотрона, модульной конструкции. В ИБХФ РАН разработан и произведен промышленный образец мобильного аэропонного фитотрона на базе 40-футового морского контейнера, а также сверхкомпактные фитотроны-плантариумы индивидуального использования.

Аэропонный фитотрон в необходимой степени автоматизирован, что уменьшает трудозатраты и позволяет за короткий период обеспечивать потребителей свежей продукцией. Преимущества аэропонного способа культивирования заключаются в достижении максимально возможной продуктивности благодаря оптимизации всех параметров роста и развития растений. С применением фитотронных аэропонных технологий выращивания растений обеспечивается рациональное природопользование, требуются только электроэнергия, питьевая вода, минеральные удобрения и семена сельскохозяйственных культур. В процессе производства не образуются промышленные отходы, кроме растительных остатков, не происходит загрязнения окружающей среды.

Перспективы аэропонных технологий в сочетании с метаболической инженерией растений в биофарминге.

Биофарминг или биофармация — это биопроцесс, синтез и выделение специфических (чаще чужеродных) биологически активных молекул из растений или клеточных и тканевых культур, которые выращиваются массово в строго контролируемых условиях. Начало биофармации было положено с выпуском первого генноинженерного препарата инсулина в 1982 году. Сегодняшняя биофармация отличается от традиционной тем, что в процессе производства используются генетически модифицированные сельскохозяйственные растения, микроорганиз-

мы и клеточные культуры. Существует множество препаратов, получаемых из растений, культивируемых плантационным способом или из диких лекарственных растений, такие как опий, разнообразные алкалоиды, дигоксин, раувольфин, резерпин, винкристин, паклитаксел, камптотецин и др. Биоактивные соединения, например, пиперин, куркумин, папаин, бромелин и др., добываются из культурных съедобных растений. [25]. Современная биофармация имеет важное преимущество: теперь вакцины и антитела можно производить из сельскохозяйственных культур («молекулярное растениеводство»), без необходимости использования эмбрионов птицы и клеточных культур [26].

Так называемое молекулярное растениеводство, то есть использование растительных клеток или растений в качестве экспрессионной платформы гетерологичных генов, является быстро развивающейся отраслью. Началом стало производство гормона роста человека (HGH) в трансгенном табаке и подсолнечнике, в 1986 году [26]. Молекулярное растениеводство в настоящее время используется для производства вакцин против сезонного гриппа [27] и вакцины Elelyso от болезни Гоше в США [28]. Хотя этот способ пока не может заменить промышленные системы экспрессии гетерологичных генов, он может сыграть уникальную роль в производстве вакцин в экстремальных ситуациях, в низкодоходных регионах мира, для создания нишевых и орфанных вакцин, а также для производства вирусных наночастиц для применения в вакцинах [29]. Производство гетерологичных белков с помощью растений имеет большие преимущества с точки зрения удобства (обычно используются целые растения, и процессы культивирования ведутся не в стерильных условиях) и стоимости, поскольку массовое производство растений значительно дешевле, чем любое другое. Вирусо-

подобные белки растительного происхождения, используемые в настоящее время для создания вакцин, включают целые вирионы, пустые капсиды растительных вирусов, а также частицы, полученные путем повторной сборки белка оболочки, очищенного от вирионов, или путем рекомбинантной экспрессии [30].

Биотехнология существенно повлияла на производство терапевтических белков, в результате чего появилось значительное количество лекарств биологического происхождения. Из белков медицинского назначения, полученных в растениях, уже проходят клинические испытания инсулин, лизоцим, лактоферрин, коллаген, липаза, антитела, вакцины и др. Трипсин растительного происхождения от компании Sigma уже можно купить в аптеках. В настоящее время на рынке имеется 84 биофармацевтических препарата, которые используют для лечения порядка 60 миллионов пациентов по всему миру [31].

Биотехнология является ключевым фактором в процессе создания крупномолекулярных препаратов, в отличие от низкомолекулярных лекарственных соединений, которые можно производить путем химического синтеза. На сегодняшний день охарактеризовано более 200 000 натуральных продуктов, полученных в результате вторичного метаболизма растений [32]. Однако низкие концентрации вторичных метаболитов в растениях и тот факт, что чрезмерный сбор дикорастущих растений поставил многочисленные виды под угрозу исчезновения, являются серьёзными препятствиями для удовлетворения растущего спроса на востребованные вторичные метаболиты [33]. Возникает потребность в разработке новых производственных систем, гарантирующих высокие качества и темпы производства. Генная инженерия растений для получения целевых вторичных метаболитов из растений призвана

удовлетворить спрос на натуральные продукты уже в нынешнем поколении.

Среди научного сообщества и практиков разных стран идет горячая дискуссия об потенциальной опасности плантационного выращивания генномодифицированных (ГМ) растений. У противников есть опасения, что ГМ растения могут скрещиваться с другими видами растений, в итоге возникнут устойчивые к пестицидам сорняки. Или в пище человека и животных появятся новые вещества, токсичные для организма. Есть и другие доводы, чаще на уровне эмоций, чем научно доказуемые. По этой причине во многих странах, в том числе в РФ законодательно запрещено выращивание ГМ растений.

Здесь мы можем уверенно утверждать, что разработанные нами аэропонные технологии выращивания разнообразных растений, в том числе ГМ, в строго контролируемых условиях фитотрона позволяют выращивать любые такие растения, без опасения попадания их в окружающую среду.

С применением аэропонных технологий выращивания можно создавать технологию получения вирусоподобных белковых частиц с целью создания вакцин для человека, животных, а также и для растений. Лаборатория занимается разработкой технологии биофарминга — получение фармацевтически значимых белков и других продуктов с помощью растений, методом транзientной экспрессии целевых генов. В нашей разработке, для улучшения инфильтрации целевых генетических конструкций в клетки растений, используется совокупность нескольких биофизических факторов — ультразвук, вакуум и высокое давление. Алгоритм чередования этих факторов повышает эффективность инфильтрации и обеспечивает последующую экспрессию целевых генов в клетках растений (рис 4).

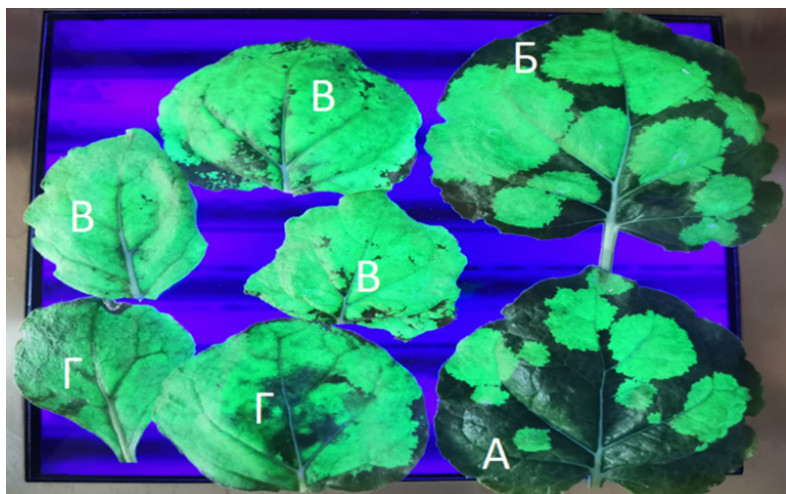


Рисунок 3. Эффективность агроинfiltrации в зависимости от комбинированных режимов обработки. А — инфильтр. шприцеванием, Б — инфильтр. УЗ + шприцевание, В — инфильтр. вакуум 0.8 атм. +УЗ+0.2 атм. вакуум, Г — инfiltrация вакуум 0.8 атм. +УЗ

Это современное направление биотехнологии и медицины, особенно значимое для быстрого получения вакцин и лекарственных препаратов.

Заключение

Управление метаболизмом растений — эффективный технологический процесс. Основываясь на фундаментальных научных исследованиях, применяя имеющийся арсенал физических и химических факторов, можно в определенной степени регулировать метаболические процессы, управляя синтезом первичных и вторичных метаболитов. Также можно ускорять отток этих метаболитов в запасующие органы. В последнее время очевидны смены парадигмы, когда классическая метаболическая инженерия, основанная на молекулярной биологии и биотехнологиях, сосуществует с синтетической биологией,

«омическими» подходами, математическим моделированием и системной биологией и дополняется ими.

Использование растительных платформ для производства в промышленных масштабах целевых растительных метаболитов имеет очевидные преимущества по сравнению с другими платформами (клеточные суспензионные культуры, дрожжи, бактерии). Безусловно, различные стратегии метаболической инженерии растений следующего поколения разноплановые и будут развиваться в нескольких направлениях: введение новых генов, кодирующих новые ферменты и пути, введение активирующих факторов транскрипции, регулирование обменного потока путем оптимизации подачи субстратов, энергии и переориентирование потоков субстратов от первичного метаболизма к вторичному метаболизму. Для промышленного производства вторичных метаболитов аэропонные технологии выращивания растений в фитотронах представляют собой контролируруемую, экологически чистую и надлежащую альтернативу трудоемкому выращиванию в полевых условиях.

В этом контексте результаты наших исследований также будут способствовать созданию экологически чистых технологий производства вакцин и других фармпрепаратов в процессе биофарминга и смогут обеспечить высокие и стабильные выходы целевых метаболитов.

Мы хотим обратить внимание исследователей и производителей на варианты и способы получения биологически активных соединений из растений. А также подчеркнуть возможности, преимущества и перспективы применения разработанных нами аэропонных технологий выращивания растений в контролируемых условиях фитотрона, дополнить опубликованные исследования и предоставить информацию о современных тенденциях и различных аспектах инженерии метаболизма растений.

Литература

1. Носов А. М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения //Биотехнология. — 2010. — № . 5. — С. 8-28.
2. Wawrosch C., Zotchev S. B. Production of bioactive plant secondary metabolites through in vitro technologies — status and outlook //Applied Microbiology and Biotechnology. — 2021. — Т. 105. — № . 18. — С. 6649-6668.
3. Barrales-Cureño H. J., Ramos Valdivia A. C., Soto Hernández M. Increased production of taxoids in suspension cultures of *Taxus globosa* after elicitation //Future Pharmacology. — 2022. — Т. 2. — № . 1. — С. 45-54.
4. Efferth T. Biotechnology applications of plant callus cultures //Engineering. — 2019. — Т. 5. — № . 1. — С. 50-59.
5. Khanahmadi M., Paek K. Y. Bioreactor technology for sustainable production of valuable plant metabolites: challenges and advances //Crop Improvement: Sustainability Through Leading-Edge Technology. — 2017. — С. 169-189.
6. Morey K. J., Peebles C. A. M. Hairy roots: An untapped potential for production of plant products //Frontiers in Plant Science. — 2022. — Т. 13. — С. 937095.
7. Burnett, M. J., & Burnett, A. C. (2020). Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities. *Plants, People, Planet*, 2(2), 121-132.
8. Bapat, V. A., Kavi Kishor, P. B., Jalaja, N., Jain, S. M., & Penna, S. (2023). Plant cell cultures: biofactories for the production of bioactive compounds. *Agronomy*, 13(3), 858.
9. Liu, J. C. T., De La Peña, R., Tocol, C., & Sattely, E. S. (2024). Reconstitution of early paclitaxel biosynthetic network. *Nature Communications*, 15(1), 1419.

10. Amerik A.Yu., Martirosyan Yu.Ts., Gachok I. V. Regulation of natural rubber biosynthesis by proteins associated with rubber particles. Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2018, 44(2): 140–149 (doi: 10.1134/S106816201801003X).

11. Amerik, A.Y.; Martirosyan, Y.T.; Martirosyan, L.Y.; Goldberg, V.M.; Uteulin, K.R.; Varfolomeev, S. D. Molecular Genetic Analysis of Natural Rubber Biosynthesis. Russian Journal of Plant Physiology. 2021. DOI: 10.1134/S1021443721010039

12. Мартиросян Ю. Ц., Варфоломеев С. Д., Гольдберг В. М., Мартиросян Л. Ю., Рязанцев Д. М., М. А. Аэропонный фитотрон. Патент РФ № 196013. Оpubл. 3.02.2020. Бюл. № 5.

13. Гольдберг В. М., Гусейнов Т. М., Соловьев А. А., Мартиросян Ю. Ц., Мартиросян Л. Ю. Устройство для измерения веса растений в фитотроне в режиме реального времени. Патент РФ № 212577. Оpubл. 29.07.2022. Бюл. № 22.

14. Мартиросян Л. Ю., Мартиросян Ю. Ц., Варфоломеев С. Д., Гольдберг В. М. Способ аэропонного выращивания каучуконосного растения кок-сагыз *Taraxacum kok-saghyz* R. Патент РФ № 2779988. Оpubл. 16.09.2022. Бюл. № 26.

15. Martirosyan, L.Yu.; Martirosyan, Yu.Ts.; Kosobryukhov, A.A.; Goldberg, V.M.; Gachok, I.V.; Martirosyan, V.V.; Gladchenko, M.A.; Gaydamaka, S.N.; Amerik, A.Yu.; Minih, A. A. Varfolomeev, S. D. Biosynthesis of rubber and inulin depending on the spectral composition of light and activity of the photosynthetic apparatus during aeroponic cultivation of *Taraxacum kok-saghyz* E. Rodin. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya 2023. DOI: 10.15389/agrobiology.2023.1.100eng

16. Martirosyan, L.Y.; Goldberg, V.M.; Barashkova, I.I.; Kasparov, V.V.; Martirosyan, Y.T.; Motyakin, M.V.; Gaydamaka, S.N.; Varfolomeev, S.D. A New Quantitative Method of Express Analysis of Natural Rubber Directly in the Root of the Rubber Plant by the

Spin Probe EPR Method. Doklady Chemistry. 2023 | DOI: 10.1134/S0012500823600955

17. Martirosyan, L.Y.; Goldberg, V.M.; Barashkova, I.I.; Kasparov, V.V.; Martirosyan, Y.T.; Motyakin, M.V.; Gaydamaka, S.N.; Varfolomeev, S.D. Quantitative Determination of Natural Rubber Content of Taraxacum kok-saghyz E. Rodin Plants Using Spin Probe Method of Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. Biophysics (Russian Federation).2023. DOI: 10.1134/S0006350923040139

18. Гольдберг В. М., Мартиросян Л. Ю., Барашкова И. И., Мотякин М. В., Мартиросян Ю. Ц., Гайдамака С. Н., Варфоломеев С. Д. Способ определения содержания каучука в тканях каучуконосных растений. Патент РФ № 2805229. Опубл. 12.10.2023. Бюл. № 29.

19. Martirosyan, Yu.Ts.; Martirosyan, L.Yu.; Kosobryukhov, A.A. Dynamic regulation of photosynthetic processes under variable spectral LED irradiation of plants. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya. 2019. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.1.130eng

20. Martirosyan, L.Yu.; Kosobryukhov, A.A.; Martirosyan, V.V.; Martirosyan, Yu. Ts. The influence of different light sources on photosynthetic performance and productivity of Cucumis sativus L. hybrid tristan F1 in aeroponic phytotron facilities, Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya. 2021. DOI: 10.15389/AGROBIOLOGY.2021.5.934ENG

21. Martirosyan, Yu.Ts.; Martirosyan, L.Yu.; Kosobryukhov, A.A. Dynamic regulation of photosynthetic processes under variable spectral LED irradiation of plants. Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya. 2019. DOI: 10.15389/agrobiology.2019.1.130eng

22. Son, K.H. and M.-M. Oh. 2013. Leaf shape, growth, and antioxidant phenolic compounds of two lettuce cultivars grown under various combinations of blue and red light-emitting diodes. HortScience 48:988-995

23. Jishi, T., Matsuda, R., & Fujiwara, K. (2021). Manipulation of intraday durations of blue-and red-light irradiation to improve Cos lettuce growth. *Frontiers in Plant Science*, 12, 778205.

24. Martirosyan, L.Yu.; Kosobryukhov, A.A.; Martirosyan, V.V.; Martirosyan, Yu.Ts. The influence of different light sources on photosynthetic performance and productivity of Cucumis sativus L. hybrid tristan F1 in aeroponic phytotron facilities, Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya. 2021. DOI: 10.15389/AGROBIOLOGY.2021.5.934ENG

25. Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of natural products*, 75(3), 311–335

26. Barta A. et al. The expression of a nopaline synthase — human growth hormone chimaeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue //Plant molecular biology. — 1986. — T. 6. — C. 347–357.

27. Ward B.J. et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (≥ 65 years): two multicentre, randomised phase 3 trials //The Lancet. — 2020. — T. 396. — № . 10261. — C. 1491–1503.

28. Rybicki E. P. Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents //Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. — 2020. — T. 12. — № . 2. — C. e1587.

29. Martí, M., Merwaiss, F., Butković, A., & Daròs, J. A. (2022). Production of potyvirus-derived nanoparticles decorated with a nanobody in biofactory plants. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 10, 877363.

30. Tariq, H., Batool, S., Asif, S., Ali, M., & Abbasi, B. H. (2022). Virus-like particles: Revolutionary platforms for developing vaccines

against emerging infectious diseases. *Frontiers in microbiology*, 12, 790121.

31. Ochoa-Villarreal M. et al. Plant cell culture strategies for the production of natural products //BMB reports. — 2016. — Т. 49. — № . 3. — С. 149. doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.3.264

32. Javed S. et al. Aloe vera gel in food, health products, and cosmetics industry //Studies in Natural Products Chemistry. — 2014. — Т. 41. — С. 261-285.

33. Chung Y. H. et al. Integrating plant molecular farming and materials research for next-generation vaccines //Nature Reviews Materials. — 2022. — Т. 7. — № . 5. — С. 372-388.

АНТИОКСИДАНТЫ, ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Разработка новых методов терапии и диагностики

10. ПРОИЗВОДНЫЕ 3-ГИДРОКСИПИРИДИНОВ В КАЧЕСТВЕ АДАПТОГЕНОВ К СТРЕССОВЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

И. В. Жигачева, Н. И. Крикунова А. Н. Голощاپов

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

В настоящей работе изучена возможность использования производных 3-гидроксипиридинов в качестве адаптогенов к стрессовым воздействиям. При этом исследована их способность влиять на активацию свободнорадикальных процессов, показателем которых является интенсивность перекисного окисления липидов в биологических мембранах, в частности мембранах митохондрий печени. Стрессовые воздействия приводят к смещению антиоксидантно-прооксидантного равновесия в сторону увеличения генерации митохондриями активных форм кислорода. В результате в мембранах этих органелл наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ в 2,5–3,0 раза. Производные 3-гидроксипиридинов снижают интенсивность ПОЛ до контрольных значений, что способствует сохранению высокой функциональной активности митохондрий. Предупреждение дисфункции митохондрий связано с повышением устойчивости организма к действию стрессовых факторов.

Ключевые слова: 3-гидроксипиридины, митохондрии, перекисное окисление липидов, дисфункция митохондрий, стресс-факторы.

1. Введение

В условиях стресса происходит активация симпатoadренальной системы и рост содержания катехоламинов в крови, что приводит к выходу Ca^{2+} из сосудистого русла в клетки. Увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} вызывает накопление этих ионов в митохондриях, что сопровождается ростом генерации АФК этими органеллами. АФК в зависимости от силы стрессового воздействия могут служить индукторами процессов адаптации, либо вызывать нарушение метаболизма клетки [1]. При этом митохондрии являются как источником, так и мишенью для этих интермедиатов. Избыточная генерация АФК приводит к окислению тиоловых групп белков, активации перекисного окисления липидов и набуханию митохондрий [2]. В этих условиях образуются токсичные для клеток продукты: альдегиды и 4-гидрокси-2,3-ноненали. Эти токсиканты подавляют ферменты, участвующие в основных метаболических путях, главным образом в цикле лимонной кислоты. При этом они влияют на транспорт электронов в дыхательной цепи митохондрий из-за истощения пула НАДН в матриксе митохондрий [3]. Кроме того, избыточная генерация АФК может влиять на функциональное состояние редокс-чувствительных внутриклеточных сигнальных путей, запуская программу клеточной гибели. [4]. В связи с этим довольно актуальной задачей является поиск новых препаратов-адаптогенов, повышающих устойчивость организма к стрессу.

Впервые термин «адаптогены» был введен Н. В. Лазаревым (1959, 1962), сформулировавшим представление о со-

стоянии неспецифической повышенной сопротивляемости организма (СНПС). Препараты, вызывающие состояние неспецифической повышенной сопротивляемости организма были названы «адаптогенами». Он и его коллеги продемонстрировали способность этих препаратов повышать устойчивость организма к широкому спектру повреждающих воздействий: гипоксии, резких колебаний температуры, интоксикации и т. д. [5]. Сходство эффектов, оказываемых различными по своей природе препаратами, позволили Н. И. Лазареву сделать вывод о наличии единого неспецифического механизма повышения резистентности организма. Поскольку общим механизмом ответа клетки на сильные стрессовые воздействия является избыточная генерация АФК митохондриями, то можно предположить, что препараты-адаптогены должны в первую очередь воздействовать на генерацию АФК этими органеллами. На эту роль претендуют антиоксиданты и в том числе производные 3-гидроксипиридинов (3-ГП).

Биологическая активность производных 3-гидроксипиридинов, вероятно, обусловлена, тем, что они являются структурными аналогами соединений группы пиридоксина (витамина В6), участвующих в обмене белков, углеводов и жиров, выработке нейромедиаторов, а также в синтезе гемоглобина и образовании эритроцитов и т.д [6]. При этом они выполняют функцию физиологических антиоксидантов. Отметим, что производные 3-ГП являются гетероциклическими аналогами ароматических фенолов и в связи с этим проявляют антиоксидантные и антирадикальные свойства [7]. Исходя из этого нами была исследована возможность использования 3-ГП в качестве адаптогенов к стрессовым воздействиям. Объектами исследования служили: N-ацетилцистеинат 2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридин (Ац-3-ГП), 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридинийгидроксид

ан-диоат (Этоксидол) и карнитинат 2-этил-6- метил-3- гидроксипиридин (КП) (рис. 1):

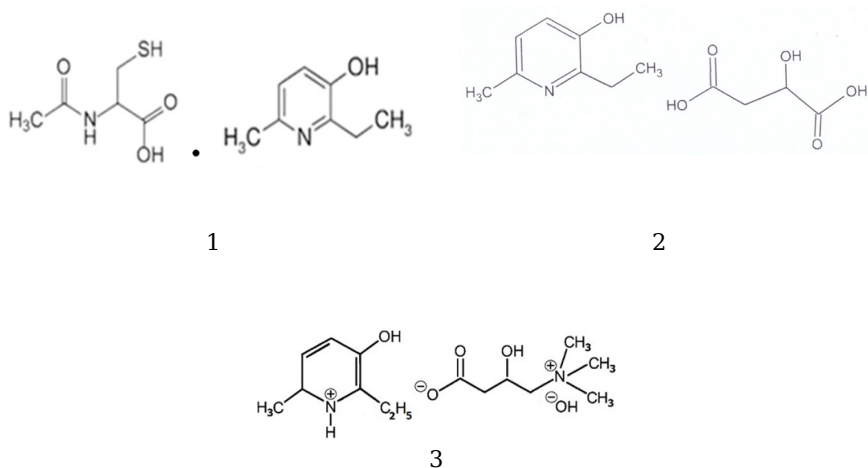


Рис. 1. N-ацетилцистеинат 2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридин (1), Этоксидол (2), Карнитинат 2-этил-6- метил-3- гидроксипиридин (3).

Эффективность антиоксидантов, как и других биологически активных веществ зависит от их концентрации [8]. В связи с этим целью исследования было также изучение функционального состояния митохондрий печени крыс в условиях стресса и влияния различных концентраций исследуемых антиоксидантов на функциональное состояние этих органелл.

2. Результаты

2.1 Антиоксидантная и прооксидантная активность Ац-3-ГП, Этоксидола и КП

Антиоксидантную активность исследуемых препаратов изучали, используя митохондрии печени мышей линии Balb/c ве-

сом 20–25 г. Исследования проводили на модели «старения» митохондрий: выделенные митохондрии (2–3 мг белка) помещали в 0,5 мл среды, содержащей 65мМ KCl, 10 мМ HEPES и 1мМ KH_2PO_4 , pH 7,4 и инкубировали 20–25 мин при комнатной температуре. Уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали флуоресцентным методом [9]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ: метанол = 2:1 (по объему) из митохондрий, содержащих 3–5 мг белка. Соотношение митохондрии: смесь хлороформ-метанол = 1:10.

«Старение» митохондрий сопровождалось активацией ПОЛ, которое регистрировали по интенсивности флуоресценции конечных продуктов ПОЛ (оснований Шиффа). При этом интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ в мембранах митохондрий печени возрастала в 2,5–3,0 раза (рис. 2).

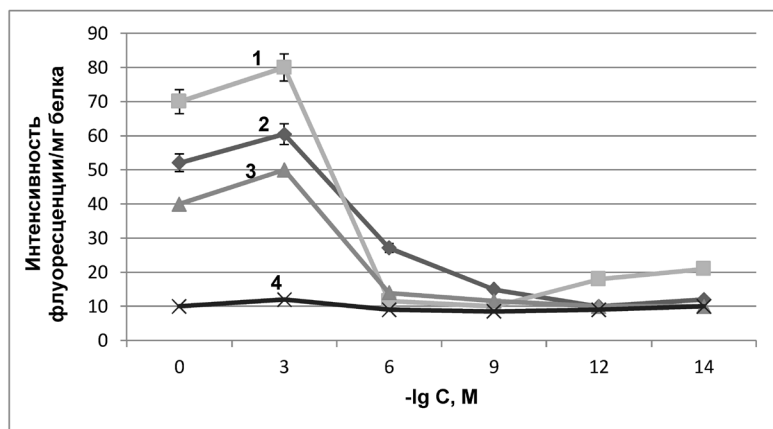


Рис. 2. Влияние «старения» КП, Ац-3-ГП и ЭТ на интенсивность флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий печени мышей. По оси ординат — интенсивность флуоресценции в усл. ед./мг белка; по оси абсцисс — концентрация исследуемых антиоксидантов. 1- «старение» + КП; 2 — «старение» + ЭТ; 3- «старение» + Ац-3-ГП; 4-контроль (без добавления антиоксидантов).

Введение в среду инкубации митохондрий КП (кривая 1), ЭТ (кривая 2) или Ац-3-ГП (кривая 3) приводило к дозозависимому снижению интенсивности ПОЛ практически до контрольных значений (кривая 4), что, вероятно, свидетельствует о наличии у препарата антистрессовых свойств. Отметим, что наиболее эффективными концентрациями для КП были 10^{-6} – 10^{-12} М, для Ац-3-ГП — 10^{-6} – 10^{-9} М, а для ЭТ– 10^{-9} – 10^{-14} М. Следует отметить, что в концентрации 10^{-3} М препараты проявляли прооксидантный эффект, что указывает на необходимость строго придерживаться концентраций, при которых изучаемые антиоксиданты предотвращают активацию ПОЛ.

2.2 Активация перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий печени мышей в условиях острой гипобарической гипоксии (ОГГ)

Антистрессовые свойства КП, ЭТ и Ац-3-ГП исследовали с использованием модели острой гипобарической гипоксии (ОГГ), которую у мышей моделировали в стеклянной барокамере в атмосфере низкого давления, (230,40 мм рт. ст.), что соответствует высоте 9000 м над уровнем моря. Время пребывания мышей «на высоте» 9,0 тыс. метров над уровнем моря составляло 5.0 минут. Выбор модели острой гипобарической гипоксии обусловлен тем, что в условиях ОГГ в мембранах митохондрий, активируются процессы свободнорадикального окисления, в результате чего происходит увеличение интенсивности перекисного окисления липидов [10]. Кроме того, эта модель позволяет изучить возможности предотвращения дисфункция митохондрий при ишемии с помощью исследуемых препаратов.

Опытной группе мышей перед стрессовым воздействием внутрибрюшинно вводили 2×10^{-6} моль/кг КП или

10^{-6} моль/кг Ац-3-ГП в течение 5 дней, ЭТ вводили в течение 7 дней в дозе 10^{-9} моль/кг. Контрольной группе животных внутрибрюшинно вводили физ. раствор по той же схеме и в тех же объемах.

ОГГ приводила к активации ПОЛ, что находило отражение в 3,5- кратном увеличении интенсивности флуоресценции продуктов ПОЛ, что согласуется с данными М. С. Кислина с соавторами [11] (рис. 3).

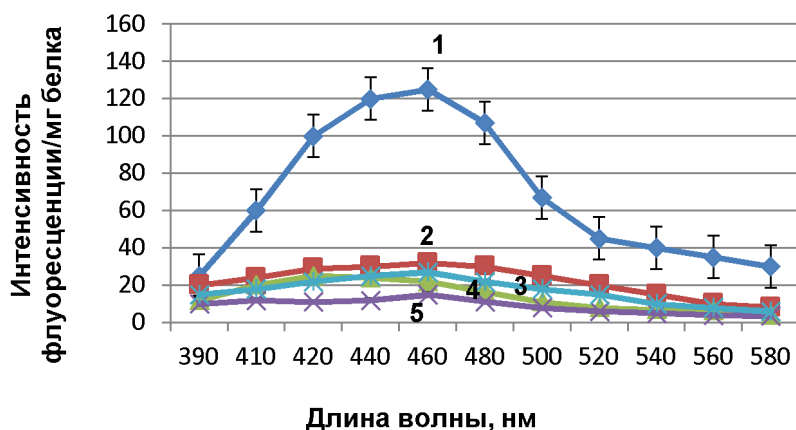


Рис. 3. Влияние острой гипобарической гипоксии карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (КП), Этоксидола и N-ацетилцистеината 2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридин на спектры флуоресценции продуктов перекисного окисления липидов в мембранах митохондрий печени мышей. По оси ординат — интенсивность флуоресценции в усл. ед./мг белка; по оси абсцисс-длина волны испускания. 1- ОГГ; 2 — ОГГ+ЭТ; 3-ОГГ+ КП; 4- ОГГ+ Ац-3-ГП; 5- Контроль (без введения препаратов).

Введение мышам антиоксидантов предотвращало активацию ПОЛ: интенсивность флуоресценции продуктов ПОЛ была почти на контрольном уровне, что еще раз свидетельствовало о наличии антистрессовых свойств у исследуемых антиоксидантов.

2.3 Жирнокислотный состав мембран митохондрий печени мышей в условиях острой гипобарической гипоксии

Активация перекисного окисления липидов, по-видимому, должна была повлиять на жирнокислотный состав общей липидной фракции митохондрий. Исследование ЖК состава мембран митохондрий печени мышей проводили методом газо-жидкостной хроматографии и хромато-масс-спектрометрии. Метилловые эфиры жирных кислот (МЭЖК) получали кислотным метанолизом липидов мембран митохондрий [12, 13]. МЭЖК экстрагировали гексаном и полученные растворы анализировали. Определение количественного состава МЭЖК проводили на хроматографе марки Кристалл 2000М (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой DB-1 (60 м × 0,32 мм, слой 0,25 мкм фирма «J&W Scientific», США). Анализ МЭЖК выполняли при программировании температуры от 120 до 270 °C со скоростью 4 °C/мин. Температура инжектора и детектора — 270 °C; скорость газа-носителя гелия составляла 2,0 мл / мин, деление потока на входе в колонку — 1:40. Идентификацию МЭЖК осуществляли по величинам индексов удерживания [12]. Содержание МЭЖК в образцах рассчитывали, по соотношению площади пика соответствующей кислоты к сумме площадей пиков, соответствующих найденным МЭЖК. Стандартное отклонение средних значений площадей пиков, полученных в трех измерениях, не превышало 5% (относительное значение). Идентификацию МЭЖК в образцах осуществляли также на основе масс-спектров, полученных после разделения МЭЖК в условиях аналогичных ГХ анализу, на приборе Hewlett Packard-6890 (США). Масс спектры получали в режиме электронного удара при ионизирующем напряжении 70eV и скорости сканирования 1с на декаду масс в области 40–400 дальтон.

Острая гипобарическая гипоксия вызывала изменения в содержании C_{18} и C_{20} жирных кислот (ЖК) (рис. 4).

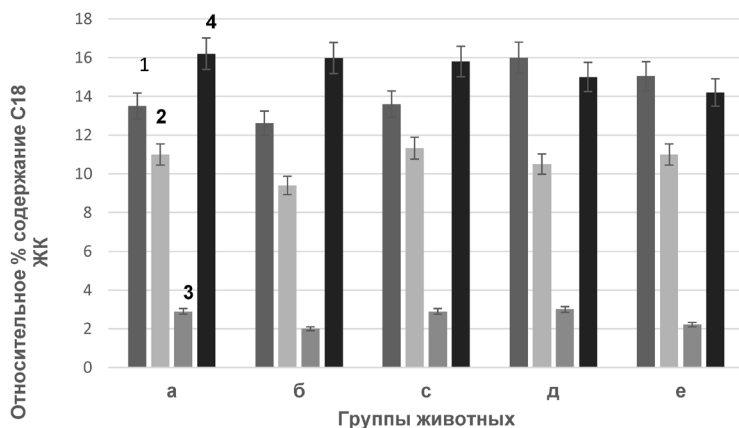


Рис. 4. Влияние ОГГ и карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина (КП), Этоксидола и N-ацетилцистеината 2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридина на относительное процентное содержание C_{18} жирных кислот (ЖК) в мембранах митохондрий печени мышей. Ось Y: относительное процентное содержание C_{18} ЖК в мембранах митохондрий. Ось X: группы животных: а-Контроль; б-ОГГ; с-ОГГ+ЭТ; д-ОГГ+Ац-3-ГП; е-ОГГ+ КП. Условные обозначения: 1-18: 2 ω6; 2-18: 1 ω9; 3-18:1ω7; 4-18: 0.

Так содержание 18:2ω6 (рис. 4, а, столбик 1) снизилось на 7%, а содержание 18:1ω9 — на 15% (рис. 4, столбик 2). Пул стеариновой кислоты почти не изменялся (рис. 4, столбик 4). При этом индекс двойных связей C_{18} ЖК понизился с $0,83 \pm 0,01$ до $0,53 \pm 0,01$. Введение мышам антиоксидантов предотвращало изменения в содержании C_{18} ненасыщенных ЖК.

Отметим, что ОГГ вызывала изменения и в содержании C_{20} ЖК в мембранах митохондрий печени мышей (рис. 5). Содержание 20:3ω3 в мембранах митохондрий в условиях ОГГ снижалось на 13%, 20:2ω6 — на 80%, а 20:1ω9 — на 33% (столбики 2,3 и 4 соответственно).

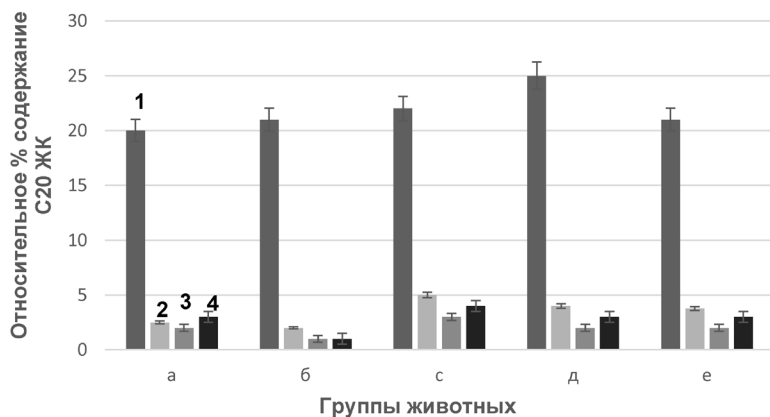


Рис. 5. Влияние ОГГ и карнитината 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, Этоксидола и N-ацетилцистеинат 2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридина на относительное % содержание C_{20} ЖК в мембранах митохондрий печени мышей. Ось Y: относительное процентное содержание C_{20} ЖК в мембранах митохондрий. Ось X: группы животных: а-Контроль; б-ОГГ; с-ОГГ+КП; д-ОГГ+ЭТ е-ОГГ+Ац-3-ГП. Условные обозначения: 1-20:4ω6; 2-20:3ω3; 3-20:2ω6; 4-20:1ω9.

Соотношение между ЖК — предшественниками и ингибиторами синтеза эйкозаноидов 20:4ω6/22:6ω3 при этом снизилось с $2,22 \pm 0,12$ до $1,43 \pm 0,10$ что свидетельствовало о снижении метаболизма в эйкозаноидном цикле (рис. 5). Учитывая, что простагландины имеют широкий спектр регуляторных функций, включая способность изменять активность ферментов, влиять на синтез гормонов и корректировать их действие на различные органы и ткани [14], то снижение содержания их предшественников, возможно, также, как и снижение содержания линолевой кислоты, влияло на устойчивость организма к стрессовым воздействиям. Отметим, что введение исследуемых препаратов предотвращало данные изменения. Более того, Этоксидол (рис. 5, д) в условиях ОГГ даже на 25% повышал содержание арахидоно-

вой кислоты (рис. 5 а, столбик1) в мембранах митохондрий контрольной группы.

2.4 Антистрессовые свойства КП, ЭТ, и Ац-3-ГП.

Изменения физико-химических свойств мембран митохондрий, вероятно, влияло на функционирование этих органелл и тем самым могло оказывать влияние на устойчивость организма к стрессовым воздействиям. Введение препаратов мышам оказывало протекторный эффект в условиях стресса. Так внутрибрюшинное введение 10^{-9} моль/кг ЭТ или 2×10^{-6} моль/кгКП в 3,2–4,3 разаувеличивало продолжительность жизни и на 12–40% повышало выживаемость мышей в условиях различных видов гипоксии, введение Ац-3-ГП повышало продолжительность жизни в 3,4–4,3 раза, а выживаемость мышей — на 25% (таблица). При этом все препараты воздействовали на динамическую работоспособность, которую определяли в тесте принудительного плавания с грузом 2% от массы тела в воде температурой 10°C до утомления животных [15]. При этом они увеличивали длительность плавания мышей в 3,2–4,2 раза.

Протекторная активность Этоксидола, 2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридина карнитината и 2-Этил-6-метил-3-гидроксипиридин N-ацетилцистеината (Представлены результаты 10 опытов).

Воздействие	Измеряемый параметр	Контроль	ЭТ 10^{-9} моль/кг	КП 2×10^{-6} моль/кг	Ац-3ГП 10^{-6} моль/кг
Подъем на высоту 11,5 тыс. м (гипобарическая гипоксия)	Время жизни в минутах % выживших	3,5±1,1 10%	14,9± 2,4 40%	13,5± 2,0 35%	15.2±1.2 35%
Инъекция нитрита натрия 250 мг/кг (гемическая гипоксия)	Время жизни в минутах % выживших	3,7±1,5 15%	11,7±2,0 35%	12,3±2,1 28%	12.7±1.4 15%
Плывание с грузом при температуре 10° С	Время жизни в минутах % выживших	3,2±0,7 0%	10,3±1,4 0%	11,4±1,1 12%	13.4±2.1 10%

3. Заключение

На основании полученных данных можно прийти к заключению, что исследованные антиоксиданты могут быть использованы в качестве адаптогенов к стрессовым воздействиям. Их адаптогенные свойства могут быть обусловлены высокой антирадикальной и антиоксидантной активностью [16,17].

Они, как и другие 3-гидроксипиридины, представляют собой гетероциклические аналоги ароматических фенолов, содержащие в ароматическом цикле гидроксильные и алкильные группы, что обуславливает их липофильность и антирадикальную активность. Наличие алкильной цепи в ароматическом цикле обеспечивает легкое проникновение этих препаратов в клетку [18]. Кроме того, производные 3-ГП, активно реагируют с гидроксильными радикалами, первичными свободными радикалами белков и перекисными свободными радикалами. Они могут повышать активность антиоксидантных ферментов [19].

Введение различных заместителей в молекулу 3-ГП в дополнение к антиоксидантной активности приводило к появлению новых свойств у исследуемых препаратов. Так введение в комплекс N-ацетилцистеина (N-Ац) обеспечивало растворимость препарата в протонных растворителях и повышало его антиоксидантную активность [20]. Возможность восстанавливать дисульфидные связи определяло способность N-ацетилцистеина разрывать мукополисахаридные цепи и деполимеризовать мукопротеины мокроты, что, возможно, позволит использовать N-ацетилцистеинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридин в качестве муколитического и противовоспалительного средства [21].

Другим исследуемым препаратом является Этоксидол, представляющий собой комплекс 3-ГП с малатом. В физиологических условиях малат является промежуточным компонентом цикла Кребса, но становится дефицитным при острой гипок-

сии. В зависимости от степени гипоксии и потребности клетки в энергии малат может окисляться с образованием АТФ при достаточном количестве кислорода в митохондриях и даже может окисляться в условиях ишемии или же восстанавливаться до сукцината «про запас» [22]. Для поступления малата в митохондрии не требуется затрат АТФ. Он попадает туда благодаря работе малат-аспартатного шунта. И, наконец, малат представляет собой единственный интермедиат цикла Кребса, который в низких концентрациях способен восстанавливать цитохром b_5 в присутствии НАДН, то есть активировать альтернативные пути окисления [23]. Кроме того, малат легко проходит через гематоэнцефалический барьер, что открывает перспективы использования ЭТ при ишемии мозга. Исходя из этого можно было предположить, что ЭТ будет оказывать защитный эффект в условиях гипоксии.

И, наконец, карнитинат 2-этил-6- метил-3- гидроксипиридин, в состав которого входит 3-ГП и L-карнитин. Адаптогенное свойство КП, вероятно, обусловлено еще и тем, что L-карнитин повышает устойчивость организма к стрессу за счет активации синтеза протекторных молекул: белков теплового шока, сиртуинов, тиреоредоксинов и небольших молекул антиоксидантов [24]. Он повышает энергетический статус организма за счет транспорта длинноцепочечных жирных кислот из цитозоля в матрикс митохондрий, где происходит β -окисление жирных кислот. При этом он стабилизирует отношение коэнзим А/ ацетил- коэнзим А (CoASH/acetylCoA) в митохондриях и снижает выработку лактата [25]. Отметим, что β -окисление жирных кислот, протекающее в митохондриях мышечных тканей имеет большое значение в условиях повышенных мышечных нагрузок, что позволяет сделать предположение о возможности использования препарата в условиях сопровождающимися высокими энергетическими тратами.

Таким образом исследуемые антиоксиданты являются адаптогенами широкого спектра действия. Препараты предотвращали окисление ненасыщенных жирных кислот с 18 и 20 атомами углерода, главным образом линолевой кислоты — одной из основных жирных кислот, входящих в состав кардиолипина, обеспечивающего эффективное функционирование дыхательной цепи митохондрий [26, 27]. При этом препараты предупреждали снижение метаболизма в эйкозаноидном цикле. Результатом сохранения пула ненасыщенных жирных кислот с 18 и 20 атомами углерода на исходном (контрольном) уровне, вероятно, являлось предотвращение вызванной стрессом дисфункции митохондрий. Благодаря сохранению функциональной активности митохондрий, по-видимому, поддерживались энергетические процессы в клетке, что, возможно, повышало устойчивость организма к стрессовым воздействиям.

Список литературы

1. А.Е. Шиков, Т.В. Чиркова, В.В., Емельянов, *Экологическая генетика* **2021**,19(4), 343-363. <https://doi.org/10.17816/ecogen759752>
2. H. T. Endale, W. Tesfaye, T. A. Mengstie, *Front. Cell Dev. Biol., Sec. Cell Death and Survival*. **2023**,11, <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1226044>
3. N. L. Tailor, D. A. Day, A. H. Millar. *J. of Exp. Botany*, **2003**, 55(394): 1-10 DOI: 10.1093/jxb/erh001
4. Е. В. Калинина, В. И. Иванова Радкевич, Н. Н. Чернов, *Биохимия*. **2019**,84 (11), 1538-1552 DOI: 10.1134/S0006297919110026
5. К. В. Яременко, *Психофармакология и биологическая наркология*. **2005**, 5 (4),1086-1092.

6. Sh. Dewangan, A. K. Bhatia, In: *Vitamins and metabolites in Handbook of Biomolecules Fundamentals, Properties and Applications*, (Eds Ch. Verma and D. K. Verma), **2023** Elsevier, 647 p. <https://doi.org/10.1016/C2021-0-00444-2>.
7. A. P. Danilenko, K. S. Trunov, M. V. Pokrovsky, L. M. Danilenko, M. V. Korokin, O. S. Gudyrev, A. A. Khentov, N. P. Masalytina, I. A. Tatarenkova, A. V. Cherednichenko, E. V. Boeva, I. S. Koklin, E. I. Taran, *Pharmacy & Pharmacology*. **2023**, 11(1), 48–61. DOI:10.19163/2307-9266-2023-11-1-48-61.
8. Е. Б. Бурлакова, А. А. Конрадов, Е. Л. Мальцева. В: *Проблемы регуляции в биологических системах. Биофизические аспекты*. (Под редакцией А. Б. Рубина.) **2007** Москва, Ижевск, Научный Институт компьютерных исследований, 390–423.
9. B. I. Fletcher, C. D. Dillard, A. L. Tappel, *Anal. Biochem.* **1973**, 52. 1–9 doi: 10.1016/0003-2697(73)90327-8.9.
10. L. Lukyanova, E. Germanova, N. Khmil, L. Pavlik, I. Mikheeva, M. Shigaeva, G. Mironova, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 8636.
11. M. S. Kislin, E. I. Tiul'kova, M. O. Samoïlov, *Zh Evol Biokhim Fiziol.* **2011** 47(2), 157–64
12. J. P. Carreau, J. P. Dubacq, *J Chromatogr.* **1979**, 151 (3), 384 DOI: 10.1016/S0021-9673(00)88356-9Get;
13. J. Wang, H. Sunwoo, G. Cherian, I. S. Sim, *Poult Sci.* **2000**, 79 (8), 1168 DOI: 10.1093/ps/79.8.116810,11
14. О. В. Тимошук, И. С. Лембрик, З. Р. Кочерга, *Запорожский медицинский журнал.* **2018**, 1, 121–127.
15. В. Н. Каркищенко, Н. Н. Каркищенко, Е. Б. Шустов, И. А. Берзин, Ю. В. Фокин, О. В. Алимкина, *Биомедицина.* **2016**, № 4, 34–46.
16. Irina V. Zhigacheva, Irina F. Rusina, Natalia I. Krikunova, Aleksandr N. Goloschapov, *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 13172–84 <https://doi.org/10.3390/ijms241713172>

17. I. V. Zhigacheva, N. I. Krikunova, V. Binyukov, E. M. Mil, I. F. Rusina., A. N. Goloshchapov, *Curr Mol Pharmacol*. **2023**,16(1),109–115 doi: 10.2174/18744467215666220308115514.
18. Л. М. Даниленко, С. Я. Скачилова, С. В/ Надеждин, А. С. Тимохина, О. В. Щеблыкина, А. С. Котельникова, *Результаты исследований в фармакологии*. **2018**, 4(2), 125–131. DOI 10.3897/rrharmacology.4. 28414.
19. Е. В. Пожилова, В. Е. Новиков, А. В. Новикова, *Вестник Смоленской государственной медицинской академии*. **2013**,12(3),56–66
20. К. М. Zinatullina, A. V. Orekhova, O. T. Kasaikina, N. P. Khrameeva, M. P. Berezin, I. F. Rusina, *Bulletin of the Academy of Sciences. Chemical series*. **2021**, 10, 1934–1938. doi: 10.1007/s11172-021-3299-8.31.
21. G. Aldini, A. Altomare, G. Baron, G. Vistoli, M. Carini, L. Borsani, F. Sergio, *Free Radical Research*. **2018**, 52 (7), 751–762 DOI: 10.1080/10715762.2018.1468564
22. М. Н. Дадашева, Н. Ю. Тараненко, Б. В. Агафонов, С. Ю. Чудаков, *Вестник семейной медицины*. **2015**, 1–2, 12–16.
23. E. N. Mokhova, V. P. Skulachev, I. V. Zhigacheva, *BBA* **1977**, 501, 415–423 doi: 10.1016/0005-2728(78)90109-3.
24. Е. И. Асташкин, М. Г. Глейзер, *Медицинский совет*. **2016**,10, 94–100.
25. A. Gnani, S. Longo, G. V. Gnani, A. M. Giudetti, *Molecules* **2020**, 25 (1), 182 <https://doi.org/10.3390/molecules25010182>
26. R. De Paeppe, S. D. Lemaire, A. Danon, *Plant Signaling & Behavior*. **2014**, 9, e29228–1–e29228–4
27. G. Paradies, V. Paradies, F. M. Ruggiero, G. Petrosillo, *Cells* **2019**, 8, 728 doi:10.3390/cells8070728

11. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В РАЗВИТИИ И ПРОГНОЗЕ СОЦИАЛЬНО ЗНАЧИМЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Заварыкина Т.М., Носиков В.В.

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

Введение

К социально значимым заболеваниям человека относятся распространенные заболевания, требующие значительных экономических затрат на лечение и реабилитацию пациентов, такие как онкологические заболевания и сахарный диабет.

Онкологические заболевания занимают ведущее место в мире как по уровню заболеваемости, так и по смертности. Современная теория канцерогенеза основывается на том, что помимо внешних факторов, таких как образ жизни и условия окружающей среды, для возникновения опухоли важно наличие генетической предрасположенности [1]. Известен ряд драйверных мутаций, отвечающих за возникновение отдельных видов рака. Чаще всего эти мутации изменяют функционирование генов-онкосупрессоров или приводят к активации онкогенов в клетке. Однако мутации в этих генах, как правило, отвечают только за часть случаев заболевания. В связи с этим выявление диагностических и прогностических маркеров может служить основой для создания современных моделей патогенеза отдельных видов рака, а также разработки новых методов профилактики групп риска и лечения больных.

Прецизионный подход в лечении заболеваний включает в себя поиск методов выявления индивидуальных особенностей

в ответе на лечение. Чувствительность определенного пациента к действию лекарственных веществ связана с индивидуальными особенностями организма этого пациента, которые могут влиять как на эффективность лечения, так и на риск возникновения побочных эффектов и степень их проявления. В случае онкологических заболеваний важной составляющей ответа на лечение также являются индивидуальные особенности опухоли. Исследованием генетических особенностей, в частности, роли отдельных вариантов генов, которые потенциально могут быть вовлечены в ответ на лечение, занимается фармакогенетика. Генетические варианты, имеющие фармакогенетическое значение, могут быть представлены наследуемыми изменениями в геномах пациента и опухоли или соматическими мутациями в геноме опухоли, связанными с молекулярными особенностями опухолевых клеток и их патогенеза [2]. Кроме того, в качестве фармакогенетических маркеров исследуются профили экспрессии генов и уровень их метилирования в опухоли.

Однонуклеотидные замены, или однонуклеотидные полиморфные маркеры, могут приводить к изменению структуры белкового продукта гена, имеют достаточно высокую частоту встречаемости в популяции, что делает их перспективными для использования в качестве диагностических, прогностических и предиктивных маркеров. Также значимыми для фармакогенетики маркерами помимо полиморфных маркеров могут быть наследственные и соматические мутации, возникающие в клетках опухоли в ходе канцерогенеза.

Сахарный диабет типа 1 (СД1) — широко распространенное, тяжелое заболевание, приводящее к ранней инвалидности и преждевременной смертности [3]. При СД1 происходит аутоиммунное разрушение β -клеток островков Лангеранса поджелудочной железы, что приводит к полной зависимости больных от введения экзогенного инсулина, который необходим для ре-

гуляции уровня глюкозы в крови. Распространенность СД1 среди европейского населения составляет около 0.4% [4] и с каждым годом увеличивается, поэтому СД1 представляет собой не только медицинскую, но и серьезную социальную проблему.

Развитие СД1 более чем наполовину связано с генетическими факторами. Актуальность изучения молекулярной генетики СД1 обусловлена главным образом возможностью приблизиться к идентификации генов, предрасполагающих к СД1, и понять, какие именно гены и как определяют развитие этого заболевания.

Молекулярно-генетические маркеры риска развития заболеваний

Среди опухолей женской репродуктивной системы **рак яичников** (РЯ) характеризуется низкой выживаемостью и занимает второе место по смертности в онкогинекологии [5]. Клинические исходы РЯ во многом зависят от своевременной постановки диагноза, а также доступности необходимого хирургического лечения и системной терапии. Известно, что патогенез РЯ в ряде случаев, чаще всего при наследственном варианте заболевания, тесно связан с мутациями генов-онкосупрессоров *BRCA1* и *BRCA2*. Однако данные мутации встречаются в 10–15% случаев РЯ [6]. Установлено, что в поддержании стабильности генома клетки и предотвращении неопластической трансформации участвуют системы репарации ДНК, апоптоза и контроля клеточного цикла. Возникновение злокачественных новообразований часто связано с нарушением в функционировании этих систем клетки. Известно, что накопление повреждений ДНК приводит к возникновению мутаций, хромосомным перестройкам и, тем самым, к злокачественной трансформации. При этом приобретённые и наследственные дефекты в системе

репарации ДНК могут также формировать предрасположенность к злокачественным новообразованиям [7]. Пролиферация генетически изменённых клеток с дефектами в системе репарации способствует неуклонному увеличению частоты мутаций и усиливает генетическую нестабильность клеток [8]. В нашей работе при исследовании полиморфных маркеров ключевых генов систем репарации ДНК и контроля клеточного цикла и апоптоза у здоровых доноров и больных РЯ было выявлено повышение риска развития РЯ для носителей аллеля *Arg* (*T*) маркера rs25487 гена *XRCC1* (значение ОШ=2.27 при $p=0.0001$ для образцов ткани больных РЯ; ОШ=2.20 при $p=0.00046$ для образцов крови больных РЯ). Повышение риска развития РЯ было выявлено вне зависимости от используемой модели наследования для генотипа *Arg/Arg*, или *T/T*, наибольшие результаты были получены для рецессивной модели ($OR = 3.52$, $95\% CI = 1.66-7.45$, $p = 0.0001$). Полученные данные согласуются с работой Malisic E. J. et al., показавшей, что аллель *Arg* полиморфного маркера *Gln399Arg* гена *XRCC1* ассоциирован с риском развития РЯ (ОШ=2.64, $p < 0.01$) по сравнению с аллелем *Gln* для сербской популяции [9]. Также было выявлено статистически значимое снижение риска развития РЯ при носительстве гетерозиготного генотипа *Lys/Gln* (*T/G*) маркера rs13181 гена *ERCC2* только для образцов опухолевой ткани пациентов, но не для образцов крови ($OR = 0.48$, $95\% CI = 0.29-1.75$, $p = 0.0042$) для кодоминантной модели и повышение риска для генотипа *Gln/Gln* (*T/T*) $OR = 2.43$, $CI = 0.67-2.85$, $p = 0.016$ для рецессивной модели наследования. В работе Michalska et al. сходные результаты были получены для польской популяции: генотип *Gln/Gln* был связан с повышенным риском развития РЯ ($OR = 5.01$, $p < 0.0001$), тогда как для генотипа *Lys/Gln* было выявлено снижение риска ($OR = 0.41$, $p < 0.0001$) [10].

В ходе работы также было выявлено, что носительство минорных аллелей генов контроля клеточного цикла *rs1042522 TP53*, *rs2279744 MDM2*, *rs1801270 CDKN1A* не связано с риском развития РЯ у жительниц Московского региона [11]. Для полиморфных маркеров генов *MDM2* и *CDKN1A* в научной литературе отсутствовали работы, посвященные исследованию связи маркеров с риском развития РЯ. В случае маркера *rs1042522* гена *TP53* данные были неоднозначны: при анализе распределения генотипов в индийской популяции Dholariya S. et al. установили, что носительство генотипа *Pro/Pro* полиморфного маркера *Arg72Pro* связано с повышенным риском развития РЯ (ОШ = 4.40, 95% ДИ = 1.40–13.99) [12], тогда как в мета-анализе Zhang A. et al. при исследовании выборки, состоящей в основном из европейской популяции (90.1% среди больных РЯ и 89.4% среди контрольной группы), получено, что аллель *Pro* не связан с повышенным риском развития РЯ (ОШ = 1.06, 95% ДИ = 0.93–1.20) [13]. Таким образом, выявлено, что для популяции женщин Московского региона носительство минорных аллелей изученных маркеров генов *TP53*, гена *MDM2* и гена *CDKN1A* не влияет на риск развития РЯ [11].

Связь функционально значимых полиморфных маркеров генов с риском развития определенного вида рака показывает, насколько важен данный ген для патогенеза этого заболевания. Понимание патогенеза онкологических заболеваний важно не только с фундаментальной, но и с клинической точки зрения, оно может позволить выявлять новые мишени и возможности для терапии.

Сахарный диабет типа 1 (СД1) в настоящее время относят к многофакторным, полигенным заболеваниям. Многофакторная модель наследования предполагает, что проявление болезни определяется взаимодействием средовых и генетических факторов. Под генетическими факторами при этом подразумевают

определенные аллели ряда полиморфных генов, вовлеченных в развитие СД1, которые в клинической практике получили название аллелей, предрасполагающих к развитию СД1.

К середине 90-х годов в геноме человека с использованием подхода «ген-кандидат» удалось надежно идентифицировать только два локуса, связанных с предрасположенностью к развитию СД1: локус *MHC* (главный комплекс гистосовместимости) и полиморфный тандемный повтор (*VNTR*) в 5'-нетранскрибируемой области гена инсулина (*INS*). Эти два локуса, названные *IDDM1* и *IDDM2*, соответственно, определяют около 42% семейного риска развития СД1 [14].

Для выявления других локусов, содержащих гены, предрасполагающие к СД1, разработан подход, основанный на анализе наследования аллелей полиморфных маркеров в ядерных семьях с двумя сибсами, больными СД1 (семьи с конкордантными сибсами). Наряду с анализом сцепления, для которого необходимы полные семьи с двумя сибсами, неравновесную передачу аллелей (TDT) можно анализировать и в семьях с единственным потомком. Впервые этот метод использовали для того, чтобы подтвердить сцепление области генома, включающей ген *INS*, как раз с СД1 [15].

Работы по полному геномному поиску, направленные на выявление локусов, предрасполагающих к развитию СД1 [16-18], рассмотрены достаточно подробно [14]. Все они, во-первых, подтвердили, что локус *MHC* (*IDDM1*) является главным локусом, определяющим предрасположенность к СД1, и, во-вторых, позволили обнаружить на разных хромосомах человека более 20 локусов, которые, как предполагалось, могут содержать гены, определяющие предрасположенность к СД1 [14, 16-18]. Однако не удалось получить достоверных доказательств сцепления большинства хромосомных локусов, выявленных этим методом, с СД1.

Прорыв в молекулярной генетике СД1 произошел благодаря разработке нового типа геномного поиска [19], получившего название «genome-wide association (GWA)». Этот подход основан на использовании микрочипов и позволяет в сжатые сроки определять генотипы около 500000 однонуклеотидных полиморфных маркеров, расположенных достаточно плотно на всех хромосомах человека. При этом отпадает необходимость собирать большие коллекции ядерных семей, так как в этих исследованиях используются просто большие группы больных и здоровых индивидов [19–20].

Выявление генов, предрасполагающих к развитию СД1, позволит лучше понять патогенез этого заболевания и влияние на него генетических факторов.

Для изучения ассоциации ряда полиморфных маркеров с СД1 в нашей работе использовали две группы лиц, выравненных по полу и возрасту: группу больных (366 человек) с наличием сахарного диабета типа 1 различной манифестации и контрольную группу (526 здоровых индивидов). Выборки были предоставлены сотрудниками ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России (г. Москва), этнически однородны и составлены из русских, не являющихся родственниками. В нашей работе было исследована ассоциация полиморфных маркеров генов *IL10*, *IL6* и *PTPN2* с риском развития СД типа 1.

Как уже говорилось ранее, основной причиной возникновения СД1 является органоспецифическое аутоиммунное разрушение продуцирующих инсулин β -клеток островков Лангерганса поджелудочной железы. Центральная роль при этом отводится провоспалительным цитокинам. В ряде работ показано, что провоспалительные цитокины, в том числе и интерлейкин 1 (*IL1*), являются цитотоксичными для β -клеток и участвуют в развитии эндотелиальной дисфункции, запуская локальную воспалительную реакцию в ткани поджелудочной железы,

а также каскад продукции других цитокинов, что в конечном счёте приводит к активации Т- и В-лимфоцитов. Хроническая секреция IL1 приводит к необратимому разрушению β -клеток поджелудочной железы. Именно поэтому мы исследовали ассоциацию нескольких полиморфных маркеров гена другого цитокина, обладающего противовоспалительными свойствами, а именно, интерлейкина 10 с риском развития СД1. Для полиморфных маркеров *rs1800872* и *rs3024505* гена *IL10* статистически значимых ассоциаций с риском развития СД типа 1 выявлено не было. В то же время нами выявлено статистически значимое увеличение частоты предрасполагающего генотипа *CC* полиморфного маркера *rs1800896* гена *IL10* в группе больных СД1 ($\chi^2=15.52$, $p=0,0004$). Данный полиморфный вариант *IL10* приводит к снижению синтеза цитокина, что ведет к снижению противовоспалительной активности [21–22].

Обнаружение ассоциации ассоциация гена *IL10* с СД1 привело нас к решению изучить ассоциацию гена другого цитокина, а именно, гена интерлейкина 6 (*IL6*) с риском развития СД1. Интерлейкин 6 (ген *IL6*) — представитель цитокинового семейства, который в отличие от интерлейкина 10 обладает провоспалительными свойствами. IL6 активирует эндотелиальные клетки и обеспечивает сбор лейкоцитов около стенок сосудов. Предполагается, что такая активность IL6 может приводить к постепенному разрушению β -клеток поджелудочной железы. В ряде работ было показано, что полиморфный маркер *rs1800796*, расположенный в промоторной области гена *IL6* влияет на транскрипцию гена и соответственно на экспрессию этого цитокина, что в итоге контролирует уровень циркулирующего в крови интерлейкина 6. В отношении, другого полиморфного маркера *rs1800795* (G-174C), разными авторами было показано, что у пациентов с генотипом *CC* наблюдался высокий уровень IL-6 [23–24]. В нашей работе для полиморфных марке-

ров *rs1800796*, *rs1800797* и *rs1554606* гена *IL6* статистически значимых ассоциаций с риском развития СД типа 1 выявлено не было. В то же время нами выявлено статистически значимое увеличение частоты предрасполагающего генотипа *CC* полиморфного маркера *rs1800795* гена *IL6* в группе больных СД1 по сравнению с контрольной группой ($\chi^2=9,48$, $p=0,0088$). Для данного полиморфного маркера была отмечена ассоциация с увеличенным уровнем гликированного гемоглобина, общего холестерина и холестерина низкой плотности у пациентов с СД1, что указывает на патогенную роль полиморфного *rs1800795* гена *IL6* в развитии СД1 [25].

Проведенные за последние годы полные геномные поиски с использованием микрочипов высокой плотности позволили обнаружить ассоциацию с СД1 ряда новых локусов. Однако эти данные относятся, главным образом, к больным СД1 из Великобритании [26–28]. Необходимость проведения аналогичных исследований в русской популяции не вызывает сомнений, так как известно, что вклад различных генов в формирование предрасположенности к СД1 существенно различается в разных популяциях. В 2007 г. проведены широкомасштабные исследования генетической предрасположенности к СД1 [26, 27]. В этих работах не только подтвердили ранее найденную ассоциацию полиморфного маркера *C1858T* гена *PTPN22* с СД1, но и обнаружили ассоциацию полиморфного маркера *rs2542151*, расположенного в довольно далеко (5,5 т. п. н.) от гена *PTPN2*, кодирующего тирозиновую фосфатазу Т-лимфоцитов типа 2, а также полиморфных маркеров в ряде других геномных локусов, что подтверждено в более поздних публикациях [29, 30].

Тирозиновая фосфатаза *PTPN2* кодируется геном *PTPN2*, который экспрессируется в большинстве типах тканей и его экспрессия зависит от фазы клеточного цикла и регулируется

цитокинами [31]. *PTPN2* вовлечена в ряд сигнальных путей, которые участвуют как в регуляции иммунного ответа, так и в развитии β -клеток. Ассоциацию полиморфного маркера *rs2542151*, удаленного на 5,5 т. п. н. от гена *PTPN2*, с СД1 впервые обнаружили в популяции Великобритании, при этом в данном гене обнаружен лишь один маркер, ассоциированный с заболеванием с высокой достоверностью [26]. Однако этот маркер находится за пределами гена и его функциональная значимость сомнительна. В нашей работе было исследовано пять полиморфных маркеров этого гена: *rs2542151* (первая обнаруженная ассоциация в локусе *PTPN2*), *rs3737361*, *rs2847281*, *rs547268* (характеризуют блок неравновесия по сцеплению в области гена *PTPN2*) и *rs2542156* (расположен в предполагаемом участке связывания миРНК *hsa-miR-34a*) с риском развития СД1 (Рис. 1). Для полиморфных маркеров *rs2542151*, *rs3737361*, *rs547268* и *rs2542156* гена *PTPN2* статистически значимых ассоциаций с риском развития СД1 выявлено не было. Следует отметить, что полиморфный маркер *rs2542156*, который расположен в предполагаемом сайте связывания миРНК *hsa-miR-34a*, вообще не полиморфен в русской популяции, хотя предполагалось, что именно он является этиологическим вариантом в гене *PTPN2*. Полиморфный маркер *rs2542151* также не показал ассоциации с СД1, в отличие от популяции Великобритании, что может свидетельствовать либо о недостаточном размере выборки либо, что более вероятно, о слабой силе ассоциации этого полиморфного маркера с СД1 в русской популяции.

В то же время нами выявлено статистически значимое увеличение частоты предрасполагающего генотипа *CC* полиморфного маркера *rs2847281* гена *PTPN2* в группе больных СД1 по сравнению с контрольной группой. Полиморфный маркер *rs2847281* расположен в интроне 5 гена *PTPN2* и на-

ходится в частичном неравновесии по сцеплению с *rs478582*, который в одном из исследований показал более сильную ассоциацию, чем *rs2542151* [26]. Независимое подтверждение ассоциации указывает на то, что этиологический вариант может находиться именно в этом блоке неравновесия по сцеплению и требуется дальнейшее изучение данного, по-видимому, важного гена для понимания механизмов аутоиммунных заболеваний.

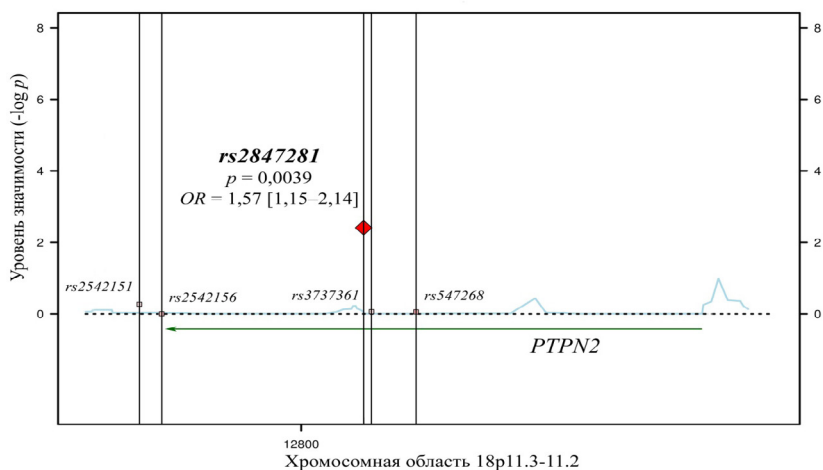


Рисунок 1. Схема расположения изученных полиморфных маркеров в хромосомной области 18p11.3-11.2.

При изучении влияния *PTPN2* на функционирование β -клеток обнаружили, что синтез *PTPN2* регулируется цитокинами IL-1 β , IFN- γ и TNF- α , а ингибирование гена *PTPN2* приводит к усилению активации STAT1 и апоптозу β -клеток, вызванному цитокинами [32]. Эти наблюдения позволяют предположить, что *PTPN2* может действовать и на уровне иммунной системы, и на уровне β -клеток, усиливая их апоптоз в условиях воспалительной реакции. Возможно, этиологический вариант

следует искать не только в экзонах и фланкирующих областях, но и в интронах гена *PTPN2*.

Таким образом, в нашем исследовании мы изучили ассоциацию полиморфных маркеров генов *IL6*, *IL10* и *PTPN2* с СД1 и было показано, что некоторые полиморфные маркеры этих генов выражено ассоциированы с СД1, что позволяет нам сделать вывод и об ассоциации этих генов с СД1.

Предиктивные маркеры эффективности терапии онкологических заболеваний

Разработка молекулярно-генетических маркеров эффективности противоопухолевой терапии позволит улучшить результат лечения и персонифицировать подход к лечению пациентов со злокачественными опухолями, в том числе женской репродуктивной системы. Рак молочной железы (РМЖ) и рак яичников (РЯ) занимают важное место в структуре онкологической заболеваемости у женщин [5]. Выработка стратегии, которая поможет увеличить эффективность лечения данных категорий больных, крайне важна. РМЖ является самым частым онкологическим заболеванием среди женщин. Наиболее агрессивный подтип РМЖ — тройной негативный вариант (ТНРМЖ), при котором отсутствуют известные мишени для таргетной терапии [33,34], и ведущим методом лечения остается химиотерапия (ХТ), в том числе с включением производных платины [35–38]. Также, производные платины являются основным химиотерапевтическим препаратом при лечении РЯ [39]. При этом РЯ относится к онкологическим заболеваниям, для которых характерна низкая выживаемость [40]. Выявление взаимосвязей между молекулярно-генетическими маркерами и эффективностью платиносодержащей ХТ может помочь сформировать крите-

рии отбора больных для назначения платиносодержащей ХТ и расшифровать механизм устойчивости к препаратам этой группы, что является актуальной задачей, направленной на улучшение непосредственных и отдаленных результатов лечения больных ТНРМЖ и РЯ и уменьшение токсичности терапии.

Механизм действия ХТ на основе препаратов платины заключается в формировании внутри- и межцепочечных сшивок в ДНК клетки, задержке клеточного цикла и инициации апоптоза опухолевой клетки [41]. Гены системы репарации ДНК являются ключевыми в ответе на платиносодержащую ХТ. Наиболее важными изученными нарушениями в случае РЯ и РМЖ является носительство мутации в генах *BRCA1* и/или *BRCA2*. Они наблюдаются в 20% случаев РЯ и 10% случаев РМЖ, характерны для наследственного варианта заболевания, но могут также быть спорадическими. Гены *BRCA1/2* являются генами-онкосупрессорами, они играют ключевую роль в системе репарации ДНК методом гомологичной рекомбинации. Опухоль, развивающаяся у носителей мутаций в гене *BRCA1/2*, имеет высокую чувствительность к широкому спектру современных химиопрепаратов, в частности препаратам платины, и лучший ответ на неоадъювантную ХТ в целом [42,43]. Применение препаратов платины при ТНРМЖ обеспечивает высокую частоту полных патоморфологических регрессий (суррогатного маркера эффективности ХТ) как у больных *BRCA*-ассоциированным, так и у больных спорадическим вариантом заболевания [35,44].

Ответ на платиносодержащую ХТ может быть также обусловлен активностью других систем репарации ДНК, в частности, системы эксцизионной репарации оснований (BER) или нуклеотидов (NER). Интегральным белком BER, координирующим сборку всего белкового комплекса репарации, является

XRCC1, который кодируется геном *XRCC1* [45,46]. Экспрессия гена *XRCC1* играет важную роль в качестве маркера состояния системы репарации BER и уровня повреждений опухолевых клеток при ТНРМЖ [47], а также имеет прогностическое значение для клинического ответа опухоли [48]. Функция белка XRCC1 не ограничивается системой репарации путем BER, он также участвует в репарации односторонних разрывов ДНК (SSBR). Помимо этого, белок XRCC1 входит в систему репарации двусторонних разрывов путем соединения нехомологичных концов (NHEJ), взаимодействуя с PARP1, а также в систему эксцизионной репарации путем NER [45,49]. Дефицит XRCC1 вызывает накопление мутаций вследствие нерепарированных разрывов ДНК, а также вызывает геномный стресс [50]. Связь полиморфного маркера *rs25487* гена *XRCC1* с эффективностью платиносодержащей ХТ была показана в работах на ряде видов рака [51–53].

В нашей работе была выявлена связь полиморфного маркера *rs25487* гена *XRCC1*, метилирования промотора и мутации *5382insC* гена *BRCA1* с безрецидивной выживаемостью (БРВ) при РЯ [54]. Обнаружено увеличение медианы времени без прогрессирования при носительстве аллеля *C* ($p=0.025$) и генотипа *C/C* ($p=0.022$) *rs25487 XRCC1* в период наблюдения до 19 месяцев от окончания ХТ и тенденция к значимости в течение периода наблюдения ($p=0.08$) (Рис. 1). В подгруппе носителей генотипа *C/C* мутации *5382 insC BRCA1* не было выявлено ни одного рецидива, в то время как среди больных без носительства этой мутации рецидив заболевания выявлен в 35% случаев ($p=0.035$). Среди 21% больных с инактивацией функции гена *BRCA1* метилированием промотора или наличием генотипа *C/C 5382 insC* выявлен один рецидив (1,5%) ($p=0.033$).

В случае ТНРМЖ выявлено снижение медианы БРВ у носителей аллеля *T* и, в особенности, генотипа *T/T* вне зависимости

от наличия мутации в генах *BRCA1/2* (Рис. 1). Отсутствие связи со статусом мутации в генах *BRCA1/2* согласуется с рядом исследований, не выявивших достоверных различий в частоте полных патоморфологических регрессий РМЖ (суррогатного маркера увеличения БРВ) при сравнении носителей наследственной мутации гена *BRCA1* с больными без мутаций в этом гене [34,36,42,55]. Результаты, получены нами в исследовании БРВ согласуются с результатами упомянутой выше работы по изучению связи этого маркера гена *XRCC1* с эффективностью платиносодержащей ХТ при РЯ, где было выявлено уменьшение времени без прогрессирования при носительстве аллеля *T* ($p = 0.025$) [54].

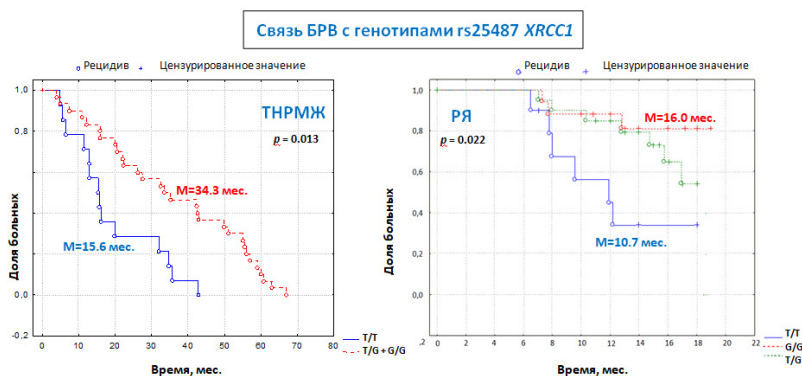


Рисунок 2. Связь безрецидивной выживаемости с генотипами маркера rs25487 гена *XRCC1*.

Также в нашей работе была обнаружена связь полиморфного маркера гена *XRCC1* с ОВ больных ТМРМЖ. Это может быть связано с фактом, что поддержание целостности и выживаемость клеток, дефицитных по гену *XRCC1*, в большой степени зависят от путей репарации двунитевых разрывов. При использовании ингибиторов ATM и DNA-ПКс, которые отвечают за репарацию двунитевых разрывов ДНК, в дефицитных по *XRCC1*

клетках РМЖ была выявлена индукция синтетической летальности за счет накопления двунитевых разрывов ДНК, которые приводили к аресту клеточного цикла в G2-M-фазе и инициации апоптоза [50,56]. В целом, полученные данные позволяют сделать вывод о важной роли изученного маркера гена *XRCC1* в ответе на платиносодержащую ХТ.

Ген *ERCC5* кодирует один из ключевых ферментов системы репарации ДНК путем NER. При изучении полиморфного маркера rs17655 гена *ERCC5* нами были получены достоверные различия в БРВ у больных ТНРМЖ. При этом медиана БРВ составляла 20.0 мес. для носителей минорного аллеля С и 35.2 мес. при отсутствии этого аллеля ($p = 0.035$). Эта зависимость сильнее проявлялась для минорной гомозиготы маркера гена *ERCC5*, медиана БРВ для больных с генотипом С/С составляла 15.9 мес. тогда как для двух других генотипов — 33.6 мес., $p = 0.039$). Полиморфный маркер rs17655 находится на С-конце белка, который взаимодействует с фактором транскрипции TFIIN при сборке белкового комплекса репарации [57,58]. Замена аминокислоты в этой позиции белка влияет на эффективность сборки комплекса с TFIIN и, следовательно, всей системы NER.

В ответе на цитотоксическую терапию также важно состояние системы контроля клеточного цикла, которое влияет и на запуск репаративных процессов в клетке. При попадании в клетку цитотоксичных агентов, в частности препаратов платины, происходит активация этой системы и остановка клеточного цикла в сверхочных точках. Показано, что цисплатин вызывает повышение уровня основных белков клеточного цикла: p53, mdm2 и p21, которые отвечают за прохождение клетки сверхочных точек. В результате поврежденные клетки останавливаются в соответствующих фазах клеточного цикла для репарации ДНК или инициации апоптоза. В то же вре-

мя в резистентных к цисплатину клетках РЯ и рака легкого не происходит ареста клеточного цикла и апоптоза [59,60]. Существует ряд работ, связывающих изменения в генах регуляции клеточного цикла с эффективностью терапии препаратами платины, значительная часть которых проведена для немелкоклеточного рака легкого, в терапии которого часто используются препараты платины. Однако для РЯ и ТНРМЖ также проводились подобные исследования, но в гораздо меньшем объеме.

В нашем исследовании при РЯ была выявлена связь с БРВ для маркеров генов *CDKN1A* ($p=0.01$) и *TP53* ($p=0.04$) в подгруппе с полной или оптимальной циторедуктивной операцией. Эта подгруппа была выделена, так как максимальный объем хирургического лечения является одним из важнейших факторов благоприятного прогноза при РЯ. В литературе отсутствуют данные об исследовании связи изученных маркеров с длительностью ВБП в зависимости от типа проведенной операции.

Для больных ТНРМЖ носительство аллеля *A* полиморфного маркера rs1801270 гена *CDKN1A* было связано с уменьшением БРВ в период от 15 до 60 месяцев наблюдения. Данный маркер гена *CDKN1A* характеризуется значимо сниженной экспрессией белкового продукта гена при носительстве минорного аллеля *A* (замене аминокислоты на *Arg*) [61]. При этом показано, что резистентность к препаратам платины может быть связана не только с повышенной экспрессией белка p21 [62–64], но и со снижением его экспрессии [65,66], в чем проявляется двойственность свойств этого белка, проявляющего одновременно качества гена супрессора опухоли и онкогена [67]. Таким образом, носительство минорного аллеля *A*, вызывая понижение экспрессии белка p21, оказывает влияние на формирование резистентности опухолевых клеток к действию платино-содержащей ХТ.

Перспективы развития исследования молекулярно-генетических маркеров при онкологических заболеваниях

Полиморфные маркеры генов могут быть перспективными для индивидуализации лечения беременных женщин с онкологическими заболеваниями. В имеющейся научной литературе большинство работ, посвященных онкологическим заболеваниям в период беременности, представляют собой описание единичного клинического случая или серии случаев. Остаются дискуссионными вопросы сохранения беременности у онкологических больных и тактики лечения у таких пациенток. Накопленный клинический опыт влияния проведения ХТ у беременных с онкологическими заболеваниями не дает полного представления о воздействии ХТ на организм матери и плода. Все это говорит о необходимости разработки новых методов прогнозирования ответа на лечение и оценки статуса плода у женщин, получающих ХТ во время беременности. Более удобны для исследования беременных у женщин фармакогенетические маркеры, которые неизменны в течение всей беременности, так как организм женщины в ходе развития плода претерпевает значительные метаболические изменения; иметь уже известную или предполагаемую на основе известных молекулярных путей связь с ответом на ХТ определенной группой препаратов и/или при конкретной локализации опухоли; учитывать планцентарный транспорт и ферментативный состав плацентарного барьера для предсказания риска токсического действия лекарственных веществ на плод. В этой связи полиморфные маркеры генов максимально соответствуют данным требованиям. Нами проводится исследование связи ряда полиморфных маркеров генов репарации ДНК, контроля клеточного цикла и транспортных белков с ответом на лечение рака у беременных

женщин. По предварительным результатам выявлена связь маркеров генов, кодирующих транспортные белки семейства ABC и контроля клеточного цикла с клиническим ответом и степенью патоморфоза опухоли при использовании цитотоксической ХТ. Также перспективными являются исследования изменения экспрессии генов транспортных белков и генов биотрансформации ксенобиотиков в крови и плаценте беременных женщин с онкологическими заболеваниями и связи с эффективностью ХТ и акушерскими параметрами, такими как масса плаценты, новорожденного и др.

Одно из активно развивающихся и крайне перспективных направлений исследований в области поиска молекулярно-генетических маркеров эффективности лечения рака — исследование циркулирующей опухолевой ДНК (цоДНК). цоДНК представляет собой один из вариантов жидкостной биопсии, при этом она характеризуется наличием генетических изменений (мутаций, изменений в метилировании генов, в количестве их копий и др.), идентичных тем, которые содержит опухолевая ткань. Результаты ряда клинических исследований показали, что цоДНК может играть роль в выявлении минимальной резидуальной болезни и возникающей резистентности к терапии при РМЖ на ранней стадии [68,69], а также в мониторинге прогрессирования заболевания у пациентов с распространенным РМЖ [70,71]. Основные преимущества анализа цоДНК заключаются в его высокой специфичности, корреляции с опухолевой нагрузкой, включая метастатический процесс, с ответом на лечение, а также в наибольшей репрезентативности исследуемого материала, который максимально отражает гетерогенность опухолевой ткани, а также ее изменения в процессе лечения и прогрессии.

Значительное количество пациенток получают неoadъювантную лекарственную терапию, от эффективности которой

во многом зависит необходимость и объем постнеоадьювантного лекарственного лечения. Как известно, достижение полного лекарственного патоморфоза является важным прогностическим признаком и ассоциируется с увеличением общей и безрецидивной выживаемости. При достижении полной патоморфологической регрессии выживаемость больных ТНРМЖ практически соответствует выживаемости при других благоприятным подтипах. В последние годы появляются данные о том, что более чувствительным методом оценки эффекта неоадьювантной лекарственной терапии может быть определение в крови цоДНК. Создание и внедрение надежного маркера, отражающего полный лекарственный патоморфоз опухоли, может стать дополнительным инструментом индивидуализации терапии. Кроме того, крайне интересным современным направлением в лечении раннего РМЖ является изучение возможности отказа от хирургического лечения в случае достижения полного патоморфоза; в подобных исследованиях для подтверждения полного патоморфоза используется биопсия ткани опухоли, однако, этот метод не позволяет изучить всю массу опухоли. Изучение концентрации и характеристик цоДНК в таких ситуациях может быть более информативным, так как отражает молекулярные изменения в опухоли в режиме реального времени. Нами проводится изучение динамики концентрации цоДНК крови больных ТНРМЖ в процессе неоадьювантной лекарственной терапии в качестве суррогатного маркера выраженности лекарственного патоморфоза опухоли и фактора прогноза эффективности терапии. В настоящее время отработан протокол проведения количественного анализа цоДНК у пациентов с ТНРМЖ на примере клинического случая, получены количественные результаты определения цоДНК в плазме в динамике. Сопоставление с ответом на лечение согласуется с литературны-

ми данными о низком уровне цоДНК у больных с полной патоморфологической регрессией опухоли [72].

Прикладное направление исследований в области молекулярно-генетических диагностических маркеров — разработка нового метода молекулярного профилирования РМЖ на основе быстрого анализа транскриптов основных маркеров — рецепторов стероидных гормонов (эстрогена и прогестерона), рецептора эпидермального фактора роста HER2 и маркера пролиферации Ki67. В настоящее время определение этих маркеров и молекулярно-биологического подтипа опухоли показано всем без исключения больным с диагнозом РМЖ на стадии планирования лечения. Анализ данных маркеров является важнейшим этапом в оптимизации выбора терапии при РМЖ. Определение молекулярно-биологических маркеров (транскриптов) рецептора эстрогена, рецептора прогестерона, HER2 и Ki67 с помощью современных методов, например, с применением детекции на основе электрохимии, перспективно в качестве аналога рутинного иммуногистохимического метода. Развитие этого подхода может стать серьезным продвижением для улучшения диагностических возможностей здравоохранения. В ИБХФ РАН проводятся работы, направленные на создание системы для определения маркерных транскриптов РМЖ в образце биопсийного материала с целью последующей разработки системы анализа с использованием электрохимической детекции сигнала.

Таким образом, исследование молекулярно-генетических маркеров при социально значимых заболеваниях человека важно как для понимания патогенеза заболевания, так и для использования в качестве предиктивных и прогностических маркеров с целью улучшения результатов лечения больных.

Ссылки

1. M. Carbone et al. *Nat. Rev. Cancer*. **2020**, 20(9), 533–549.
2. L. Weng, L. Zhang, Y. Peng, R. S. Huang, *Pharmacogenomics*. **2013**, 14(3), 315–324.
3. И. И. Дедов, М. В. Шестакова, *Сахарный диабет. Руководство для врачей*. 2003, М.: ИКЦ «Универсум Паблишинг».
4. Diabetes Epidemiology Research International Group, *Diabetes*. **1988**, 37, 1113–1119.
5. F. Bray, M. Laversanne, H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, I. Soerjomataram, & A. Jemal, *CA: a cancer journal for clinicians* **2024**, 74(3), 229–263.
6. R. Yoshida *Breast Cancer* **2021**, 28 (6) 1167–1180.
7. B. Pardo, B. Gomez-Gonzalez, A. Aguilera, *Cell. Mol. Life Sci.* **2009**, 66, 1039–1056.
8. S. P. Jackson, J. Bartek, *Nature* **2009**, 461, 1071–1078.
9. E. J. Malisic, A. M. Krivokuca et al., *Cancer Biomarkers* **2015**, 15, 685–691.
10. M. M. Michalska, D. Samulak et al., *Advances in Medicine* **2015**, 2015, 1–7.
11. П. К. Бреннер, М. А. Капралова, Д. С. Ходырев, С. В. Хохлова, Г. Н. Хабас, А. В. Асатунова, Ю. В. Носова, Л. Н. Каюмова, Т. М. Заварыкина, *Генетика*, **2022**, 58(9), 1094–1098.
12. Dholariya S., Mir R. et al. *Clin. Transl. Oncol.* **2016**, 18 (1), 73–81.
13. Zhang A. et al. *Oncotarget* **2017**, 8(68), 112761–112769.
14. В. В. Носиков, *Генетика сахарного диабета типа 1. В «Геномика — медицине»*. 2005, М.: ИКЦ «Академкнига», с. 281–311.
15. R. S. Spielman, R. E. McGinnis, W. J. Ewens, *Am. J. Hum. Genet.* **1993**, 52, 506–516.
16. J. L. Davies, Y. Kawaguchi, S. T. Bennett, et al., *Nature*. **1994**, 371, 130–136.

17. C. A. Mein, L. Esposito, M. G. Dunn, et al., *Nat. Genet.* **1998**, 19, 297-300.
18. P. Concannon, K. J. Gogolin-Ewens, D. A. Hinds et al., *Nat. Genet.* **1998**, 19, 292-296.
19. Wellcome Trust Case Control Consortium, *Nature.* **2007**, 447, 661-678.
20. J. A. Todd, N. M. Walker, J. D. Cooper et al., *Nat. Genet.* **2007**, 39, 857-864.
21. R. Posadas-Sánchez, J. Angeles-Martínez, N. Pérez-Hernández et al., *Cytokine.* **2018**, 106, 12-18.
22. P. Gao, Y. Uzun, B. He et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2019**, 116(15), 7581-7590.
23. E. M. Godarzi, E. K. Sarvestani, E. Aflaki, Z. Amirghofran, *Clin. Rheumatol.*, **2011**, 30(2), 179-184.
24. L. Giannitrapani, M. Soresi, D. Balasus, et al., *World J. Gastroenterol.*, **2013**, 19(16), 2449-2455.
25. G. Jr. Rudofsky, A. Schlotterer, P. Reismann et al., *Horm. Metab. Res.*, **2009**, 41(4), 308-313.
26. J. A. Todd, N. M. Walker, J. D. Cooper et al., *Nat. Genet.* **2007**, 39, 857-864.
27. WTCCC. *Nature.* **2007**, 447, 661-678.
28. A. Vella, J. D. Cooper, C. E. Lowe et al. *Am. J. Hum. Genet.*, **2005**, 76, 773-779.
29. J. C. Barrett, D. G. Clayton, P. Concannon et al., *Nat. Genet.*, **2009**, 41, 703-707.
30. J. D. Cooper, D. J. Smyth, A. M. Smiles. et al., *Nat. Genet.* **2008**, 40, 1399-1401.
31. P. D. Simoncic, C. J. McGlade, M. L. Tremblay, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **2006**, 84(7), 667-675.
32. D. J. Smyth, J. D. Cooper, R. Bailey et al., *Nat. Genet.* **2006**, 38, 617-619.

33. Д. А. Морозов, И. В. Колядина, И. П. Ганьшина и др., *Злокачественные опухоли* **2021**, 11(4), 5-13.
34. О. О. Гордеева, И. В. Колядина, Л. Г. Жукова и др., *Современная онкология* **2019**, 21(3), 46-51.
35. О. О. Гордеева, И. В. Колядина, Л. Г. Жукова и др., *Современная онкология* **2019**, 21(3), 46-51.
36. О. О. Гордеева, И. В. Колядина, Л. Г. Жукова и др., *Опухоли женской репродуктивной системы* **2020**, 16(2), 25-37.
37. И. В. Колядина, И. В. Поддубная, О. А. Павликова и др., *Современная онкология*, **2017**, 19(1), 9-16.
38. И. В. Колядина, *Опухоли женской репродуктивной системы*, **2021**, 17(3), 59-68
39. Тюляндина А. С., Коломиец Л. А., Морхов К. Ю., Нечушкина В. М., Покатаев И. А., Румянцев А. А. и соавт., *Злокачественные опухоли: Практические рекомендации RUSSCO #3s2*, **2022**, 12, 198-211.
40. R. Siegel et al., *CA Cancer J. Clin.* **2013**, 63, 11-30.
41. Д. Б. Корман, Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов. 2014, М.: Практическая медицина, 336 с.
42. M. Wunderle, P. Gass, L. Häberle et al., *Breast Cancer Res. Treat.* **2018**, 171, 85-94.
43. A. Tutt, H. Tovey, M.C.U. Cheang et al., *Nat. Med.* **2018**, 24(5), 628-637.
44. P. Sharma, Sh. R. Stecklein, B. F. Kimler et al., *ASCO Meeting Abstracts*, **2014**, 32(15), 1022.
45. K. Kudo, E. Gavin, S. Das et al., *Oncogene* **2012**, 31, 4718-4724.
46. G. Wright, M. Sonavane, N. R. Gassman, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22(11), 5475.
47. K. J. Lee, C. G. Pielt, J. F. Andrews et al., *PLoS One* **2019**, 10(14), e0223725.

48. M. A. Tarek, A. Fatah, A. Arora et al., *Oncotarget* **2015**, 26(6), 21964–21978.
49. G. Wright, M. Sonavane, N. R. Gassman, *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22(11), 5475.
50. Gee M. E., Faraahi Z., McCormick A. et al., *J. Ovarian Res.* **2018**, 11, 50.
51. R. D. Francia, L. D. Lucia, M. D. Paolo et al., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2015**, 22(19), 4443–4445.
52. M. U. Bushra, S. F. Rivu, A. E. Sifat et al., *Mol. Biol. Rep.* **2020**, 47(9), 7073–7082.
53. N. Zhang, Y. Ouyang, J. Chang et al., *Biomed. Res. Int.* **2020**, 22, 3520764.
54. Т. М. Заварыкина, С. В. Хохлова, А. С. Тюляндина и др., *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* **2021**, 171(6), 745–750.
55. E. Hahnen, B. Lederer, J. Hauke et al., *JAMA Oncol.* **2017**, 3, 1378–1385.
56. R. Sultana, T. Abdel-Fatah, R. Abbotts et al., *Cancer Res.* **2012**, 73(5), 1621–34.
57. A. F. Fagbemi, B. Orelli, O. D. Scharer, *DNA Repair (Amst.)* **2011**, 10(7), 722–729.
58. S. Ito, I. Kuraoka, P. Chymkowitch et al., *Mol. Cell* **2007**, 26, 231–43.
59. B. H. Sørensen, D. Nielsen, U. A. Thorsteinsdottir et al., *American journal of physiology, Cell physiology*, **2016**, 310(11), C857–C873.
60. N. Sarin, F. Engel, G. V. Kalayda et al., *PloS One* **2017**, 12(7), e0181081.
61. L. Su, Y. Sai, R. Fan et al., *Lung Cancer* **2003**, 40(3), 259–266.
62. E. Korobeinikova, R. Ugenskiene, R. Insodaite et al., *Int. J. Biol. Markers* **2021**, 36(2), 14–21.

63. A. Zamagni, A. Pasini, F. Pirini et al., *Int. J. Oncol.* **2020**, 56(6), 1574–1584.
64. R. Koster, A. di Pietro, H. Timmer-Bosscha, J. H. Gibcus et al., *J. Clin. Invest.* **2010**, 120(10), 3594–3605.
65. N. Sarin, F. Engel, G. V. Kalayda et al., *PloS One* **2017**, 12(7), e0181081.
66. G. Li, Z. Liu, E. M. Sturgis, Q. Shi et al., *Carcinogenesis* **2005**, 26(9), 1596–1602.
67. I. B. Roninson, *Cancer Letters* **2002**, 179(1), 1–14.
68. T. M. Zavarykina, P. K. Lomskova, I. V. Pronina, S. V. Khokhlova, M. B. Stenina, G. T. Sukhikh, *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 17073.
69. Y. H. Chen, B. A. Hancock, J. P. Solzak et al., *NPJ Breast Cancer* **2017**, 3, 24.
70. I. Garcia-Murillas, N. Chopra, I. Comino-Mendez et al., *JAMA Oncol.* **2019**, 5(10), 1473–1478.
71. M. Murtaza, S. J. Dawson, K. Pogrebniak et al., *Nat. Commun.* **2015**, 6, 8760.
72. П. К. Ломскова, О. А. Розанова, М. А. Капралова, И. В. Пронина, М. Б. Стенина, С. В. Хохлова, Т. М. Заварыкина, XXIII Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы «БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА» 20–22 ноября 2023 г.

12. ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОРАЗМЕРНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Е. Д. Никольская¹, Н. Г. Яббаров¹, М. Б. Сокол¹

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

Онкологические заболевания являются социально значимыми и поскольку представляют серьезную угрозу для здоровья людей во всем мире, что связано как с высокой распространенностью данного типа заболевания, так и недостаточной эффективностью существующих терапевтических схем лечения. Возникновение злокачественных опухолей связано с различными факторами и путями, которые, в итоге, влияют на клеточный цикл и способствуют неконтролируемому росту и делению клеток.

Создание новых систем доставки лекарственных веществ, а также применение альтернативных видов лечения является перспективным подходом для увеличения эффективности химиотерапии [1, 3–5]. Системы доставки в виде наночастиц обладают большим потенциалом в медицине и фармакологии. Наночастицы могут быть использованы для доставки лекарственных препаратов и других биологически активных веществ к определенным местам в организме. Одним из наиболее перспективных типов наночастиц являются полимерные наночастицы. Частицы обладают высокой стабильностью и биосовместимостью, что делает их безопасными для использования в медицине. Кроме того, полимерные наночастицы могут быть функционализированы векторными молекулами для адресной доставки препаратов. Этот подход позволяет доставлять лекарственные препараты непосредственно к злокачественным новообразованиям, минуя здоровые ткани, что

повышает эффективность лечения и снижает побочные эффекты.

Наночносители могут избирательно доставлять лекарственные препараты в опухолевые ткани, обладая при этом контролируемой скоростью высвобождения активного компонента, поддерживая концентрацию действующего вещества на необходимом терапевтическом уровне. Полимерные наночастицы являются потенциальным перспективным средством доставки для повышения эффективности существующих противоопухолевых препаратов, а также снижения неспецифической токсичности. Создание наноразмерных систем доставки лекарственных веществ — перспективное направление для получения новых препаратов направленного действия с улучшенным профилем безопасности и эффективностью действия.

Поли(молочная-со-гликолевая кислота) — PLGA (ПЛГА), является одним из наиболее хорошо охарактеризованных биоразлагаемых сополимеров, который деградирует на нетоксичные продукты (H_2O и CO_2). Полимер разлагается *in vivo* путем гидролиза сложноэфирных связей до его мономерных единиц (лактат и гликолят). В то время как D-лактат не подвергается дальнейшему метаболизму перед экскрецией, L-лактат превращается в CO_2 , который выводится через легкие и превращается в пируват, который входит в цикл Кребса. Гликолят, с другой стороны, либо выводится непосредственно через почечную систему, либо может окисляться до глиоксилата, который впоследствии далее превращается в глицин, серин и пируват. Последний снова может вступать в цикл Кребса и метаболизироваться до CO_2 и H_2O . Благодаря биосовместимости и биodeградируемости PLGA оказался потенциальным и многообещающим полимером для создания систем доставки лекарственных препаратов, в том числе и наночастиц.

На Рис. 1 представлена схема получения полимерных наночастиц из PLGA с помощью метода одинарных эмульсий.

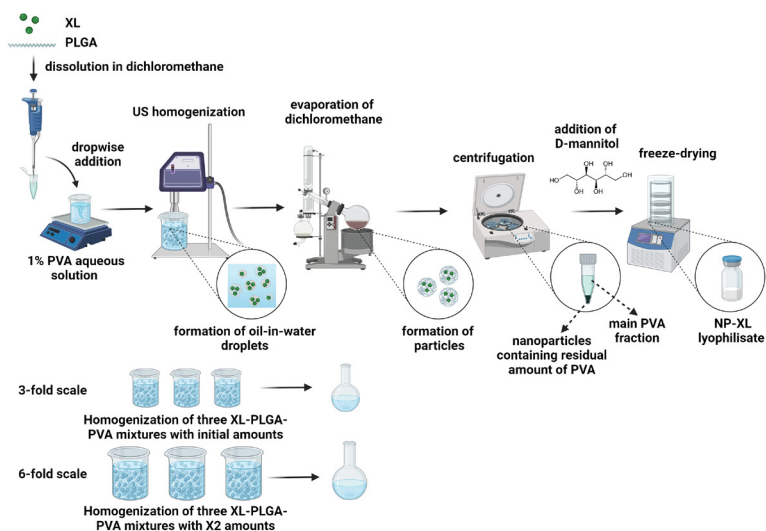


Рисунок 1. Схема получения полимерных наночастиц (на примере наночастиц, содержащих производное хлорина е6 (XL)), с помощью метода одинарного эмульгирования (рисунок из статьи [1]).

Ниже будут представлены результаты, демонстрирующие эффективность применения полимерных наночастиц для терапии онкологических заболеваний.

Получение полимерных наночастиц, содержащих паклитаксел, адресного действия и исследование их биологической активности для лечения солидных опухолей

Серьезные побочные эффекты, вызываемые составом лекарственной формы паклитаксела, представленной на фармацевтическом рынке, обусловлены содержанием токсичного солюбилизатора Cremophor® EL, а его неспецифическое накопление значительно ограничивают клиническое применение паклитаксела. Разработка новой лекарственной формы паклитаксела — наночастиц из сополимера молочной

и гликолевой кислот (PLGA), конъюгированных с векторной молекулой — третьим доменом альфа-фетопротеина (rAFP3d-NP), для повышения профиля безопасности паклитаксела позволило бы решить ряд недостатков уже известных лекарственных форм.

rAFP3d является функциональным и рецептор-связывающим (третьим) доменом альфа-фетопротеина (АФП). АФП является онкофетальным белком, экспрессирующимся во время эмбрионального развития организма. Во взрослом возрасте увеличение уровня АФП в организме свидетельствует о наличии онкологического заболевания, в связи с чем его используют в качестве онкомаркера. Известно, что на поверхности большого количества опухолевых клеток расположены рецепторы АФП, что позволяет применять как полноразмерный белок (АФП), так и его функциональные фрагменты для адресной доставки препаратов [2–3].

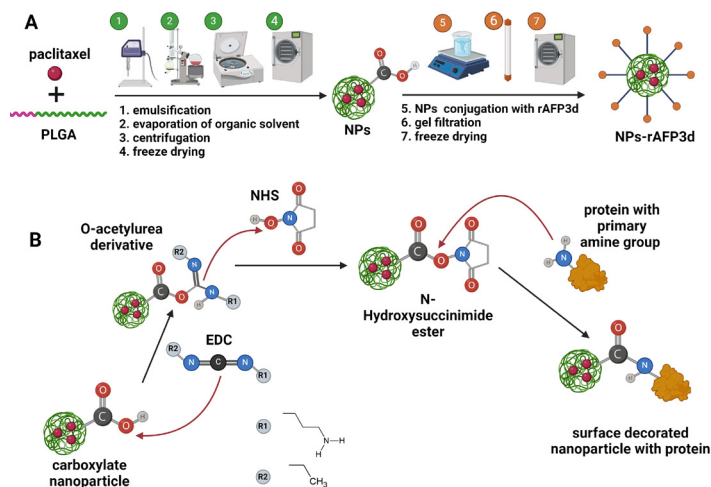


Рисунок 2. Технологическая схема синтеза конъюгата rAFP3d-NP (А). (Б) Механизм реакции конъюгации наночастиц PLGA с rAFP3d с помощью карбодиимидного метода (рисунок из статьи [3]).

Синтезированные полимерные наночастицы (NP), содержащие паклитаксел, характеризовались высоким содержанием паклитаксела — 5%масс. и размером не более 280 нм. Конъюгат наночастиц с белковой векторной молекулой — рекомбинантным третьим доменом альфа-фетопротейна (rAFP3d), был получен с помощью карбодиимидного метода (Рис. 2). Исследование кинетики высвобождения из наночастиц показало наличие двухфазного профиля с 67%-м высвобождением паклитаксела в течение 220 ч.

Увеличение площади под кривой при исследовании биораспределения и времени полувыведения после введения rAFP3d-NP подтвердило длительную циркуляцию в крови по сравнению с субстанцией паклитаксела (Рис. 3). Конъюгат rAFP3d-NP продемонстрировал значительное ингибирование роста опухоли на моделях линии 4T1 (аденокарцинома молочной железы мыши) и SKOV-3 (аденокарцинома яичника человека) (Рис. 3).

Таким образом, было доказано, что синтезированный конъюгат — rAFP3d-NP, является перспективной системой доставки паклитаксела и может быть использован для эффективной доставки других гидрофобных препаратов в опухолевые клетки и ткани.

Получение новых структурных производных карбоплатина для оптимизации инкапсуляции и противоопухолевой эффективности в составе наночастиц PLGA

В настоящее время молекулярное моделирование широко применяется для прогнозирования взаимодействия лекарств и полимеров, а также для оптимизации метода получения новых систем доставки лекарственных соединений. Выполненное исследование описывает сочетание подходов *in silico* и *in vitro*, направленных на улучшение дизайна полимерных наночастиц для лечения онкологических заболеваний. Был применен сервис PASS для прогнозирования биологической активности новых производных карбоплатина (Кпт).

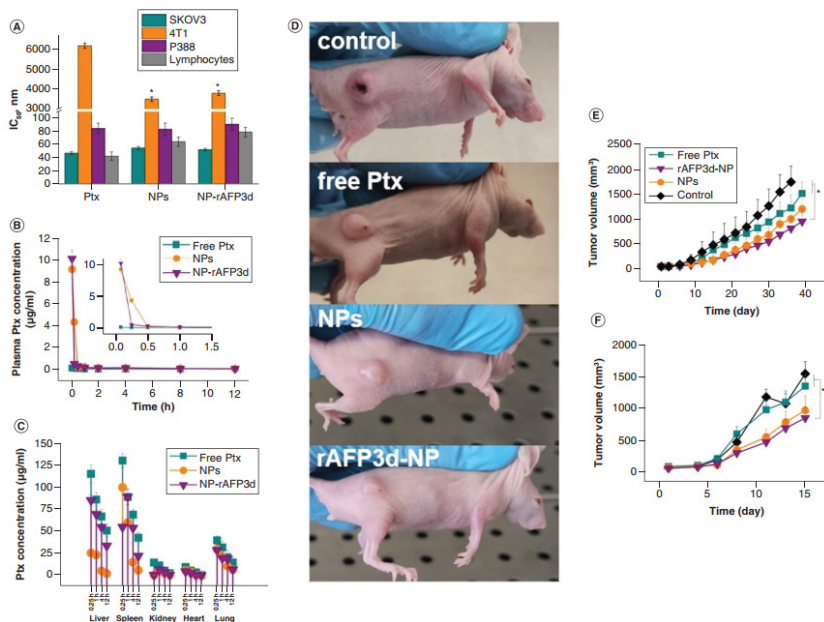
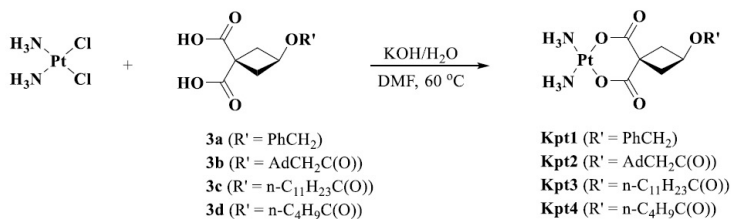


Рисунок 3. (A) Выживаемость клеток линий 4T1, SKOV-3, P388 (лимфолейкоза мыши) и лимфоцитов человека после 72 ч инкубации с паклитакселом (Ptx), наночастицами, содержащими паклитаксел (NPs) и конъюгатом (rAFP3d-NP). (B) Исследование фармакокинетики в плазме крови кролика после введения Ptx, NPs и rAFP3d-NP в дозе, равной 1.2 мг/кг по Ptx. (C) Биораспределение паклитаксела по органам после введения Ptx, NPs и rAFP3d-NP в дозе, равной 1.2 мг/кг по Ptx. (D) Изображение торможения роста опухоли линии SKOV-3 у мышей Nude BALB/c в последний день проведения эксперимента. Противоопухолевая эффективность (торможение роста опухоли) у мышей после лечения Ptx, NPs или rAFP3d-NP при внутривенном введении (в дозе, равной 0.046 мг/кг по Ptx) в отношении моделей (E) SKOV-3 и (F) 4T1 *in vivo* (рисунок из статьи [3]).

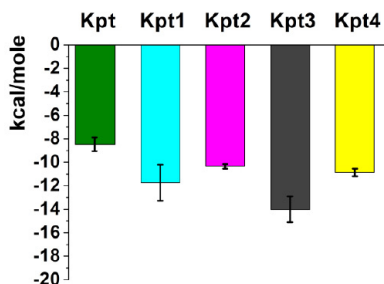
Молекулярное моделирование выявило зависимость между энергией связывания соединений с полимером (ПЛГА), химической структурой производных платины (Pt), эффективностью их инкапсуляции в полученных наночастицах и профилем высвобождения препаратов из наночастиц (Рис. 4). Эффектив-

ность инкапсуляции производных Pt коррелировала с результатами моделирования *in silico* [4].

Синтез новых производных карбоплатина Kpt1-4



Энергия связывания производных карбоплатина с полимером (ПЛГА)



3D моделирование взаимодействия производных карбоплатина с полимером ПЛГА

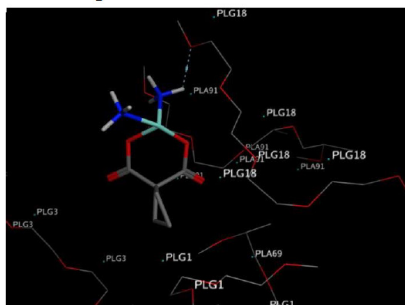


Рисунок 4. Рисунок, изображающий схему синтеза новых производных карбоплатина (Kpt1- Kpt4); рассчитанную энергию связывания производных с полимером (ПЛГА); 3D моделирование взаимодействия карбоплатина с полимером (ПЛГА) (рисунок адаптирован из статьи [4]).

Полученные наночастицы PLGA (Kpt-NP — Kpt4-NP) проявили более высокий уровень цитотоксической активности в отношении клеток немелкоклеточной карциномы легкого человека линии A549 по сравнению с неинкапсулированными производными карбоплатина со значениями IC₅₀ (концентрация, при которой наблюдается гибель 50% клеток): 1.40–23.20 мкМ

и 7.32–79.30 мкМ, соответственно (Рис. 5). Аналогичные профили цитотоксичности и отличия между наночастицами и свободными субстанциями наблюдались и в отношении клеток линий H69 (мелкоклеточная карцинома легкого человека) и MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека).

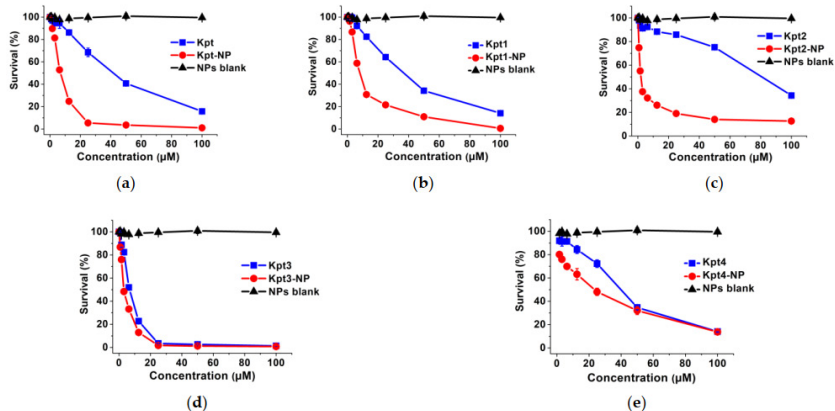


Рисунок 5. Кривые выживаемости клеток линии A549 после инкубации в течение 72 ч с: (a) Kpt и Kpt-NP; (b) Kpt1 и Kpt1-NP; (c) Kpt2 и Kpt2-NP; (d) Kpt3 и Kpt3-NP; (e) Kpt4 и Kpt4-NP (рисунок из статьи [4]).

Таким образом, синтезированные наночастицы продемонстрировали высокий потенциал, а полученные результаты — применимость комбинации методов *in silico* и *in vitro* для оптимизации инкапсуляции препаратов при синтезе наночастиц и прогнозирования противоопухолевой эффективности новых аналогов лекарственных препаратов и их полимерных систем доставки.

Получение полимерной формы нового фотосенсибилизатора на основе эфира феофорбида а-17 триэтиленгликоля и исследование его противоопухолевой активности

Целью разработки полимерной формы нового фотосенсибилизатора — производного хлорина еб, является повышение его

биодоступности и безопасности для возможности применения *in vitro* и *in vivo* и дальнейшего потенциального использования в качестве оригинального противоопухолевого препарата для фотодинамической терапии (ФДТ).

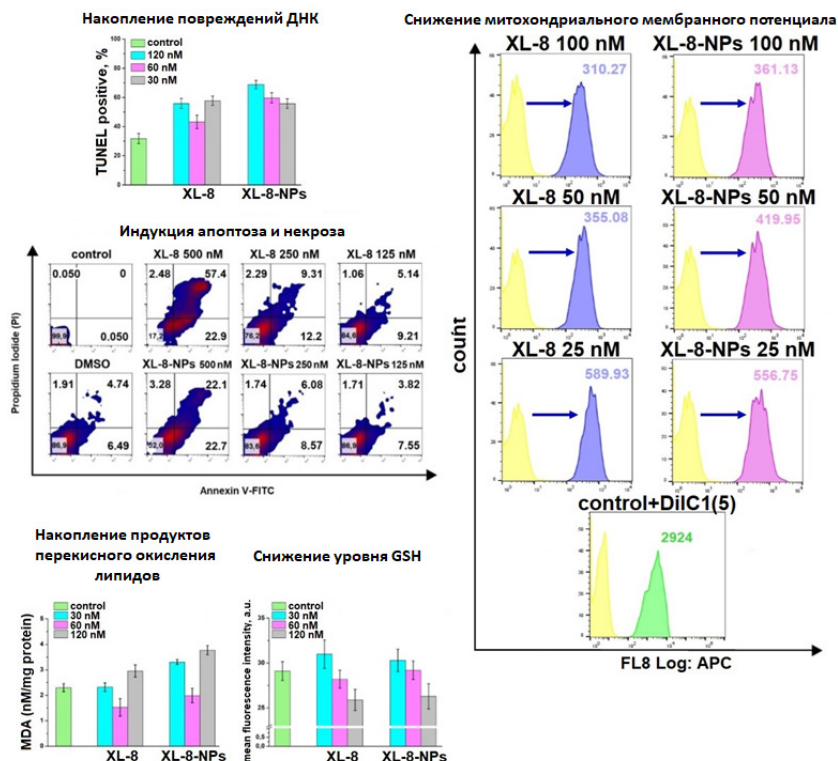


Рисунок 6. Рисунок, изображающий результаты исследования и сравнения эффективности свободной субстанции (XL-8) и наночастиц (XL-8-NPs) при исследовании накопления поврежденных ДНК с помощью метода TUNEL; индукции апоптоза и некроза; накопления продуктов перекисного окисления липидов и снижения уровня GSH; снижение митохондриального мембранного потенциала (рисунок адаптирован из статьи [5]).

Эфир феофорбида *a*-17 триэтиленгликоля (XL-8) является перспективными высокоактивным фотосенсибилизатором,

производным хлорина *e6*, применяемого в фотодинамической терапии злокачественных новообразований. Однако, высокая липофильность и низкая растворимость значительно снижают потенциал его применения в клинической практике. Был разработан метод инкапсуляции XL-8 в биосовместимую полимерную матрицу на основе сополимера молочной и гликолевой кислот — ПЛГА (Рис. 1) [1, 5]. Полученная форма (XL-8-NPs) характеризовалась небольшим размером (182 ± 19 нм), высоким содержанием (4.63%) и эффективностью инкапсуляции XL-8 (87.7%), отрицательным поверхностным зарядом (-22.2 ± 3.8 мВ) и постепенным высвобождением субстанции из матрицы.

Включение субстанции в полимерную матрицу не нарушало биологической активности XL-8: XL-8-NPs индуцировали окислительный стресс, вызывали нарушение митохондриального мембранного потенциала и накопление продуктов перекисного окисления липидов, что приводило к апоптозу и гибели опухолевых клеток (HeLa) *in vitro* (Рис. 6).

Таким образом, получение полимерной системы доставки в виде наночастиц позволило сохранить свойства активного соединения, а также способствовало более эффективной противоопухолевой терапии (ФДТ) *in vivo*: наблюдалось существенное торможение роста опухолей в группе мышей, лечение которых проводили наночастицами, по сравнению с группами, лечение которых проводили с применением свободной субстанции.

Резюмируя представленные данные, можно сделать вывод о перспективности создания полимерных наночастиц на основе ПЛГА для эффективной терапии онкологических заболеваний разной нозологии с применением как стандартной химиотерапии, так и альтернативных методов, таких как ФДТ.

Ссылки

1. Sokol M. B., Beganovskaya V. A., Mollaeva M. R., Yabbarov N. G., Chirkina M. V., Belykh D. V., Startseva O. M., Egorov A. E., Kostyukov A. A., Kuzmin V. A., Lomakin S. M., Shilkina N. G., Krivandin A. V., Shatalova O. V., Gradova M. A., Abakumov M. A., Nikitin A. A., Maksimova V. P., Kirsanov K. I., Nikolskaya E. D., *Pharmaceutics*. **2024**, 16(1), 126.
2. Yabbarov N. G., Mollaev M. D., Zabolotskii A. I., Mazalev D. A., Gorokhovets N. V., Sokol M. B., Mollaeva M. R., Fomicheva M. V., Pshenichnikova A. B., Nikolskaya E. D., *Applied Biochemistry and Microbiology*. **2022**, 58(8), 899–908.
3. Mariya B. Sokol, Nikita G. Yabbarov, Mariia R. Mollaeva, Margarita V. Chirkina, Murad D. Mollaev, Artur I. Zabolotsky, Sergey L. Kuznetsov, Elena D. Nikolskaya. Alpha-fetoprotein mediated targeting of polymeric nanoparticles to treat solid tumors // *Nanomedicine*. 2022.
4. Sokol M. B., Chirkina M. V., Yabbarov N. G., Mollaeva M. R., Podrugina T. A., Pavlova A. S., Temnov V. V., Hathout R. M., Metwally A. A., Nikolskaya E. D., *Pharmaceutics*. **2022**; 14(11), 2333.
5. M. R. Mollaeva, E. Nikolskaya, V. Beganovskaya, M. Sokol, M. Chirkina, S. Obydennyi, D. Belykh, O. Startseva, M. D. Mollaev, N. Yabbarov, *Antioxidants*. **2021**, 10(12), 1985.

13. ПОЛИАКРИЛАТЫ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ

Л.А. Островская, Д.Б. Корман

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

Среди химических соединений, изучаемых в последнее время в качестве потенциальных противоопухолевых агентов, большое внимание привлекают металлоорганические соединения, в том числе вещества, содержащие благородные металлы, в первую очередь- золото и серебро. Как показали исследования последних десятилетий, золото и серебросодержащие соединения обладают значительной биологической, в том числе, антибактериальной, гемостатической, цитотоксической и противоопухолевой активностью [1].

Интерес к исследованию противоопухолевых свойств комплексных соединений, содержащих благородные металлы, был стимулирован случайным обнаружением в конце 1960-х годов высокой противоопухолевой активности комплексного соединения двухвалентной платины (цис-дихлордиаминоплатина, цис-платин) и последующим, в конце 1970-х годов, быстрым внедрением её в клиническую практику, где препарат стал применяться при лечении широкого спектра солидных опухолей [2, 3].

Среди многообразия изученных в последние годы металлоорганических соединений особый интерес представляют металл производные полиакриловой кислоты (полиакрилаты), синтезированные под руководством академика М. Г. Воронкова в Иркутском институте химии имени А. Е. Фаворского СО РАН и относящиеся к новой для онкологии группе соединений, ранее в этом направлении не изучавшихся — металлосодержащие полимеры.

В результате исследований, проведенных нами в Институте биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, из этой группы соединений для дальнейшего углублённого изучения в качестве потенциальных цитостатиков были отобраны полиакрилаты, содержащие золото (аурумакрил) и серебро (аргакрил). В этих исследованиях впервые было показано, что золото-серебро-содержащие полимеры могут обладать значимой цитотоксической и противоопухолевой активностью [4-6].

Необходимо отметить, что аурумакрил и аргакрил являются первыми и пока единственными полимерными соединениями среди изученных золото и серебро содержащих веществ, способных в определённых условиях формировать нано размерные частицы драгоценных металлов в полимерной матрице, что вероятно вносит свой вклад в особенности метаболизма и биологической активности препаратов в физиологических условиях [7].

Согласно существующим представлениям полимерные комплексы, которые содержат в своем составе ионогенные группы и наночастицы металла, способны к комплементарным конформационным превращениям и кооперативному связыванию, а также к не валентным взаимодействиям с биологическими объектами. Эти свойства определяют возможный широкий спектр фармакологической активности полимерных композитов, содержащих наночастицы благородных металлов, в том числе в качестве потенциальных лекарственных препаратов [1, 7].

Проведенные нами доклинические исследования полиакрилатов золота и серебра включают исследование противоопухолевой и цитотоксической активности препаратов на моделях солидных опухолей животных *in vivo* и клеточных линиях опухолей человека *in vitro*, а также изучение определённых аспектов механизма действия этих соединений.

Исследовавшиеся препараты представляют собой неполные металлические соли полиакриловой кислоты, содержащие ионы благородных металлов (8 масс. %).

Аурумакрил -неполная золотая соль полиакриловой кислоты: $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAuCl}_3\text{H}-)_m$, аргакрил — неполная серебряная соль полиакриловой кислоты: $(-\text{CH}_2-\text{CHCOOH}-)_n(-\text{CH}_2\text{CHCOOAg}-)_m$, где $n=12000-35000$, $m=1650-6650$. Молекулярная масса полимеров составляет 100–300 кДа.

Субстанции препаратов представляют собой стекловидные пластинки золотистого (аурумакрил) и серебристого (аргакрил) цвета, хорошо растворимые в воде [7–9].

ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИАКРИЛАТОВ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА IN VIVO

Противоопухолевая активность аурумакрила и аргакрила установлена на моделях перевиваемых солидных опухолей мышей — карцинома лёгких Льюис, аденокарцинома Акатол, аденокарцинома Са-755 при ежедневном многократном в/б введении препаратов [10].

Отметим, что аурумакрил применялся в суточной дозе 20 мг/кг, в то время как аргакрил использовался в большинстве опытов в дозе 2 мг/кг, что объясняется значительно более высокой токсичностью препарата, содержащего серебро, по сравнению с препаратом золота.

Аурумакрил тормозит развитие всех трёх изученных солидных опухолей мышей — карциномы лёгких Льюис, аденокарциномы Акатол и аденокарциномы Са-755 — на 80–90% (рис. 1).

Аргакрил эффективно тормозит развитие карциномы лёгких Льюис (90%) и аденокарциномы Са-755 (70%), проявляя несколько меньшую активность в отношении опухоли Акатол (55%) (рис. 2).



Рис. 1. Противоопухолевая активность аурумакрила на моделях карциномы лёгких Льюис (а), аденокарциномы Ака-тол (б), аденокарциномы Са-755 (в)

1 — контроль **2** — аурумакрил, 20 мг/кг/сутки, в/б, с 1 по 5 сутки после перевивки опухоли

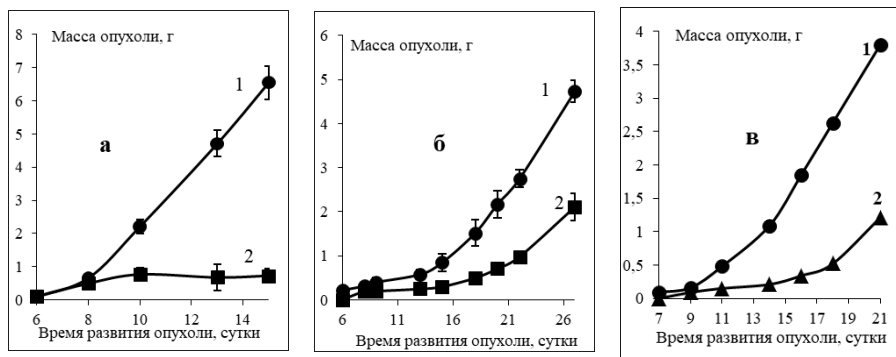


Рис. 2. Противоопухолевая активность аргакрила на моделях карциномы лёгких Льюис (а), аденокарциномы Акатол (б) и аденокарциномы Са-755 (в)

1 — контроль **2** — аргакрил, 2 мг/кг/сутки, в/б, с 1 по 5 сутки после перевивки опухоли (Са-755–6 мг/кг/сутки, с 1 по 9 сутки)

При этом средняя продолжительность жизни животных под влиянием аргакрила увеличивается на 50% (карцинома лёгких

Льюис), а под влиянием аурумакрила — на 30% (аденокарцинома Ca-755) по сравнению с контролем.

Представленные результаты свидетельствуют о несомненной противоопухолевой активности полиакрилатов золота и серебра, вызывающих торможение развития солидных опухолей мышей на 55–90%.

В дополнение к приведенным данным, отметим, что препараты обладают некоторым антиметастатическим действием, установленным в специальных экспериментах по изучению влияния этих соединений на появление метастазов в легких при развитии карциномы Льюис. Применение аурумакрила и аргакрила приводило к торможению образования колоний опухолевых клеток в лёгких на 50% и 26% по сравнению с контролем, соответственно, при оценке эффекта на 23 сутки развития опухоли [1].

Весьма существенным представляется также тот факт, что аурумакрил, как показало специальное сравнительное исследование, проведенное на моделях солидных опухолей мышей (карцинома лёгких Льюис и аденокарцинома Акатол), проявляет противоопухолевую активность сопоставимую с эффектом конвенциональных цитостатиков различного механизма действия (цисплатин, циклофосфан, 5-фторурацил, доксорубин) [11].

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ПОЛИАКРИЛАТОВ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА IN VITRO

Аурумакрил и аргакрил, как показали эксперименты с использованием стандартного МТТ теста для оценки гибели клеток, проявляют значительную цитотоксическую активность в отношении ряда клеточных культур опухолей человека различного генеза — рак легкого А-549, рак толстой кишки

НСТ116, меланома Mel Me, рецептор-положительная карцинома молочной железы MCF-7 [12].

Значения показателя цитотоксичности IC_{50} (концентрация вещества, вызывающая гибель 50% клеток) аурумакрила и аргакрила, характеризующие чувствительность изученных линий опухолевых клеток к препаратам, приведены в таблице 1. Учитывая, что аурумакрил и аргакрил являются полимерами на основе полиакриловой кислоты с массовым содержанием металлов в количестве 8%, а противоопухолевый эффект этих соединений связывают в основном с действием образующихся наночастиц благородных металлов, представляется уместным характеризовать цитотоксическую активность этих препаратов соответствующими показателями в пересчёте на содержание золота и серебра, соответственно [13].

Таблица 1

Значения показателя IC_{50} аурумакрила и аргакрила для ряда опухолевых клеток человека, культивируемых *in vitro*.

КУЛЬТУРА КЛЕТОК	АУРУМАКРИЛ	АРГАКРИЛ
	IC_{50} , мкг/мл	
Рак молочной железы MCF-7	8,0	2,0
Рак легкого A549	4,0	6,4
Меланома Mel Me	4,9	14,4
Рак толстой кишки НСТ116	5,2	14,4

Полученные данные позволяют дифференцировать изученные клеточные линии опухолей человека по чувствительности к препаратам. Так, наибольшую чувствительность к действию аурумакрила проявляют клетки рака лёгкого линии A549, а к действию аргакрила — клетки карциномы молочной железы MCF-7 (табл. 1).

Влияние аргакрила и аурумакрила на выживаемость клеток карциномы молочной железы MCF-7 в зависимости от концентрации препаратов характеризуют данные, представленные на рисунке 3.

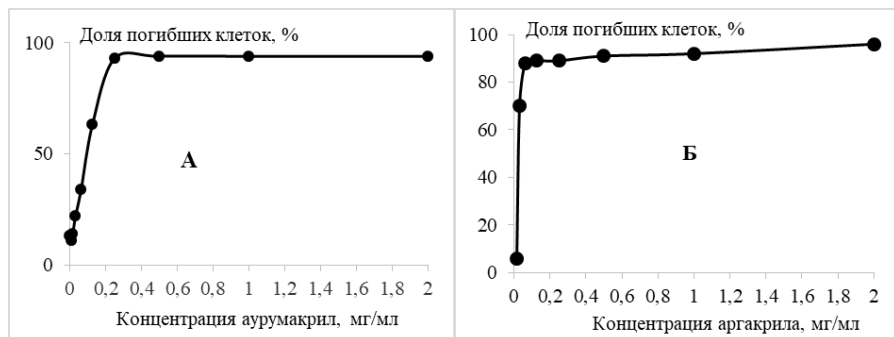


Рис. 3. Изменение доли погибших клеток MCF-7 в зависимости от концентрации препаратов аурумакрил (А) и аргакрил (Б).

Оба изученных препарата — аргакрил и аурумакрил, как видно из представленных данных, обладают доза-зависимым цитотоксическим действием на опухолевые клетки, вызывая их гибель, выраженность которой зависит от концентрации препарата и природы металла, содержащегося в полимере.

Аргакрил и аурумакрил вызывают практически полную гибель опухолевых клеток MCF-7 (94–96%) при воздействии в максимальной концентрации 2 мг/мл (рис. 3).

Значения IC_{50} в отношении клеток MCF-7 составляют 8 мкг/мл и 2 мкг/мл для аурумакрила и аргакрила, соответственно (табл. 1, рис. 3).

Таким образом, очевидно, что оба изученных препарата обладают выраженной способностью оказывать летальное действие на клетки опухолей человека, различаясь при этом по спектру цитотоксического эффекта.

Как уже было отмечено ранее, принципиальные отличия в химической структуре золото- и серебро содержащих полимеров на основе полиакриловой кислоты, от других широко исследуемых металло-комплексов дают основания полагать, что мишени и механизмы реализации противоопухолевого эффекта аурумакрила и аргакрила, возможно, иные, чем у ряда известных лекарственных средств, применяемых для лечения больных злокачественными опухолями [3].

В этой связи особый интерес представляет оценка наличия перекрёстной резистентности между металлополиакрилатами (аурумакрил и аргакрил) и широко применяемыми в клинической практике противоопухолевыми препаратами, такими, в частности, как цисплатин и доксорубицин.

С этой целью нами было проведено изучение цитотоксической активности аурумакрила и аргакрила на чувствительном (MCF-7) и резистентных к цисплатину (MCF-7/CP) и доксорубицину (MCF-7/ADR) вариантах культуры клеток рака молочной железы человека MCF-7 с параллельной оценкой цитотоксичности для этих линий клеток препаратов цисплатина и доксорубицин [14].

Рассматривая действие аурумакрила и аргакрила необходимо отметить как принципиально важный результат, полученный в данном исследовании, сохранение практически одинаковой цитотоксической активности полиакрилатов в отношении чувствительных и резистентных к действию цисплатина и доксорубицина клеток.

Показано, что цитотоксичность аурумакрила в отношении чувствительной (MCF-7) и резистентной к цисплатину (MCF-7/CP) линий клеток сохраняется практически на одном уровне — IC_{50} составляет 10 и 9,6 мкг/мл, соответственно, увеличиваясь по отношению к клеткам, резистентным к доксорубицину (MCF-7/ADR) — IC_{50} равен 6 мкг/мл (табл. 2).

Цитотоксичность аргакрила для всех трёх линий клеток, как чувствительных, так и резистентных к цисплатину и доксорубину, находится примерно на одном уровне — IC_{50} имеет значения, равные 4 и 3,2 мкг/мл, соответственно (табл. 2).

Таблица 2

Значения показателя IC_{50} аурумакрила, аргакрила, цисплатина и доксорубина в отношении чувствительных (MCF-7) и резистентных (MCF-7/CP, MCF-7/ADR) клеток культуры рака молочной железы человека.

Препарат	Культура клеток		
	MCF-7	MCF-7/CP	MCF-7/ADR
	IC_{50} , мкг/мл		
Аурумакрил	10	9,6	6
Аргакрил	4	3,2	3,2
Доксорубин	0,12	5	5
Цисплатина	2	20	7

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что резистентные к цисплатину и доксорубину клетки рака молочной железы человека сохраняют в полной мере чувствительность к цитотоксическому действию полиакрилатов — аурумакрила и, особенно, аргакрила (Табл. 3).

Иными словами, в результате проведенных исследований обнаружено отсутствие перекрёстной резистентности у полиакрилатов (аурумакрил и аргакрил) с цисплатином и с доксорубином на модели культуры клеток рака молочной железы человека MCF-7.

Обнаруженное в проведенном исследовании сохранение чувствительности к цитотоксическому действию полиакрилатов благородных металлов у клеток, обладающих

резистентностью к цисплатину и доксорубицину, может рассматриваться в качестве свидетельства, подтверждающего предположение о наличии определённых особенностей в механизме противоопухолевого эффекта этих соединений.

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ПОЛИАКРИЛАТОВ ЗОЛОТА И СЕРЕБРА

Исследование некоторых аспектов механизма противоопухолевого действия полиакрилатов включало изучение характера гибели клеток, индуцированной препаратами, и оценку влияния соединений на структуру ДНК опухолевых клеток.

ХАРАКТЕР ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Соединения, содержащие золото и серебро, подобно другим противоопухолевым препаратам, способны вызывать как некротическую, так и апоптотическую гибель клеток.

Задача проведенных нами исследований состояла в оценке роли апоптоза в индуцируемом аурумакрилом и аргакрилом процессе гибели опухолевых клеток.

Оценка доли клеток на ранней стадии апоптоза проведена с использованием коммерческого набора «Vybrant Apoptosis Assay Kit № 4» с флуоресцентными красителями YO-PRO-1 и йодистым пропидием («Invitrogen», США) [15].

Проведенное исследование позволило установить, что апоптоз является доминирующим механизмом в индуцируемой аурумакрилом и аргакрилом гибели опухолевых клеток (рис. 4 и 5).

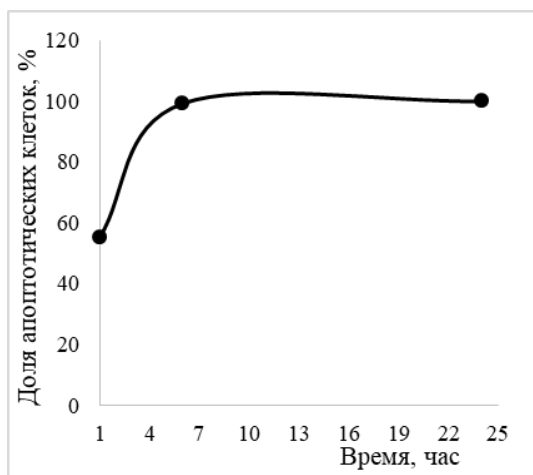


Рис. 4. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аурумакрила (500 мкг/мл).

По оси абсцисс — время инкубирования клеток с аурумакрилом, час
По оси ординат — доля апоптотических клеток среди погибших клеток, %

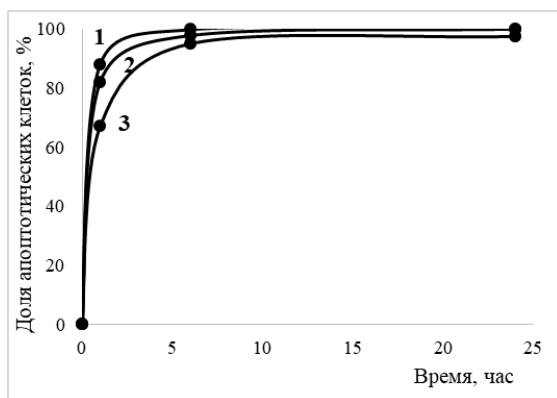


Рис. 5. Изменение доли апоптотических клеток среди общего числа погибших клеток линии MCF-7 в зависимости от длительности воздействия аргакрила в различных концентрациях: 1-500 мкг/мл; 2-250 мкг/мл; 3-100 мкг/мл.

По оси абсцисс — время инкубирования клеток с аргакрилом, час
По оси ординат — доля апоптотических клеток среди погибших клеток, %

ВЛИЯНИЕ МЕТАЛЛОПОЛИАКРИЛАТОВ НА СТРУКТУРУ ДНК ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Одной из ключевых внутриклеточных мишеней, воздействие на которую может приводить к гибели опухолевых клеток, является ДНК, что подтверждает многолетний клинический опыт использования алкилирующих противоопухолевых препаратов, до сих пор входящих в арсенал основных лекарственных средств, применяемых для лечения разнообразных опухолей [3].

Известно, что в результате структурных повреждений ДНК, могут возникать одно- и двунитевые разрывы ДНК, а также ДНК-сшивки, которые в случае отсутствия или дефектности репарации этих повреждений ведут к гибели клетки.

Предпринятое нами исследование было направлено на изучение способности аурумакрила и аргакрила индуцировать однострунчатые и двунитевые разрывы ДНК и образование ДНК-сшивок (в том числе сшивок ДНК — белок) в опухолевых клетках (культура клеток карциномы молочной железы человека MCF-7).

Анализ однострунчатых разрывов ДНК, индуцированных аурумакрилом и аргакрилом, проведен с использованием метода электрофореза единичных клеток в щелочных условиях (метод ДНК-комет).

Для выяснения способности аурумакрила и аргакрила индуцировать двунитевые разрывы ДНК применён иммуноцитохимический метод определения в клетках фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), детектирующего двунитевой разрыв ДНК.

Оценка способности препаратов индуцировать сшивки в молекуле ДНК опухолевых клеток линии MCF-7 проведена с использованием модифицированного метода ДНК-комет в щелочных условиях. При этом для дифференциации природы сшивок

«ДНК-ДНК» и «ДНК-белок» определялась доля ДНК в хвосте ДНК-комет в присутствии протеиназы К, которая избирательно взаимодействуя с белком, позволяет регистрировать сшивки типа «ДНК-белок».

Проведенное исследование позволило выявить определённые различия в механизме влияния препаратов, содержащих золото и серебро, на структуру ДНК опухолевых клеток [16, 17].

Механизм действия аурумакрила реализуется через образование однонитевых разрывов ДНК (рис. 6), трансформирующихся в сшивки типа ДНК-белок (рис. 7).

Механизм действия аргакрила связан с индукцией однонитевых и двунитевых разрывов ДНК, число которых в два раза превосходит контрольный (спонтанный) уровень этих показателей, при отсутствии образования под влиянием препарата сшивок в молекуле ДНК (рис. 8 и 9).

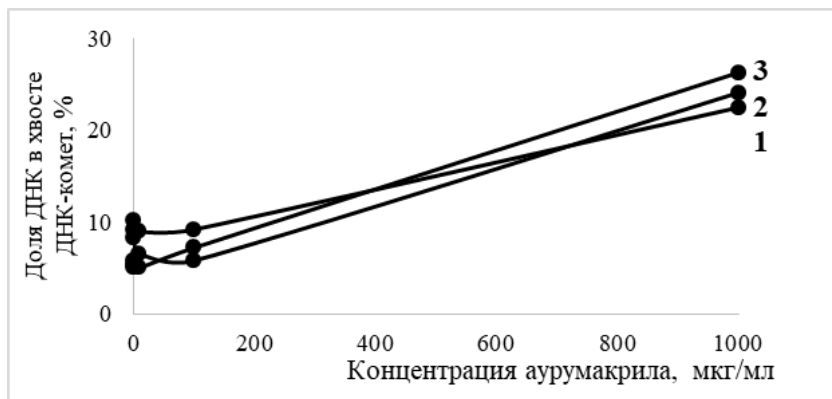


Рис. 6. Влияние аурумакрила на образование однонитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аурумакрила при различных сроках инкубации (1-1 час; 2-6 часов; 3-24 часа).

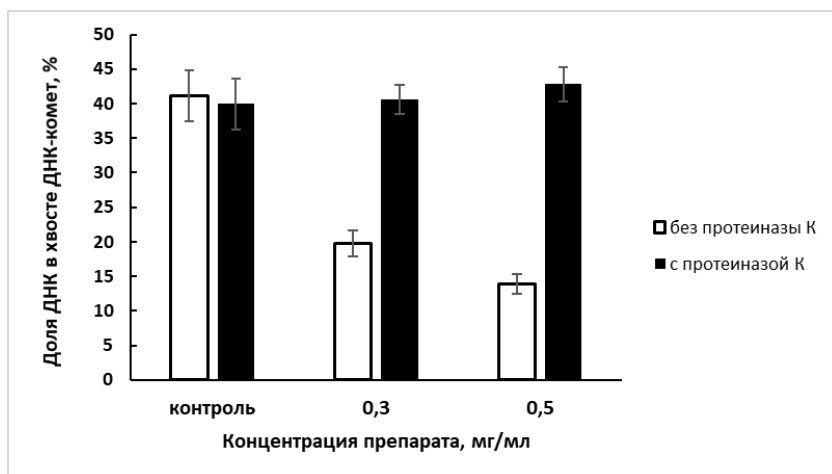


Рис. 7. Индукция аурумакрилом сшивок «ДНК-белок» в молекуле ДНК опухолевых клеток линии MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет (%) в зависимости от концентрации аурумакрила (мг/мл) без воздействия протеиназы К и в присутствии протеиназы К.

Анализ данных, характеризующих влияние полиакрилатов золота и серебра на структуру ДНК опухолевых клеток (линия MCF-7) позволяет, как нам представляется, предложить следующую трактовку полученных результатов:

- механизм действия аурумакрила реализуется через образование одонитевых разрывов ДНК, трансформирующихся в сшивки типа ДНК-белок, что возможно объясняет снижение спонтанного уровня двунитевых разрывов ДНК в клетках под влиянием препарата;

- механизм действия аргакрила связан с индукцией одонитевых и двунитевых разрывов ДНК, число которых в два раза превосходит контрольный (спонтанный) уровень этих показателей, при отсутствии образования под влиянием препарата сшивок в молекуле ДНК.

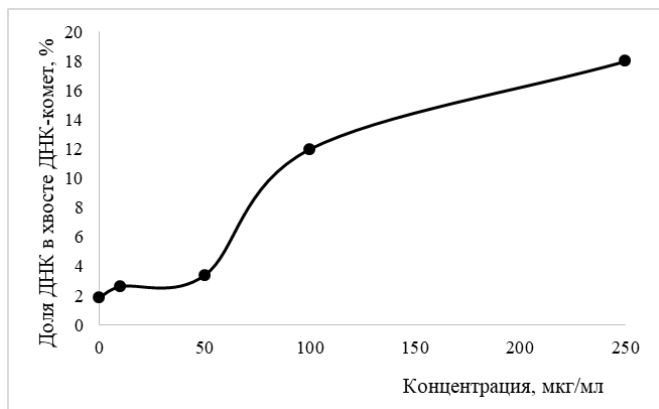


Рис. 8. Влияние аргакрила на образование одонитевых разрывов ДНК в опухолевых клетках линии MCF-7. Изменение доли ДНК в хвосте ДНК-комет в зависимости от концентрации аргакрила при инкубации клеток с препаратом в течение 24 часов.

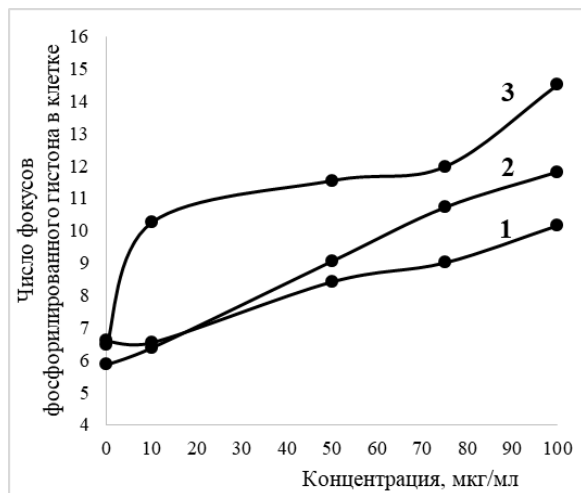


Рис. 9. Влияние аргакрила на образование двунитевых разрывов ДНК в клетках MCF-7. Изменение числа фокусов фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) в зависимости от концентрации аргакрила при инкубации клеток в течение 1 часа (1), 6 часов (2) и 24 часов (3).

Эти результаты указывают на возможные различия в механизме цитотоксического действия аурумакрила и аргакрила, которые, вероятно определяются природой металлов, содержащихся в исследуемых полиакрилатах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные к настоящему времени экспериментальные данные свидетельствуют о существенной цитотоксической, антипролиферативной и противоопухолевой активности большого числа разнообразных золото- и серебросодержащих соединений. Эти данные получены на большом числе различных экспериментальных моделей *in vitro* и *in vivo*, стандартных для современной экспериментальной противоопухолевой химиотерапии.

Исследованные соединения различаются по химическому строению, но общим для всех этих веществ является наличие в их молекулах ионов золота или серебра, что дало основание многим исследователям полагать, что цитотоксическое действие этих соединений во многом обусловлено наличием этого иона. В то же время важное значение для реализации цитотоксической и противоопухолевой активности этих соединений имеет характер лигандов, образующих с этими ионами комплексные соединения.

Среди золото- серебросодержащих соединений, исследованных к настоящему времени в качестве потенциальных противоопухолевых агентов, следует особо выделить комплексы этих металлов с полимерами. Единственными представителями этой группы соединений пока являются золото- и серебросодержащие полиакрилаты — препараты с условными названиями Аурумакрил и Аргакрил.

В отличие от других изученных соединений, содержащих эти благородные металлы и представляющих собой «малые молекулы» («мини-молекулы»), полиакрилаты золота и серебра являются «макромолекулами», то есть существенно отличаются по химической структуре. Принципиальные различия в химической структуре дают основания полагать, что, возможно, аурумакрил и аргакрил имеют иные мишени и механизмы реализации противоопухолевого действия по сравнению с другими золото-серебросодержащими соединениями.

Проведенные нами доклинические исследования, выполненные на различных опухолевых моделях, показывают, что оба препарата обладают значительной цитотоксической, антипролиферативной и противоопухолевой активностью.

Вместе с тем следует отметить, что обнаружены различия в чувствительности к аурумакрилу и аргакрилу клеток различных опухолей животных *in vivo* и клеток опухолей человека *in vitro*, а также отличия в механизме действия препаратов, которые вероятно определяются природой металлов, содержащихся в исследуемых полиакрилатах.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности дальнейшего доклинического изучения полиакрилатов, содержащих как золото, так и серебро, в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. А. Островская, Д. Б. Корман «Золото и серебро в экспериментальной терапии опухолей», Практическая медицина, М., **2023**.
2. Д. Б. Корман «Основы противоопухолевой химиотерапии», Практическая медицина, М., **2006**.

3. Д. Б. Корман «Мишени и механизмы действия противоопухолевых препаратов» Практическая медицина, М., **2014**.

4. Л. А. Островская, М. Г. Воронков, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова, М. М. Фомина, В. А. Рыкова, К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, *Биофизика* **2014**, 59 (4), 785–789.

5. L. A. Ostrovskaya, D. B. Korman, N. V. Bluhterova, M. M. Fomina, V. A. Rikova, K. A. Abzaeva, L. V. Zhilitskaya, N. O. Yarosh, *Biointerface Research in Applied Chemistry* **2014**, 4 (4), 816–819.

6. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, А. К. Грехова, А. Н. Осипов, Н. В. Блюхтерова, М. М. Фомина, В. А. Рыкова, К. А. Абзаева, *Известия Академии наук. Серия химическая* **2017**, 66 (12), 2333–2338. DOI: 10.1007/s11172-017-2025-z.

7. К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, Г. Г. Белозерская, Л. А. Островская, *Известия Академии наук. Серия химическая* **2017**, 66 (12), 2314–2316. DOI: 10.1007/s11172-017-2021-3.

8. М. Г. Воронков, К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова, М. М. Фомина, В. А. Рыкова, Патент РФ № 2372091 от 2009. Бюллетень изобретений, **2009**, 31.

9. Л. А. Островская, М. Г. Воронков, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова, М. М. Фомина, В. А. Рыкова, К. А. Абзаева, Л. В. Жилицкая, *Биофизика* **2014**, **59** (4), 785–789.

10. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Н. В. Блюхтерова, М. М. Фомина, В. А. Рыкова, Ю. А. Хоченкова, К. А. Абзаева, *Биофизика* **2021**, 66 (5), 978–984. DOI: 10.31857/S0006302921050161.

11. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова, М. М. Фомина, В. А. Рыкова, К. А. Абзаева, *Биофизика* **2020**, 65 (2), 360–366. DOI: 10.31857/S0006302920020192.

12. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Н. В. Блюхтерова, Ю. А. Хоченкова, К. А. Абзаева, *Биофизика* **2022** 67 (1), 82–87. DOI: 10.31857/S0006302922010070.

13. К. А. Абзаева, М. Г. Воронков, Л. В. Жилицкая, Л. А. Островская, М. М. Фомина, Н. В. Блюхтерова, В. А. Рыкова, *Химико-фармацевтический журнал* **2012**, 46 (4), 11-15.

14. Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Е. И. Некрасова, Ю. А. Хоченкова, Н. В. Блюхтерова, К. А. Абзаева, *Биофизика* **2022**, 67 (5), 951-959. DOI: 10.31857/S0006302922050118, EDN: JIVOB

15. А. К. Чигасова, Л. А. Островская, Д. Б. Корман, *Биофизика* **2022**, 67 (6), 1185-1191. DOI: 10.31857/S0006302922060151, EDN: LKVLQG.

16. А. К. Чигасова, Л. А. Островская, Д. Б. Корман, *Биофизика* **2022**, 67 (6), 1158-1162. DOI: 10.31857/S0006302922060126, EDN: LKICKI.

17. А. К. Чигасова, Л. А. Островская, Д. Б. Корман, Н. В. Блюхтерова, *Биофизика* **2023**, 68 (6), 1187-1199. DOI: 10.31857/S0006302923060108, EDN: RORUYD.

*Экспериментальные исследования
выполнены сотрудниками:*

*ст. н. с. Н.В. Блюхтерова, ст. н. с. В.А. Рыкова,
ст. н. с., к. б. н. М.М. Фомина, н.с., к. б. н. А.К. Чигасова,
н. с., к. б. н. Е.И. Некрасова, инженер-исследователь Т.В. Шарова
ФГБУН Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля
РАН,*

м. н. с. Ю.А. Хоченкова, н. с. О.О. Рябая

*Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
им. Н.Н. Блохина*

ст. н. с., к. х. н. К.А. Абзаева

*ФГБУН Институт химической кинетики и горения
им. В.В. Воеводского СО РАН*

14. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОБЪЕКТЫ

Л. Н. Шишкина, М. В. Козлов, В. А. Меньшов

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

Рост антропогенной нагрузки на окружающую среду приводит к существенному усилению воздействия неблагоприятных экологических факторов физической и химической природы на биоту и человека. Прогнозирование последствий их влияния на биологические объекты затруднено по многим причинам. Среди них и появление обширных территорий с повышенным радиационным фоном вследствие аварий на АЭС и радиохимических производствах, и загрязнение природной водной среды из-за способности химических токсикантов перемещаться на значительные расстояния от источников загрязнения, и наличия аэрозолей в воздухе, содержащих сложную композицию самых разных химических веществ. При этом необходимо иметь в виду, что изучение механизма действия неблагоприятных факторов существенно затруднено из-за отсутствия выраженных эффектов на уровне организма при действии токсикантов в фоновых концентрациях, непредсказуемостью совместного действия различных факторов особенно в малых дозах, отсутствием линейной зависимости «Биологический эффект — доза» в области слабых воздействий [1–3].

Бурное развитие мембранологии в 70-х годах прошлого столетия привело к обоснованию важности свободнорадикальных реакций, протекающих в разных компартментах клетки, в регуляции клеточного метаболизма в норме и при действии повреждающих факторов. Именно процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), стационарность которых в норме поддерживается

физико-химической системой регуляции на всех уровнях организации биологических объектов [4–6], в эволюционном плане являются одной из наиболее ранних регуляторных систем защиты организма от действия повреждающих факторов [7]. Показано, что процессы ПОЛ мембранной системы клетки и органа, схема которой приведена на Рис. 1, функционируют как единое целое [8]. Это позволяет оценить последствия воздействия неблагоприятных факторов, в том числе и при их совместном действии на биологический объект, по изменению масштаба и характера взаимосвязей между тесно скоординированными в норме параметрами системы регуляции ПОЛ, используя различные методы биохимической физики.

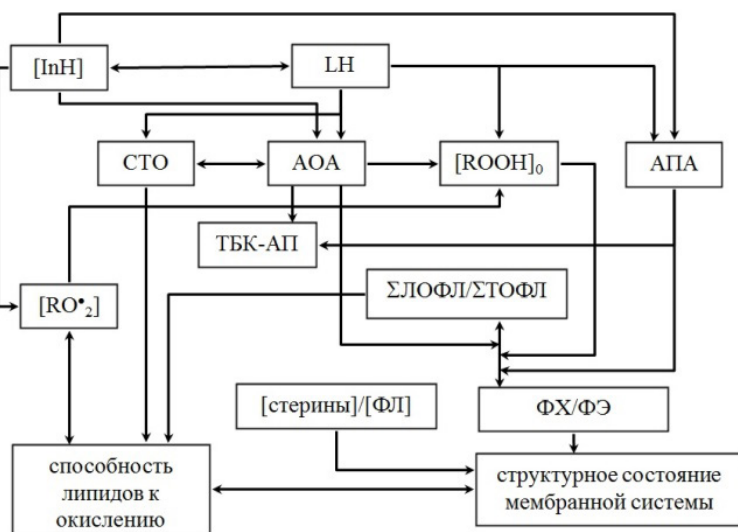


Рисунок 1. Схема взаимосвязей между параметрами физико-химической системы регуляции ПОЛ на клеточном и органном уровнях [5].

Прежде всего необходимо отметить, что исходное состояние параметров системы регуляции ПОЛ и их физико-химические

свойства оказывает существенное влияние на формирование последствий воздействия особенно слабых повреждающих факторов. Так, прямая корреляция между соотношением сумм более легко- и более трудноокисляемых фракций фосфолипидов ($\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$), характеризующее способность липидов к окислению [2,5], и интенсивностью ПОЛ, о которой в сложных биологических системах судят по содержанию реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой продуктов окисления, выявлена только при $[\text{ТБК-АП}]_0 \geq 0.03$ нмоль/мг белка (Рис. 2).

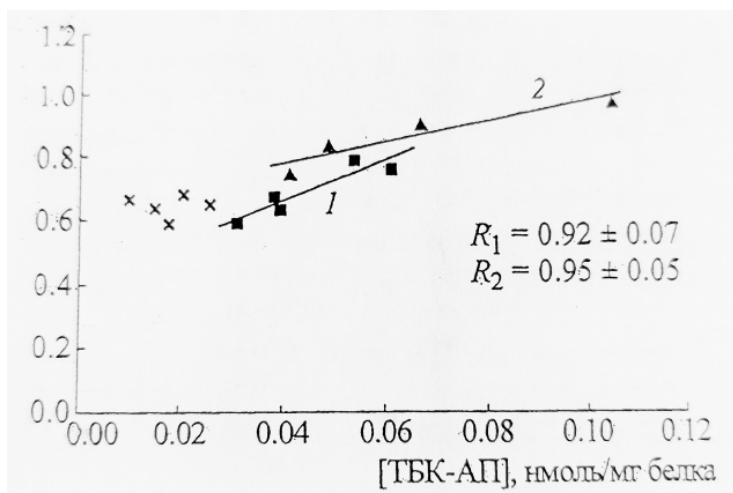


Рисунок 2. Зависимость величины отношения $\Sigma\text{ЛОФЛ}/\Sigma\text{ТОФЛ}$ от содержания ТБК-активных продуктов в гомогенате печени мышей: липиды печени мышей SHK (самки) содержат пероксиды и проявляют либо антиоксидантные свойства (крестики), либо прооксидантный эффект (прямая 1); липиды печени мышей линии Balb/c (самцы) содержат пероксиды (прямая 2) [9].

И низкоинтенсивное γ -облучение мышей SHK (самки) в дозе 15 сГр, и однократное введение им пер ос гексан-эфирных экстрактов питьевой воды с разным содержанием бенз(а)пирена (БП) и полихлорбисфенилов (ПХБ) в широком диапазоне

концентраций вызывают существенные изменения масштаба взаимосвязи между содержанием пероксидов в липидах эритроцитов и количеством ТБК-активных продуктов в плазме крови мышей [5,10]. Отсутствие линейной зависимости «биологический эффект — доза» при воздействии ионизирующих излучений, и химических токсикантов обуславливают нарушение взаимосвязей между содержанием внеклеточной ДНК и количеством продуктов ПОЛ в плазме крови мышей, а константа скорости щелочной элюции ДНК лимфоцитов крови мышей наиболее значительно увеличивается при введении экстрактов проб воды с повышенным содержанием БП [10]. Интенсивность ПОЛ в гомогенатах органов мышей оказывает влияние даже на наиболее устойчивую в биологических мембранах взаимосвязь между содержанием кетодиенов (КД) и диеновых конъюгатов (ДК) [6,11] при формировании последствий рентгеновского облучения мышей в малых дозах переменной мощности, что следует из данных, представленных на Рис. 3 а, б.

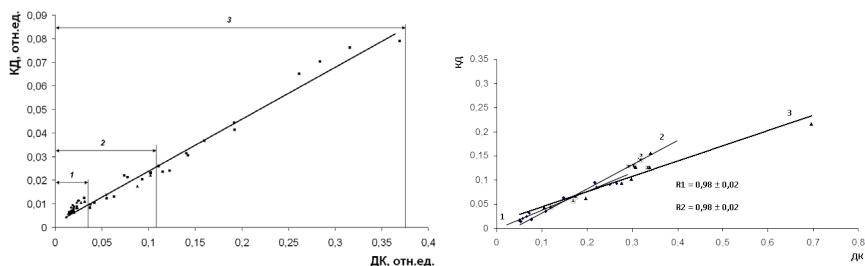


Рисунок 3. Взаимосвязь между содержанием КД и ДК в липидах печени мышей SHR (самки) в исходной контрольной группе (1), возрастном контроле (2) и через месяц после облучения в дозах 0.88–1.46 мГр с переменной мощностью дозы (а) и в липидах головного мозга мышей в группе возрастного контроля (1) и через 31 сут после облучения в дозах 0.90 (2) и 0.88 (3) мГр [11].

В то время как в липидах печени увеличение содержания продуктов окисления сопровождается только ростом вари-

абельности показателя в последовательности: контрольная группа в начале эксперимента (1) < возрастной контроль (2) < группа облученных мышей (3), в липидах головного мозга экспериментальные данные располагаются на разных прямых.

Высокая чувствительность параметров системы регуляции ПОЛ (обеспеченность липидов органов антиоксидантами, состав и физико-химические свойства липидов, структурное состояние мембран, интенсивность ПОЛ) к действию слабых повреждающих факторов, выявленная в лабораторных экспериментах и в природных популяциях грызунов, отловленных на территориях с повышенным радиационным фоном [5,10-15], позволила предложить данную систему регуляции в качестве основы экологического мониторинга [16].

Экспериментально показано, что важная роль а регуляции метаболизма принадлежит корреляционной взаимосвязи, между способностью липидов к окислению и отношением основных фракций фосфолипидов органов животных фосфатидилхолин/фосфатидилэтаноламин (ФХ/ФЭ), характеризующее структурное состояние мембранной системы органа [5]. Так, присутствие в питьевой воде мышей отходов целлюлозно-бумажного производств (черного щелока) в малых дозах вызывает существенные изменения масштаба данной корреляционной взаимосвязи в липидах печени, наиболее выраженное при самой низкой концентрации токсиканта (Рис. 4).

Именно однотипность функционирования физико-химической системы регуляции ПОЛ на разных уровнях организации биологических объектов [6] позволяет использовать различные модельные системы для первичной оценки биологических последствий воздействия неблагоприятных факторов на организм. В биологических мембранах процессы окисления преимущественно протекают в режиме автоокисления в диффузионной области. Это позволило предложить автоокисление

модельного субстрата (метилолеата) в качестве адекватной модели процесса ПОЛ в биомембранах в сочетании с математическим анализом кинетических кривых окисления с помощью компьютерного пакета программ KINS для оценки антиоксидантных (АО) свойств биологически активных веществ (БАВ) и их участия на разных стадиях процесса окисления [16,17].

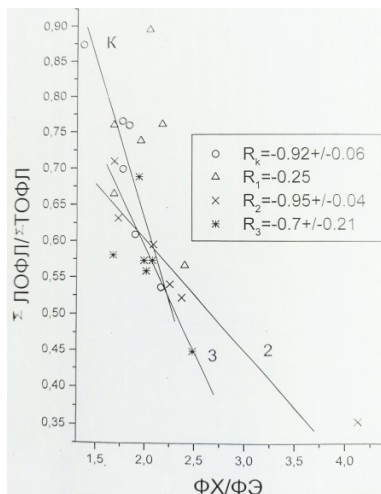


Рисунок 4. Взаимосвязь между соотношением сумм более легко- более трудноокисляемых фракций и отношением ФХ/ФЭ в фосфолипидов печени мышей SHK (самки) в зависимости от концентрации черного щелока в питьевой воде через месяц после начала эксперимента: ○ — возрастной контроль, △ — 0.005%, × — 0.015%, * — 0.05%.

Поскольку одними из основных компонентов биологических мембран являются фосфолипиды, то необходимо учитывать, что антирадикальные и АО свойства синтетических и природных антиоксидантов, как и БАВ существенно изменяются в их присутствии за счет образования комплексов с фосфолипидами и влиянием любых БАВ на способность фосфолипидов к спонтанной агрегации [15,18,19]. Для оценки участия экологических

факторов на разных стадиях процессов окисления была предложена модель низкотемпературного автоокисления лецитина в водной среде [16]. Было установлено, что начальная скорость окисления, как и в сложных биологических системах, зависит от исходной степени окисленности лецитина, а при присутствии в среде ионов меди, обладающих выраженными токсическими свойствами и являющихся инициаторами ПОЛ, приводит к увеличению интенсивности окисления лецитина (Рис. 5).

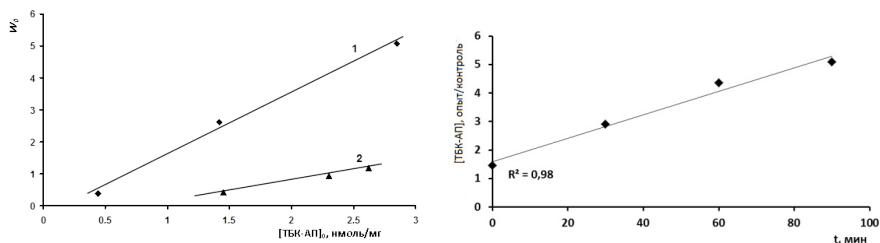


Рисунок 5. Зависимость начальной скорости окисления лецитина при 20° С в дистиллированной воде от исходной концентрации ТБК-активных продуктов (а) [16] и влияние тонов Cu^{2+} на динамику накопления ТБК-активных продуктов при автоокислении лецитина (б) [18].

Для оценки способности компонентов водной среды образовывать комплексы с фосфолипидами была использована математическая обработка УФ-спектров лецитина и его смесей с различными БАВ в водной среде по методу Гаусса [15,17]. Это позволило не только подтвердить наличие комплекса, но и выявить структурные группы, фосфолипидов, принимающих участие в его образовании. Аналогичная обработка УФ-спектров образцов природной воды позволяет выявить присутствие в них соединений разных химических групп [20], что важно для экспресс-оценки качества водной среды.

Использование метода динамического рассеяния света для оценки способности лецитина к спонтанной агрегации в водной

среде как в присутствии различных БАВ, так и в пробах природной воды позволяет оценить влияние компонентов среды на структурное состояние липосом лецитина и прогнозировать последствия их воздействия при поступлении в организм [17,20, 21].

Одним из факторов, неблагоприятно сказывающихся на здоровье человека, является курения табака и электронных сигарет. При этом табачный и сигаретный дым относят к важным факторам воздействия на окружающую среду [22], ежегодно провоцируя выброс 84 миллионов тонн углекислого газа в атмосферу. Необходимо также учитывать, что табачные изделия содержат более шести тысяч токсичных химических веществ, помимо того, что окружающую среду ежегодно загрязняют почти 4,5 триллиона фильтров от уже выкуренных сигарет. Вследствие этого курение ежегодно провоцирует более восьми миллионов смертей, преимущественно обусловленных хроническими обструктивными болезнями легких (ХОБЛ), факторы риска которых приведены на рис. 6. В 2019 году по данным ВОЗ ХОБЛ устойчиво занимал 3–4 место среди всех причин смертей в мире.

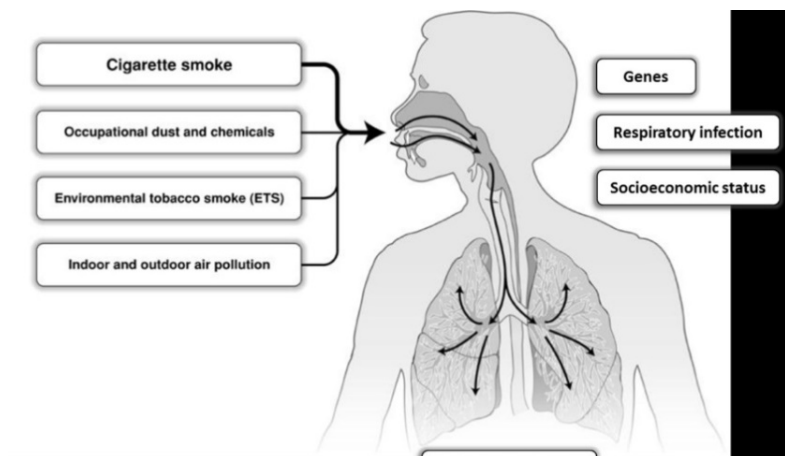


Рисунок.6. Факторы риска ХОБЛ.

Респираторная система является одним из наиболее чувствительных органов человека при взаимодействии с аэрозолями окружающей среды, принимая на себя основную часть вредных веществ атмосферного воздуха. Многими исследователями доказана связь между степенью техногенного загрязнения воздушной среды и распространенностью заболеваний бронхолегочной системы. Так, загрязнение воздуха взвешенными частицами (particulate matter, PM) табачного дыма может инициировать такие заболевания органов дыхания, как ХОБЛ, бронхиальная астма (БА), пневмофиброз, рак легких [23]. Международным агентством по изучению рака взвешенные частицы классифицируются как канцерогены 1-й группы [24].

Известно, что размер взвешенных частиц играет ключевую роль в их проникающую способность. Более крупнодисперсные частицы, аэродинамический диаметр которых составляет 2,5–10 мкм (PM₁₀), достигают бронхов и могут накапливаться в тканях легких. Мелкодисперсные частицы, диаметр которых варьирует в диапазоне 0,1–2,5 мкм (PM_{2,5}), могут достигать бронхиол и альвеол; а ультрамелкодисперсные (0,1–0,001 мкм, PM_{0,1}) способны сразу проникать в кровоток и достигать любой ткани или органа человека [25].

Основными доказанными механизмами действия PM_{2,5}, повреждающих респираторную систему, являются ПОЛ, обусловленное свободными радикалами, нарушение внутриклеточного баланса кальция, воспаление [26]. Обладающие окислительно-восстановительными свойствами металлы с переменной валентностью, находящиеся в составе PM_{2,5}, также способны вызывать генерацию свободных радикалов и окислительный стресс. Для изучения механизма формирования окислительного стресса в крови курильщиков нами была разработана хемилюминесцентная модель, схема которой представлена на рис. 7.

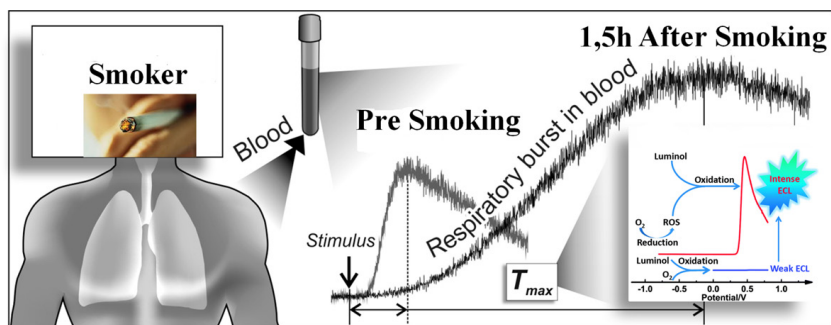


Рисунок 7. Хемилюминесцентная модель исследования окислительного стресса в крови курильщика.

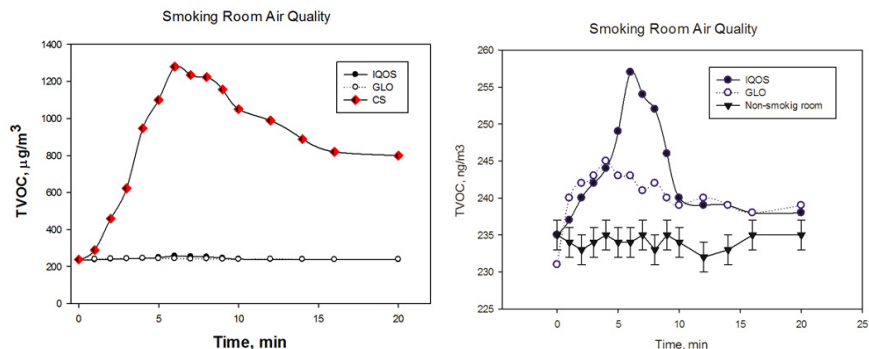


Рисунок 8 (слева). Динамика содержания органических летучих соединений для трех видов сигарет: обычная сигарета (CS) и сигареты с системами нагревания табака № 1 (IQOS) и № 2 (GLO).

Рисунок 9 (справа). Динамика содержания летучих органических соединений в воздухе после выкуривания сигарет с системами нагревания табака № 1 (IQOS) и № 2 (GLO) и нормальным воздухом в рабочем помещении..

Результаты сравнительного исследования фотоионизационным методом суммы летучих органических соединений с потенциалом ионизации ниже 10.6 eV для трех видов сигарет представлены на рис. 8, а на рис. 9 приведена сравнительная динамика содержания летучих веществ в воздухе рабочей ком-

наты для двух последних систем нагревания табака с нормальным воздухом рабочей комнаты.

Существенные различия выявлены и по содержанию взвешенных частиц в воздухе рабочей комнаты после прокуривания разных сигарет (рис. 10, 11).

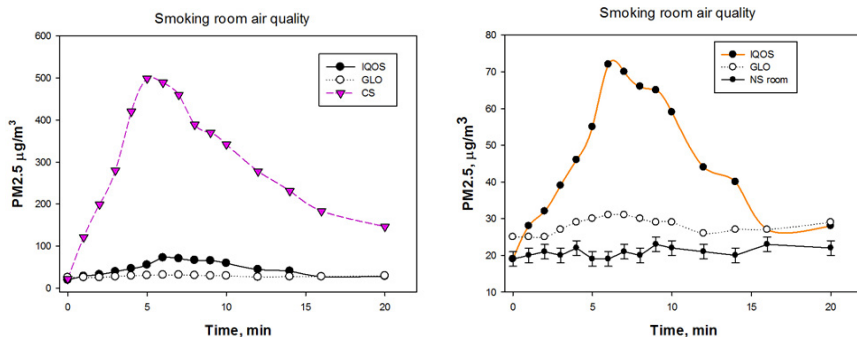


Рис. 10 (слева). Динамика содержания частиц PM_{2,5} в воздухе рабочей комнаты после прокуривания обычных сигарет (CS) и сигарет с системами нагревания табака № 1 (IQOS) и № 2 (GLO). **Рисунок 11** (справа). Динамика содержания частиц PM_{2,5} в воздухе рабочей комнаты после прокуривания сигарет с системами нагревания табака № 1 (IQOS) и № 2 (GLO) и нормальным воздухом в рабочем помещении.

Как видно из представленных данных (рис. 10), наибольший риск, безусловно, имеют обычные сигареты, поскольку концентрации взвешенных частиц в воздухе после курения обычной сигареты в 10 раз выше, чем от систем нагревания табака. Установлено также, что постоянные концентрации PM_{2,5} > 20 мг/м³ в окружающей среде связаны с увеличением тяжести респираторных симптомов, вызывая обструкцию дыхательных путей, хронический бронхит и астму. В этой связи и обычные сигареты, и различные системы нагревания табака представляют определенный риск для респираторной системы некурящего человека, находящегося в одном помещении с курящим.

Таким образом, тесная взаимосвязанность параметров физико-химической системы регуляции ПОЛ в норме и однотипность ее функционирования на разных уровнях организации биообъектов является основой для оценки степени воздействия повреждающих экологических факторов разной природы на биологические системы. Многофакторный анализ экспериментальных данных позволяет не только определить масштаб и характер нарушения взаимосвязей между параметрами системы регуляции ПОЛ, но и выявить факторы, обуславливающие степень этих нарушений. Компьютерный анализ кинетических кривых окисления модельных систем и их смесей с различными БАВ и компонентами водной среды в сочетании с математической обработкой их УФ-спектров по методу Гаусса дает возможность для более детального анализа механизма участия токсикантов в регуляции ПОЛ на разных стадиях окисления и их участия в образовании комплексов с одними из основных компонентов мембран — фосфолипидами. Спонтанная агрегация модельной системы на основе природных липидов (лецитин) в присутствии в водной среде различных БАВ позволяет изучить их влияния на структурное состояние мембран биообъектов. Математическая обработка УФ-спектров образцов природной воды и спонтанная агрегация лецитина в их присутствии могут быть использованы в качестве экспресс-тестов для анализа гидрохимического состава образцов воды и их влияния на структурное состояние мембран биообъектов при поступлении природной воды в организм. Анализ функциональных тестов при попадании токсикантов аэрозолей в организм дает возможность оценить их участие в механизме формирования патологий и разработать стратегию минимизации их повреждающих воздействий.

Ссылки

1. Е. Б. Бурлакова, *Вестн. РАН* **1994**, 64 (5), 425–431.
2. L. N. Shishkina, Ye. V. Kushnireva, M. A. Smotryaeva, *Oxidation Commun.* 2001, 24 (2), 276–286.
3. V. R. Zhernovkov, I. A. Roshchina, G. M. Zubareva, G. P. Shmatov, B. V. Lokshin, N. P. Pal'mina, *Water*, **2010**, 27 (April), 58–68.
4. Ye. B. Burlakova, N. P. Pal'mina, Ye. L. Mal'tseva, In: *Membrane Lipid Oxidation* (Ed. C. Vigo-Pelfrey), **1991**, Boca Raton & Ann Arbor: CRC Press, V/ III, 209–237.
5. Л. Н. Шишкина, Е. В. Кушнирева, М. А. Смотряева, *Ради-ац. биология. Радиоэкология* **2004**, 44 (3), 289–295.
6. L. N. Shishkina, M. A. Klimovich, M. V. Kozlov, In: *Pharmaceutical and Medical Biotechnology: New Perspectives* (Eds. R. Orlicki, C. Cienciala, L. P. Krylova, J. Pielichowski, G. E. Zaikov), **2013**, Nova Science Publishers: N.Y., Chapter 14, pp. 151–158.
7. Е. Б. Меньщикова, Н. К. Зенков, *Успехи совр. биологии*, **1993**, 13 (4), 442–455.
8. Л. Н. Шишкина, Е. Б. Бурлакова, в кн.: *Панорама современной химии России. Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. Том 2. Биологическая кинетика*, **2005**, Химия, М., 365–395.
9. Н. В. Хрустова, М. В. Козлов, Л. Н. Шишкина, *Биофизика*, **2011** 56 (4), 668–672.
10. Ю. И. Скурлатов, Е. В. Штамм, Л. Н. Шишкина, А. В. Рощин, В. О. Швыдкий, Л. В. Семеняк, *Хим. физика*, **2020** 39 (2), 50–57.
11. Л. Н. Шишкина, М. А. Климович, М. В. Козлов, *Биофизика*, **2014**, 59 (2), 380–386.
12. A. G. Kudyashrva. L. N. Shishkina, O. G. Shevchenko, L. A. Bashlykova, N. G. Zagorskaya, *J. Environ. Radioactivity*, **2007**, 97, 30–41.

13. М. А. Климович, К. Ф. Сергейчев, Д. М. Карфидов, Н. А. Лукина, Л. Н. Шишкина, *Технологии живых систем*, **2010**, 7 (8), 17–29.

14. Л. Н. Шишкина, А. Г. Кудяшева, Н. Г. Загорская, О. Г. Шевченко, А. И. Таскаев, *Радиац. биология. Радиоэкология*, **2011**, 51 (1), 185–200.

15. Л. Н. Шишкина, М. В. Козлов, А. Ю. Повх, В. О. Швыдкий, *Хим. физика*, **2021**, 40 (9), 57–63.

16. Л. Н. Шишкина, М. В. Козлов, Л. И. Мазалецкая, А. Ю. Повх, В. О. Швыдкий, Н. И. Шелудченко, *Хим. физика*, **2020**, 39 (6), 52–58.

17. L. N. Shishkina, M. V. Kozlov, L. I. Mazaletskaia, N. V. Khrustova, and N. I. Sheludchenko, In: *Antioxidants in Systems of Varying Complexity: Chemical, Biochemical and Biological Aspects* (Eds. L. N. Shishkina, A. N. Goloshchapov, L. I. Weisfeld), **2020**,

18. Л. Н. Шишкина, А. С. Дубовик, М. В. Козлов, А. Ю. Повх, В. О. Швыдкий, *Актуальные вопросы биолог. Физики и химии*, **2022** 7 (1), 169–165.

19. Л. Н. Шишкина, Л. И. Мазалецкая, М. В. Козлов, Н. И. Шелудченко, *Изв. АН. Сер. хим.*, **2023**, 72 (8), 1876–1886.

20. V. Shvydkiy, S. Dolgov, A. Dubovik, M. Kozlov, A. Povkh, L. Shishkina, G. Duca, *Chemistry J. Moldova*, **2022**, 17 (2), 35–42.

21. Л. Н. Шишкина, А. С. Дубовик, В. О. Швыдкий, М. В. Козлов, Е. В. Штамм, А. Г. Георгиади, *Биофизика*, 2024, 69 (2), 341–348.

22. ЕВ/ Сальникова, В. И. Сальников, П. Ч. Аманов, А. А. Юдин, *Universum: химия и биология; электрон. Журнал*, **2017**, № 7 (37). 7univrtsum.com/ru/nature/authors/4910.

23. И. Н. Симонова, М. В. Антонюк, в кр.: *Роль техногенного загрязнения воздушной среды в развитии бронхолегочной патологии*, **2015**, Здоровье. Медицинская экология. Наука, 1 (59), 14–20.

24. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Trichloroethylene, tetrachloroethylene, and some other chlorinated agents. Lyon, France; **2014**. Vol. 106

25. C. I. Falcon-Rodriguez, A. R. Osornio-Vargas, I. Sada-Ovalle, P. Segura-Medina, *Front. Immunol.*, **2016**; 7, 3. DOI: 10.3389/fimmu.2016. 00003

26. Y. F. Xing, Y. H. Xu, M. H. Shi, Y. H. Lian, *J. Thorac. Dis.*, **2016**, 8 (1), e69-74. DOI: 10.3978/j.issn.20721439.2016. 01.19.

МАТЕРИАЛОВЕДЕНИЕ

Композиты, биокompозиты, наноструктуры, полимеры, фотоэнергетика

15. ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕТОДОВ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ НОВЫХ МАТЕРИАЛОВ И ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ И СВОЙСТВ

Д.Г. Квашини¹

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

На сегодняшний день низкоразмерные наноматериалы представляют собой перспективную платформу для создания нанобъектов, имеющих потенциал для использования в широком диапазоне применений: оптике, гибкой (носимой) электронике, сенсорике, катализе, биоинженерии, регенеративной медицине и др. Препятствием на пути к повсеместному применению вновь синтезируемых наноматериалов различного химического состава является чрезвычайная сложность и дороговизна экспериментального исследования особенностей их структуры при различных условиях синтеза, а также их низкая стабильность в окружающей среде при нормальных условиях.

Таким образом, полное понимание о структуре и свойствах материала, а также перспектив их применения невозможно без проведения теоретических исследований и описания новых физико-химических эффектов с помощью современных вычис-

лительных алгоритмов. Кроме того, теоретические исследования в области низкоразмерных наноматериалов приоритетны как в мировой, так и в отечественной науке, о чем свидетельствует пункт 7 из списка критических технологий Российской Федерации: Компьютерное моделирование наноматериалов, наноустройств и нанотехнологий.

Синтез нового материала — оксинитрида бора

Снижение размерности материалов приводит к значительным изменениям в свойствах материала, что может открыть новые перспективные области применения низкоразмерных материалов в различных областях науки и технологий. Запрещенная зона играет решающую роль в оптических и электронных свойствах полупроводниковых материалов. Создание новых материалов с подходящими электронными спектрами является задачей с высоким приоритетом во многих областях, таких как фотоэлектричество, создание транзисторов и датчиков, фотосинтез, фотолюминесценция и т. д. [1–3]. Изменения электронной структуры материала в физике твердого тела обычно достигается допированием сторонними атомами [4, 5]. Ранее теоретически было доказано, что соединение диэлектрического монослоя гексагонального нитрида бора (h-BN) с полуметаллическим графеном позволит создать материал состава B-C-N с изменяемой запрещенной зоной. Однако на практике эта интересная теоретическая концепция сталкивается с многочисленными трудностями. Дело в том, что при высоких температурах компоненты BN и графена стремятся разделиться, поэтому гомогенное смешивание их в гексагональной решётке является термодинамически невыгодным процессом [6, 7]. Этот факт ограничивает структурное разнообразие сплавов BCN для

точного изменения электронной структуры и/или другой корректировки свойств материала.

Другим способом изменить электронную и магнитную структуру является введение атомов кислорода в решетку *h*-BN [8]. Ранее научные группы С. Х. Хонга (S. H. Hong) и Д. Гольберга (D. Golberg) сообщили, что функционализированные по краям листы BN проявляют чувствительность в ультрафиолетовой и ближней УФ-областях [9, 10]. Все эти факты говорят о том, что функционализация кислородом является альтернативным путем для изменения электронной структуры *h*-BN. Кроме кислорода, для изменения запрещенной зоны *h*-BN могут быть использованы многие другие примесные атомы и функциональные группы включая Н, F и др. [11, 12]. Однако стоит заметить, что такие атомы не могут быть идеально внедрены в кристаллическую решетку *h*-BN.

Данное исследование посвящено поэтапному изучению контролируемого изменения электронных свойств *h*-BN путем функционализации кислородом, включая внутреннее замещение *h*-BN и краевое гидроксильное окисление [13].

С помощью теории функционала электронной плотности было предсказано снижение ширины запрещенной зоны монослоя *h*-BN после допирования его кристаллической структуры атомами кислорода. Ширина запрещенной зоны чистого *h*-BN составила 4,56 эВ (Рис. 1а). Полученное значение соответствует ранним работам [14, 15]. Необходимо отметить, что теоретически рассчитанное значение запрещенной зоны (при помощи DFT) занижено по сравнению с экспериментально полученным из-за недоучета ошибки электрон-электронного взаимодействия [16].

На Рис. 1а показана зависимость ширины запрещенной зоны для периодических монослойных нанолитов BNO от концентрации кислорода. Был рассмотрен режим регуляр-

ного случайного замещения (замещение атомов N на атомы O) вместо других специфических расположений, таких как формирование цепей O-B-O. Рассчитанное значение ширины запрещенной зоны убывает монотонно от 4,56 до 4,34 эВ с увеличением концентрации O от 0 до 16,7 ат.%. Случай замещения атомов B был исключен из-за того, что такое замещение приводит к структурной деформации и нестабильности BN-листа [17].

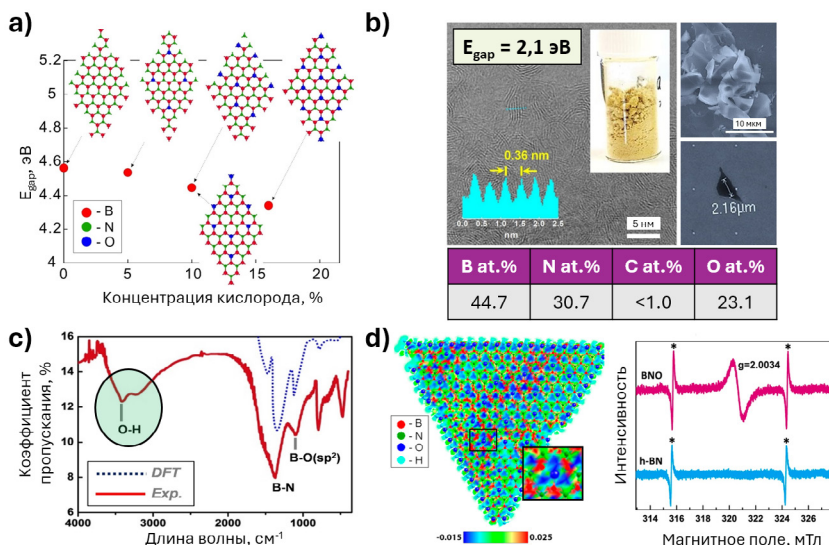


Рисунок 1. (а) Зависимость ширины запрещенной зоны от концентрации внедренного кислорода (в режиме беспорядочного допирования) в бесконечном монослое h-BN. (б) ПЭМ-изображение синтезированного материала BNO. На вставке представлен профиль интенсивности положений, соответствующий отмеченной голубой пунктирной линии области, а также фотография синтезированного образца BNO. (с) сравнение экспериментального ИК-спектра и смоделированного методом DFT. Моделирование DFT основано на двумерной периодической модели наноструктуры BNO с 10 ат.% кислорода. (д) Рассчитанная карта изменения плотности заряда и цвета соответствующих атомов приведены на вставке, сравнение ЭПР-спектров порошков синтезированного BNO и h-BN. Звездочками отмечены сигналы от метки Mn^{2+} .

На основе полученных результатов в национальном институте материаловедения (NIMS) в г. Цукуба, Япония был успешно синтезирован оксинитрид бора (порошок желтого цвета) с высоким содержанием кислорода около 23,1 ат.% (Рис. 1 Результаты СЭМ и ПЭМ порошкообразного продукта показали чешуйчатую морфологию с размером каждой чешуйки от субмикронметра до 10 мкм. Результаты ПЭМ высокого разрешения и XRD-анализ показывают слоистый характер материала, описанным в ранних работах о пористых твердотельных BN-материалах [18, 19]. Количественный EDX-элементный анализ подтверждает присутствие В, N и О с очень незначительной примесью атомов С в продукте.

ИК-спектроскопия использовалась для более глубокого понимания природы связывания в полученном BNO-образце. На Рис. 1 показано сравнение ИК-спектров, полученных экспериментально (красная кривая) и с помощью DFT (синяя пунктирная кривая). Получено, что для модели BNO с содержанием кислорода 10 ат.% DFT расчеты корректно описывают основные максимумы, ответственные за валентные колебания, расположенные в диапазоне частот от 1000 до 1500 см^{-1} . Однако экспериментальные данные также демонстрируют дополнительные сигналы сильного поглощения на частоте 3410 см^{-1} , которые приписываются валентным колебаниям связи О-Н [10], которые не были получены с помощью DFT. Предложенная модель представляла двумерную периодическую модель наноструктуры BNO. Наличие пика поглощения на частоте 3410 см^{-1} свидетельствует о наличии краевого гидроксирования полученных образцов. В результате была рассмотрена непериодическая модель монослоя BNO (нанохлопьев), в которой края были функционализированы сопряженными-ОН группами (Рис. 1d). Концентрация кислорода в таких рассмотренных моделях составляла 12,5 ат.% и 25 ат.%. На основании

рассчитанных уровней НОМО и LUMO для конечных нанохлопьев BNO можно сделать вывод о формировании электронных уровней и минизон вблизи уровня Ферми. Ширина ближайшей запрещенной зоны составила $\sim 3,8$ эВ, что намного меньше, чем в периодическом монослое h-BN. Как ожидалось, увеличение кислорода до 25 ат.% в конечной структуре BNO приводит к дальнейшему уменьшению разности НОМО-LUMO до $\sim 1,7$ эВ (Рис. 1d). Полученное низкое значение запрещенной зоны делает такие нанобъекты превосходным материалом для абсорбции света в УФ- и в видимом диапазоне длин волн.

Наряду с замещением атомов N на O в решетке h-BN, ожидается присутствие неспаренных электронов и возникновение соответствующего парамагнетизма. Для этого было рассчитано изменение плотности заряда (разница между плотностью валентного заряда всей структуры, представленной на Рис. 1d и суммой атомных плотностей валентного заряда) BNO-наночешуйки с 20 ат. % кислорода. На Рис. 1b изображен плоский профиль плотности заряда. Наблюдаемое распределение содержит локализованный отрицательный заряд (синий цвет) в области примесного атома кислорода, вызванный дополнительными электронами на атоме кислорода относительно удаленного азота. Основываясь на результатах, полученных с помощью компьютерного моделирования были проведены экспериментальные ЭПР измерения. Был обнаружен сильный ЭПР-резонансный сигнал в магнитном поле ~ 320 мТ с вычисленным значением g-фактора 2,0034 (Рис. 1). Эти результаты демонстрируют существование свободных электронов в синтезированном материале BNO, предсказанные с помощью DFT (Рис. 1), в то время как для стандартного соединения h-BN такой резонансный пик не был обнаружен.

Стоит отметить, что до сих пор остается неизвестной точная атомная структура оксинитрида бора. В 2022 году нами была

предложена попытка с помощью эволюционного алгоритма USPEX [20, 21] предсказать кристаллическую структуру слоистого BNO в зависимости от концентрации кислорода. По результатам работы алгоритма были предсказаны 3 стабильных и 6 метастабильных соединений. Внедрение атомов кислорода привело к тому, что все предсказанных структуры содержали большое количество дефектов. Опираясь на имеющиеся экспериментальные данные [13] была определена наиболее вероятная структура BNO, которая имеет химическую формулу $B_5N_3O_2$.

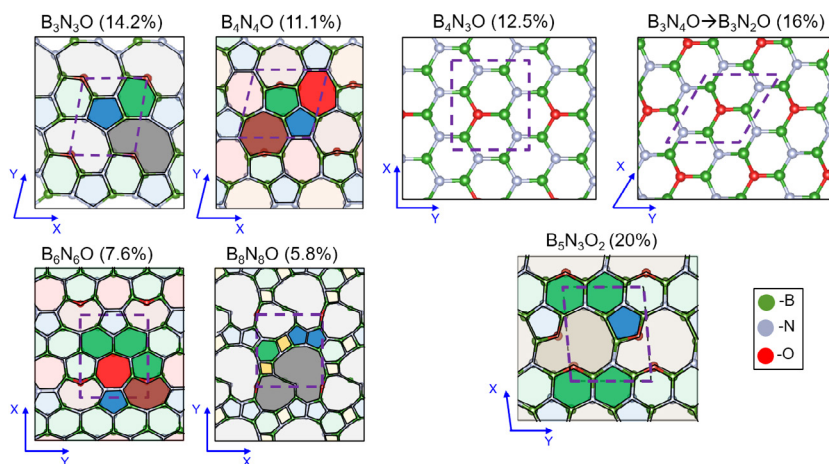


Рисунок 2. Предсказанные кристаллические структуры BNO с различной концентрацией атомов кислорода и составных компонентов (рисунок из статьи [22]).

Для новой структуры были рассчитаны ее физико-химические свойства, показана ее термодинамическая и термическая стабильности, а также полупроводниковые свойства [22].

Полученные в данной работе результаты открывают новый практический путь для разработки и синтеза стабильных

наноразмерных полупроводниковых структур на основе ВН с контролируемыми электронными свойствами. Такие структуры являются перспективными для применения в различных областях физики, таких как оптика, электроника, магнетизм, а также в областях, связанных с хранением энергии, фотодинамической терапии раковых заболеваний и адресной доставки лекарств.

Описание процессов трансформации структуры и свойств ОУНТ в ходе экспериментального создания внутримолекулярного соединения

Хиральность или спиральность — фундаментальная и интересная особенность углеродных нанотрубок (УНТ) [23]. В некотором смысле спиральная структура УНТ напоминает спиральную структуру ДНК [24]. В то время как генетическая информация жизни закодирована в последовательности ДНК, спиральность УНТ определяет, будет ли он металлическим или полупроводниковым [25]. Полупроводниковые УНТ продемонстрировали превосходные характеристики в энергоэффективных нанотранзисторах [26] и являются перспективными для создания микропроцессоров за пределами кремния [27]. Однако, несмотря на успехи в селективном росте и разделении [28], эффективный контроль хиральности по-прежнему отсутствует, что препятствует практическому применению [27].

Поскольку электронная структура неразрывно зависит от молекулярной и кристаллической структур, механическая деформация может изменять электронные свойства [29]. Теоретически, прикладывая пластическую деформацию для изменения хиральности, можно изменять электронные свойства УНТ, например, превращать их из металлических

в полупроводниковые [30]. Экспериментально сообщалось о модификации хиральности УНТ путем пластической деформации [31], однако эффективного контроля над преобразованиями хиральности не было, и они рассматривались как случайные скачки из-за малых энергетических различий в различных хиральных структурах [32, 33].

В данной работе представлены результаты исследования по разработке и изготовлению транзистора с внутримолекулярным переходом на основе отдельной УНТ, в которой локальная спиральность была изменена с помощью программируемой деформации, концептуально схожей с генной инженерией целевых сегментов ДНК. Переход от металла к полупроводнику был реализован для изготовления транзисторов из УНТ с использованием сегмента с измененной хиральностью в качестве полупроводникового канала, ковалентно связанного между выводами истока и стока металлической трубки (Рис. 2а). Крайне интересным результатов экспериментальной работы являлось нетривиальное изменение индекса хиральности УНТ при ее пластической деформации. Интересно отметить, что наблюдаемая тенденция к увеличению противоположна предыдущим теоретическим предсказаниям [30], где дислокации, зарождающиеся из дефектов Стоуна-Троуера-Уэльса (STW) [34], энергетически более выгодны, что приводит к уменьшению угла хиральности (Рис. 2b). Экспериментальные условия предполагают, что УНТ подвергаются воздействию высокой температуры от Джоулевского нагрева, сопровождающегося медленным удлинением в квазистатическом процессе.

Основываясь на экспериментальных наблюдениях нашими коллегами из НИТУ МИСиС была разработана теоретическая модель, которая учитывала испарение димеров углерода в процессе пластической деформации УНТ из-за высокой темпера-

туры, вызванной Джоулевым нагревом УНТ. Данное предположение не было принято во внимание в ранних теоретических работах по изучению пластической деформации УНТ.

С помощью DFT была рассчитана энергия образования дефектов 5-8|5, которая демонстрирует, что при малом угле хиральности дислокация (1,0) энергетически более предпочтительна. Для предсказания динамики хиральности было рассчитано отношение вероятностей образования (1,0) и (0,1) дислокаций, которое показывает возрастающую зависимость угла хиральности, что согласуется с экспериментальными наблюдениями (Рис. 2b).

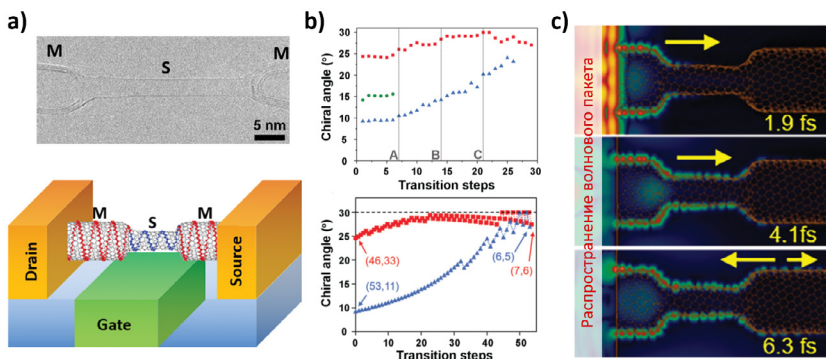


Рисунок 3. (а) ТЕМ-изображение внутримолекулярного транзистора SWCNT с длиной канала $\sim 2,8$ нм (сверху). Схема внутримолекулярного транзистора SWCNT с полупроводниковым каналом между двумя металлическими выводами нанотрубок (снизу). (b) Экспериментальное (сверху) и теоретическое (снизу) изменение углов хиральности нанотрубок при пластических деформациях. (с) Атомная модель соединения УНТ (22,4)/(9,4)/(22,4) со снимками временной эволюции электронного волнового пакета при прохождении через соединение.

Для детального исследования и объяснения особенностей транспортных свойств полученных внутримолекулярных соединений УНТ нами было изучено прохождение

электронного волнового пакета через два соединения УНТ с диаметрами, полученными экспериментально (Рис. 2с). На Рис. 2с показаны снимки распространения волнового пакета через соединения УНТ (22,4)/(9,4)/(22,4), демонстрирующие пропускание, отражение и интерференцию электронных волн. Пространственные распределения волновых функций демонстрируют локализованные состояния, обусловленные геометрическим ограничением центрального сегмента. Наблюдение четкой квантовой интерференции при комнатной температуре объясняется большей шириной запрещенной зоны центрального сегмента с измененной хиральностью и, что важно, уменьшением рассеяния электронов на ковалентно связанном переходе нанотрубки. По результатам теоретических и экспериментальных исследований данное устройство было названо Квантовым интерферометром Фабри-Перо. Результаты исследования были опубликованы в журналах *Ultramicroscopy* в 2018 году и *Science* в 2021 году [32, 35].

Ссылки

Ссылки на статьи в международных журналах (Авторы, Журнал год, том, страницы):

1. K. S. Novoselov, A. Mishchenko, A. Carvalho, A. H. C. Neto, *Science*, **2016**, 353, aac9439.
2. J. Liu, H. Wang, M. Antonietti, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, 45, 2308-2326.
3. M. Chhowalla, H. S. Shin, G. Eda, L.-J. Li, K. P. Loh, H. Zhang, *Nat. Chem.*, **2013**, 5, 263-275.
4. E. F. Schubert, *Doping in III-V Semiconductors* (New Jersey, Cambridge University Press., **2005**; <http://www.cambridge.org/catalogue/catalogue.asp?isbn=9780521419192>).

5. L. Ci, L. Song, C. Jin, D. Jariwala, D. Wu, Y. Li, A. Srivastava, Z. F. Wang, K. Storr, L. Balicas, F. Liu, P. M. Ajayan, *Nat. Mater.*, **2010**, 9, 430-435.
6. M. P. Levendorf, C.-J. Kim, L. Brown, P. Y. Huang, R. W. Havener, D. A. Muller, J. Park, *Nature*, **2012**, 488, 627-632.
7. J. Lu, K. Zhang, X. F. Liu, H. Zhang, T. C. Sum, A. H. C. Neto, K. P. Loh, *Nat. Commun.*, **2013**, 4, 2681.
8. Q. Weng, X. Wang, X. Wang, Y. Bando, D. Golberg, *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, 45, 3989-4012.
9. D. Lee, B. Lee, K. H. Park, H. J. Ryu, S. Jeon, S. H. Hong, *Nano Lett.*, **2015**, 15, 1238-1244.
10. Q. Weng, Y. Ide, X. Wang, X. Wang, C. Zhang, X. Jiang, Y. Xue, P. Dai, K. Komaguchi, Y. Bando, D. Golberg, *Nano Energy*, **2015**, 16, 19-27.
11. C. Tang, Y. Bando, Y. Huang, S. Yue, C. Gu, F. Xu, D. Golberg, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 6552-6553.
12. X. Li, J. Zhao, J. Yang, *Sci. Rep.*, **2013**, 3, 1858.
13. Q. Weng, D. G. Kvashnin, X. Wang, O. Cretu, Y. Yang, M. Zhou, C. Zhang, D.-M. Tang, P. B. Sorokin, Y. Bando, D. Golberg, *Adv. Mater.*, **2017**, 29, 1700695-1700712.
14. X. Blase, A. Rubio, S. G. Louie, M. L. Cohen, *Phys. Rev. B*, **1995**, 51, 6868-6875.
15. A. Bhattacharya, S. Bhattacharya, G. P. Das, *Phys. Rev. B*, **2012**, 85, 035415.
16. P. J. Hasnip, K. Refson, M. I. J. Probert, J. R. Yates, S. J. Clark, C. J. Pickard, *Phil Trans R Soc A*, **2014**, 372, 20130270.
17. L. A. Silva, S. C. Guerini, V. Lemos, J. M. Filho, *IEEE Trans. Nanotechnol.*, **2006**, 5, 517-522.
18. Q. Weng, X. Wang, C. Zhi, Y. Bando, D. Golberg, *ACS Nano*, **2013**, 7, 1558-1565.
19. Q. Weng, X. Wang, Y. Bando, D. Golberg, *Adv. Energy Mater.*, in press, doi:10.1002/aenm.201301525.

20. C. W. Glass, A. R. Oganov, N. Hansen, *Comput. Phys. Commun.*, **2006**, *175*, 713–720.
21. A. O. Lyakhov, A. R. Oganov, H. T. Stokes, Q. Zhu, *Comput. Phys. Commun.*, **2013**, *184*, 1172–1182.
22. Z. I. Popov, K. A. Tikhomirova, V. A. Demin, S. Chowdhury, A. R. Oganov, A. G. Kvashnin, D. G. Kvashnin, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **2021**, *23*, 26178–26184.
23. S. Iijima, *Nature*, **1991**, *354*, 56–58.
24. J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature*, **1953**, *171*, 737–738.
25. R. Saito, M. Fujita, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, *Appl. Phys. Lett.*, **1992**, *60*, 2204–2206.
26. C. Qiu, Z. Zhang, M. Xiao, Y. Yang, D. Zhong, L.-M. Peng, *Science*, **2017**, *355*, 271–276.
27. G. Hills, C. Lau, A. Wright, S. Fuller, M. D. Bishop, T. Srimani, P. Kanhaiya, R. Ho, A. Amer, Y. Stein, D. Murphy, Arvind, A. Chandrakasan, M. M. Shulaker, *Nature*, **2019**, *572*, 595–602.
28. J. R. Sanchez-Valencia, T. Dienel, O. Gröning, I. Shorubalko, A. Mueller, M. Jansen, K. Amsharov, P. Ruffieux, R. Fasel, *Nature*, **2014**, *512*, 61–64.
29. T. Zhu, J. Li, *Prog. Mater. Sci.*, **2010**, *55*, 710–757.
30. B. I. Yakobson, **19980223**.
31. J. Y. Huang, S. Chen, Z. Q. Wang, K. Kempa, Y. M. Wang, S. H. Jo, G. Chen, M. S. Dresselhaus, Z. F. Ren, *Nature*, **2006**, *439*, 281–281.
32. D.-M. Tang, D. G. Kvashnin, O. Cretu, Y. Nemoto, F. Uesugi, M. Takeguchi, X. Zhou, F.-C. Hsia, C. Liu, P. B. Sorokin, N. Kawamoto, M. Mitome, H.-M. Cheng, D. Golberg, Y. Bando, *Ultramicroscopy*, **2018**, *194*, 108–116.
33. E. S. Penev, V. I. Artyukhov, B. I. Yakobson, *ACS Nano*, **2014**, *8*, 1899–1906.
34. A. J. Stone, D. J. Wales, *Chem. Phys. Lett.*, **1986**, *128*, 501–503.

35. D.-M. Tang, S. V. Erohin, D. G. Kvashnin, V. A. Demin, O. Cretu, S. Jiang, L. Zhang, P.-X. Hou, G. Chen, D. N. Futaba, Y. Zheng, R. Xiang, X. Zhou, F.-C. Hsia, N. Kawamoto, M. Mitome, Y. Nemoto, F. Uesugi, M. Takeguchi, S. Maruyama, H.-M. Cheng, Y. Bando, C. Liu, P. B. Sorokin, D. Golberg, *Science*, **2021**, 374, 1616–1620.

16. НИЗКОРАЗМЕРНЫЕ МАГНЕТИКИ С КОНКУРИРУЮЩИМИ ОБМЕННЫМИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯМИ

В. Я. Кривнов, Д. В. Дмитриев

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

Обсуждены результаты теоретических и экспериментальных исследований магнитных свойств квазиодномерных соединений, состоящих из цепочек молекул с магнитными ионами. Рассмотрены модели некоторых классов этих соединений с конкурирующими ферро- и антиферромагнитными обменными взаимодействиями на геометрически фрустрированных решетках. Основное внимание уделено рассмотрению свойств основного состояния и низкотемпературной термодинамики и их зависимости от соотношения величин обменных взаимодействий. Показано, что при определенном значении этого отношения основное состояние макроскопически вырождено и энтропия при нулевой температуре конечна. Полученные результаты использованы для анализа магнитных свойств реальных соединений.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование магнитных свойств низкоразмерных систем (одномерных и квазиодномерных) вызывает в последнее время значительный интерес как с экспериментальной, так и с теоретической точек зрения. Это, в значительной мере, связано с успехами в синтезе низкоразмерных магнетиков. В этих соединениях магнитные ионы образуют цепочки, разделенные органическими или неорганическими комплексами.

Вследствие такой структуры обменные взаимодействия внутри цепочек значительно сильнее межцепочечных и поэтому базовыми для описания таких систем служат одномерные спиновые модели.

К настоящему времени синтезировано большое количество квазиодномерных соединений, в которых обменное взаимодействие между соседними ионами является антиферромагнитным и значительно сильнее взаимодействий несоседних ионов. Примерами таких соединений являются, например, KCuF_3 , Sr_2CuO_3 , CuGeO_3 . В этих соединениях магнитными являются ионы двухвалентной меди Cu^{2+} , имеющие спин $s=1/2$. Такая спиновая цепочка описывается точно решаемой одномерной моделью Гейзенберга, результаты которой прекрасно согласуются с экспериментальными данными. В частности, основное состояние таких систем антиферромагнитно и спиновые корреляции спадают с расстоянием степенным образом. Магнитные свойства и их температурные зависимости для этих соединений изучены достаточно подробно.

В последние годы был синтезирован другой, возможно более интересный, класс медноокисных соединений, состоящих из CuO_4 блоков с краевым зацеплением между ними. Такая структура приводит к тому, что обменное взаимодействие J_1 соседних ионов Cu^{2+} является ферромагнитным ($J_1 < 0$), а взаимодействие J_2 несоседних ионов - антиферромагнитным ($J_2 > 0$) и эти взаимодействия сравнимы по величине. К числу таких соединений относятся, например, $\text{Li}_2\text{ZrCuO}_4$, $\text{Rb}_2\text{Cu}_2\text{Mo}_3\text{O}_{12}$, Li_2CuO_2 , LiCu_2O_2 . Квантовая модель, описывающая эти системы, довольно сложна и ее свойства существенно зависят от отношения величин конкурирующих ферро- и антиферромагнитных взаимодействий α , $\alpha = J_2/J_1$. Основное состояние ферромагнитно при $\alpha < 1/4$ и антиферромагнитно при $\alpha > 1/4$ и это антиферромагнитное состояние имеет

спиральную спиновую структуру с периодом спирали, зависящим от α . Нами было показано, что температурная зависимость магнитной восприимчивости в этой фазе отличается от стандартной. Вообще, магнитные свойства этой модели и их температурная зависимость весьма необычны, и их теоретическое и экспериментальное изучение активно продолжается в настоящее время.

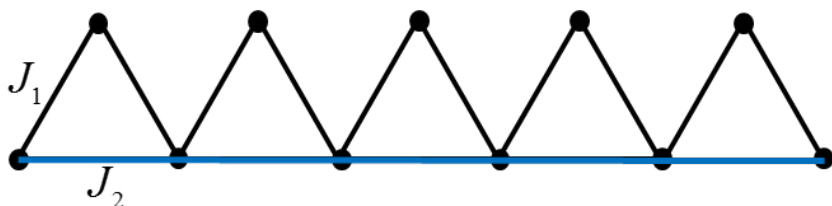


Рисунок 1. Спиновая модель дельта цепочки.

Большой интерес в последние годы вызывает изучение низкоразмерных магнетиков на геометрически фрустрированных решетках [1–3]. В отличие от альтернантных (например, квадратных или кубических) фрустрированные решетки нельзя разбить на две подрешетки так, чтобы узлы одной из них были связаны только с узлами другой. К числу фрустрированных относятся треугольная, гексагональная, гранецентрированная решетки, решетки кагоме, решетки типа пироксворд и др. Фрустрация в таких решетках означает невозможность одновременной минимизации энергии всех попарных взаимодействий (если только они не все ферромагнитны) выбором конфигурации спинов с параллельной или антипараллельной ориентацией. Важным классом магнетиков с фрустрацией являются соединения, состоящие из треугольных кластеров магнитных ионов. Типичным примером таких соединений является так называемая дельта-цепочка, представляющая собой линейную цепь треугольников с магнитными ионами в их вершинах (рис. 1).

Базовой моделью для описания магнитных свойств этих соединений является модель Гейзенберга с обменными взаимодействиями спинов магнитных ионов в узлах фрустрированной решетки, причем эти взаимодействия, вообще говоря, различны для разных пар соседних спинов и, как правило, имеются два разных обменных интеграла. Например, модель Гейзенберга для дельта-цепочки имеет вид:

$$\hat{H} = J_1 \sum \vec{S}_i \cdot \vec{S}_{i+1} + J_2 \sum \vec{S}_{2i-1} \cdot \vec{S}_{2i+1} \quad (1)$$

где спины основания треугольников и вершин имеют квантовые числа sb и sa соответственно, J_1 — обменное взаимодействие между спинами основания и вершин треугольников, а J_2 — взаимодействие между ближайшими спинами основания дельта-цепочки. Прямое взаимодействие между вершинными спинами отсутствует.

Магнитные свойства модели (1) с обоими антиферромагнитными (AF) взаимодействиями ($J_1 > 0$, $J_2 > 0$) и их зависимость от соотношения величин J_1 и J_2 были достаточно хорошо изучены, в особенности для случая $sa = sb = 1/2$ [2, 4–7]. В частности, если $J_1 = J_2$, то модель имеет двукратно вырожденное основное состояние, а пары спинов вершин и оснований треугольников образуют синглет. При $J_2 = J_1/2$ и магнитном поле близком к насыщению кривая намагниченности имеет плато со скачком намагниченности, а теплоемкость наряду с широким высокотемпературным максимумом имеет дополнительный низкотемпературный пик. Эти особенности поведения модели согласуются с экспериментальными данными для соединения $\text{YCuO}_{2.5}$, имеющего структуру дельта-цепочки с антиферромагнитными взаимодействиями.

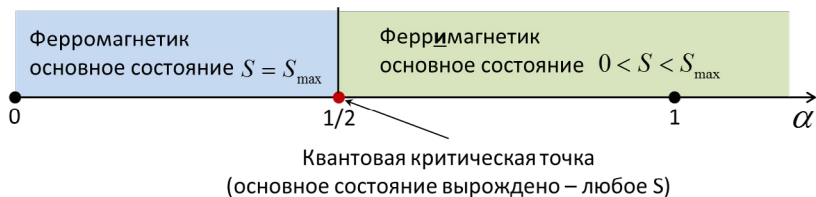


Рисунок 2. Фазовая диаграмма основного состояния F-AF дельта-цепочки (схематически).

В отличие от дельта-цепочки с обоими антиферромагнитными взаимодействиями эта же модель с ферромагнитным взаимодействием J_1 и антиферромагнитным J_2 ($J_1 < 0$, $J_2 > 0$) (F-AF модель) до недавнего времени была изучена существенно меньше даже для случая спинов $sa = sb = 1/2$. Было лишь известно, что основное состояние модели с $sa = sb = 1/2$ ферромагнитно, если параметр фрустрации $\alpha = J_2/|J_1|$ меньше $1/2$ и ферримагнитно при $\alpha > 1/2$. Критическая точка $\alpha_c = 1/2$ разделяет эти фазы (см. рис. 2).

Интерес к изучению F-AF дельта-цепочки существенно возрос после появления реальных соединений, описывающихся этой моделью. Примером такого рода соединений являются комплексы $[\text{CuH}_2\text{O}][\text{Cu}(\text{malH}_2\text{O})\text{ClO}_4]_2$, содержащие магнитные ионы Cu^{2+} со спином $1/2$ [8-9]. Другим примером соединений со структурой F-AF дельта-цепочки является флуорид $\text{Cs}_2\text{LiTi}_3\text{F}_{12}$. Очень интересным примером соединений, описывающихся моделью F-AF дельта-цепочки, являются недавно синтезированные циклические комплексы, содержащие магнитные молекулы $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$ с рекордным значением спина основного состояния молекулы, $S = 60$ [10].

В данной работе будут рассмотрены магнитные свойства F-AF модели и будет проведено сравнение полученных результатов с экспериментальными данными для соединения $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$.

МАГНИТНЫЕ СВОЙСТВА F-AF ДЕЛЬТА-ЦЕПОЧКИ

Как было отмечено выше, параметр фрустрации $\alpha=1/2$ разделяет ферро — и ферримангнитные фазы F-AF модели, т. е. это значение $\alpha_c=1/2$ соответствует квантовой критической точке модели. (В общем случае произвольных спинов sa и sb критическое значение параметра фрустрации $\alpha_c=sa/2sb$). Подробный анализ свойств модели в критической точке был дан в наших работах [11–16] и здесь мы кратко приведем основные результаты этих работ. Расчет энергии одно-магнонных состояний (в дальнейшем мы будем называть состояния со спином $S=(S_{\max}-k)$ k -магнонными состояниями) показывает, что их спектр является бездисперсионным (плоским) с нулевой энергией (мы будем отсчитывать энергию от энергии ферромагнитного состояния $S=S_{\max}$.) Бездисперсионность спектра означает наличие локализованных состояний, т. е. магнонов, «живущих» в ограниченной области решетки, в данном случае в долине между двумя соседними треугольниками. Это автоматически означает наличие точных k -магнонных неперекрывающихся (изолированных) состояний с нулевой энергией. Как показано нами в [11], в F-AF модели при $\alpha=\alpha_c$ все состояния с нулевой энергией принадлежат основному состоянию. Отметим, что подобные локализованные состояния существуют и в дельта-цепочке с антиферромагнитными взаимодействиями [2]. Однако, их энергии выше энергии основного синглетного состояния и они становятся основными только в магнитном поле близком к полю насыщения. Кроме того, наряду с много-магнонными изолированными состояниями в F-AF модели имеется еще один класс связанных состояний с нулевой энергией, построенный из перекрывающихся локализованных состояний. Таким образом, мы имеем уникальную ситуацию, когда к основному состоянию принадлежат ферромагнитное ($S=S_{\max}$), синглетное ($S=0$) и состояния со всеми промежуточными S . (Фазовая диаграмма

основного состояния схематически показана на рис. 2). Подсчет числа всех основных состояний с нулевой энергией представляет довольно сложную комбинаторную задачу, которая была решена нами в [11,12]. Для F-AF дельта-цепочки со спинами вершин и основания s_a и s_b , состоящей из N треугольников, полное число вырожденных состояний $W(N)$ модели при критическом значении параметра фрустрации $\alpha_c = s_a/2s_b$ равно:

$$W = (2s_a + 2s_b - 1)NC_N^{N/2} + 2^N \quad (2)$$

Например, для цепочки из 10 треугольников с $s_a = s_b = 1/2$ число вырожденных основных состояний равно 3545. В термодинамическом пределе, $N \gg 1$, $W \approx 2^N$. Таким образом, основное состояние экспоненциально (макроскопически) вырождено, а энтропия на спин при нулевой температуре, $T=0$, конечна и равна $\ln(2)/2 = 0.3465$ (в единицах k_B). Интересно отметить, что число изолированных магнонов, дающих вклад в основное состояние, равно $W_0 = (1.6180)^N$ и оно экспоненциально мало по сравнению с W . Это означает, что подавляющий вклад в число основных состояний вносят много-магнонные связанные комплексы.

Намагниченность (спин основного состояния) при нулевой температуре $T=0$ определяется усреднением величины S_z по ансамблю вырожденных основных состояний и магнитный момент на спин равен $m = \frac{1}{2}(s_a + s_b) - \frac{1}{4}$. Заметим, что в ферримагнитной фазе намагниченность m также равна этому значению, а в ферромагнитной фазе $m = \frac{1}{2}(s_a + s_b)$, т. е. при $\alpha = \alpha_c$ происходит скачок намагниченности $\Delta m = 1/4$. Таким образом, в критической точке происходит квантовый фазовый переход первого рода.

Дельта-цепочка в критической точке является одним из немногочисленных примеров многочастичной квантово-

механической системы с макроскопически вырожденным основным состоянием и остаточной энтропией.

Спектр возбужденных состояний модели в критической точке также весьма необычен. Например, в одномагнитном спиновом секторе $S=S_{\max}-1$ модели с $sa=sb=1/2$ щель ΔE в спектре возбуждений равна 1, а в двухмагнитном $S=S_{\max}-2$ она становится $\Delta E=0.022$. Такое резкое уменьшение величины щели связано с тем, что минимальной энергии возбуждения соответствуют не состояния рассеяния двух магнонов, а их связанные состояния. Низколежащие многомагнитные возбуждения также сформированы связанными состояниями и щель в спектре состояний с фиксированным значением спина $S=S_{\max}-k$ драматически уменьшается с ростом k . Например, щель $\Delta E < 10^{-9}$ уже при $k=6$. Это свидетельствует об экспоненциальной малости щели при $k \gg 1$. Подобно модели с $sa=sb=1/2$ щель в спектре возбуждений экспоненциально мала и в случае других sa и sb . Оказывается также, что полный спектр низжайших возбуждений состоит из участков (подзон), соответствующих энергиям связанных состояний двух, трех и т. д. магнонов. Другими словами, спектр имеет многомасштабную структуру, которая определяет особенности низкотемпературной термодинамики. Например, теплоемкость имеет пики, определяемые вкладом соответствующих подзон спектра (рис. 3).

Как следует из приведенных выше результатов, поведение F-AF дельта-цепочки в критической точке имеет ряд необычных свойств, касающихся прежде всего гигантского вырождения основного состояния и остаточной энтропии, экспоненциально малых щелей в спектре возбуждений и особенностей низкотемпературной термодинамики. Хотя все эти особенности относятся, строго говоря, к модели в самой критической точке, тем не менее, при значении параметра фрустрации близким к критическому «следы» этих особенностей все еще заметны.

Например, континуум вырожденных при $\alpha = \alpha_c$ основных состояний расщепляется при отклонении от критической точки и превращается в огромное число экспоненциально близких уровней, а спектр возбуждений имеет, хотя и менее выраженную, но многомасштабную структуру.

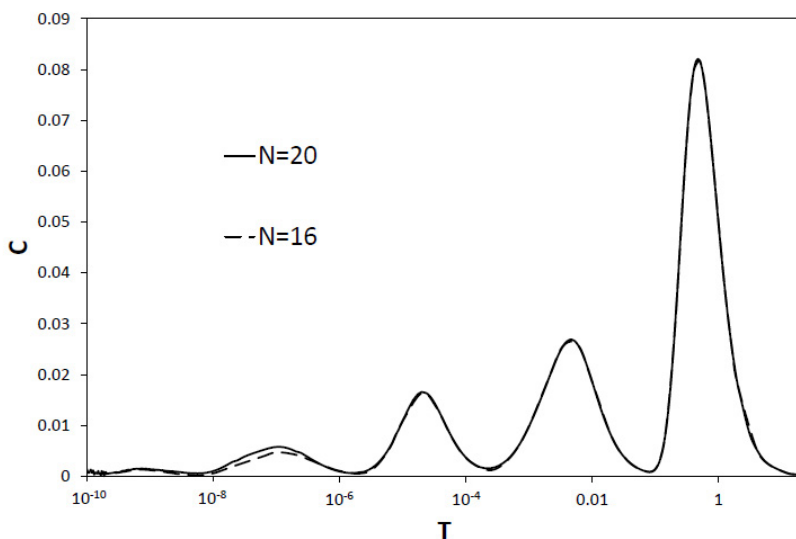


Рисунок 3. Зависимость теплоемкости от температуры для F-AF дельта-цепочки длиной $N=16$ и $N=20$ при критическом значении параметра фрустрации.

На первый взгляд, все необычные свойства модели при $\alpha \approx \alpha_c$ хотя и весьма интересны, но представляют скорее академический интерес, поскольку существование реальных соединений со структурой F-AF дельта-цепочки с параметром фрустрации близким к критическому представлялось маловероятным. Тем более неожиданным оказалось сообщение [10] о синтезе соединения, содержащего магнитные молекулы с рекордным на тот момент значением спина основного состояния, $S=60$! Эти мо-

лекулы представляют собой циклические координационные кластеры (рис. 4), в которых десять магнитных ионов Fe и десять ионов Gd образуют структуру циклической дельта-цепочки $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$, состоящей из десяти треугольников с ионами Gd в вершинах и ионами Fe в основаниях. Ожидается, что это соединение весьма перспективно для использования в молекулярной спинтронике и для создания эффективных магнитоохлаждающих устройств. Хорошо известно, что спиновые системы с макроскопически вырожденным основным состоянием демонстрируют значительный магнитокалорический эффект, т. е. охлаждение системы в результате адиабатической размагниченности. Стандартными материалами для магнитоохлаждения являются парамагнитные соли. Геометрически фрустрированные квантовые системы могут рассматриваться как альтернативные материалы для магнитоохлаждающих устройств. Мы показали [11], что дельта-цепочка с параметром фрустрации близком к $1/2$ характеризуется высоким значением скорости охлаждения $(dT/dh)_S$. Отметим, что в купратах $[\text{CuH}_2\text{O}]^*[\text{Cu}(\text{malH}_2\text{O})\text{ClO}_4]_2$ с $\alpha \approx 1$ было экспериментально продемонстрировано понижение спиновой температуры от 0.1K до 0.016K при изменении магнитного поля от 6 Т до нуля.

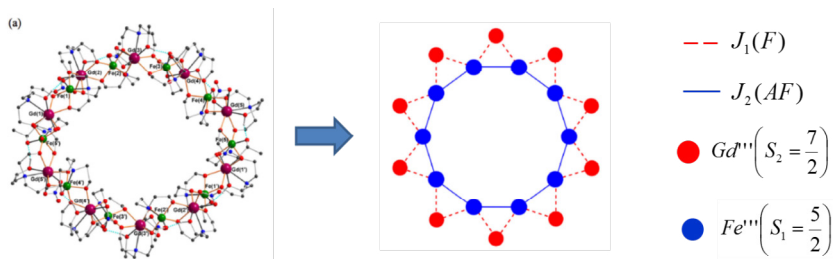


Рисунок 4. Соединение $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$.

Анализ экспериментальных данных для кривой намагниченности и магнитной восприимчивости соединений $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$

позволил установить [10], что обменное взаимодействие ионов Fe антиферромагнитно и составляет $J_2 \sim 0.65K$, а взаимодействие ионов Fe и Gd ферромагнитно с величиной $J_1 \sim 1K$, тогда как прямое взаимодействие между ионами Gd пренебрежимо мало. На основании этих данных можно заключить, что молекула $Fe_{10}Gd_{10}$ является практически идеальной конечно-размерной реализацией F-AF дельта-цепочки с параметром фрустрации $\alpha = J_2/J_1 = 0.65$. Поскольку спины магнитных ионов Fe (s_b) и Gd (s_a) равны $5/2$ и $7/2$ соответственно, критическое значение параметра фрустрации равно $\alpha_c = 0.7$. Таким образом, молекула $Fe_{10}Gd_{10}$ находится в ферромагнитной области фазовой диаграммы модели (что объясняет рекордное значение спина основного состояния), но очень близко к критической точке. Как предполагают авторы работы [10] химическая модификация молекулы $Fe_{10}Gd_{10}$ может сдвинуть ее параметр α прямо к критическому значению и даже пересечь его.

Таким образом, понимание магнитных свойств молекулы $Fe_{10}Gd_{10}$ связано с задачей исследования магнитных свойств дельта-цепочки в ферромагнитной фазе, но с параметром фрустрации близким к критическому. Точное аналитическое решение такой квантово-механической модели не представляется возможным, а относительно большие значения спинов ионов Fe и Gd серьезно ограничивают размеры системы доступной для численных расчетов. Даже высокоэффективные приближенные подходы на основе метода Ланцоша позволяют провести расчет лишь для гипотетической молекулы Fe_6Gd_6 . Эти расчеты показали, что даже для этой системы спектр низкоэнергетических состояний при $\alpha = 0.65$ имеет квазивырожденную структуру. В то же время, эта система слишком мала для исследования термодинамических свойств, особенно при низких температурах. С другой стороны, в случае относительно больших значений спинов $s_a = 7/2$, $s_b = 5/2$ представляет-

ся вполне оправданным использование классического приближения, когда спины заменяются векторами с длинами sa и sb . Легко убедиться в том, что значение критического параметра фрустрации, $\alpha_c = sa/2sb$, определяющего точку перехода между ферро- и ферримагнитными фазами, одно и то же в квантовом и классическом случаях.

Статистическая сумма и свободная энергия классической модели может быть вычислена точно [11,14,15] для любой длины дельта-цепочки, в том числе состоящей из 10 треугольников, как в молекуле $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$. Мы не будем останавливаться здесь на деталях этих вычислений и приводить соответствующие довольно громоздкие формулы, а обсудим некоторые наиболее важные особенности, относящиеся к магнитным свойствам модели в ферромагнитной фазе, которая реализуется для молекулы $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$. Одной из важных характеристик системы являются спиновые корреляционные функции, определяющие ее магнитные свойства. При нулевой температуре спины выстроены параллельно, т. е. имеется дальний порядок, который разрушается при $T \neq 0$ и корреляционные функции спадают экспоненциально с расстоянием между спинами и радиус корреляции $r_0 = 35(\alpha_c - \alpha)/2T$ при низких температурах. Такое поведение корреляторов определяет, в частности, реакцию системы на внешние возмущения. Например, намагниченность при низких температурах и малых магнитных полях ведет себя как $m = hr_0/T$ (h - безразмерное магнитное поле), а магнитная восприимчивость в нулевом поле $\chi_0 = (\partial m / \partial h)_{=0}$ как $\chi_0 = r_0/T$. Таким образом, можно ожидать, что классическое приближение вполне адекватно для описания магнитных термодинамических функций квантовой дельта-цепочки, по крайней мере, в ферромагнитной фазе. Действительно, полученная нами в классической модели зависимость $m(h, T)$ (при малых значениях h и T) хорошо согласуется

с экспериментальными данными, полученными в [10] для молекулы $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$. Интересно также сравнить низкотемпературное поведение восприимчивости $\chi = m/h$ с восприимчивостью молекулы $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$ в ненулевом поле. Ее температурная зависимость (точнее, зависимость величины χT), вычисленная в классическом приближении, показана на рис. 5. Она имеет максимум и затем падает до нуля. Кривая на рис. 5 очень хорошо воспроизводит экспериментальную зависимость для $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$, приведенную в [10]. В частности, максимум $(\chi T)_{\text{max}} \sim 720 \text{ cm}^3 \text{ K/mol}$ достигается при $T_{\text{max}} \sim 4 \text{ K}$ в сравнении с экспериментальными значениями $(\chi T)_{\text{max}} \sim 754 \text{ cm}^3 \text{ K/mol}$ при $T_{\text{max}} \sim 3 \text{ K}$.

Как мы отмечали выше, имеется ряд соединений типа F-AF дельта-цепочки с магнитными ионами со спином $s=1/2$ и параметром фрустрации $\alpha > 1/2$. Основное состояние квантовой модели этих соединений является магнито-упорядоченным (ферромагнитным). Численные расчеты показывают, что намагниченность в этой фазе равна половине максимальной. Аналитическое рассмотрение модели при α близком к $1/2$ едва ли возможно, но оно может быть проведено для больших значений параметра фрустрации. Соответствующие расчеты, проведенные нами [13] в рамках теории возмущений по $1/\alpha$ показали, что спин основного состояния S_{tot} равен

$$S_{\text{tot}} = \left(\frac{1}{2} + \frac{1}{\pi^2 \alpha} \right) n \quad (3)$$

т.е. отличается от половины максимально $S_{\text{max}} = n$ на малую величину. При этом магнитные моменты на узел основания цепочки и вершинной подсистемы равны $1/(\pi^2 \alpha)$ и $1/2$, соответственно. Хотя полученный результат относится к области боль-

ших α , можно ожидать, что спин основного состояния S_{tot} будет описываться этой формулой при всех $\alpha > 1/2$.

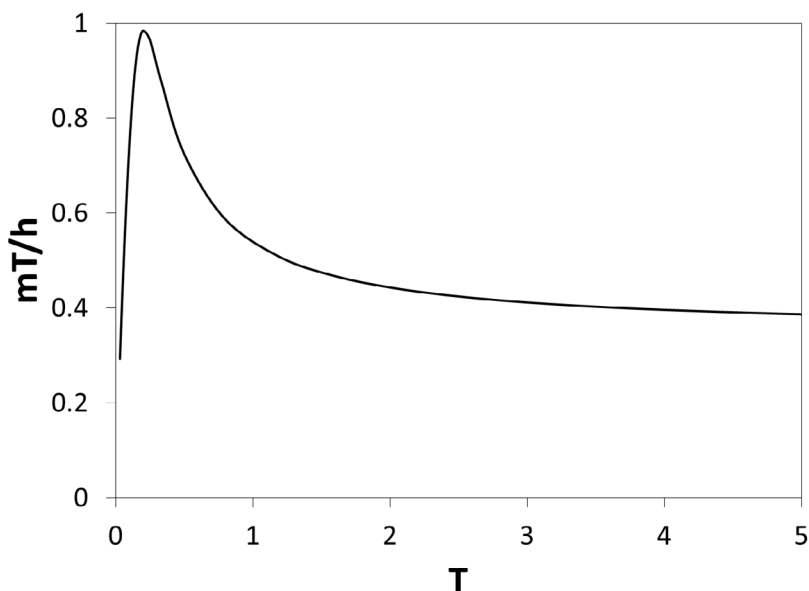


Рисунок 5. Зависимость величины mT/h от температуры для модели $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$

Еще одним из интересных примеров соединений, описывающих моделью F-AF дельта-цепочки, являются медно-оксидные соединения $\text{Ba}_3\text{Cu}_3\text{In}_4\text{O}_{12}$ и $\text{Ba}_3\text{Cu}_3\text{Sc}_4\text{O}_{12}$. В соответствующей модели спины вершин и основания равны $sa=1/2$, $sb=1$ и критическое значение параметра фрустрации $\alpha_c=1/4$. В критической точке основное состояние макроскопически вырождено. При $\alpha < \alpha_c$ основное состояние ферромагнитно. В соединениях $\text{Ba}_3\text{Cu}_3\text{In}_4\text{O}_{12}$ и $\text{Ba}_3\text{Cu}_3\text{Sc}_4\text{O}_{12}$ антиферромагнитное обменное взаимодействие мало и параметр фрустрации $\alpha \approx 0$, так что модель, описывающая эти соединения становится чисто ферромагнитной и она адекватно описывает магнитные

свойства указанных соединений. При $\alpha > \alpha_c$ F-AF дельта-цепочка с $sa=1/2$, $sb=1$ имеет более сложную фазовую диаграмму по сравнению с моделью, рассмотренной выше. Как показано нами в [17], в зависимости от значения α реализуются две ферромагнитные и две синглетные фазы. В одной из ферромагнитных фаз намагниченность на узел m равна $1/3$, а в другой $m=1/6$. Интересной особенностью модели является поведение кривой намагниченности $m(h)$ в синглетных фазах: кривые намагниченности имеют плато при определенном значении магнитного поля.

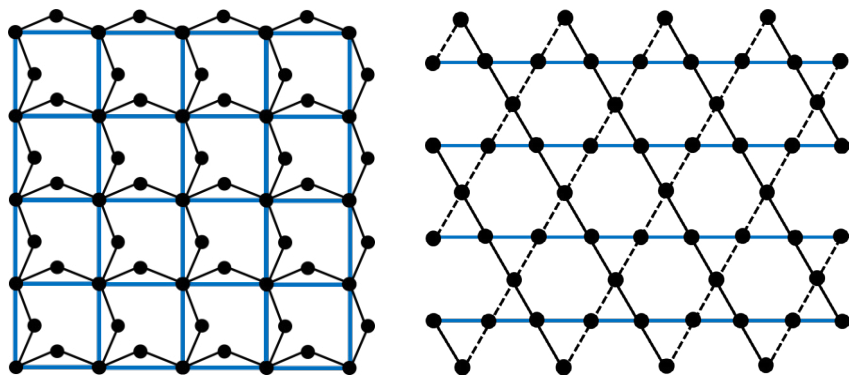


Рисунок 6. Двумерные решетки: кагоме (справа) и Тасаки (слева), черные и синие линии, соединяющие узлы решеток, соответствуют ферро- и антиферромагнитным взаимодействиям

Как было отмечено выше, F-AF дельта-цепочка с критическим значением параметра фрустрации имеет макроскопически вырожденное основное состояние, состоящее как из локализованных, так и связанных много-магнонных комплексов. Возникает вопрос о возможности такого вырождения в квантовых моделях на других геометрически фрустрированных решетках. В нашей работе [18] были рассмотрены модели с конкурирующими обменными ферро- и антиферромагнитными

взаимодействиями на некоторых двумерных решетках: решетке кагоме и решетке Тасаки (рис. 6). Последняя является двумерным обобщением дельта-цепочки. Как и в случае дельта-цепочки, существует критическое значение параметра фрустрации, при котором их основное состояние макроскопически вырождено и включает как изолированные, так и связанные много-магнанные комплексы. Полное число вырожденных основных состояний F-AF модели на решетках кагоме и Тасаки равно $W=1.461N^{1/6}$ и $W=1.54N^{1/3}$, соответственно (N – число узлов решетки). Как и в случае дельта-цепочки основной вклад в число основных состояний вносят связанные много-магнанные комплексы. Энтропия на узел конечна при нулевой температуре и равна $0.063k_B$ для кагоме решетки и $0.144k_B$ для решетки Тасаки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы изучили модель дельта-цепочки с ферро- и антиферромагнитными обменными взаимодействиями. Конкуренция взаимодействий приводит к фрустрации. Взаимное влияние квантовых эффектов и фрустрации приводит к ряду необычных свойств, которые проявляются особенно заметно при критическом значении параметра фрустрации. Основное состояние в этом случае макроскопически вырождено и имеется остаточная энтропия. Спектр возбуждений имеет экспоненциальную щель и многомасштабную структуру, которая проявляется в низкотемпературном поведении термодинамических величин. Недавно синтезированное циклическое соединение $Fe_{10}Gd_{12}$ является реализацией этой модели с параметром фрустрации близким к критическому и для описания ее магнитных свойств может быть использовано классическое приближение. Мы показали, что вычисленная кривая намагниченности хорошо

согласуется с экспериментальными данными при низких температурах, а максимум в температурной зависимости восприимчивости при фиксированном магнитном поле очень хорошо согласуется с экспериментально наблюдаемым.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. T. Diep, *Frustrated Spin Systems* (Singapore: World Scientific), **2013**.
2. O.Derzhko, J.Richter, M.Maksymenko, *Int. J. Modern Phys.* **2015**, 29, 1530007.
3. Д. В. Дмитриев, В. Я. Кривнов, *Хим.физика* **2009** 28(3), 24-30.
4. M. E. Zhitomirsky, H.Tsunetsugu, *Phys. Rev. B* **2004**, 100403.
5. J.Schnack, H.-J.Schmidt, J.Richter, J.Schulenberg, *Eur. Phys. J.B* **2001**, 24, 475.
6. J.Richter, J.Schulenburg, A.Honecker, J.Schnack, et al, *J. Phys.: Condens. Matter* **2004**, 6, S779.
7. O.Derzhko, J.Richter, *Phys. Rev.B* **2004**, 70, 104415.
8. C.Ruiz-Perez, M.Hernandez-Molina, P.Lorenzo-Luis et al., *Inorg. Chem.* **2000**, 39, 3845.
9. Y.Inagaki, Y.Narumi, K.Kindo, et al., *J. Phys.Soc. Jpn.* **2005**, 74, 2831.
10. A.Baniodeh, N, Magnani, Y.Lan et al., *npj Quantum Materials* **2018**, 3, 10.
11. V.Ya.Krivnov, D. V. Dmitriev, S.Nishimoto, S.-L.Drechsler, J. Richter, *Phys. Rev.B* **2014**, 90, 014441.
12. D. V. Dmitriev, V. Ya. Krivnov, *Phys. Rev.B* **2015** 82, 054407.
13. Д. В. Дмитриев, В. Я. Кривнов, *Хим.физика* **2021** 40 (2), 29-32.
14. D. V. Dmitriev, V. Ya. Krivnov, J.Richter, J.Schnack, *Phys. Rev.B* **2019** 99, 094410.

15. D. V. Dmitriev, V. Ya. Krivnov, J.Richter, J. Schnack, Phys. Rev.B **2020** 101, 054427.

16. O.Derzhko, J.Schnack, D, V.Dmitriev, V. Ya. Krivnov, J.Richter, European Physical Journal B **2020** 93, 161.

17. D. V. Dmitriev, V. Ya. Krivnov, Journal of Physics: Condensed Matter **2023** 35, 095802.

18. D. V. Dmitriev, V. Ya. Krivnov, Journal of Physics: Condensed Matter **2021** 33, 435802.

17. ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОСТРУКТУРЫ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СОВРЕМЕННЫХ МАТЕРИАЛОВ (ПОЛИМЕРОВ, КОМПОЗИТОВ, НАНОМАТЕРИАЛОВ) МЕТОДАМИ АКУСТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ.

В.М. Левин, Е.С. Мороков.

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

Существенным элементом современных исследований, как фундаментальных, так и прикладных, является изучение микроструктуры исследуемого объекта. Большинство методов микроструктурных исследований — оптическая, электронная, зондовая микроскопия и др.; позволяют наблюдать структуру объекта на его поверхности; их применение для изучения микроструктуры в объеме образцов связано с нарушением их целостности — получением срезов, изготовлением шлифов, сколов и т. д. Существуют лишь два подхода, реализующие визуализацию микроструктуры объектов без их разрушения — рентгеновская компьютерная микротомография и импульсная акустическая микроскопия.

Импульсная акустическая микроскопия является и доступным методом неразрушающей объемной визуализации. Она основывается на использовании зондирующих импульсов фокусированного высокочастотного ультразвука в диапазоне от 25 МГц до нескольких ГГц, обеспечивающем пространственное разрешение, латеральное и по глубине от десятков микрон до долей микрона.

Ультразвук проникает в объем подавляющего большинства материальных объектов. В случае фокусированного пучка па-

раметры отраженного или рассеянного излучения, регистрируемого в режиме на отражение, определяются взаимодействием зондирующего ультразвука с объектом в фокальной области пучка и, в конечном счете, микроструктурой и механическими свойствами объекта внутри этой области. Для визуализации объемной структуры используются длиннофокусные пучки, длина перетяжки которых сравнима с толщиной исследуемого объекта, и импульсные зондирующие сигналы, позволяющие разделять во времени эхо сигналы, отраженные на разной глубине. Набор эхо импульсов (т. н. А-скан), регистрируемых в точке наблюдения, сохраняется в памяти управляющего компьютера вместе с координатами точки наблюдения (Рис. 1). Он используется либо для измерения локальных геометрических (положение отражающей структуры по глубине) или упругих (локальное значение скорости звука и упругого модуля) характеристик объекта, либо для формирования акустических изображений. Изображения формируются растровым образом при сканировании зондирующим ультразвуковым пучком по поверхности объекта. В результате сканирования формируется многомерная база данных — 3D акустическое изображение микроструктуры объекта. Выделение эхо сигналов с определенным временем задержки с помощью т. н. электронных ворот позволяет выбирать эхо сигналы, отраженные на данной глубине внутри объекта в разных точках на его поверхности, и отображать их величину в градациях серого, формируя акустические изображения (т. н. С-сканы) структуры объекта на фиксированной глубине. Отображение (развертка) структуры эхо сигнала, регистрируемого внутри выделенного интервала времен задержки при одномерном сканировании объектива, т. н. В-скан, передает структуру образца в его поперечном сечении (Рис. 1). Трехмерная микроструктура объекта восстанавливается путем ее послойной визуализации (в виде набора С-сканов)

по глубине (микроакустическая томография). Измерение временных интервалов между эхо-импульсами, отраженными на разной глубине в объеме образца, лежит в основе микроакустической техники — метода измерения локальных значений скоростей звука и упругих модулей материала с помощью импульсов фокусированного ультразвука.

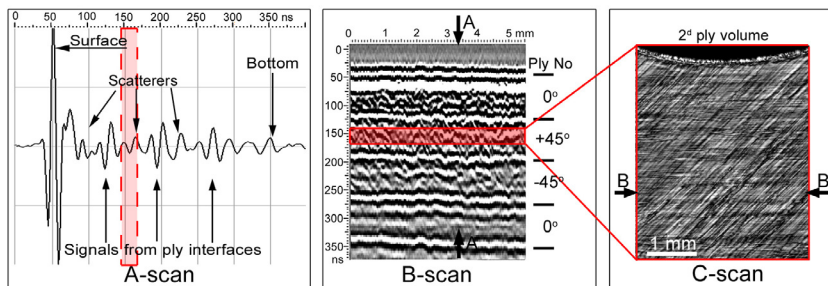


Рисунок 1. А-скан (эхограмма), В-скан (вертикальное сечение) и С-скан (горизонтальное сечение) 4-слойного ламината, полученные с помощью акустического микроскопа на частоте 100 МГц. АА- позиция А-скана, ВВ-позиция В-скана. Красная рамка на изображениях соответствует временному интервалу, отображающему расположение и толщину С-скана (из статьи [1]).

Импульсная акустическая микроскопия является доступным и эффективным инструментом для неразрушающего наблюдения микроструктуры и процессов микроструктурных изменений в объеме различных объектов. Институт биофизической физики им. Н. М. Эмануэля РАН (ИБХФ РАН) сегодня является одним из признанных мировых лидеров в развитии импульсной акустической визуализации высокого разрешения и методов ее использования для решения актуальных проблем современной науки и техники. Здесь создаются современные аппаратные средства импульсной акустической микроскопии, разрабатываются методики исследований; созданные методы и устройства используются для проведения

актуальных исследований. На Рис. 2 представлена линейка импульсных акустических микроскопов и специализированных приставок, разработанных в 2010–2023 гг. в ИБХФ РАН. Она включает версии исследовательских и полупромышленных микроскопов на диапазон частот от 50 до 200 МГц, а также версию с ЛЧМ зондирующим сигналом в диапазоне 50–1500 МГц.



Рисунок 2. Линейка импульсных акустических микроскопов, разработанная в ИБХФ РАН: исследовательский микроскоп SIAM-2010 (из статьи [2]); исследовательский микроскоп SIAM-2017 с приставкой для исследований мелких лабораторных животных (из статьи [3]); исследовательский микроскоп SIAM-2017совмещенный с горизонтальной машиной мех. нагружения (из статьи [1]); ЛЧМ акустический микроскоп SIAM-LFM. 1.

В последние годы значительные усилия коллектива исследователей ИБХФ РАН были сосредоточены на использовании техники ультразвуковой визуализации высокого разрешения для изучения дефектов внутренней микроструктуры Композитных материалов, в первую очередь, армированных углепластиков — carbon fiber reinforced composites (CFRC) [1,2, 4–12] и нанокомпозитов [13–17], а также для характеристики материалов и объектов тканевой инженерии и восстановительной медицины [18–26].

Основным вопросом материаловедения современных композитных материалов является совершенство упорядоченной структуры армирующих элементов (волокон) в изотропном матриксе; характер несовершенств, возникающих в процессе изготовления композита; процессы структурных нарушений при механических и климатических нагрузках и микроскопические механизмы разрушения композитных материалов под действием перечисленных нагрузок и при их сочетанном воздействии. Импульсная акустическая микроскопия эффективно используется для визуализации объемной микроструктуры углепластиков. В работах [1,2,4,6,10] было показано, что метод позволяет визуализировать без нарушения целостности материала весь спектр структур, образующих углепластиковый композит, — от отдельных углеродных филаментов (8–12 μm) до упаковки углеродных нитей (100–120 μm) в слои и упаковки слоев в ламинаты (Рис. 3). Метод дает возможность, также без нарушения целостности, выявлять и визуализировать разнообразные типы микроструктурных дефектов, в т. ч. протяженные дефекты адгезии между армирующими элементами и полимерной матрицей, протяженные трещины в матрице и другие закрытые дефекты, толщина которых может лежать в субмикронном диапазоне и составлять всего лишь десятки и сотни нанометров.

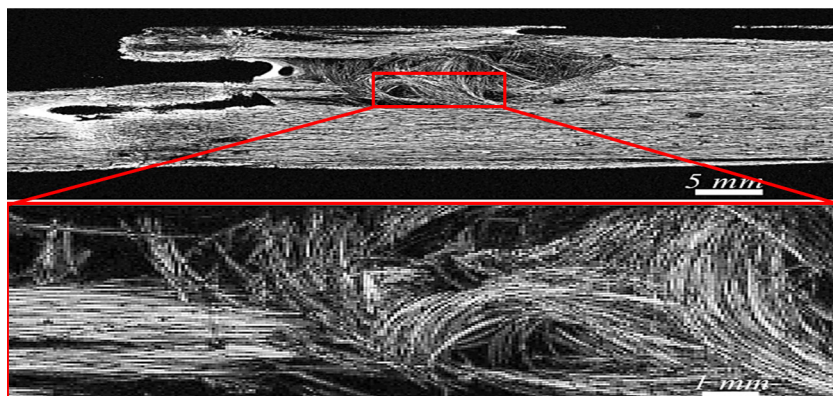


Рисунок 3. Акустические изображения нитей в объеме углепластика (из статьи [10]).

Одной из наиболее привлекательных особенностей использования импульсной акустической микроскопии в материаловедении композитов является возможность изучать в реальном времени процессы деформирования и разрушения, в т. ч. микроскопические, идущие в объеме композита в ходе нагружения. Визуализируется и запоминается первичная микроструктура в объеме образца, с ней и между собой сравниваются 3D акустические изображения микроструктуры, получаемые на каждом этапе нагружения, и выявляются микроструктурные изменения. С применением акустической микроскопии экспериментально были визуализированы и описаны механизмы разрушения ряда углепластиков под действием внешних растягивающих сжимающих, изгибных или ударных нагрузок [1,2, 4–12]. Описаны процессы возникновения, роста и объединения повреждений в динамике. На Рис. 4 представлен пример акустической визуализации процессов разрушения углепластика при изгибе.

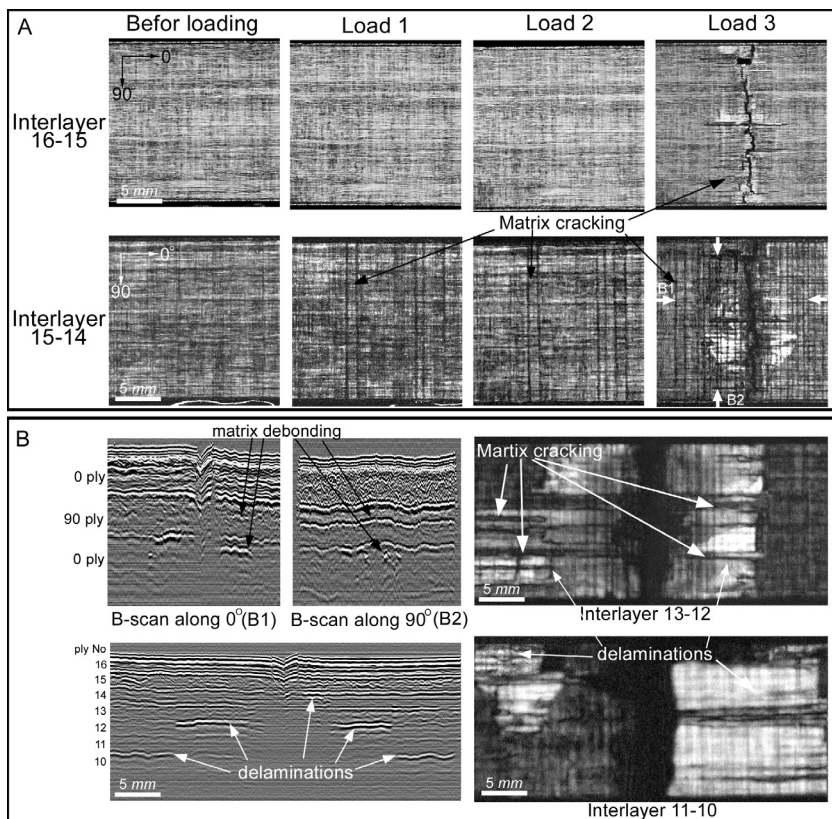


Рисунок 4. Акустические изображения, демонстрирующие развитие микроскопических разрушений при 3-точечном изгибе в области растяжения ниже средней линии изгиба при последовательном увеличении нагрузки индентора: А — последовательное образование дефектов в нижних слоях ламината; (В) — образование протяженных межслоевых трещин на заключительном этапе изгибной нагрузки (из статьи [2]).

Процессы нагружения и визуализации объемной микроструктуры могут выполняться одновременно т. н. in-situ визуализация, которая предполагает наблюдение процесса деформирования в реальном времени [1,4]. In situ ульт-

тразвуковая визуализация стала возможна благодаря разработке и созданию в ИБХФ РАН специального испытательного стенда, в котором испытательная машина сопряжена с акустическим микроскопом (Рис. 1). In-situ визуализация микроструктуры использовалась для изучения динамики необратимой деформации при растягивающих нагрузках (Рис. 5). Выявлены минимальные значения деформаций, при которых возникают микроструктурные нарушения целостности. Описанные микромеханические механизмы разрушения легли в основу ряда численных моделей, описывающих развитие повреждений в углепластике и остаточный ресурс материала.

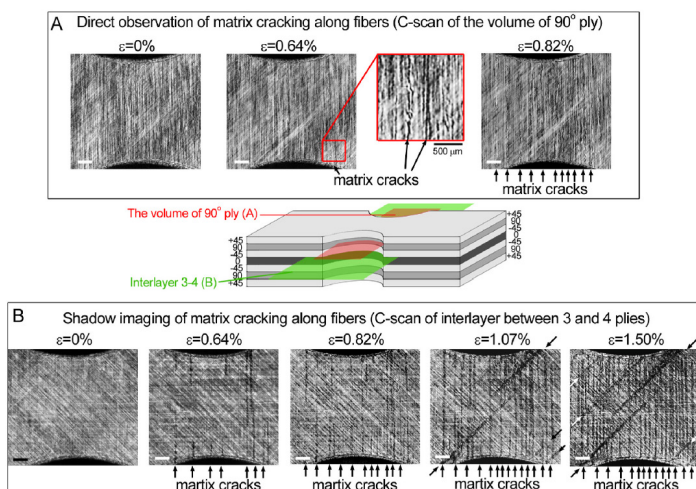


Рисунок 5. Развитие матричных трещин в ламинате $[45^\circ/90^\circ/-45^\circ/0^\circ/-45^\circ/90^\circ/45^\circ]$ при растяжении. Ультразвуковые изображения получены в объеме 90° слоя (A) и в промежутке между 3 и 4 слоями $-45^\circ/0^\circ$ (B) (из статьи [1]).

Другим повышенным объектом интереса для акустической микроскопии стали полимерные нанокомпозиты.

Идея нанокомпозитов основана на внедрении различных типов низкоразмерных наночастиц в объем полимерной матрицы. Углеродные (графитовые) 1D и 2D наноформы — одностенные и многостенные углеродные нанотрубки, графитовые нанопластинки или наночешуйки. Важной характеристикой нанокомпозитов является пространственное распределение их дисперсной фазы. Оптимальный вариант — равномерная дисперсия наночастиц, однако экспериментальные исследования предполагают неоднородное распределение наноуглеродного армирования. Как показали многолетние ультразвуковые исследования, в объеме нанокомпозитов практически невозможно сформировать протяженную непрерывную микроструктуру из наночастиц [13–17]. Их агломерация и высокая степень сродства приводит к формированию, т. н. аэрогелей, структур, в состав которых входят множественные микроскопические газовые пузыри. Формирование таких структур не приводит к улучшению физико-механических свойств материала, как это предполагалось в теории. На всех получаемых изображениях (Рис. 6), как акустических, так и рентгеновских, наблюдается характерная особенность развития фрактальной структуры — агломерация частиц с захватом воздуха. Об этом свидетельствует высокая контрастность изображений, определяемая большой разницей акустических свойств (импедансов) эпоксидной матрицы и воздуха при акустическом зондировании, а также существенной разницей поглощения излучения в матричный материал, армирующие частицы и воздух для рентгеновских лучей. Кроме того, наблюдаемые неоднородности на этих изображениях имеют правильную сферическую форму и плавные границы.

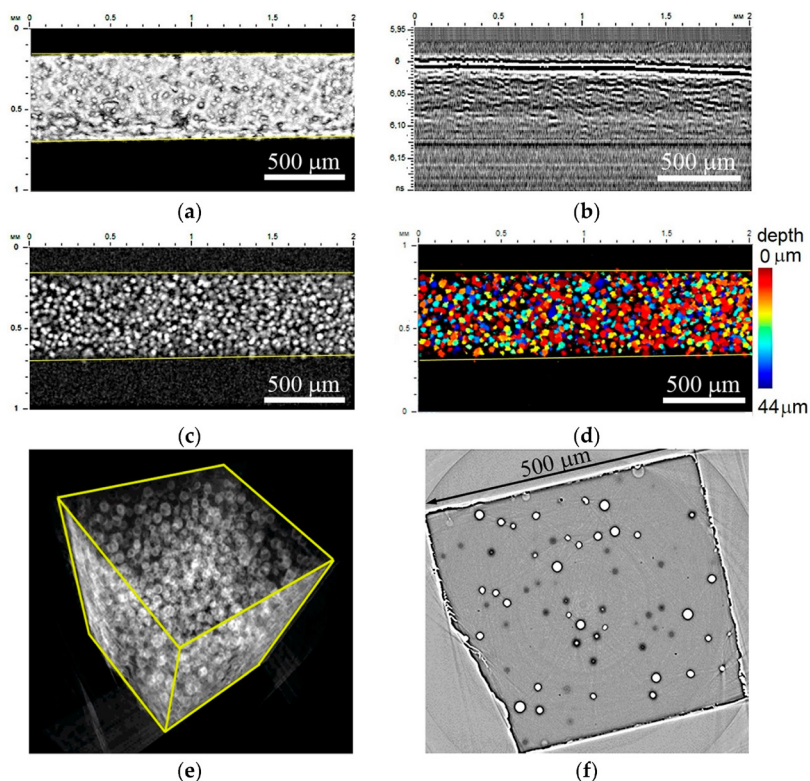


Рисунок 6. Внутренняя микроструктура нанокompозита с нанотрубками. (a)–(d) акустические изображения образца, (e), (f) — изображения, полученные методом рентгеновской томографии на синхротроне PETRA III (из статьи [13]).

Другим важнейшим практическим применением техники импульсной акустической микроскопии является характеристика объемной микроструктуры и механических свойств объектов тканевой инженерии для реконструктивной медицины [18–26]. В основе современной реконструктивной медицины лежит формирование тканеинженерных продуктов. В тканевой инженерии в качестве основы будущего тканевого продукта используются

полимерные матриксы (скаффолды), в которые вносятся клетки реципиента. Их заселение и последующий рост обуславливает формирование соответствующего тканеинженерного продукта (импланта), который имплантируется в дефектный орган, приживляется, и со временем замещается естественной тканью за счет процессов деградации искусственного матрикса и замены его естественным соединительнотканым остовом. Каждый этап формирования и приживления импланта требует неразрушающего и неинвазивного контроля его объемной микроструктуры, его состояния и процессов, идущих в его объеме, как на стадии его создания, так и на стадиях его вживления и функционирования в организме. С учетом непоражающего характера ультразвукового излучения и достаточно эффективных механизмов ультразвукового контраста при отображении микроструктуры полимерных объектов и биологических тканей импульсная акустическая микроскопия представляется идеальным инструментом для неразрушающих и неинвазивных оценок в тканевой инженерии.

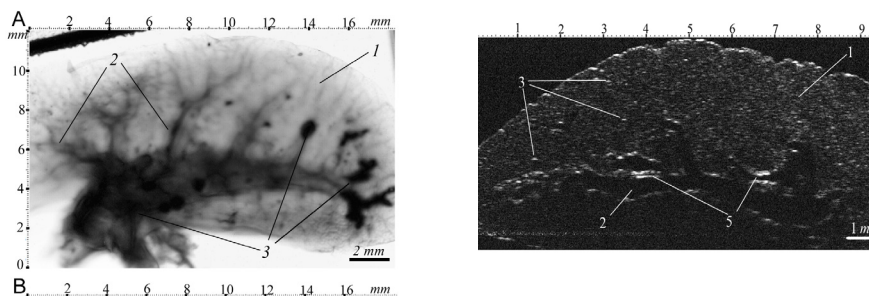


Рисунок 7. Ультразвуковые изображения горизонтальная (слева) и вертикальная (справа) проекция децеллюляризованных легких крысы (из статьи [25]).

Ультразвуковые методы обеспечивают эффективное проникновение зондирующего излучения в биологическую среду, необходимый уровень разрешения и контраста для наблюде-

ния основных структурных элементов материала, неинвазивный и неповреждающий характер наблюдения объемной микроструктуры не только на в условиях *in vitro* [21,23–26], но *in vivo* [3]. Кроме того, техника импульсной ультразвуковой микроскопии дает возможность оценивать *in situ* процессы приживления импланта, деградации искусственного матрикса и замены его соединительнотканым остовом [25]. Отдельный предмет изучения — процессы деградации и биodeградации биосовместимых полимерных материалов в биологической среде и организме. Разработанные в ИБХФ РАН подходы и методики обеспечивают визуализацию структурных элементов любых видов материалов медико-биологического применения. Были получены акустические изображения морфологии внутренней микроструктуры децеллюрезированных тканей со сложной пространственной микроструктурой в т. ч. легких (Рис. 7) [25,26].

Впервые были получены данные о возможностях использования фокусированного пучка высокочастотного ультразвука для наблюдения микроструктурных изменений в натуральных матриксах при их механическом нагружении в условиях водной среды [18–20, 22]. Экспериментально изучалась динамика изменения микроструктуры коллагенового матрикса и матриксов из полимерных волокон. Выявлены механизмы деформирования матриксов и эволюции их микроструктуры при растяжении (Рис. 8).

Проведен значительный объем работ по изучению процессов деградации и биodeградации в материалах на основе поли-L-лактида (PLLA) и его сополимеров [3, 21, 24]. Исследовалась микроструктура и свойства PLLA матриксов в процессе их биodeградации в модельных средах. Для количественной характеристики измерялись локальные значения скоростей продольных и поперечных упругих волн в образце на разных стадиях

гидротермального старения, выявлялись пространственные вариации скоростей и распределение по объему образца в процессе деградации (Рис. 9).

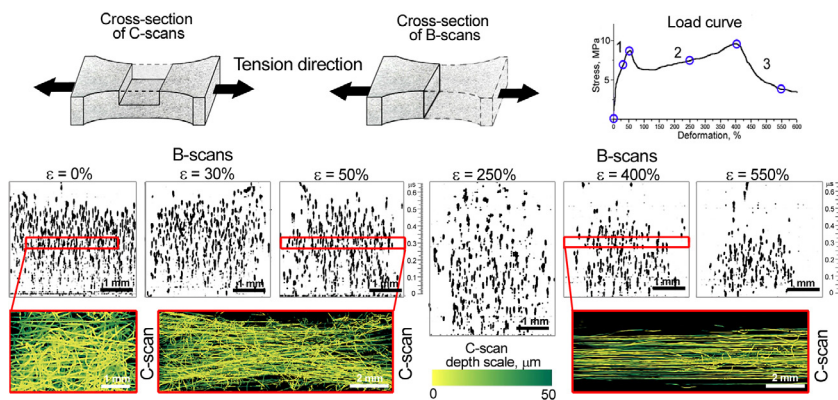


Рисунок 8. Ультразвуковая визуализация процессов разрушения нетканых полимерных матриц при растяжении (из статьи [18]).

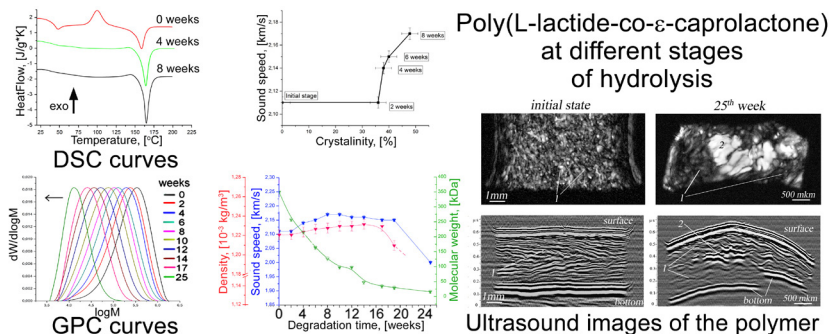


Рисунок 9. Динамика физико-механических и физических свойств сополимера PLCL при гидротермальном старении (graphical abstract из статьи [24]).

Гидролиз полимеров, а также деградацию микроструктуры и свойств полимерных изделий биомедицинского назначения следует оценивать в условиях, приближенных к условиям живого организма. Разработка и использование полимеров требу-

ют методов, позволяющих характеризовать и контролировать свойства и микроструктуру материала как *in vitro*, так и *in vivo*. Впервые в мировой практике в ИБХФ РАН была предложена новая экспериментальная установка для *in vivo* ультразвукового мониторинга с высоким разрешением за деградацией имплантированных полимеров [3]. Акустические изображения демонстрируют появление, рост и изменение внутренних неоднородностей полимеров в процессе деградации (Рис. 10). Изменение упругих свойств оценивалось путем расчета скорости распространения упругих волн (продольных волн) в полимерных образцах на различных стадиях деградации. Было установлено, что процесс деградации *in vivo* полимеров PLGA происходит с задержкой на 2 недели по сравнению с гидротермальным старением *in vitro*.

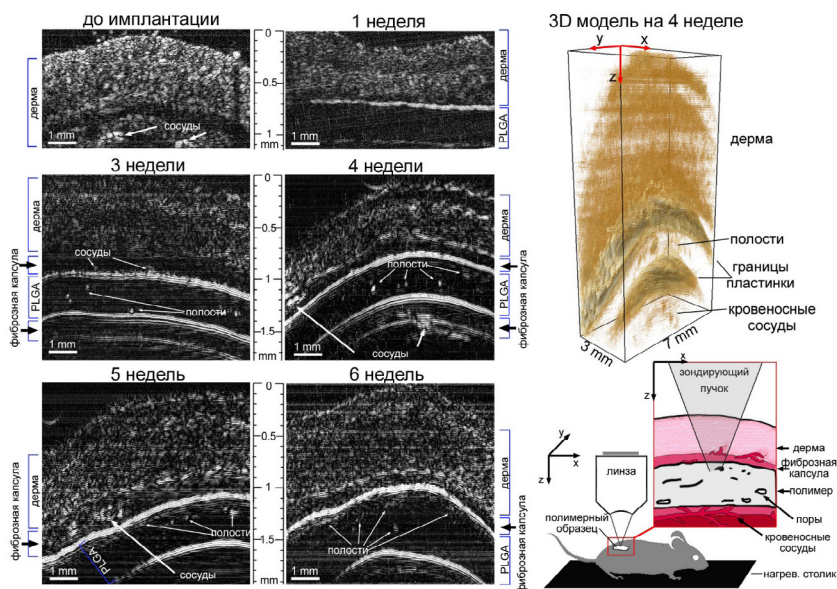


Рисунок 10. Ультразвуковые изображения имплантированного образца PLGA на различных стадиях деградации *in vivo*. (из статьи [3]).

Ссылки

Ссылки на статьи в международных журналах (Авторы, Журнал год, том, страницы):

1. E. Morokov, S. Titov, V. Levin, *Composites Part B* **2022**, 247, 110360.
2. E. Morokov, V. Levin, T. Ryzhova, E. Dubovikov, Yu. Petronyuk, I. Gulevsky, *Composite Structures* **2022**, 288, 115427.
3. E. Morokov, N. Yabbarov, N. Sedush, A. Bogachenkov, A. Malykhin, V. Demina, P. Azarkevich, E. Nikolskaya, M. Chirkina, M. Sokol, *European Polymer Journal* **2023**, 195, 112248.
4. E. S. Morokov, V. M. Levin, *Macromol. Symp.* **2022**, 404, 2100278.
5. E. S. Morokov, V. M. Levin. *AIP Conference Proceedings* **2022**, 2509, 020135.
6. E. Morokov, V. Levin, A. Chernov, A. Shanygin, *Composite Structures* **2021**, 256, 113102.
7. П. В. Шершак, В. М. Левин, В. А. Косарев, Е. С. Мороков, Ю. С. Петронюк, *Materials Physics and Mechanics* **2021**, 47, 514–526
8. А. В. Панков, В. Л. Токарь, Ю. С. Петронюк, В. М. Левин, Е. С. Мороков, Т. Б. Рыжова, И. В. Гулевский, *Диагностика материалов* **2020**, 86, 58–65.
9. Т. Б. Рыжова, Ю. С. Петронюк, Е. С. Мороков И. В. Гулевский, В. М. Левин, А. Н. Шаныгин, *Вестник МАИ* **2020**, 27, 92–104.
10. V. Levin, Y. Petronyuk, E. Morokov, T. Ryzhova, A. Shanygin, Q. Yuan, H. Wanxia, I. Artyukov, S. Bellucci, *Polymer Engineering and Science* **2019**, 59, 2508–2513.
11. Y. Petronyuk, E. Morokov, V. Levin, T. Ryzhova, A. Chernov, V. Sherbakov, A. Shanygin, *Polymer Engineering and Science* **2017**, 57, 703–708.

12. Ю. С. Петронюк, В. М. Левин, Е. С. Мороков, Т. Б. Рыжова, А. В. Чернов, И. В. Гулевский, *Известия Российской академии наук. Серия физическая* **2016**, 80, 1363–1368.
13. I. Artyukov, S. Bellucci, V. Kolesov, V. Levin, E. Morokov, M. Polikarpov, Y. Petronyuk, *Polymers* **2024**, 16, 1354.
14. S. Bellucci, V. Levin, E. Morokov, Y. Petronyuk, A. Shubin, *IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering* **2018**, 443, 012005.
15. V. Levin, E. Morokov, Y. Petronyuk, A. Cataldo, S. Bistarelli, F. Micciulla, S. Bellucci, *Polymer Engineering and Science* **2017**, 57, 697–702.
16. V. Levin, Y. Petronyuk, E. Morokov, L. Chernozatonskii, P. Kuzhir, V. Fierro, A. Celzard, M. Mastrucci, I. Tabacchioni, S. Bistarelli, S. Bellucci, *Physica Status Solidi (B): Basic Solid State Physics* **2016**, 253, 1952–1959.
17. V. M. Levin, Y. S. Petronyuk, E. S. Morokov, A. Celzard, S. Bellucci, P. P. Kuzhir, *Physics Procedia* **2015**, 70, 703–706.
18. E. Khramtsova, E. Morokov, C. Antipova, S. Krasheninnikov, K. Lukanina, T. Grigoriev, *Polymers* **2022**, 14, 3526.
19. A. Zykova, E. Morokov, P. Tyubaeva, *Macromol. Symp.* **2022**, 404, 2100322.
20. E. Morokov, A. Zykova, P. Tyubaeva, *Advanced Engineering Materials* **2021**, 2001373.
21. E. Morokov, V. Demina, N. Sedush, K. Kalinin, P. Dmitryakov, S. Krasheninnikov, E. Khramtsova, T. Grigoriev, S. Chvalun, V. Levin., *Macromol. Symp.* **2021**, 395, 2000223.
22. E. Morokov, A. Zykova, P. Tyubaeva., *Macromol. Symp.* **2021** 396, 2000245.
23. О. Р. Куликова, Е. А. Храмцова, К. Г. Антипова, Т. Д. Пачаев, Е. С. Мороков, К. И. Луканина, В. М. Левин, Т. Е. Григорьев, *Биомедицина* **2021**, 17, 42–47.

24. E. S. Morokov, V. A. Demina, N. G. Sedush, K. T. Kalinin, E. A. Khramtsova, P. V. Dmitryakov, A. V. Bakirov, T. E. Grigoriev, V. M. Levin, S. N. Chvalun, *Acta Biomaterialia* **2020**, 109, 61–72.

25. E. Morokov, E. Khramtsova, V. Levin, E. Kuevda, E. Gubareva, T. Grigoriev, K. Lukanina, *Artificial Organs* **2019**, 43, 1104–1110.

26. E. Khramtsova, E. Morokov, Y. Petronyuk, V. Levin, K. Lukanina, T. Grigoriev, A. Shepelev, S. Chvalun, E. Gubareva, E. Kuevda, *Polymer Engineering and Science* **2017**, 57, 709–715.

18. НОВЫЕ СЛОИСТЫЕ НАНО-МАТЕРИАЛЫ: АТОМНЫЕ СТРУКТУРЫ И ИХ СВОЙСТВА

Л.А. Чернозатонский

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

В последнее десятилетие двумерные (2D) материалы предоставляют исключительные возможности для исследования явлений, возникающих в кристаллах атомарной толщины. Их уникальные свойства дают широчайшее применение в различных областях от электроники до медицины и биологии [1].

*В 2020–2024 г. г. в ИБХФ РАН продолжало развиваться моделирование новых наноструктур — материалов из двумерных слоев графенов и нитридов и их гетероструктур при использовании современных квантово-механических программ на основе методов *ab initio* (теории плотности электронных состояний — DFT) и молекулярной динамики.*

В начале этого периода было изучение оптических и электронных свойств нанопористых структур на основе бислойных графенов, а также их изменения при механическом [2] и электрическом [3] воздействиях.

В биграфеновых наносетках (BGNM) с различными типами укладки (AA и AB) двух графеновых слоев обнаружена сильная зависимость электронных и оптических спектров поглощения от их структуры, направления и поляризации падающего света, а также в процессе их механических деформаций [2]. На Рисунке 1 показан пример такого воздействия на AA-BGNM наносетку.

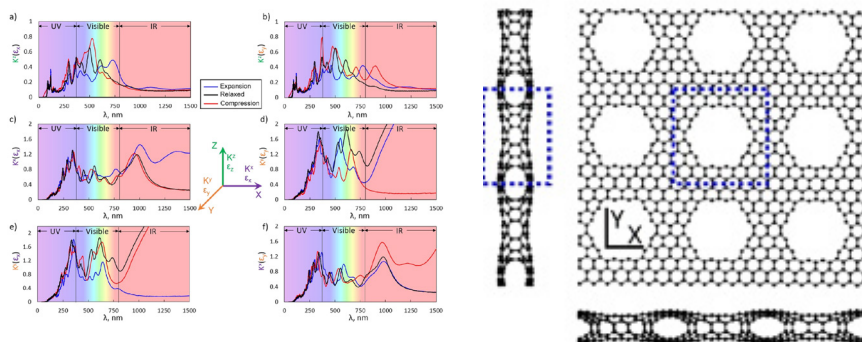


Рисунок 1. Зависимость коэффициента экстинкции $K_i(\epsilon_j)$ ($i, j = X, Y, Z$) от длины световой волны, падающей в направлении i на AA-BGNM сетку (схема атомной структуры справа) от подвергнутой деформации на 4% вдоль j направлений X и Y (слева и справа). Черная, красная и синяя линии — коэффициент экстинкции для расширенных, свободных и сжатых структур, соответственно.

Одновременно проводился расчет и анализ электронной зонной структур наносеток при деформации вдоль направлений X и Y . На Рисунке 2 показан пример зависимости межзонных переходов ΔE в электронном спектре AA-BGNM наносетки при варьировании достаточно малыми (менее 4%) деформациями, когда происходит значительное изменение (0.1–0.5 эВ) их величин. Она особенно заметна при наблюдении оптических резонансных эффектов для деформаций вдоль оси X (зигзаг направления атомов в AA-BGNM — см. вставку справа на Рис. 1).

Подобная трансформация электронного спектра происходит в биграфеновых структурах с различным расположением нанопор при приложении поперечного электрического поля [3] (см. пример справа на Рис. 2), в сочетании со значительными изменениями зонной структуры — трансформацией и превращению полуметаллических структур в полупроводниковые. Рассмотренные варианты эффективного управления электрон-

ными и оптическими свойствами подобных наносеток, частично уже наблюдавшихся в экспериментах, имеют существенное значение для дальнейшей разработки графеновых нанопористых материалов, что открывает новые перспективы их использования в электронных и оптоэлектронных наноприборах.

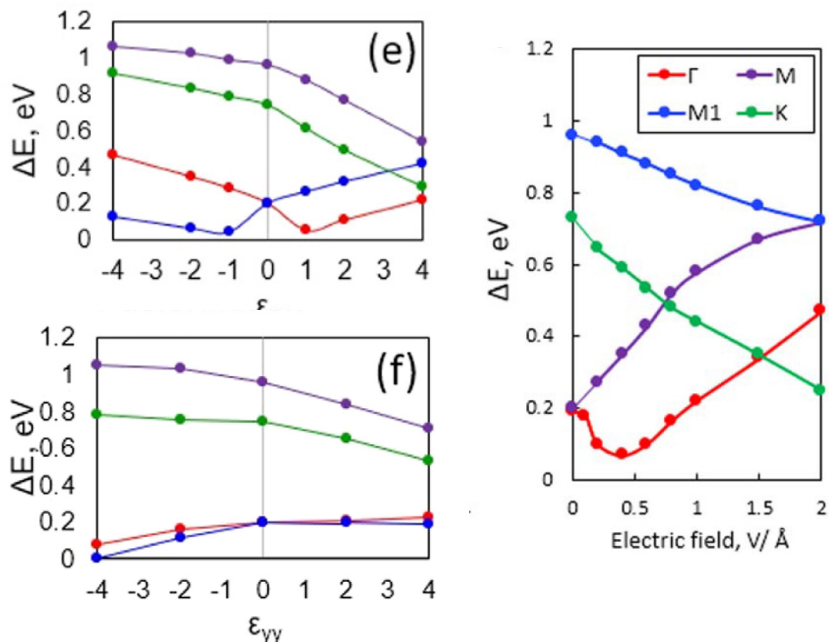


Рисунок 2. Изменение разности энергий между валентной зоной и зоной проводимости электронного спектра в точках Γ , M, K и M1 электронного спектра AA-BGNM наносетки: от степени деформаций ϵ_{xx} и ϵ_{yy} вдоль осей X и Y — синие, красные, зеленые, фиолетовые линии *слева* [2]; от электрического поля — красные, фиолетовые, зеленые, синие линии *справа* [3].

В ИБХФ проводились совместные с Томским ГУ и Kyungpook National University (South Korea) по новым структурам работы на основе биграфена [4-6].

Было показано, что островки наноалмазов, заключенные между двумя листами графена (Рисунок 3), формируемые ковалентными связями при трансформации плоских углеводородных молекул, проявляются как химически эквивалентные частицы — квантовые точки, которые могут образовывать расширенные квантовые ансамбли с большим потенциалом применения для наносенсоров, фотодиодов, солнечных панелей [4].

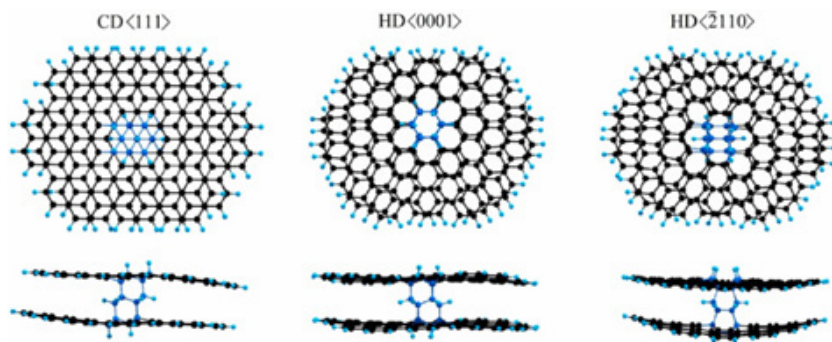


Рисунок 3. Островки наноалмазов, образуемые при гидрировании двух чешуек графенов с помещенными между ними плоскими углеводородными молекулами.

В перфорированных наносетках высокая кривизна торoidalных графеновых краев нанопор вызывает резкое изменение химических свойств атомов углерода, превращая свернутые края в локальные способные к окислению фрагменты. Поэтому для Li, Ca или Al атомов возникает асимметричная координация в нанопоре с переносом электрона от атомов металла к краевым C-атомам (рис. 4 слева). В таких структурах было обнаружено ферромагнитное спиновое упорядочение с высокими значениями магнитного момента [5].

Также была смоделирована и исследована атомная и электронная структуры периодических вертикальных гибридных

гетероструктур на основе легированных скрученных двухслойных графенов (Рисунок 4). Использовались муаровые подрешетки биграфена с адатомами фтора и алюминия для создания структурной поляризации заряда и некомпенсированных спиновых моментов (1,05 мкБ на элементарную ячейку). Показано, что такая спиновая поляризация этой сверхрешетки в основном определяется парциальными электронными состояниями углерода и фтора [6].

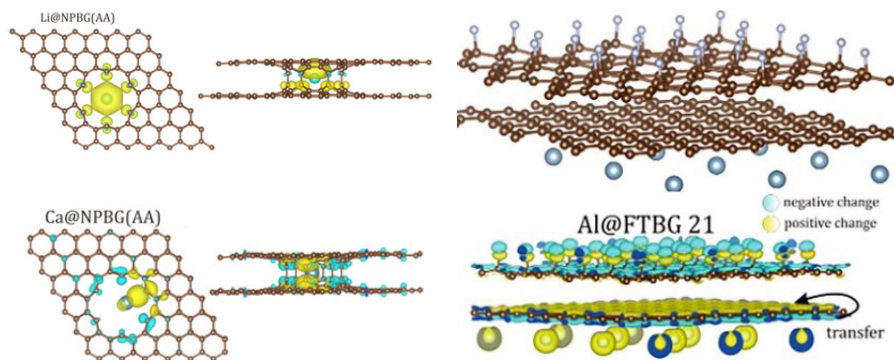


Рисунок 4. Виды элементарных ячеек перфорированных биграфеновых сверхрешеток с Li и Ca в отверстиях — *слева*; *справа* сверху — муаровая атомная Янус гетероструктура с углом $\theta=21.8^\circ$ скрутки биграфена, где с одной его стороны расположены ковалентно-связанные атомы фтора, а с другой — алюминия, внизу — распределение зарядов на ней.

Предложенные гетероструктуры могут проявлять спиновую динамику и магнито-стрикционные свойства, перспективные для приложений связанных с квантовыми явлениями.

В сотрудничестве с ИФП СО РАН и ОИЯИ впервые были исследованы проводящие свойства и процесс образования наночешуек фторированного графена перфорированных после облучения ионами высоких энергий. С помощью

методов компьютерного моделирования была описана модель образования чешуек, демонстрирующих электронные свойства как у полупроводниковых квантовых точек [7]. Было проведено моделирование электронных свойств на границе замкнутого двухслойного графена в наносетках: найдены специфические углы закрутки биграфенов, при которых данная система наиболее стабильна, что позволило объяснить структуру замкнутых биграфеновых границ. Предложенный и исследованный механизм перехода от полуметаллического к полупроводниковому поведению в многослойных графенах с отверстиями при образовании многосвязанной структуры показал [8], что именно сильное искривление и «замыкание» нанопор при ковалентном соединении краев соседних слоев графеновых слоев нарушает полуметаллический характер спектра этой системы. Он хорошо описывает эффект высокой подвижности в мультиграфенах после их облучения ионами.

Исследованные нанообъекты имеют перспективы применения в различных областях, начиная с оптоэлектроники и фотоники и заканчивая элементами гибкой электроники.

Поскольку основной задачей современного материаловедения является создание материалов с программируемыми полезными свойствами, то ультратонкие алмазоподобные пленки — *диаманы*, предсказанные в 2009 году в ИБХФ РАН [9], представляют собой одну из самых интригующих двумерных мембран, сочетающую в себе уникальные механические, электронные и оптические свойства. В 2018–20 годах были *синтезированы* диаманы из двух и малослойных графенов в АА- и АВ укладках путем полного гидрирования или фторирования, а их *атомная структура* подтверждена рядом надежных методов — сканирующей

туннельной микроскопией и дифракцией рентгеновских лучей [10]. В большинстве теоретических работ рассматривали пока только структуры алмазов с обычной для графита АВ укладкой.

Бурное развитие нового направления *твистроники* — исследований слоистых наноструктур на основе *молекулярно-связанных* 2D слоев, свернутых (twisted) под углом θ относительно друг друга, когда образуется муаровая картина наложения двух атомных структур, обнаружило в них широкое поле новых физических резонансных эффектов в электронике, оптике и спинтронике. Оно вызвало наш интерес к моделированию и исследованию возможности образования устойчивых алмазоподобных структур с ковалентно-связанными муаровыми слоями — *муаровых алмазов*. Последние работы по синтезу скрученных биграфенов позволили нам надеяться на синтез таких «скрученных» алмазов $Dn\theta$. Это и было сделано [11–16] в наших теоретических расчетах алмазов из свернутых под близким к 30° углом графенов, покрытых парами атомов водорода (сформированные комплексы Н-С-С-Н — вставка на Рис. 5) — новых структур твистроники, которые существенно отличаются от обычного алмаза из нескрученного биграфена АВ укладки Бернала с чередующимися Н-С комплексами [9]). Было предсказано, что такие структуры устойчивы, а их электронные свойства сильно зависят от угла скрутки θ . В полученных структурах имеются только sp^3 -гибридизированные атомы, что приводит к появлению несколько напряженной структуры с появлением ультраширокой запрещенной зоной. Ширина ее для гидрированных $Dn29.4$ и $Dn27.8$ и фторированных $F-Dn29.4$ и $F-Dn27.8$ алмазов составляет 3,6, 3,3, 4,1 и 4,5 эВ соответственно, что больше, чем диэлектрические щели обычных алмазов (≈ 3 эВ), основанных на АА- или АВ-биграфенах [10].

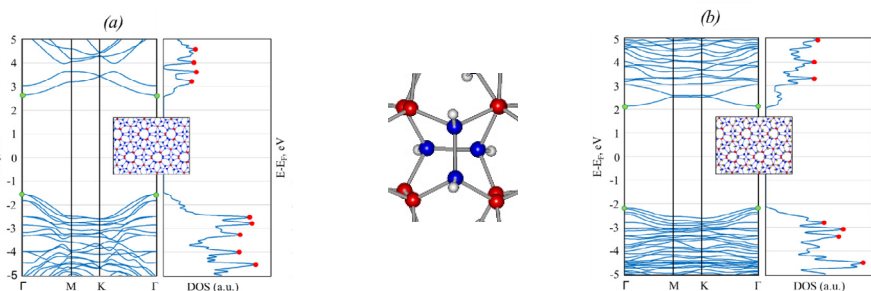


Рисунок 5. Диаманы Dn21.8 — (a) и F-Dn21.8 — (b) с общими видами их атомной структуры сверху, зонными и DOS структурами с их резонансными особенностями — пиками плотностями, обозначенными красными точками, (на вставке: ковалентно-соединенные С-атомы в соседних слоях — красные точки, Н- белые и С- синие атомы в Н-С-С-Н комплексе).

Известно, что для идентификации 2D структур наиболее удобным инструментом являются «отпечатки пальцев» инфракрасных и Рамановских (комбинационного рассеяния) спектров. На примере структур диаманов с $\theta = 21.8^\circ$ было показано [12], что их наиболее активные рамановские частоты оказались смещены в синий цвет по сравнению со стандартными диамантами. В рассматриваемых муаровых диаманах свет может взаимодействовать с ними при его поляризации, параллельной плоскости пленки, что удобно для её идентификации.

В последнее время из-за упрощения методов синтеза возрос интерес к 2D графеновому квазикристаллу из скрученных под углом 30° двух молекулярно-связанных монослоев графена. Поэтому нами был впервые смоделирована и рассчитана структура двумерного алмазо-подобный квазикристалла, полностью состоящего из sp^3 -гибридизованных атомов при гидрировании и фторировании поверхностей квазикристаллического биграфена. Особенности его

электронных и механических характеристик были сравнены с ближайшим муаровым аппроксимантом Dn29.4 (см. Рис. 6).

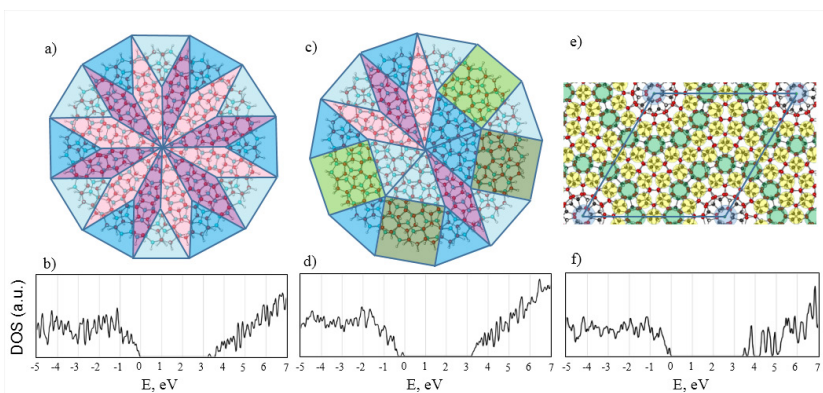


Рисунок 6. Структура DnQC кластеров — дисков с центрами, совпадающими с центрами пересечения треугольных, ромбических и квадратных элементов мозаики Стампли: 12ти ромбов (а), точкой пересечения 4х треугольников и 4х ромбов (с) и соответствующие им плотности электронных состояний (b, d) в сравнении со структурой периодического аппроксиманта — Dn29.4 алмазана (е) и его плотности состояний (f).

Было показано [13], что предлагаемые DnQC квазикристаллы обладают ультра-широкой диэлектрической щелью (Рис. 6) и уникальными механическими свойствами — они обладают высокой как и алмаз твердостью. Упругие константы DnQC алмазов заметно отличаются от алмаза Dn, причем разрыв при действии острия для DnQC и Dn29.4 мембран наступает при больших значениях силы действующего на них острия, чем для мембран из других алмазов.

Таким образом DnQC квазикристаллы открывают путь к синтезу новых бислойных кристаллов различного состава с уникальным набором физико-химических свойств.

Комбинация DFT-расчетов и машинного обучения межатомных потенциалов позволило провести расчеты решеточной теплопроводности алмазов с углами свертки 0° , $13,2^\circ$, $21,8^\circ$ и $27,8^\circ$ [14]. Показано, что муаровые алмазы на основе функционализированных атомами водорода биграфенов, скрученных под близким к 30° углом, обладают ультранизкой теплопроводностью на два порядка ниже ее высоких значений для нескрученного Dn0 алмаза (см. Рисунок 7).

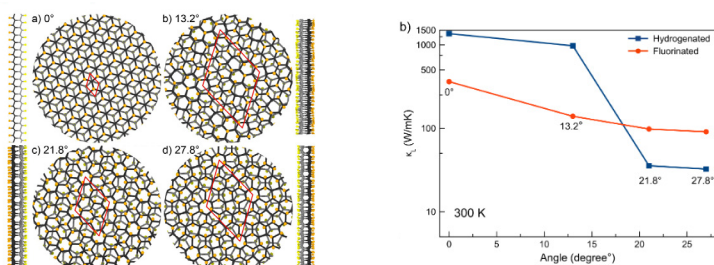


Рисунок 7. Структуры алмазов — слева, и поведение коэффициента теплопроводности от угла свертки — справа.

Этот эффект связан с высоким ангармонизмом и рассеянием фононов, связанным с сильным нарушением симметрии атомной структуры муаровых Dn21.8 и Dn27.8 по сравнению с Dn0 и Dn13.2 алмазами. Алмазы с Муаровым углом θ , обладают ультранизкой теплопроводностью на два порядка ниже ее высоких значений для нескрученных Dn алмазов. Такие пленки с «квази-аморфной» структурой могут служить эффективными теплоизоляторами в гетероструктурных устройствах нанoeлектроники

Был впервые рассмотрен и изучен 2D алмазоподобный слой, названный *диамон*, который представляет собой гидрированный с верхней поверхности скрученный под близким к 30° углом биграфена, молекулярно связанного

с подложкой в виде третьего слоя [15]. Гетероструктура обладает *спиновой сверхрешеткой с периодом муаровой структуры* из-за перетекания электронной плотности с *негидрированной* стороны диамона (Рисунок 8). Она может быть перспективным при использовании в устройствах 2D спинтроники.

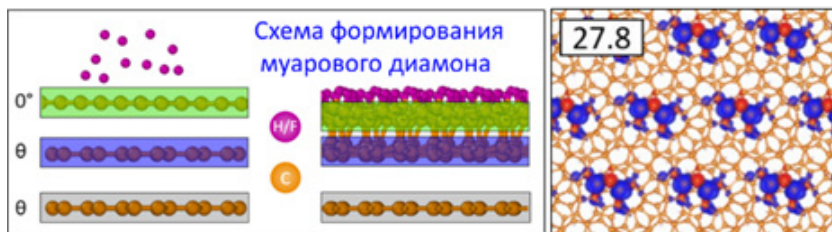


Рисунок 8. Формирование диамона на подложке и его вид снизу в интерфейсе диамон-графен (атомы со спином вверх — красные, и спином вниз — синие).

Был рассмотрен механизм формирования и определены свойства 3х- и 4х-слойных муаровых диаманов [16] со специально выбранными укладками графенов углами свертки 00θ и θ00θ, основанный на возможности фазового перехода при гидрировании таких мультиграфенов в алмазоподобные слоистые структуры, где все атомы углерода переходят из sp^2 в sp^3 состояния гибридизации (Рисунок 9). Он основывался на имеющихся теоретических и экспериментальных работах по формированию диаманов из свернутых и несвернутых биграфенов. Расчет показал энергетическую стабильность таких слоистых гетероструктур, а также искусственного муарового алмазоподобного типа кристалла из очень большого числа четырехслойных муаровых стопок, образование которого может происходить при сравнительно небольших ≈ 3 ГПа давлениях, аналогично формированию алмазоподобным структурам

при механическом воздействии на многослойный графен [9]. Показано, что все они обладают электронным спектром с ультра-широкой диэлектрической щелью, причем величина ее вначале уменьшается с ростом количества исходных слоев, но для кристалла запрещенная зона из-за большего напряжения связей С-С' между слоями, чем в ранее рассмотренных алмазах.

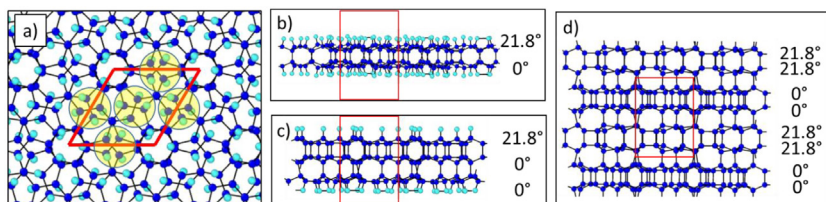


Рисунок 9. Верхняя сторона алмаза Dn21.8 с отмеченными желтыми кружками пересечения связей (а) и атомные структуры алмазов Dn21.8 (N) на основе скрученного графена с двумя (b), тремя (c) и бесконечным числом скрученных 4х слойных стопок (d). Красными прямоугольниками обозначены расчетные суперячейки этих структур.

Следует ожидать, что с увеличением количества слоев такие алмазовые структуры должны обладать более высокими прочностными свойствами, чем алмазы, формируемые из двух свернутых слоев [17].

Таким образом нами впервые предложены муаровые структуры и 2D алмазных квазикристаллов на основе функционализации водородом или фтором скрученных *под близкими к 30° углами* биграфенов и показано что они, обладают ультра-широкой диэлектрической щелью и высокой твердостью, *сравнимыми с объемным (3D) алмазом*.

Отметим, что из подобных структур, как и из обычных многослойных алмазов, можно будет создавать твердые прозрачные защитные покрытия наноприборов, элементы опти-

ки с отличными от известных материалов свойствами. Наличие большого количества узких пиков плотностей состояний в электронных спектрах может привести к наблюдению новых нелинейных электрических и оптических, экситонных и фото-электрических резонансных эффектов в таких муаровых диаманах.

Особенностью муаровых диаманов является сглаженная форма мини-зон с большим количеством пиков на плотности электронных состояний (DOS), что определяет резонансную картину их оптических свойств в УФ диапазоне. Это отражается на оптических спектрах поглощения, отражения и прохождения — «рябь» резонансных пиков с максимумом в районе 100–120 нм (≈ 10 эВ). Коэффициенты отражения и пропускания для фторированных пленок значительно отличаются от случая гидрированных пленок, что связано с большей химической активностью фтора по сравнению с водородом. Эти результаты открывают большие перспективы применения таких структур как основы 2D оптоэлектронных элементов в УФ диапазоне, а также диэлектрического изолирующего защитного сверхтонкого слоя в нанoeлектронных электромеханических устройствах.

В 2022 г. были начаты исследования *муарых нитранов* (новых аналогов диаманов) основанных на скрученных нитридных h-MN ($M=B, Ga, Al$) гексагональных слоях.

Сначала были рассмотрены борнитраны BNn21.8 из *гидрированного* и *фторированного* (F) скрученного под углом 21.8° h-BN бислоя. Расчеты в совместной работе с коллегами из МИФИ рамановского (R) и инфракрасного (IR) спектров муаровых борнитранов, показали, что они обладают модами с параллельными 2D-плоскости колебаниями и существенно отличаются от соответствующих спектров нескрученного борнитрана, что облегчает их идентифицирование.

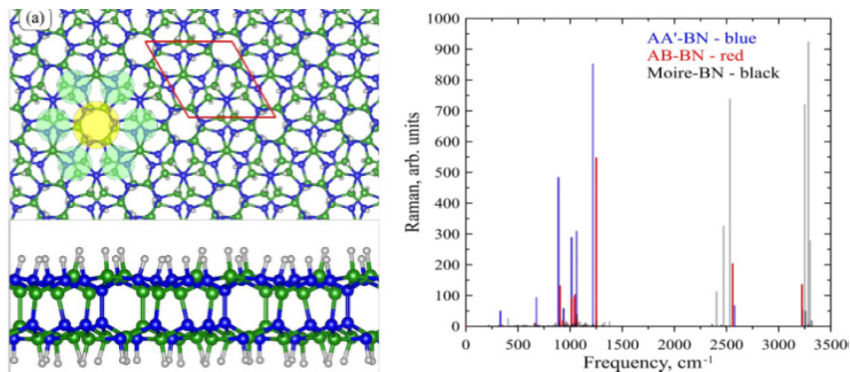


Рисунок 10. Атомная BNn21.8 структура-слева, справа — видно отличие в R спектрах несвернутых (на основе бислоев AA' и AB укладки) и муарового BNn21.8 борнитрана.

BNn21.8 и F-BNn21.8 нитраны [18] оказались полупроводниками с большим количеством узких пиков плотности электронных состояний, связанных с появлением в зонном спектре уплотненных мини-зон за счет образования сверхрешеточной муаровой атомной структуре. Расчет идентифицирующих структуру борнитранов рамановских и инфракрасных спектров, показал, что они существенно отличаются от частот соответствующих спектров нескрученных борнитранов.

Далее были рассмотрены муаровые MN, M=Al, В и Ga нитраны — аналоги алмазов, состоящие из двух ковалентно связанных 2D листов скрученных на угол $\theta=27.8^\circ$ (выбор которых диктовался малыми размерами их сверхячеек для успешного расчета эффективным методом теории функционала плотности — DFT) при гидрировании и фторировании как их обеих сторон, так с разных F-H сторон — с образованием Янус-структур (Рисунок 11) [19]. Такие пьезо-полупроводниковые структуры обладают с непрямой запрещенной зоной, а также большим количеством узких пиков на плотности электронных со-

стояний, связанных с уплощенными мини-зонами. Последнее обеспечивает применимость муаровых борнитранов с управляемыми внешними механическими и электрическими воздействиями электронными свойствами как элементов качества элементов резонансной нелинейной оптики и оптоэлектроники,.

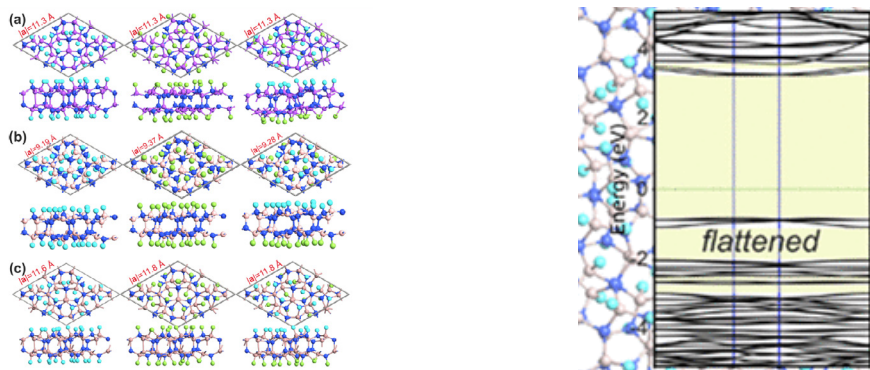


Рисунок 11. Элементарные ячейки AlN_{27.8} (a), BN_{27.8} (b) (c) GaN_{27.8} нитридов (первый столбец — гидрированные бислои, второй—фторированные, а третий—где с одной стороны осуществляется пассивация водородом, а с другой — фтором; цифры в ячейках обозначают длину вектора решетки, атомы азота — синие, бора — бежевые, алюминия—фиолетовые, атомы галлия — коричневые)—слева; справа — электронный спектр муара BN_{27.8} с уплощенными мини-зонами.

Они оказались полупроводниками с запрещенной зоной в 1-4 эВ диапазоне. Наличие большого количества пиков в плотности электронных состояний (DOS) связанных с уплощенными мини-зонами, обеспечивает применимость фторированных или гидрированных муаровых нитридов в качестве полупроводниковых материалов для наноустройств, в которых используются резонансные опто-электронные явления. Обнаружено, что муаровые пленки с адсорбированными Н и F атомами имеют совершенно разные упругие отклики и пьезоэлектрические

константы, что привлекательно для их механо-электрических применений.

Проводилось также моделирование sp^3 -гибридизированного квазикристалла нитрида бора ($BNnQC$) на основе свенутого на 30° гексагонального бислоя BN ($BN30$) и расчеты устойчивой атомной и электронной структуры его нанодиска и скрученного на $29,4^\circ$ аппроксиманта (Рисунок 12.). Таким образом установлена возможность создания нитридных $QCMn$ ($M=Al, B, Ga$ *et al.*) квазикристаллов с новой ранее не наблюдавшейся и не рассматриваемой в квазикристаллах симметрией 3-го порядка. Следует подчеркнуть принципиальное отличие этих материалов такой симметрии от симметрии квазикристалла из 2D двухатомных гексагональных слоев и от известных квазикристаллов *проявлением пьезоэлектрических свойств*. Электронная структура аппроксиманта такого $QCBNn$ кристалла- $29.4BNn$ и $27.8BNn$ борнитриданов со значениями диэлектрических щелей ~ 5 эВ, что классифицируют эти предсказанные материалы как новые широкозонные 2D-пьезоэлектрические квазикристаллы. Высокая жесткость аппроксимантов указывает на высокие механические свойства и $QCBNn$ квазикристалла.

Отметим, что метод формирования таких муаровых алмазоподобных пленок защищен Патентом РФ 2022.

Наряду с бислойными структурами на основе одинаковых 2D бислоев моделировались новые стабильные диаманоподобные пленки на основе скрученных муаровых бислоев графена и нитрида бора (G/BN) был найден набор углов, при которых такая структура становится соизмеримой. Для формирования диаманоподобного материала были использованы две соразмерные структуры с углами закручивания $\theta = 10.9^\circ$ и $\theta = 25.3^\circ$ с наименьшими муаровыми периодами G/BN бислоя, что позволило рассчитать *ab initio* методами их атомные и электронные

структуры [21]. Двустороннее гидрирование или фторирование таких муаровых бислоев G/BN и последующая межслойная ковалентная связь приводили к открытию полуметаллического графенового спектра с диэлектрической щелью ≈ 3 эВ (ниже значений для 2D слоя h-BN и 3D кубического кристалла c-BN), что соответствует полупроводниковому характеру проводимости исследуемых алмазо-подобных пленок с выраженным резонансным характером спектров плотности электронных состояний (DOS). Такие G/BN пленки открывают в будущем большой потенциал для различных технических применений благодаря присутствию пьезоэлектрического BN слоя.

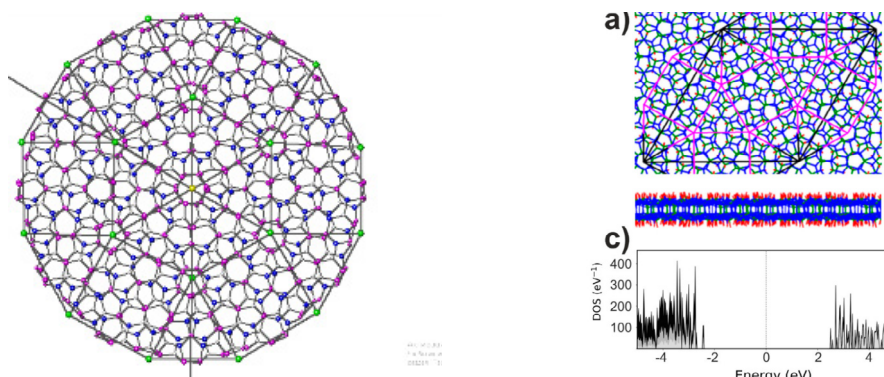


Рисунок 12. Атомная структура BNnQC со схемой мозаики из треугольных и квадратных элементов (атомы: В — желтый, N — синий, Н — белый, фиолетовым цветом обозначены ковалентно связанные В и N атомы в соседних слоях) — вид сверху справа; вид муарового BNn29.4 борнитрида- BNnQC аппроксиманта (его сверхрешетка выделена черными линиями, а фиолетовыми линиями нанесена схема мозаики квазикристалла) — и его DOS спектр расположены слева.

Интерес к полимерным структурам на основе фуллеренов возобновился в связи с развитием в 2022 г технологий синтеза тонких в один слой полимеризованных C60 фуллеренов (PC60), которые являются хорошими полупроводниками. Нас такие

2D пленки заинтересовали с точки зрения создания гетероструктур их молекулярно-связанных с ними известных 2D слоев, поскольку ранее подобные бислои не рассматривались, то был выбран h-BN слой. Он был продиктован интересом к возможности контролировать свойствами PC60/ h-BN структуры внешним механическим или электрическим воздействием за счет наличия h-BN пьезокристалла и к ее применению в новых механо-электрических, фотоэлектронных и электрооптических устройствах.

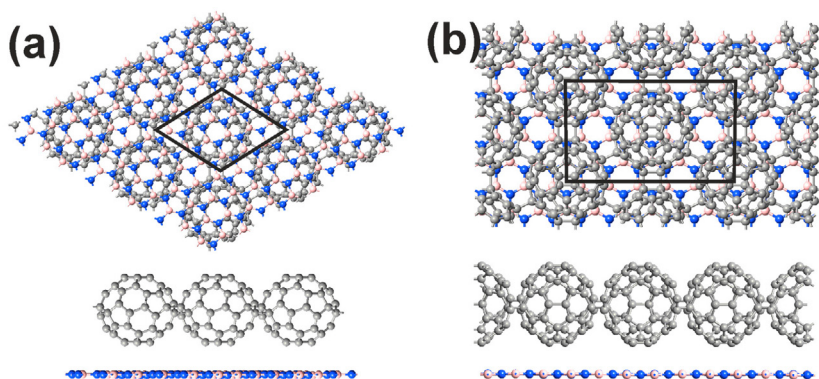


Рисунок 13. Атомные конфигурации оптимизированных гетероструктур из h-BN монослоя нитрида бора и фазы HPC60 с «2+2» цикло-присоединениями фуллеренов — (а), из h-BN монослоя и фазы qHPC60 полимерной сетки из «1+1» и «2+2» связанных фуллеренов — (б), (черные линии — элементарные ячейки их сверхрешеток).

Нам удалось смоделировать такие PC60/h-BN гетероструктуры [21], поскольку малые деформации растяжения и сжатия сетки полимера позволили обеспечить соразмерное размещение их в виде сверхрешеток (Рисунок 13). Расчет энергии образования показал их стабильность. Было показано, что возникающее между слоями молекулярное взаимодействие приводит к некоторому переносу заряда между компонентами с пере-

распределением в них электронной плотности, определяя их электронные и оптические свойства, отличные от свойств отдельно взятых полимерных C60 сеток и h-BN, тем самым указывая на новые возможности использования подобных бислойных гетероструктур.

В ближайшее время нашей группой предполагается провести исследования влияния поперечного электрического поля и механических воздействий на опто-электронные и адсорбционные свойства двуслойных гетероструктур, пьезоэлектрические свойства муаровых нитриданов, моделирование атомной и электронной структур новых квазидвумерных материалов на основе трехслойных свернутых 2D слоев.

Ссылки

1. L. Liao, E. Kovalska, J. Regner, Q. Song and Z. Sofer, *Small*, **2024**, 20, 2303638.
2. L. A. Chernozatonskii, A. A. Artyukh, A. G. Kvashnin, D. G. Kvashnin, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2020**, 12, 55189.
3. L.A. Chernozatonskii and D G Kvashnin, *Nanotechnology*, **2020**, 31, 115203.
4. I. A. Melchakova, T. G. Tenev, N. V. Vitanov, O. N. Tchaikovskaya, L. A. Chernozatonskii, B. I. Yakobson, P. V. Avramov, *Carbon* **2022** 192, 61.
5. G.T. Oyeniyi, I. A. Melchakova, L. A. Chernozatonskii, P. V. Avramov, *Carbon* **2022**, 96, 1047.
6. I. A. Melchakova, G. T. Oyeniyi, L. A. Chernozatonskii, P. V. Avramov. *Mater. Science*, **2023**, 227, 112266.
7. N.A. Nebogatikova, I. V. Antonova, V. A. Demin, D. G. Kvashnin, L. A. Chernozatonskii, *Nanotechnology*, **2020**, 31, 295602.
8. L. A. Chernozatonskii, L. Y. Antipina, D. G. Kvashnin, *JETP Letters*, **2020**, 111, 235–238.

9. А. Чернозатонский, П. Б. Сорокин, А. Г. Квашнин, Д. Г. Квашнин, *Письма в ЖЭТФ*, **2009** 90, 144-149.
10. F. Lavini, M. Rejhon, and E. Riedo, *Nat. Rev. Mater.* **2022**, 10, 20227.
11. L. A. Chernozatonskii, V. A. Demin, D. G. Kvashnin, *Appl. Phys. Lett.*, **2020**, 117, 253104.
12. L. A. Chernozatonskii, K. P. Katin, V. A. Demin, M. M. Maslov, *Appl. Surface Science* **2020**, 537, 14801.
13. L. A. Chernozatonskii, V. A. Demin, A. G. Kvashnin, D. G. Kvashnin, *Appl. Surface Science*, **2022**, 572, 151362.
14. S. Chowdhury, V. A. Demin, L. A. Chernozatonskii, A. G. Kvashnin, *Membranes*, **2022**, 12, 925.
15. L. A. Chernozatonskii, V. A. Demin, D. G. Kvashnin, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2022**, 13, 5399.
16. L. A. Chernozatonskii, V. A. Demin, *JETP Letters*, **2022**, 115, 161-166.
17. С. В. Ерохин, А. А. Ращупкин, Л. А. Чернозатонский, П. Б. Сорокин, *Письма в ЖЭТФ*, **2024**, 119, 831-838.
18. L. A. Chernozatonskii, K. P. Katin, A. I. Kochaev, M. M. Maslov, *Appl. Surface Science*, **2022**, 538, 154909.
19. L. A. Chernozatonskii, A. I. Kochaev, K. P. Katin, M. M. Maslov, *ACS Appl. Electronic Materials*, **2023**, 5, 5677.
20. L. A. Chernozatonskii, A. I. Kochaev, *Crystals*, **2023**, 13, 421.
20. V. A. Demin, L. A. Chernozatonskii, *Nanomaterials*, **2023**, 13, 84122.
21. L. A. Chernozatonskii, A. I. Kochaev, *Polymers*, 2024, 16, 1580.

19. ПЕРСПЕКТИВЫ СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГЕТИКИ В СВЕТЕ РАЗВИТИЯ ПЕРОВСКИТНОЙ ФОТОВОЛЬТАИКИ

О.И. Шевалеевский

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

Резюме. В области солнечной фотоэнергетики наиболее приоритетные на сегодняшний день разработки связаны с исследованием перовскитных солнечных элементов (Perovskite Solar Cells, PSC). В предлагаемом обзоре кратко изложена история развития PSC, описано современное состояние работ в области перовскитной фотовольтаики, обсуждаются вопросы эффективности и стабильности PSC и представлены результаты работ в этой области, проводимых в Институте биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН. Особое внимание уделено разработкам нового поколения PSC на основе неорганических перовскитных материалов в виде сложных оксидов, tandemным СЭ и вопросам использования PSC для работы в условиях низкой и диффузной освещенности.

1. Введение

Вопросы, связанные с широкомасштабным использованием солнечной энергии в качестве альтернативы традиционным невозобновляемым источникам, таким, как уголь, нефть и природный газ, стали подниматься передовыми представителями мировой науки еще в начале предыдущего столетия. Так, в 1930-е годы в своих публичных выступлениях будущий Нобелевский лауреат Николай Семёнов указывал на солнечную энергию, как на единственно доступный неисчерпаемый источник

экологически чистой энергии будущего [1]. Начало 1950-х годов стало для мира отправным моментом создания и производства фотоэлектрических преобразователей солнечной энергии (солнечных элементов, СЭ) на основе кристаллического кремния. Однако потребовалось еще несколько десятилетий напряженных усилий, прежде чем были разработаны и внедрены рентабельных технологии масштабного производства СЭ и солнечных панелей. Параллельно с этим в мире сформировалось новое обширное научное направление, которое носит теперь название «солнечная фотовольтаика» или, просто, «фотовольтаика».

Фотопреобразователи на основе кристаллического, поликристаллического и аморфного кремния в течение семидесяти лет доминируют на мировом рынке производства СЭ. В последнее время работы в этой области носят, в основном, технологический и внедренческий характер, в то время как научная составляющая практически отсутствует. На этом фоне, в области фотовольтаики продолжаются обширные фундаментальные научные исследования, которые направлены на поиск и создание перспективных СЭ на основе новых видов материалов и альтернативных принципов фотопреобразования солнечной энергии. Основной целью является разработка и создание новых видов СЭ, которые должны составить конкуренцию имеющимся на сегодняшний день технологиям.

Наиболее перспективными кандидатами для фотовольтаики будущего являются системы, основанные на принципах нанотехнологий, которые используют наноматериалы, позволяют повысить эффективность, расширить область применения и снизить себестоимость производства СЭ [2]. На сегодняшний день наибольшее внимание сосредоточено на новом поколении материалов со структурой перовскита и СЭ на их основе — перовскитных солнечных элементах (Perovskite Solar Cells, PSCs).

2. Солнечная фотовольтаика сегодня

Переход к ресурсосберегающим технологиям и масштабное внедрение возобновляемых источников энергии имеет принципиальное значение для будущего мировой энергетики. Среди всех доступных возобновляемых источников единственным реальным потенциалом обладает энергия солнечного излучения, которая может быть напрямую преобразована в электричество с помощью СЭ. Мировое производство кремниевых солнечных панелей, монокристаллических (c-Si) и поликристаллических (multi-Si), растет в геометрической прогрессии, а их стоимость снижается и составляет сейчас 0,21–0,35 \$/Вт [3]. Рис. 1 демонстрирует экспоненциальный рост объемов мирового производства электроэнергии, получаемой от солнечных станций, и параллельное падение стоимости кремниевых СЭ. К началу 2024 год вклад солнечной энергетики достиг значения 1,5 трлн кВт, что составляет более 5% от всей мировой выработки электроэнергии. К другим менее распространенным видам СЭ, которые были разработаны в последнее десятилетие и могли бы стать потенциальными конкурентами СЭ на основе кремния, относятся СЭ на основе тонких халькогенидных пленок (CIGS) и СЭ на основе теллурида кадмия (CdTe). Долгосрочный прогноз изменения средней стоимости электроэнергии, вырабатываемой в мире солнечными панелями, предполагает, что к 2030 году стоимость кВт*ч электроэнергии, вырабатываемая СЭ, будет сопоставима со стоимостью электроэнергии, получаемой от традиционных невозобновляемых источников. Последнее будет означать достижение, так называемого, сетевого паритета, что повлечет за собой необратимые изменения всего мирового энергетического сектора. Однако, нынешняя ситуация в области солнечной фотовольтаики не является столь однозначной. Основная проблема заключается в отсутствии реальных возможностей дальнейшего улучшения параметров СЭ,

а, главное, снижения затрат в рамках доминирования кремниевой фотовольтаики, так как потенциал данной технологии считается исчерпанным. В связи с этим, задача научного сообщества состоит в разработке новых подходов, которые, на основе фундаментальных исследований или за счет использования новых конструкционных решений и новых материалов, позволят создавать альтернативные виды СЭ, которые будут в состоянии изменить глобальную энергетическую структуру.

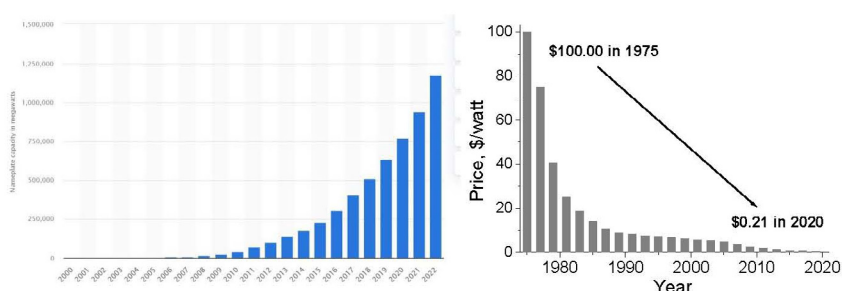


Рисунок 1. Рост установленной мощности энергии, вырабатываемой в мире.

3. Современное состояние работ в области перовскитной фотовольтаики

Как было сказано, наиболее перспективные работы в области современной фотовольтаики связаны с разработкой PSC. В этих элементах в виде фотопоглощающего слоя используются перовскитные материалы с уникальной структурой, в которой чередуются органические и неорганические компоненты, что обуславливает наличие у перовскитов необычных электрических, магнитных и оптических свойств. В традиционных PSC, в общем случае, используется фоточувствительный перов-

скитный материал вида $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbX}_3$ с шириной запрещенной зоны 1,5–2,3 эВ [5], который обладает высоким коэффициентом поглощения света [6]. Эти материалы относительно дешевы и технология изготовления PSC менее затратна, в сравнении с технологиями изготовления СЭ на основе кремния. Архитектура PSC представляет собой многослойную систему, в которой на мезоскопический электрон-проводящий слой (electron transport layer, ETL) последовательно нанесен активный слой фотопоглощающего перовскита, дырочно-проводящий слой (hole transport layer, HTL) и металлический контакт, или противоэлектрод [7]. Иллюстрация структуры PSC и фотография лабораторных образцов PSC, сконструированных в лаборатории Солнечных фотопреобразователей ИБХФ РАН, приведена на Рис. 2.



Рис. 2.1.6. Схема герметизации образцов ПСЭ (слева) и общий вид герметизированных образцов ПСЭ с рабочей площадью около 1 см² (справа).

5

Рисунок 2. Вид архитектуры PSC (слева) и фотография лабораторных образцов PSC, разработанных в лаборатории Солнечных фотопреобразователей ИБХФ РАН (справа).

Первоначально, значение слова «перовскит» было присвоено кристаллической структуре титаната кальция, открытого в 1839 году Густавом Розе и названного в честь русского минералога Льва Перовского. Позже термином «перовскит» стали именовать все соединения с кристаллической структурой, аналогичной титанату кальция [8]. Впервые солнечный фотопреобразователь на основе перовскита, который использовался в качестве сенситизатора в DSSC, был представлен Т. Miyasaka [4]. Такой

СЭ обладал низким КПД и плохой стабильностью, так как перовскиты разлагались при контакте с ионами йодида/трийодида натрия, находящимися в электролите. Ситуация кардинально изменилась с разработкой твердотельного аналога PSC со слоем HTL вида 20,7,70-тетракис-(N, N-ди-4-метоксифениламин)-9,9-спиробифлуорен (Spiro-MeO-TAD) [8]. Стабильность работы PSC повысилась и КПД составил 10,9% при напряжении холостого хода выше 1,1 В. Таким образом, перовскитная фотовольтаика осуществила исторический переход от конструкции вида DSSC с жидким электролитом к классической твердотельной схеме. Первое рекордное значение эффективности в 20% было получено в 2015 г. при использовании перовскитного материала на основе йодида свинца формамидиния $\text{HC}(\text{NH}_2)_2\text{PbI}_3$ в соединении с политриариламином (PTAA), который использовался в качестве HTL [9]. В 2017 г. был зафиксирован КПД в 22,1% [10], а на сегодняшний день стабилизированная эффективность PSC составляет около 26%.

В плане перспективных исследований представляют интерес перовскиты смешанного состава $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Pb}(\text{I}_{1-x}\text{Br}_x)_3$. Установлено, что частичная замена ионов йода ионами брома ($x = 0,1-0,15$) повышает стабильность перовскитного материала в PSC, где в качестве дырочного носителя использовался политриариламин (PTAA). Так, в лаборатории H. Park (Сеул, Южная Корея) использован материал $\text{HC}(\text{NH}_2)_2\text{PbI}_3$ с узкой запрещенной зоной (1,47 эВ) и получена эффективность 22% [11]. Использование слоев формамидиния на основе йодида свинца $(\text{FAPbI}_3)_{1-x}(\text{MAPbBr}_3)_x$ позволило синтезировать более стабильные плотные микроструктурированные слои перовскита и получить высокую стабилизированную эффективность PSC [12]. В мире ведется также активная работа по разработке tandemных СЭ, представляющих сочетание PSC и СЭ на основе c-Si, в которых получена эффективность, превышающая 30% [13, 14].

4. Проблемы стабильности и развитие неорганических PSC

За короткий период времени эффективность PSC возросла с 3 до 26%, что сделало их серьезными конкурентами СЭ на основе кремния. Одновременно, была выявлена и основная проблема, которая до сегодняшнего дня препятствует масштабному внедрению PSC. Ключевой компонент PSC, фотопоглощающий слой $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{PbI}_3$ (MAPbI_3), в естественных условиях структурно нестабилен и быстро деградирует при попадании влаги, воздействия света и при повышении температуры. В реальных условиях на открытом воздухе эффективность PSC на основе MAPbI_3 в течение короткого периода времени значительно снижается [15]. В результате, несмотря на перечисленные выше достоинства, PSC не может пока рассматриваться, как состоявшийся конкурент традиционным кремниевым СЭ.

Решение проблемы может заключаться в замене органо-неорганические материалов на их неорганические аналоги на основе, например, соединений с перовскитной структурой типа APbX_3 , где А — неорганический катион, и PbX_3 анион (где $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$). Так, в работах наших соотечественников из ИПХФ РАН [16, 17] использовались материалы вида CsPbI_3 , которые показали высокую стабильность фотоэлектрических параметров. Однако, при длительной эксплуатации соединения на основе PbX_3 могут потерять стабильность вследствие высокой диффузионной способности атомов галогенов и их высокой ионной подвижности.

5. Неорганические PSC на основе сложных оксидов

Низкая стабильность перовскитов, используемых в традиционных PSC, привела к идее использования для фотопогло-

щающих слоев неорганических перовскитов со структурой $A_2B'V''O_6$, представляющих собой двойные оксидные перовскиты редкоземельных элементов R_2NiMnO_6 (где R — редкоземельный элемент) [18, 19]. Уникальные полупроводниковые и оптические свойства обнаружены в соединении Sm_2NiMnO_6 (SNMO). Высокая диэлектрическая проницаемость SNMO способствует снижению скорости рекомбинации электронно-дырочных пар, а оптическая запрещенная зона ($E_g = 1,4$ эВ) соответствует максимуму спектра солнечного излучения: указанные параметра являются оптимальными для эффективной работы СЭ [20]. Основными преимуществами такого класса неорганических соединений являются их априори высокая долговременная стабильность, не зависящая от внешней температуры, отсутствие фотодеградаци и устойчивость к атмосферной влажности. Значение оптической запрещенной зоны E_g составляет 2–2,5 эВ и за счет легирования может быть уменьшена до 1–1,5 эВ. Работы, ведущиеся в ряде мировых лабораториях, указывают на перспективы оптимизации неорганических PSC указанного состава и повышения их фотоэлектрических параметров с сохранением их уникальной стабильности. [21].

6. Перовскитные солнечные элементы для работы в закрытых помещениях

Преобразование световой энергии с использованием СЭ может осуществляться как в стандартных условиях AM1.5G, так при низкоинтенсивном и диффузном освещении, в частности, в условиях искусственного освещения в закрытых помещениях. В СЭ на основе кремния при низких уровнях солнечной радиации эффективность снижается, а в условиях диффузного освещения практически обнуляется [15]. При этом,

например, в СЭ вида DSSC и PSC наблюдается противоположная тенденция. На рис. 3 показано изменение эффективности преобразования в СЭ DSSC и c-Si в зависимости от интенсивности падающего света и угла падения света относительно плоскости СЭ.

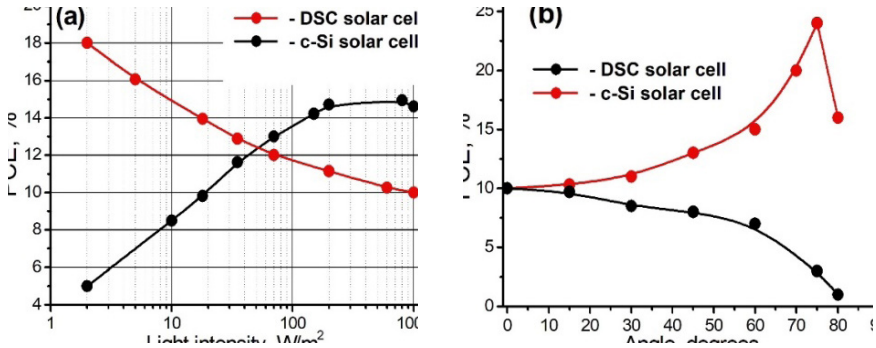


Рисунок 3. Эффективность преобразования (PCE) для СЭ вида DSSC и c-Si при изменении интенсивности освещения (a) и угла падения света (b)

Отметим, что одной из актуальных задач современной фотовольтаики является также разработка СЭ для использования как в условиях высокой, так и низкой интенсивности солнечной радиации, а также в условиях диффузного освещения. DSSC и PSC показали свои преимущества для эффективного использования в условиях изменяемой интенсивности солнечного освещения [22]. На Рис. 4 представлены графики изменения эффективности преобразования солнечной энергии (PCE) в зависимости от интенсивности падающего света для PSC и c-Si элементов. Установлено, что PSC могут эффективно работать и в условиях искусственного освещения в закрытых помещениях. Так, при низкоинтенсивном светодиодном освещении в 1000 лк эффективность преобразования PSC составила 34,5% [28].

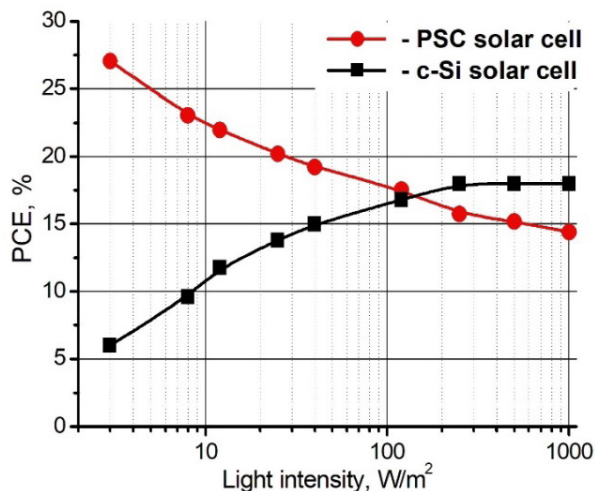


Рисунок 4.. Зависимость эффективности преобразования энергии (PCE) от интенсивности освещения для PSC и c-Si СЭ.

Было показано, что в DSSC эффективность фотопреобразования возрастает при снижении освещенности с 10–12% в режиме AM1.5G до значений, превышающих 20% при рассеянном искусственном освещении (200–1000 лк). В аналогичных условиях PSC демонстрируют еще более впечатляющие результаты, когда эффективность возрастает с ~18–20% в режиме AM1.5G до ~30% при окружающем освещении 200–1000 лк [23, 24]. Таким образом, DSSC и PSC продемонстрировали уникальное преимущество, заключающееся в поддержании высокой эффективности при низкоинтенсивном искусственном освещении [25, 26]. Для работы при искусственном освещении предложены новые инженерные решения и созданы эффективные СЭ, такие, как, например, двусторонний элемент DSSC. На рисунке 5 приведен пример конструкционного решения, которое было разработано и запатентовано в ИБХФ РАН и позволяет значительно повысить эффективность СЭ [27]. Заметим, что если

в предложенной конструкции заменить СЭ на основе DSSC на PSC, который показывает в указанных условиях эффективность $\sim 30\%$ [23], КПД такого двустороннего устройства может быть удвоен и, теоретически, составить значение $\sim 60\%$.

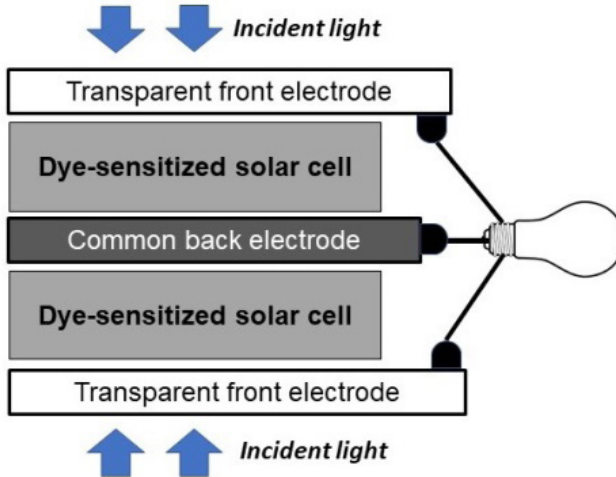


Рисунок 5. Архитектура двустороннего DSSC элемента для работы в закрытых помещениях [27].

Использование подобных систем в закрытых помещениях предназначено для питания маломощных устройств, например, калькуляторов, а также других устройств интернета вещей IoT (Internet of Things). Традиционно для этой цели используются СЭ на основе аморфного кремния (a-Si) с КПД СЭ a-Si $\sim 4\text{--}5\%$ [28]. В то же время DSSC в аналогичных условиях показывают в 4 раза большую эффективность, превышающую 20%, в то время как эффективность PSC при этом составляет $\sim 30\%$ [23]. В практическом плане это означает, что необходимый период времени освещения, требуемый для зарядки источников питания электронных устройств, используемых для IoT, для СЭ на основе PSC будет в 5 раз меньше, чем в случае использования для этой цели СЭ на основе a-Si.

7. Новые материалы для PSC: эффективные электрон-проводящие слои

В конструкции PSC электрон-проводящий слой (ETL) осуществляет перенос носителей заряда, генерируемых в перовскитном слое за счет поглощения фотонов, на задний контакт СЭ. Традиционно, в PSC в качестве ETL используется мезоскопический слой TiO_2 [29]. Оптимизация эффективности переноса зарядов через ETL на основе TiO_2 достигается легированием ниобием, что впервые было применено в TiO_2 фотоэлектродах используемых в DSSC [30–32]. Показано, что с увеличением концентрации Nb от 0 до 3 мол.% проводимость нанокристаллического слоя TiO_2 увеличивалась [31, 33]. Аналогичный эффект наблюдался и в PSC, где использование слоя TiO_2 с содержанием 2,7 мол.% Nb привело к повышению эффективности преобразования энергии на 19% [34, 35]. Спектры оптического пропускания слоев TiO_2 , легированных Nb, представленные на Рис. 6, указывают на смещение спектра в сторону ультрафиолетовой области, которое растет по мере увеличения концентрации легирования. В результате, ширина запрещенной зоны TiO_2 при легировании увеличивается с 3,0 эВ в нелегированном образце до 3,2 эВ в образце, легированном 2,7 мол.% Nb.

Поиск новых эффективных материалов для ETL привел к неожиданному результату, который продемонстрировал возможность использования для этой цели оксидов с очень широкой запрещенной зоной, таких как ZrO_2 ($E_g \sim 6$ эВ). Наноструктурированные слои на основе ZrO_2 обеспечивают эффективный перенос электронов через оксидный слой, несмотря на пренебрежимо малую концентрацию свободных электронов в зоне проводимости материала [36]. Наблюдаемый эффективный электронный перенос в ZrO_2 объясняется на основе механизма прыжковой проводимости, что возможно благодаря высокой концентрации локализованных состояний в запрещенной зоне ZrO_2 . На Рис. 7

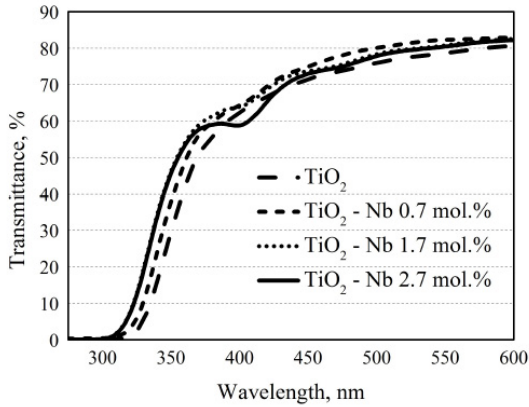


FIG. 2. Optical transmittance of Nb-doped TiO₂ layers with a varied Nb content

Рисунок 6. Оптическое пропускания легированных Nb слоев TiO₂ [34].

схематично представлены диаграммы энергетических зон на границе раздела PSC/ZrO₂ (Рис. 7b) в сравнении с традиционной схемой PSC/TiO₂ (Рис. 7a). Зонная диаграмма на Рис. 7a показывает, что край зоны проводимости перовскита расположен выше края зоны проводимости электрода TiO₂, что обеспечивает классический перенос зарядов из зоны проводимости перовскитного слоя в зону проводимости TiO₂ [37]. В случае использования в качестве ETL ZrO₂ (Рис. 7a) наблюдается противоположная картина, т. е. зона проводимости перовскита расположена значительно ниже зоны проводимости ZrO₂.

Улучшение оптоэлектронных характеристик ZrO₂ может быть достигнуто за счет легирования оксидом иттрия (Y₂O₃) [38]. Легирование редкоземельными металлами улучшает транспортные характеристики электродов и повышает эффективность PSC. Так, в работе [44] были получены и исследованы PSC с архитектурой вида стекло/FTO/ZrO₂-Y₂O₃/CH₃NH₃PbI₃/

spiro-MeOTAD/Au, где содержание легирующей добавки Y_2O_3 в ZrO_2 - Y_2O_3 варьировалось от 0 до 10 моль.%

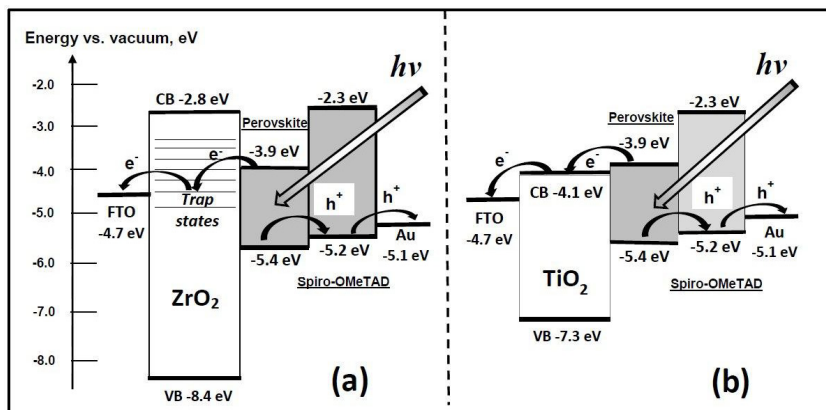


Рисунок 7. Диаграммы границы раздела энергетических зон для PSC на основе ETL ZrO_2 (a) и TiO_2 (b) [37].

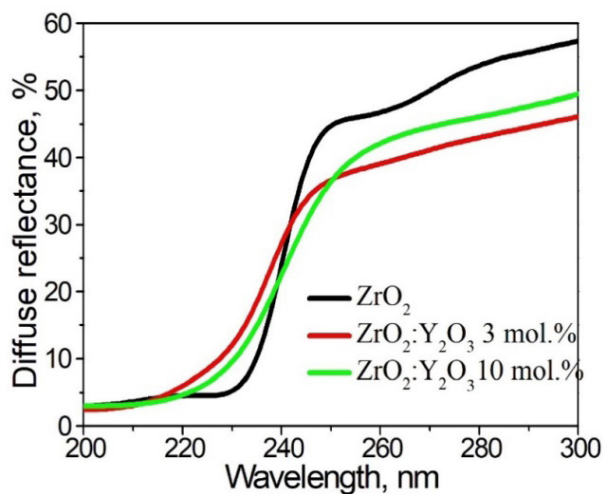


Рисунок 8. Спектры диффузного отражения для нелегированного ZrO_2 и для системы ZrO_2 - Y_2O_3 [37].

На Рис. 8 представлен сравнительный вид спектров диффузного отражения (R) для нелегированного ZrO_2 и для порошков $\text{ZrO}_2\text{-Y}_2\text{O}_3$, где содержание Y_2O_3 колеблется от 3 до 10 mol%. Вычисление значений E_g для систем ZrO_2 и $\text{ZrO}_2\text{-Y}_2\text{O}_3$ показало, что увеличение концентрации легирования увеличивает величину E_g с 5,74 эВ в ZrO_2 до 5,63 эВ в $\text{ZrO}_2\text{-Y}_2\text{O}_3$ (3%) [37]. На Рис. 9 представлены вольт-амперные характеристики, полученные для PSC в стандартных условиях освещения AM1,5G. Сравнение КПД PSC для нелегированных и легированных Y_2O_3 ETL на основе ZrO_2 , показывает преимущества последних.

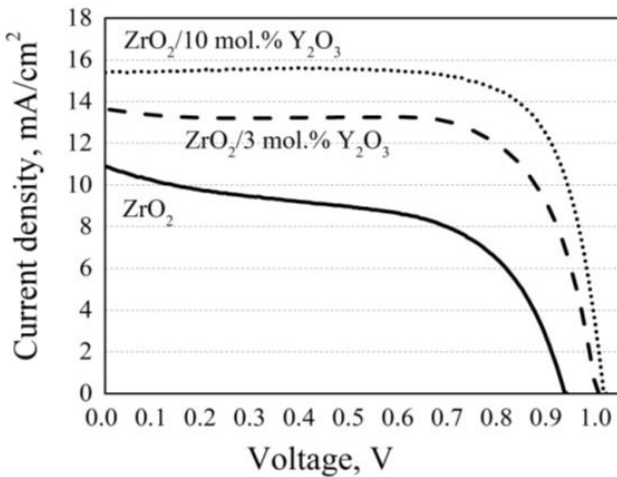


Рисунок 9. J-V характеристики для PSCs с ETL на основе $\text{ZrO}_2\text{-Y}_2\text{O}_3$ [37].

8. Тандемные перовскитно-кремниевые солнечные элементы

Схема тандемного СЭ представляет собой два расположенных один под другим СЭ, верхний из которых частично пропускает падающий на его поверхность поток солнечного излучения.

На Рис. 10 дана иллюстрация работы tandemного СЭ, с нижним СЭ на основе кремния. Такая конфигурация была успешно использована при проектировании tandemных СЭ вида DSSC/c-Si [39] и DSSC/PSC [40].

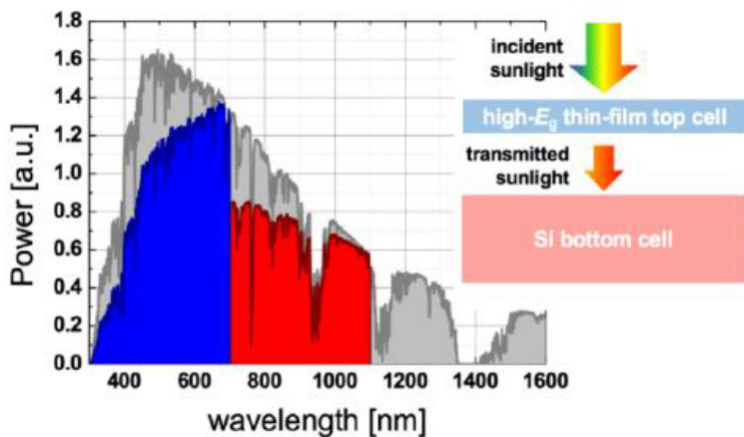


Рисунок 10. Распределение долей солнечной энергии, которые утилизируется верхним прозрачным СЭ (окрашено синим) и нижним СЭ на основе кремния (окрашено красным).

Наиболее перспективная tandemная схема представляет собой комбинацию перовскитного и кремниевого СЭ вида PSC/c-Si [41] с эффективностью в условиях AM1.5G более 30% [13]. Стабилизированная эффективность традиционных c-Si СЭ в этих условиях освещения достигла значения $\sim 26\%$ и уже приблизилось к своему практическому пределу. Существенное повышение эффективности СЭ на основе c-Si возможно только при его интеграции в tandemную систему. Возможность создания tandemных СЭ открылась с появлением эффективных тонкопленочных полупрозрачных СЭ, таких, как DSSC и PSC. На Рис. 11 представлена фотография тан-

демной солнечной панели DSSC/c-Si, которая разработана в ИБХФ РАН.

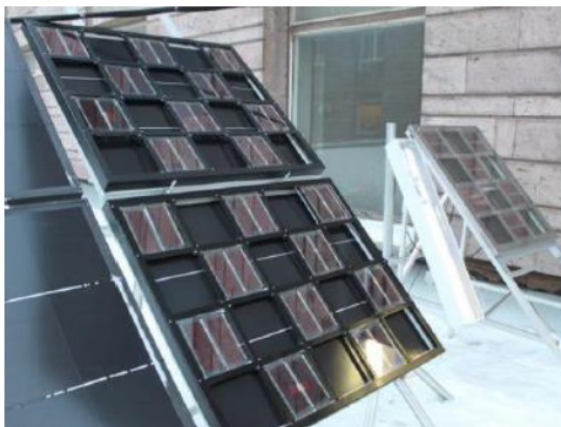


Рисунок 11. Тандемная солнечная панель DSSC/c-Si, установленная на крыше здания ИБХФ РАН в Москве для проведения мониторинга работы в круглосуточном режиме.

Наиболее эффективными на сегодня являются тандемные перовскитно-кремниевые СЭ вида PSC/c-Si. В тандемной конструкции PSC/c-Si в качестве верхнего СЭ используется PSC с эффективностью около 20%. Комбинирование перекрывающихся областей оптического поглощения PSC и c-Si элементов, обладающих, соответственно, шириной запрещенной зоны в 1,6 и 1,1 эВ, позволяет получить суммарную эффективность, превышающей 30% [42, 43]. На Рис. 12 представлены двух-электродная и четырех-электродная конфигурации, которые используются для конструирования тандемных СЭ вида PSC/c-Si. Первая, двух-электродная конструкция, в идеальном случае представляет из себя монолитную структуру, в которой верхний СЭ (PSC) сформирован непосредственно на поверхности нижнего c-Si СЭ, и верхний токосъемный

электрод служит одновременно нижним контактом для верхнего элемента PSC (Рис. 12b) [14]. Двух-электродная конфигурация подразумевает последовательное электрическое соединение двух разнородных СЭ [41], вследствие чего возникают проблемы несоответствия их электрических параметров. При конструировании монокристаллических двух-электродных тандемных СЭ с последовательным соединением отдельных элементов, основной технической проблемой становится сопряжение их электрических параметров, включая напряжения холостого хода, последовательное сопротивление и пр., что требуется для достижения максимального КПД при AM1.5G. Однако, при изменении интенсивности освещения эффективность двух-электродной схемы может значительно понизиться вследствие нелинейной зависимости фотоэлектрических характеристик каждого из СЭ, что приведет к рассогласованию параметров, настроенных на режим работы в условиях освещения AM1.5G.

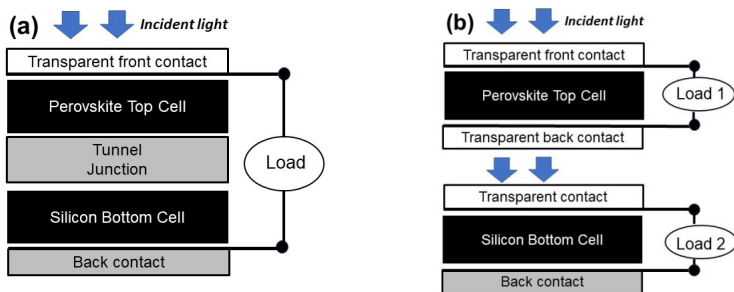


Рисунок 12. Схема двух-электродного (a) и четырех-электродного (b) тандемного перовскитно-кремниевого СЭ вида PSC/c-Si

Перечисленные проблемы, характерные для двух-электродной схемы, решаются при переходе на четырех-электродную

конфигурацию, в котором оба СЭ элемента не имеют общих электрических контактов, но связаны только оптической схемой [42], при этом мощность от двух независимых источников поступает на электронное устройство управления, задачей которого является регулировка и сопряжение их выходных параметров.

10. Заключение

В представленном выше обзоре кратко изложена история развития перовскитных солнечных элементов (PSC), описано современное состояние работ в области перовскитной фотовольтаики, обсуждаются перспективы дальнейших исследований PSC и проблемы, которые препятствуют внедрению этого класса фотопреобразователей в широкомасштабное производство. В статье представлены результаты работ по перовскитной фотовольтаике, проводимых в Институте биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН. Особое внимание уделено разработкам и исследованиям нового поколения PSC на основе неорганических перовскитных материалов в виде сложных оксидов, tandemным СЭ на основе PSC и вопросам использования PSC для работы в условиях низкой и диффузной освещенности, включая их применение в закрытых помещениях с искусственным освещением.

Работа выполнена в ИБХФ РАН в рамках Госзадания № 1201253312.

Ссылки

1. Н. Н. Семёнов. *Научное слово* **1931**, 2–3.
2. J. Yin, A. Molini, A. Porporato. *Nature Communications* **2020**, *11*, 4781.

3. «Crystalline Silicon Photovoltaic Module Manufacturing Costs and Sustainable Pricing», <https://www.nrel.gov/docs/fy19osti/72134.pdf>.
4. A. Kojima, K. Teshima, Y. Shirai. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6050–6051.
5. S. S. Shin, E. J. Yeom, et al. *Science* **2017**, *356*, 167–171.
6. R. C. O. Quiroz, Y. Shen, et al. *J. Mater. Chem. A* **2018**, *6*, 3583–3592.
7. M. H. Kumar, N. Yantara, et al. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11089–11091.
8. H. S. Kim, C. R. Lee, et al. *Sci. Rep.*, **2012**, *2*, 591.
9. W. S. Yang, J. H. Noh, et al. *Science* **2015**, *348*, 1234–1237.
10. S. S. Shin, E. J. Yeom, et al. *Science* **2017**, *356*, 167–171.
11. N.-G. Park, M. Grätzel, et al. *Nat. Energy* **2016**, *1*, 16152.
12. N. J. Jeon, J. H. Noh, et al. *Nature* **2015**, *517*, 476–480.
13. A. Rohatgi, K. Zhu, et al. *IEEE Journal of Photovoltaics* **2020**, *10*, 417–422.
14. F. Sahli, J. Werner, et al. *Nature Mater.* **2018**, *17*, 820–826.
15. J. Schoonman. *Chem. Phys. Lett.* **2015**, *619*, 193–195.
16. A. F. Akbulatov, S. Yu. Luchkin, et al. *J. Phys. Chem. Lett.* **2017**, *8*, 1211–1218.
17. S. A. Adonin, L. A. Froliva, et al. *Adv. Energy Mater.* **2018**, *8*, 1870026.
18. S. R. Spurgeon, Y. Du, et al. *Chem. Mater.* **2016**, *28*, 3814–3822.
19. M. S. Sheikh, D. Ghosh, et al. *Mater. Sci. Eng. B* **2017**, *226*, 10–17.
20. N. Zhang, D. Chen, et al. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 26467.
21. C. Lan, S. Zhao, et al. *J. Alloy. Compd.* **2016**, *655*, 208–214.
22. S. S. Y. Juang, P. Y. Lin, et al. *Frontiers in Chemistry* **2019**, *7*, 00209.
23. J. Lim, H. Kwon, et al. *Nano Energy* **2020**, *75*, 104984.

24. S. Biswas, H. Kim. *Polymers* **2020**, *12*, 1338.
25. S. Mathew, A. Yella, et al. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 242–247.
26. H. Michaels, M. Rinderle, et al. *Chem Sci.* **2020**, *11*, 2895–2906.
27. «Double-sided solar photoconverter», S.D. Varfolomeev, A.V. Todinova, O.I. Shevaleevsky. Patent. RU 2531768: MPK H01 L 31/04, **27.10.2014**, Iss. 30, 7.
28. G. Apostolou, A. Reiders, M. Verwaal. *Energy Science & Engineering* **2016**, *4*, 69–85.
29. G. Murugadoss, G. Mizuta, et al. *APL Materials* **2014**, *2*, 081511.
30. S. Kozlov, A. Nikolskaia, et al. *Physica status solidi A* **2016**, *213*, 1801–1806.
31. N. Tsvetkov, L. Larina, O. Shevaleevskiy, B.T. Ahn. *Energ. Environ. Sci.* **2011**, *4*, 1480–1486.
32. N.A. Tsvetkov, L.L. Larina, et al. *Prog. Photovolt: Res. Appl.* **2012**, *20*, 904–911.
33. S. Kozlov, A. Nikolskaia, et al. *Phys. St. Sol. A* 2016, *213*, 1801–1806.
34. M.F. Vildanova, S.S. Kozlov, A.B. Nikolskaia, O.I. Shevaleevskiy. *Nanosystems: Phys. Chem. Math.* 2017, *8*, 540–545.
35. O.I. Shevaleevskiy, A.B. Nikolskaya, et al. *Rus. J. Phys. Chem. B* 2018, *12*, 663–668.
36. A.N. Bugrov, O.V. Almjasheva. *Nanosystems: Phys. Chem. Math.* 2013, *4*, 810–815.
37. L.L. Larina, O.V. Alexeeva, et al. *Nanosystems: Phys. Chem. Math.* 2019, *10*, 70–75.
38. O.V. Almjasheva, A.A. Krasilin, V.V. Gusarov. *Nanosystems: Phys. Chem. Math.* 2018, *9*, 568–572.
39. A.B. Nikolskaia, M.F. Vildanova, S.S. Kozlov, O.I. Shevaleevskiy. *Semiconductors* 2018, *52*, 88–92.

40. M.F. Vildanova, A.B. Nikolskaia, S.S. Kozlov, O.I. Shevaleevskiy. Tech. Phys. Let. 2018, 44, 126-129.

41. Q. Wali, N.K. Elumalai, et al. Renewable and Sustainable Energy Reviews 2018, 84, 89-110.

42. C.O. Quiroz, Y. Shen, et al. J. Mater. Chem. B 2018, 6, 3583-3592.

43. M. Jaysankar, M. Filipic, et al. Energ. Environ. Sci. 2018, 11, 1489-1498.

20. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

А.А. Попов¹

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



1. Биоразлагаемые композиционные полимерные материалы, включая рециклинг и проблему микропластика

Постоянно растущее промышленное производство синтетических полимерных материалов (пластмасс) приводит к масштабному (постепенно переходящему в катастрофическое) загрязнению окружающей среды их отходами.

В результате возникли две, казалось бы, разнонаправленные, но фактически тесно связанные задачи: во-первых, продление срока службы используемых технических полимерных изделий путем предупреждения их коррозии, в том числе микробной биокоррозии, и, во-вторых, ускорение биоразложения отходов, накапливающихся после завершения срока службы этих изделий. Первая задача решается путем введения в состав полимера стабилизирующих и биоцидных добавок, вторая — путем введения добавок ускоряющих разрушение пластмасс под действием физико-химических факторов среды и делающих их доступными для утилизации микроорганизмами. Актуальной, и масштабной становится проблема получения так называемых «биопластиков» на основе биологических полимеров (например, крахмала, целлюлозы, хитина, альгината).

В последнее время особую остроту приобрела проблема «микропластиков». Термин «микропластики» (МП) (microplastics, MP) впервые применен при обнаружении и исследовании распределения мелких фрагментов синтетических пластмасс в морских осадках. Наибольшее внимание привлекает вопрос возможных вредных последствий, оказываемых МП на организмы животных и человека. МП обнаруживаются в широко используемых человеком продуктах и бытовых материалах. Поэтому изучение процессов биodeградации пластиков приобрело чрезвычайную актуальность.

Целью наших исследований является установление механизма разрушения полимерных композитных материалов на основе полиолефинов и сополимеров полиолефинов, полиэфиров и легко биоассимилируемых полимеров природного происхождения (преимущественно лигноцеллюлозных отходов сельского хозяйства и различных отраслей промыш-

ленности) в результате комплексного анализа кинетических особенностей и закономерностей процесса деградации композитов на их основе под действием биологических и физико-химических факторов окружающей среды. В задачу исследований входит: 1. разработка научно-технических основ создания композитов на основе смесей термопластичных полимеров, микро- и наноразмерных частиц наполнителей и функциональных добавок, отвечающих критериям биоразлагаемости; 2. анализ кинетики процессов деградации материалов под действием физико-химических факторов (модельных сред): ультрафиолетового излучения повышенной интенсивности (фотоокисление), кислорода воздуха (термоокисление), воды и агрессивных химических сред (растворы кислот, щелочей и солей) (абиотическая деградация); 3. исследование закономерностей деградации материалов под действием чистых тест-культур бактерий и микромицетов, а также их сообществ (биотическая деградация); 4. изучение процессов деградации материалов при комплексном воздействии физико-химических и биологических факторов (макро- и микроорганизмов почвенного грунта) в стационарных и природных условиях (натурные испытания). (везерометре). 4. изучение динамики изменения химического состава, структуры и свойств материалов в процессе деградации в модельных монофакторных и природных мультифакторных условиях с установлением зависимости интенсивности деградации от химического состава и структуры (технология компаундирования) материалов; 7. анализ продуктов деструкции материалов с целью определения характера влияния на скорость процесса разрушения и оценки экологической безопасности.

Решаются вопросы биоразложения полимерных материалов, а также факторов, влияющих на ускоренную биодеградацию композиций на основе полиолефинов, полилактида,

полигидроксиалканоатов, полиэтиленоксида, поликапролактона, простых полиэфиров и полиацеталей. Благодаря комплексному анализу кинетики процессов физико-механической и биохимической деградации, протекающих в материалах под действием солнечного света, кислорода, агрессивных химических веществ и жизнедеятельности микроорганизмов, устанавливаются закономерности разрушения разработанных композиционных материалов в условиях полигонов твердых бытовых отходов. Изученная схема разрушения материалов позволит установить закономерности и механизм деградации наполненных полимерных композиций с многоуровневой структурой, что в дальнейшем будет использовано при создании подобных систем полимеров. Основными ожидаемыми научными результатами являются: 1. Создание научно-практических основ создания иерархически организованных полимерных систем, способных саморазрушаться при определённых условиях; 2. Определение влияния структуры и химического состава материалов на способность материалов к физико-химической и биологической деградации; 3. Установление закономерностей деградации материалов и выявление основных факторов окружающей среды, определяющих кинетику этого процесса; 3. Разработка схемы разложения разработанных материалов под воздействием факторов окружающей среды, включая термо- и фотоокислительную деструкцию, а также гидролиз и окисление полимеров вплоть до их деградации под действием агрессивных химических сред и внеклеточных ферментов микроорганизмов; 4. Установление механизма деградации и разработка принципов управления скоростью разрушения в окружающей среде материалов на основе полимерной матрицы и легко биоассимилируемых дисперсных наполнителей; 5. Разработка экспресс-методов оценки способности микроорганизмов к деструкции пластиков и определение скорости их

роста Коллективом установлены закономерности, касающиеся влияния морфологии композиций синтетических крупнотоннажных полиолефинов с добавками, инициирующими процессы оксо- и биodeградации (Zykova A. K., Pantyukhov P. V. et al., 2021; Mastalygina E. E., Varyan I. A. et al. 2020). Установлена оптимальная технологическая схема получения композиций (тип смесителя, режимы экструзии и рецептура смесей). Показано, что структура разработанных композиционных материалов очень чувствительна к технологии их переработки (типу и интенсивности внешнего воздействия) и химическому составу материалов (Olkhov A. A., Tyubaeva P. M. et al., 2020). Проведен широкий спектр исследований по определению влияния технологии компаундирования и состава композитов на структурные особенности и ряд физико-химических свойств материалов. Благодаря экспериментально обоснованному выбору эксплуатационных характеристик, параметров получения смесевых композиций и технологии формования пленок, выработаны практические рекомендации по созданию ряда композитов.

В работе нами использован комплекс технологических подходов к созданию иерархически организованных полимерных систем, а также набор методов физико-химического изучения структуры и свойств разработанных материалов, методы микробиологического и химико-энзиматического анализа и другие. В модельных опытах воздействия микробиологических штаммов на индивидуальные полимеры устанавливаются кинетические зависимости протекания деструктивного процесса, выявляются основные факторы, влияющие на интенсивность деструкции, включая химического структуру и конформацию макроцепи, разветвленность, молекулярную массу, наличие другого мономера, его количества и характера распределения по цепи, надмолекулярной

структуры (степень кристалличности, ориентация). Устанавливается роль сегментальной подвижности макромолекул в протекании деструктивного процесса под действием различных факторов. Модельные опыты позволяют подойти к пониманию механизма изучаемого процесса. Самостоятельной проблемой является выбор наиболее активных деструкторов разрабатываемых композитных материалов. Проводятся опыты с биокомпозитами, полученными на основе смесей полиэфиров, полиолефинов и природных наполнителей, содержащими вспомогательные добавки. Устанавливается как влияет химическая природа компонентов композита и его структурных особенностей на способность к биоадсорбции, биообрастанию и последующей биологической деградации. Биокомпозиты подвергаются воздействиям различных факторов, включая термоокислительную деструкцию и облучение ультрафиолетом как в лабораторных (климатическая камера), так и природных условиях (почвенные испытания в стационарном лабораторном режиме и в открытом грунте на полигоне). Идет разработка экспресс-метода количественного измерения скорости деградации пластиков в лабораторных и природных условиях.

Ниже приведены конкретные примеры изучения структуры и свойств полимерных композиций, которые представляют перспективу для создания биопластиков.

Исследованы пленочные и нетканые материалы на основе полилактида и натурального каучука. Пленочные образцы получены из раствора в хлороформе, а нетканый материал — методом электроформования. Содержание натурального каучука в смесях составляет 0, 5, 10, 15 мас. %. Добавление натурального каучука в матрицу полилактида повышает эластичность композиционного материала. Основными факторами, вызывающими разрыв полимерной цепи в процессе

биодеструкции в условиях окружающей среды, являются микроорганизмы и вода. Внешний фактор — кислород является мощным активатором деструкционных процессов в полимерах. Фото- и термоокисление представляют собой одновременное действие ультрафиолетового излучения или температуры и кислорода. Важно отметить, что комплексное воздействие солнечного света и температуры оказывает дополнительное влияние на полимерную матрицу. Определено, что добавка натурального каучука в матрицу полилактида выступает ингибитором фотодеструкции, но за счет увеличения аморфной фазы ускоряет термоокисление. Установлено, что пленочный материал может выступать в качестве мульчирующего материала, нетканый — субстратом для выращивания сельскохозяйственных культур. При испытании нетканых волокнистых материалов ПЛА и ПЛА/НК показано, что они являются не только субстратом, но и питательной средой (Подзорова М. В., Тертышная Ю. В.).

Представляют интерес композиции на основе полиэтилена низкой плотности (ПЭ) с добавлением натурального каучука (НК). Показано, что при хорошей биоразлагаемости такие материалы обладают и удовлетворительными эксплуатационными физико-механическими свойствами. Композиты ПЭНП/НК могут быть использованы для создания широкого спектра продукции для нужд сельского хозяйства и других отраслей промышленности. Исследовались образцы в виде полимерных пленок с содержанием НК от 0 до 50 мас.%. Испытания на биodeградацию проводили путем компостирования образцов полимерной пленки ПЭНП/НК в грунте подготовленном согласно ГОСТу. Биodeградацию полимерных пленок характеризовали путем изменения потери массы образцов после воздействия почвы в течение 24 месяцев (рис. 1).

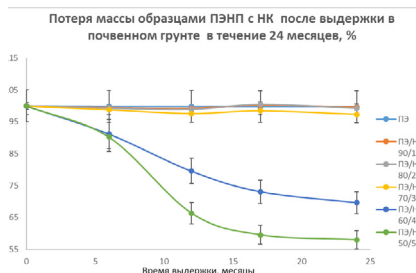
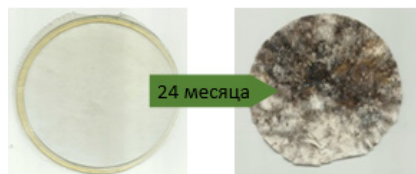


Рисунок 1. Изменение внешнего вида образца ПЭНП/НК 60/40 после выдержки в лабораторном почвенном грунте в течение 24 месяцев (слева) и потеря массы образцов ПЭНП с НК после выдержки в грунте, 24 мес., % (справа)

Наибольшая потеря массы наблюдается для композиции с содержанием НК 50% (ПЭНП/НК = 50/50). Процесс биodeградации полимерных материалов в почве под влиянием различных физических, химических и биохимических воздействий исследовался методом гелпроникающей хроматографии. Этот метод позволяет однозначно установить идет ли процесс биodeградации и как он развивается во времени. Экспериментальные данные показали, что происходит значительное уменьшение молекулярной массы полиэтилена (Варьян И.А и др.).

Исследовалась способность полимерных композиций полилактид-полибутиленадипинаттерефталат (ПБАТ) к самопроизвольной деградации в почве. Оценку проводили по потере массы. Спустя 6 месяцев выдержки в почве обнаруживаются визуальные изменения и потеря массы образцов всех изучаемых составов, особенно с большей долей ПБАТ (Селезнева Л. Д. и др.).

Влияние фазовой структуры на биодеструкцию было исследовано на примере тройных композиций ПП/ПЭНП/цел-

люлоза. Соотношение ПП и ПЭНП в полиолефиновой матрице менялось от 0 до 100%, а содержание целлюлозы в каждом образце составляло 30% вес. На микрофотографиях видны последствия действия микробиоты после выдержки в почвенном грунте в течение 15 месяцев. Происходит нарушение целостности образцов (рис. 2А), проникновение мицелиальных грибов в закапсулированные в полимерной матрице частицы наполнителя (рис. 2Б). Наиболее высокая доля поврежденных частиц наблюдается у композиций с содержанием ПП в матрице 10–20 мас.% и 80–90 мас.%. Изменение окраски целлюлозного волокна связано с накоплением пигментов, присущих разнообразным таксономическим группам грибов и некоторым бактериям.

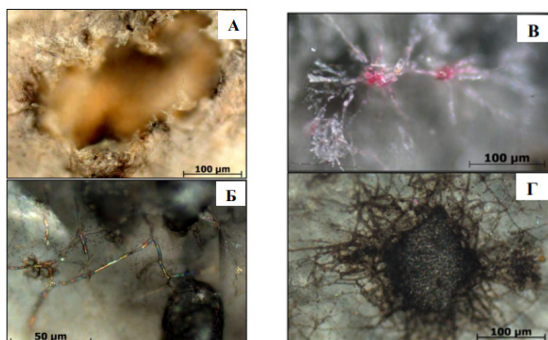


Рисунок 2. Микрофотографии композиции ПП/ПЭ/целлюлоза после 15 месяцев в грунте

Характер и динамика развития микрофлоры на поверхности образцов композиций ПП/ПЭ/целлюлоза варьируется при изменении состава полимерной матрицы. После 10 месяцев в почвенном грунте на образцах с содержанием ПП в матрице 10...30 мас% фиксируются два разных штамма мицелиальных грибов, формирующих мицелий из прозрачных гифов с ярко-розовым спороношением и развитую поверхностную сетку

мицелия из темных полупрозрачных гифов диаметром до 5 мкм с признаками спороношения (рис. 2Г). На образцах с преимущественным содержанием ПП инициируется развитие только одного вида микромицетов (Масталыгина Е. Е. и др.).

При разработке биокомпозиционных материалов, состоящих из синтетической полимерной матрицы и растительного наполнителя, было установлено повышение термоокислительной стабильности синтетических полимеров в биокомпозитах за счет целлюлозосодержащих наполнителей, обнаружен эффект окислительной стабилизации полимера. При выдержке в кислородсодержащей среде при температуре 200°C биокомпозиты имеют гораздо больший период индукции нежели чистый полимер. Это объяснялось диффузией низкомолекулярных компонентов из растительных наполнителей в полимерную матрицу в процессе компаундирования. В составе этих низкомолекулярных компонентов есть полифенольные соединения, которые являются природными антиоксидантами. Диффузия антиоксидантов в полимерную матрицу приводит к ее стабилизации в среде кислорода. При малом содержании растительных компонентов эффект стабилизации матрицы не обнаруживается, однако при высоком наполнении (50–70 мас.%) данный эффект становится очевиден (увлечение периода индукции с 5 до 50 мин). Эффект стабилизации полимерной матрицы позволяет увеличить число циклов промышленной переработки без дополнительного введения синтетических антиоксидантов, что делает высоконаполненные биокомпозиты еще более перспективными для промышленного внедрения (Пантюхов П. В., Шеленков П. Г. и др.).

Предложена оксо-разлагающая добавка к полимерным композициям на основе полиолефинов, инициирующая в малых концентрациях окислительный разрыв полиолефиновых цепей и, таким образом, повышающая способность полимерных ком-

позиций на основе полиолефинов к биоразложению в окружающей среде после окончания срока эксплуатации изготовленных из них изделий. В состав разработанной добавки входят карбоксилаты металлов или смеси карбоксилатов металлов, нанесенные на инертный носитель. В качестве карбоксилатов металлов используют 2-этилгексаноаты металлов, выбранных из группы, включающей кобальт, цинк, цирконий. Добавка, выполняющая функцию инициатора окисления — про-оксиданта, может быть введена непосредственно в базовый полимер или может быть использована в качестве компонента мастербатча, предназначенного для введения в базовый полимер на основе полиолефинов (полиэтилен, полипропилен, их сополимеры и др.) для придания изготовленным из него изделиям способности к ускоренному биоразложению в природных условиях (Луканина Ю. К. и др.)

Открыт новый структурно-химический механизм взаимодействия полимерных фаз в композитах на основе полипропилена (ПП) и полиамида ПА6/66. В капельно-матричной структуре композита фаза ПА действует как антиоксидант: она захватывает радикалы и продукты из окисляющейся фазы ПП, замедляя окисление ПП. Переход к непрерывным фазам ПП и ПА (сетка в сетке) сопровождается уменьшением подвижности фазы ПП, что приводит к резкому, в несколько раз, снижению скорости распада гидропероксидов на радикалы. Это дает дополнительную защиту ПП от окисления. Новый механизм может быть использован для приготовления перспективных композитов ПП/ПА с улучшенными свойствами, переработке смешанных отходов ПП и ПА без дополнительных добавок антиоксидантов, для создания биоразлагаемых композиций ПП и ПА (Марголин А. Л., Воронцов Н. В., Монахова Т. В. и др.).

С помощью статической манометрической установки проводилось изучение влияния состава смесей полимеров

на кинетику их термоокисления. Таким методом исследованы смеси полиэтилен низкой плотности/натуральный каучук(НК), полилактид/НК, полипропилен/полиамид. Изучены также нанокомпозиты на основе полипропилена (ПП) и наноразмерных форм углерода: фуллеренов, наноразмерного графита и графена. Нанокомпозиты получены полимеризацией *in situ*, что позволяет достичь равномерного распределения наночастиц по объему ПП. Установлен механизм защитного действия наноуглерода в окислении ПП, который состоит в ингибировании процесса окисления ПП и обусловлен взаимодействием наночастиц с пероксильными макрорадикалами ПП. Обнаружена способность графена, кроме ингибирования, катализировать окисление ПП на стадии разветвления цепей. Данные о механизме окисления этих нанокомпозитов важны в силу огромного потенциала их применения в качестве multifunctional полимерных материалов с улучшенными характеристиками термостойкости, электродинамики, теплопроводности, трибологии и адгезии, а также как экранов вредного электромагнитного излучения (Монахова Т. В. Марголин А. Л. и др.)

2. Биополимерные материалы для медицины и гигиены

Разработаны нетканые биополимерные волокнистые материалы с антибактериальными свойствами. Методом электроформования, были получены ультратонкие (1–5 мкм) волокна, содержащие 1–5% комплексов с железом, марганцем, цинком, оловом. Исследована морфология материалов, определены основные закономерности изменения свойств материалов в зависимости от концентрации комплексов и технологических параметров процесса электроформования. Испытания показали, что количество жизнеспособных микробных клеток после

экспозиции 30 минут снизилось для золотистого стафилококка в 2,2 раза, Эшерихии коли не менее, чем в 90 раз, для Сальмонеллы тифимуриум в 6 раз. Полученные материалы проявляют высокий антибактериальный эффект, позволяющий использовать их в качестве антисептических повязок, пластырей, бандажей, масок для защиты органов дыхания (Карпова С. Г., Ольхов А. А. и др.).

Проведены комплексные исследования ультратонких волокон поли(3-гидроксibuтирата) (ПГБ) с нанолитами оксида графена (ОГ), сочетающие термофизические, динамические измерения зондовым методом и сканирующую электронную микроскопию. Полученные волокнистые материалы обладают бактерицидными свойствами и должны найти применение при создании новых терапевтических систем антибактериального и противоопухолевого действия (Карпова С. Г., Ольхов А. А., Варьян И. А. и др.)

Предложена рецептура новых волокнистых материалов, полученных методом электроформования (рис. 3), на основе системы полимер-модифицирующая добавка-белковая молекула со сложной структурой для биомедицинского применения.



Рисунок 3. Схема метода электроформования (слева) Нетканый волокнистый материал на основе ПГБ (справа)

Биомиметические материалы на основе полиэфира природного происхождения поли-3-гидроксibuтирата, модифицированного геминoм и фибриногеном, представляют большой интерес и потенциально применимы в различных областях биомедицины. Материалы отличаются не только высокоразвитой поверхностью, но и высокой пористостью (более 90%), включая высокую долю открытых пор, с высокой проницаемостью для влаги и воздуха, контролируемой гидрофобностью и высокой скоростью биodeградации в ране (менее 20 дней) при постоянном антимикробном эффекте в течение 10 дней. Применение гемина в качестве модифицирующей добавки позволило значительно улучшить формовочные свойства материала для получения биомиметической структуры методом электроформования, кроме того, гемин способствовал эффективной адсорбции фибриногена на ранозаживляющем материале, обеспечивая равномерную локализацию белка на поверхности волокон. Кроме того, высокий антимикробный эффект является результатом постепенного релиза гемина из волокон поли-3-гидроксibuтирата. Фибриноген же продемонстрировал высокую эффективность в качестве активатора ранозаживления. Оценка цитотоксичности и поведения клеток *in vitro* и заживление открытых ран у мышей *in vivo* показали, что нетканые материалы на основе поли-3-гидроксibuтирата, гемина и фибриногена обладают выраженными свойствами, необходимыми для ускоренного заживления на ранних стадиях для кожных ран, включая даже раны большой площади. Такие биомиметические структуры позволили обеспечить ускорение заживления ран на 45% на 3-й день, а полное закрытие раны на 15-й день без необходимости удаления ранозаживляющей повязки (Тюбаева П. М., Варьян И. А., Гаспарян К. Г. и др.).

Создание и исследование новых полимерных материалов для медицины является актуальным и важным направлением

полимерного материаловедения. Порфирины и их производные при закреплении на полимере-носителе не только сохраняют свои свойства, но и усиливают их за счет кооперативных взаимодействий в полимерных цепях, разделения активных центров, повышения стабильности тетрапиррольного фрагмента. Полученные супрамолекулярные системы на основе полилактида и мезо-замещенных арилпорфиринов обладают антибактериальной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий (Тертышная Ю. В., Лобанов А. В., Абушахманова З. Р. и др.).

Разработано научное направление — управление фотохимическими свойствами природных и синтетических тетрапирролов на надмолекулярном уровне. Предложены способы получения надмолекулярных агрегатов хлорофилла, гемина, порфиринов и фталоцианинов в матрицах сегнетоэлектрических полимеров, поливинилпирролидона, полилактида и полигидроксibuтирата. Получены функциональные полимерные композиты для фотовольтаики и биомедицинского применения (Лобанов А. В. и др.).

3. Эластомеры, механохимическая модификация, утилизация резин.

Разработан способ активации резиновой крошки из каучуков общего назначения, который может быть использован для изготовления резиновых изделий различного назначения: в производстве резино-технических изделий, битумно-полимерных мастик, на основе которых могут быть получены гидроизоляционные материалы для строительства и ремонта. Способ заключается в разработке нового метода функционализации поверхности резиновой крошки для повышения ее активности и улучшения физико-механических и адгезионных свойств

резиновых композиций. Для реализации данного способа используется предварительная модификация крошки с помощью механохимической обработки в растворе галогеналкана. Затем следует последовательный процесс гидроксилирования или силанирования. Предложенный способ значительно повышает количество функциональных групп (как гидроксильных, так и галогенсодержащих) на поверхности резиновой крошки и, как следствие, увеличивает количество межмолекулярных сшивок в процессе вулканизации резиновой смеси, что обеспечивает более эффективное взаимодействие резиновой крошки с эластомерной матрицей резиновой смеси, в которой применяется активированная по данному способу резиновая крошка. Это приводит к повышению механических характеристик резиновой смеси, по сравнению с исходной резиновой крошкой (Михайлов И. А., Сухарева К. В. и др.).

Ведутся широкие исследования по разработке методов модификации эластомерных материалов. Основное направление деятельности сосредоточено на изучении механохимических превращений каучуков и термоэластопластов под воздействием давления набухания. Разработан способ получения галоидсодержащих каучуков методом набухания в растворах галоидсодержащих модификаторов с получением материалов, обладающих улучшенными физико-механическими и другими специфическими характеристиками. Изучается возможность получения совмещенных систем путем их галоидной компатibilизации через раствор с использованием в качестве модификаторов хлорированных парафинов. Галоидирование неполярных каучуков придает им полярность и позволяет совмещаться с полярными каучуками. Исследуется влияние соотношения эластомеров и способа смешения на формирование фазовой структуры и свойства композиций на основе бутилкаучука (БК), хлорбутилкаучука (ХБК) и этилен-пропилен-диенового

каучука (СКЭПТ). Разрабатываются рецептуры эластомерных композиций на основе диеновых каучуков для защиты резин от озонного старения.



Рисунок 4. Влияние атмосферного озона на трещинообразование шин в процессе эксплуатации

Кроме того, успешно проведены работы по повышению механических и износостойких свойств бутадиен-нитрильных каучуков путем модификации их поверхностей. Целью данной работы является исследование методов быстрой модификации поверхности бутадиен-нитрильного каучука с использованием эластомерной композиции на основе фторполимера и фторопласта. Установлено, что модификация нитрильных резин в 10%-м растворе поливинилиденфторида в трифтортрихлорэтане позволяет повысить стойкость к истиранию в 10 раз. Одним из перспективных направлений исследования является также создание эластомерных композиционных материалов с применением в качестве наполнителя алюмосиликатных ценосфер различной дисперсности, в том числе имеющих поверхностную металлизацию с целью создания облегчённых материалов с улучшенным комплексом свойств (Сухарева К. В. и др.).

В работах установлен структурный механизм торможения озонной деструкции диеновых эластомеров насыщенными полимерами. Эффективность защиты от озонного

трещинообразования зависит от совместимости компонентов, максимальна при образовании непрерывного пространственного каркаса насыщенного полимера и формировании развитого межфазного слоя с наибольшей плотностью. Теоретические представления были подкреплены экспериментальными данными о структуре межфазного слоя, объем и плотность которого в совулканизатах бутадиен-нитрильных каучуков (БНК) с этиленпропилендиеновыми эластомерами (СКЭПТ) оценивали методом Заппа по величине отклонения равновесной степени набухания совулканизатов в селективном растворителе н-гептане от аддитивных значений. Ранее установлено участие дефектных структур БНК, образуемых акрилонитрильными звеньями и нарушениями стереорегулярности бутадиеновых звеньев, в формировании межфазного слоя в смесях со СКЭПТ. Показана корреляция плотности и объема межфазного слоя в смесях БНК со СКЭПТ с долей свободного объема в дефектах структуры БНК. С увеличением доли свободного объема формируется более развитый межфазный слой, объем и плотность которого зависит от состава и стереорегулярности пропиленовых звеньев в СКЭПТ, увеличивающиеся с ростом содержания наиболее гибких этиленовых звеньев и степени изотактичности пропиленовых последовательностей (Ливанова Н. М. и др.).

4. Реакционная способность напряженных полимеров

Полимерные композиции представляют собой двухфазную и более систему с высокоразвитой поверхностью раздела между фазами. Хорошо известно, что поверхностный слой является термодинамически неравновесным, что лежит в основе закономерностей, которые являются предметом рассмотрения колло-

идной химии. Учеными школы С. Н. Журкова (В. И. Веттегрень, 1973) методом ИК-спектроскопии было показано наличие на поверхности полимеров перенапряженных связей.

На количественном уровне была изучена реакционная способность структурно деформированных органических молекул. (Попов А. А., докт. дисс., 1988 г.) Экспериментально наблюдается как ускорение, так и замедление химических реакций под влиянием структурных напряжений, что определяется механизмом реакции и характером нагрузки (растягивающая или сжимающая реакционный центр).

Ускорение реакции происходит в том случае, когда изменение геометрии реакционного центра под действием нагрузки направлено в ту же сторону, что и изменение геометрии реакционного центра при достижении переходного состояния в процессе реакции. Противоположная направленность приведет к замедлению процесса. Степень изменения константы скорости зависит от величины нагрузки и координаты реакции, и может достигать нескольких порядков. У многих химических реакций лимитирующей стадией является процесс перехода атома углерода из sp^3 в sp^2 состояние. Это, например, отрыв атома водорода и разрыв любой связи в основной цепи. Такие реакции чувствительны к структурным деформациям, значительно ускоряясь под влиянием растягивающих напряжений. К ним относятся деструктивные процессы, протекающие под влиянием окружающей среды: фото- и термоокисление, озонолиз, бидеструкция и др. Ускоряются процессы мономолекулярного разрыва основной цепи макромолекулы в процессе ползучести при испытаниях на долговечность, при гидролизе сложноэфирной и амидной связи.

Влияние растягивающих напряжений на реакционную способность мономерного звена $C-C=C-C$ диеновых эластомеров зависит от конфигурации этого звена. Так, реакция двойной связи

с озоном замедляется при взаимодействии с цис-звеном, ускоряется — с транс-звеном и не оказывает влияния при нахождении двойной связи в боковой цепи. Полученные результаты позволили объяснить известный эффект «критической деформации», наблюдаемый при озонном старении диеновых эластомеров — основного материала для производства шин. Этот эффект проявляется в том, что наиболее опасные — это малые растягивающие деформации — 10–30%. При более высоких деформациях увеличивается время до появления трещин и скорость их роста резко замедляется, растет долговечность резин.

Используя указанные закономерности, стало возможным объяснить целый ряд экспериментально наблюдаемых явлений. Так, наибольший биодеструктивный эффект обнаружен при почвенных испытаниях образцов тройных композиций полиэтилена низкой плотности с полипропиленом и растительным наполнителем, у которых реализуется наибольшая площадь фазового раздела между двумя полиолефинами. А именно, составы с содержанием каждого из двух полиолефинов в диапазоне 10–30% в расчете на их 100% содержание. Именно в этом диапазоне своего содержания второй компонент формирует дисперсную фазу в матрице большего компонента и реализуется максимальная площадь раздела между ними (Масталыгина Е. Е., канд. дисс. 2016 г.).

Применен новый принцип механохимической модификации эластомеров, основанный на инициировании химических процессов в условиях воздействия давления набухания в растворителе. С использованием гельпроникающей хроматографии установлено снижение молекулярной массы каучука и изменения ММР (M_w/M_n). Исходя из представлений о статистическом разрыве макромолекул каучука с образованием радикалов с возможной последующей рекомбинацией,

процесс механодеструкции макроцепей приводит к сужению ММР. Изначально широкое ММР стремится к пределу $(M_w/M_n) = 2$, что является наиболее вероятным распределением при статистическом разрыве цепей. Впервые проведена галлоидная механохимическая модификация поверхности резин на основе бутадиеннитрильных каучуков, где в качестве галлоидмодифицирующего компонента использованы фторсодержащие предельные углеводороды (Сухарева К. В., канд. дисс. 2018)

Обнаружены кинетические особенности озонирования нетканых ультратонких волокон полигидроксibuтирата, обладающих высокоразвитой поверхностью. Начальный этап озонирования этих волокон характеризуется высокой скоростью процесса, многократно превышающую скорость озонирования на последующем стационарном участке. Аналогичное явление ранее наблюдалось при озонировании мелкодисперсных полиолефиновых порошков с развитой поверхностью. Термодинамически неравновесный поверхностный слой, содержащий определенную долю напряжённых фрагментов макромолекул обладает повышенной реакционной способностью к акцепторам водорода, каким является озон. Происходит так называемая «химическая релаксация», сопровождаемая разрывом наиболее напряженных и неравновесных участков макромолекул с дальнейшим упорядочиванием надмолекулярной структуры. При этом повышаются физико-механические параметры материала, наблюдается двукратный рост разрывного напряжения, модуля упругости и деформации при разрыве. Кроме того, показано, что стерилизация волокон озоном наиболее эффективно по сравнению с другими способами стерилизации (Тюбаева П. М., канд. дисс., 2020).

Проведенные ранее экспериментальные и расчетные работы в рамках конформационного анализа по исследованию влияния напряжений на реакционную способность находят своё дальнейшее продолжение. Методами квантовой химии (DFT-методы B3LYP, PBE0, дважды гибридный метод B2PLYP, комбинированный метод ONIOM (CCSD: B3LYP)) и методом связанных кластеров CCSD с использованием базисов 6-31G, aug-cc-pVDZ, Midi-X и SVP изучена реакция ряда акцепторов ($\bullet\text{CH}_3$, $\bullet\text{OOH}$, $\bullet\text{CCl}_3$, O_3 и $\text{Br}\bullet$) с насыщенными циклическими углеводородами — циклогексаном, циклогептаном и циклооктаном. Особенностью данных реакций является то, что их скорость зависит от избыточной энергии цикла, хотя во всех случаях раскрытия цикла не происходит. Данные работы показывают, что различие константы скорости реакции отрыва водорода различными по природе акцепторами в ряду циклоалканов обусловлено их (циклов) различной напряженностью. В этой реакции атом углерода изменяет гибридизацию sp^3 на sp^2 с соответствующим увеличением валентного угла. Поэтому, если в молекуле изначально из-за жесткой структуры цикла этот угол увеличен, это облегчает реакцию. Выполнено моделирование реакции термического распада цепей полиэтилена и бутадиенового каучука в присутствии растягивающей силы, действующей вдоль оси молекулы. Рассмотрена реакция изолированной цепи, в качестве модели которой взяты молекулы октана и 2,6-октадиена соответственно. На основе квантовохимических расчетов методами B3LYP, LC- ω PBE, CCSD(T), CASSCF, MP2 оценена чувствительность реакции к деформации. Все методы показали, что распад цепи полиэтилена происходит при удлинении молекулы на величину порядка 1 Å, тогда как для 2,6-октадиена результат противоположен — разрыв молекулы сопровождается уменьшением ее длины на 0.3–0.5 Å. Это означает,

что при наличии деформации растяжения имеют место ускорение реакции распада полиэтилена и замедление реакции распада бутадиенового каучука (Мамин Э. А., Крисюк Б. Э., Попов А. А.).

21. НОВЫЙ КЛАСС БИОАНТИПИРЕНОВ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ МОДИФИЦИРОВАННОГО ВОЗОБНОВЛЯЕМОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Ломакин С.М., Сахаров П.А., Хватов А.В.

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

Предметы, окружающие человека, в основном имеют полимерную природу, а все углеродсодержащие полимеры, природные или синтетические, как правило подвержены горению на воздухе. Для снижения их горючести применяются специальные добавки — антипирены. Применение антипиренов — замедлителей горючести для полимерных систем является важным фактором в спасении жизни людей от пожаров и безопасности окружающей среды [1–3]. Все существующие антипирены в основном предотвращают или подавляют процессы горения путем химического или физического воздействия в газовой либо конденсированной фазе. Традиционные промышленные галоген- и фосфорсодержащие помимо высокой эффективности обладают рядом негативных качеств, к которым относится загрязнение окружающей человека среды высокотоксичными продуктами эксплуатации и горения [3–4].

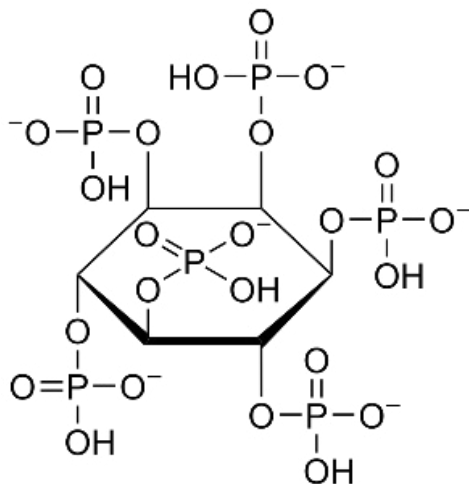
Проблемы окружающей среды и здоровья человека, возникающие при их использовании, приводят к поиску новых экологически-безопасных антипиренов для полимеров [3–8].

Значительные успехи в поиске антипиренов на современном этапе развития мировой науки обусловлены использованием нанодисперсных наполнителей: слоистых силикатов [2,3], углеродных нанотруб и многослойного графена [4–6], а также нового класса биоантипиренов производных модифицированного

возобновляемого растительного сырья. [7-10]. При этом главными критериями отбора для современных представителей антипиренов являются эффективность огнезащитного действия при минимальных концентрациях антипирена, экологическая безопасность применения и использования [8], а также экономическая целесообразность их производства.

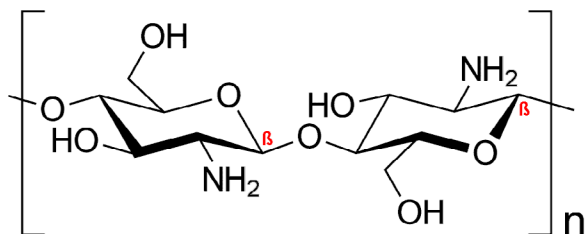
Антипирены на биологической основе (биоантипирены) сегодня привлекают внимание благодаря экологической безопасности и эффективности в повышении огнестойкости представляют инновационную альтернативу традиционным антипиренам [11-16]. В основном биоантипирены получают из материалов растительного происхождения, таких как целлюлоза, лигнин, крахмалосодержащие отходы сельскохозяйственной промышленности, хитозан и др.

Ниже приведены примеры природных прекурсоров для получения биоантипиренов.

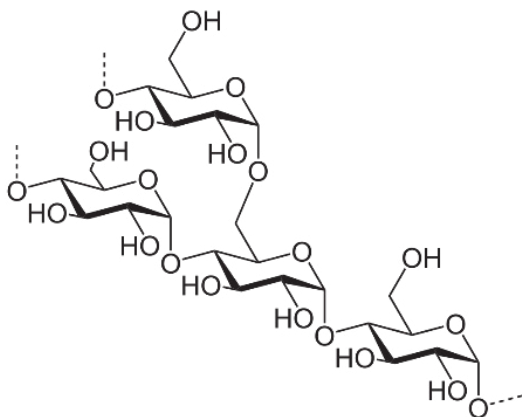


Фитиновая кислота: *Мио*-инозитгексафосфорная кислота, *D* мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексаксидигидрофосфорная кисло-

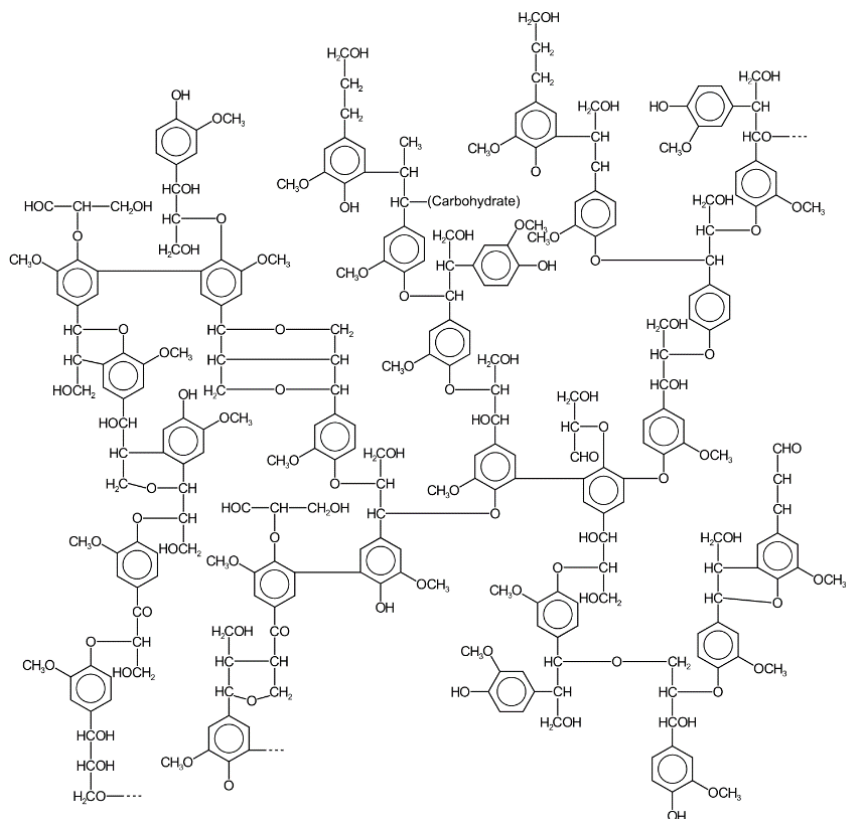
та — природное соединение, содержащееся во многих растительных материалах, таких как семена, орехи и зерна. Было доказано, что он является эффективным антипиреном, который можно использовать в пластмассах, покрытиях и текстиле [11,12].



Хитозан: аминополисахарид — биополимер, полученный из хитина, который содержится в панцирях ракообразных. Было обнаружено, что он обладает хорошими огнезащитными [13,14]. свойствами и может использоваться в различных областях применения, включая покрытия, пластмассы и ткани.



Крахмал: Смесь полисахаридов амилозы и амилопектина, мономером которых является альфа-глюкоза. Крахмал — это возобновляемый ресурс, который синтезируется растениями в хлоропластах с использованием энергии света при фотосинтезе. Антипирены на основе на основе химически модифицированного крахмала можно использовать в различных областях, включая целлюлозные покрытия, текстиль и строительные материалы [12, 15].



Лигнин является побочным продуктом целлюлозно-бумажной промышленности. Было обнаружено, что он обладает хороши-

ми огнезащитными свойствами и может использоваться в ряде областей применения, включая пластмассы, покрытия и композиты [9,16].

Огнезащитное действие биоантипиренов проявляется исключительно в конденсированной фазе и имеет физическую природу воздействия, проявляющуюся в основном за счет эффекта коксообразования горящих материалов [11,13,14]. Коксообразный материал помогает создать теплоотвод на поверхности образца, что уменьшает теплопередачу в объем материала, и таким образом, понижает температуру пиролиза [13]. Огнезащитный эффект карбонизации может быть значительно повышен за счет интумесценции (вспучивания) коксообразного поверхностного слоя [17, 18]. Интумесценция в процессе горения на поверхности происходит под действием одновременно вспенивания и карбонизации горящего материала. Интумесцентные добавки принято считать экологически-безопасными антипиренами, из-за практического отсутствия в окружающей среде высокотоксичных продуктов сгорания. С тех пор как первые интумесцентные покрытия (материалы) были запатентованы в 1938, механизм огнезащиты посредством формирования коксообразной пены объяснялся с точки зрения изолирующего барьерного действия между пламенем и поверхностью полимерного материала [17].

Как показали исследования, проведенные сотрудниками лаборатории «Химической стойкости полимеров» ИБХФ РАН окисленные производные природного возобновляемого сырья [19–20], представляющие собой целлюлозосодержащие и крахмалосодержащие (полисахара) реагенты могут найти применение в качестве эффективных антипиренов для конструкционных изделий и материалов из древесины благодаря своему уникальному свойству — интумесценции в условиях температурного воздействия [21–23]. Так в работе [21] было изучено

огнезащитное действие биоантипиренов на основе окисленной древесины, а также предложен формальный механизм процесса интумесценции с учетом химического аспекта пиролитической трансформации биоантипирена.

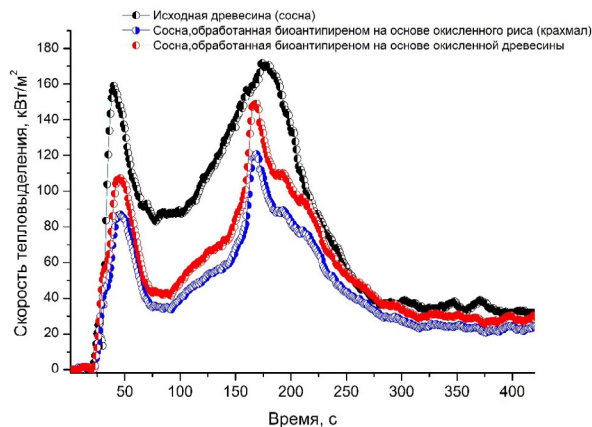


Рисунок 1. Зависимость скорости тепловыделения (СТВ) от времени для образцов исходной древесины (сосна) и обработанной биоантипиренами из окисленной древесины и окисленного риса (крахмал) в режиме испытаний на кон-калориметре при внешнем тепловом потоке 35 кВт/м^2 .

Оценка горючести древесных образцов (сосна), обработанных растворами биоантипиренов из окисленной древесины и окисленного крахмала по методике, приведенной в [22,23], проводилась на кон-калориметре по стандартам ASTM 1354-92 и ISO 5660-1 на образцах пластин $100 \times 100 \text{ мм}$ при постоянном воздействии внешнего теплового потока 35 кВт/м^2 , что соответствует условиям среднестатистического пожара [24]. Профиль кривой скорости тепловыделения для древесины имеет специфический двухстадийный вид, что отчетливо наблюдается на рис. 1. Первый пик на кривой возникает, когда

количество летучих пиролизных газов достаточно для воспламенения от внешнего искрового воспламенителя кон-калориметра. Тепло, выделяемое при сгорании, поддерживает пиролиз древесины, высвобождая больше летучих продуктов. Падение кривой соответствует образованию теплоизолирующего слоя кокса, где теплопередача затруднена, а процесс пиролиза замедлен [17–18].

Считается, что второй пик на кривой вызван выжиганием образца и растрескиванием кокса, что способствует улетучиванию большего количества продуктов пиролиза. После истощения летучих веществ горение пламени прекращается, и СТВ возвращается к устойчивому исходному уровню. В отсутствие защитного полуккокса последний пик СТВ в конической калориметрии обычно объясняется отсутствием материала под пиролизным топливом, который действует как поглотитель тепла во время устойчивого горения. На рис. 1 видно, практически двухкратное снижение значения максимальной скорости тепловыделения для образца, обработанного биоантипиреном из окисленного риса (крахмал) и полуторное снижение для обработанного биоантипиреном из окисленной древесины по сравнению с исходной древесиной. Снижение для первого пика: с 160 для исходной древесины до 104 — образец обработанный биоантипиреном из окисленной древесины и 82 кВт/м² — образец обработанный биоантипиреном из окисленного риса (крахмал). Основные результаты испытаний на кон-калориметре при тепловом потоке 35 кВт/м² приведенные в таблице 2 продемонстрировали снижение всех основных параметров оценки огнеопасности для обработанных биоантипиренами образцов древесины по сравнению с исходной древесиной: пика скорости тепловыделения на первой и второй стадии горения, суммарного дымовыделения, выделения угарного газа (СО). Полученные данные иллюстрируют высокую эффективность

действия биоантипиренов. При этом биоантипирен из окисленного риса (крахмала) превосходит по огнезащитной эффективности антипирен из окисленной древесины

Таблица 1

Основные результаты испытаний древесных образцов, полученные с помощью кон-калориметра при тепловом потоке 35 кВт/м²

Образец	Пик СТВ, кВт/м ² на 1 стадии	Пик СТВ, кВт/м ² на 2 стадии	Суммарное дымовыделение, с ед. пов., м ² /м ²	Удельная теплота сгорания, МДж/ кг	Выделение СО, кг/кг
Необработанная древесина	160	175	131,7	16,1	70
Древесина обработанная биоантипиреном из окисленной древесины	104	149	61,3	13,2	75
Древесина обработанная биоантипиреном из окисленного риса	82	119	92,3	12,6	75

Характерной особенностью пиролиза образцов древесины, обработанной биоантипиреном, предшествующего горению является образование пенококса на поверхности образцов вследствие интумесценции биоантипирена. Пенококс создает эффективный тепловой барьер на поверхности древесины, который оказывает влияние на тепловой и материальный баланс в зоне пламени и, в конечном итоге способствует его затуханию. Непосредственно данный процесс может быть исследован с помощью синхронного ТГ-ИК Фурье анализа, который позволяет определять состав летучих продуктов непосредственно в динамике процесс термодеструкции. На рис. 2 представлены

результаты синхронного ТГ-ИК Фурье анализа высушенного образца биоантипирена, позволяющие определить сложную последовательность процессов терморазложения. Полученные результаты показали, что, несмотря на сложный характер термодеструкции биоантипирена, принципиальными являются три основные стадии процесса. Первая стадия протекает в температурном диапазоне температуры 200–280°C, вторая стадия 450–500°C, а третья (высокотемпературная) выше 700°C. На первой стадии термодеструкции, в основном, происходит выделение воды и углекислого газа (ИК спектр газообразных продуктов деструкции, рис. 2) за счет реакций дегидратации и декарбоксилирования биоантипирена. Визуально в этих условиях этот образец вспучивается. На второй стадии происходит термодеструкция основной углеродсодержащей структуры биоантипирена с последующей карбонизацией углеродного остатка и образованием пенококса. На третьей стадии происходит выгорание коксового остатка, сопровождающееся выделением CO_2 .

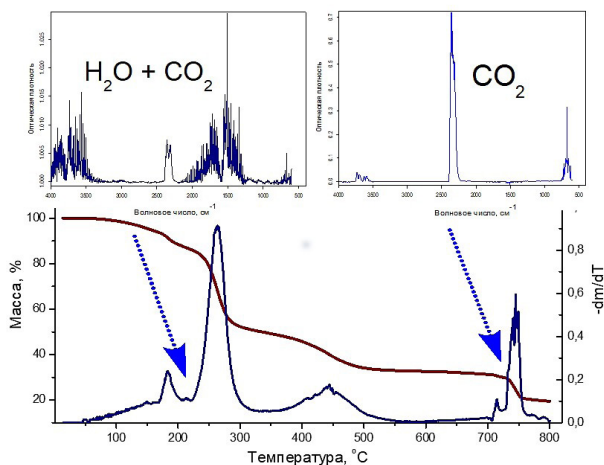


Рисунок 2. Синхронный ТГА-ИК Фурье анализ высушенного образца биоантипирена.

Декарбоксилирование и дегидратация на первой стадии, несомненно, вносят некоторый вклад в снижение горючести древесины, однако, их вклад на снижение горючести незначителен по сравнению с вкладом образующегося в процессе интумесценции пенококса, который эффективно снижает теплообмен между пламенем и поверхностью древесины.

Механизм интумесценции изучался также с помощью метода совмещенного ДСК-ТМА анализа, в котором термохимические превращения биоантипирена (ДСК) были непосредственно проанализированы в режиме его теплового расширения (ТМА). На рис. 3 представлен совмещенный ДСК-ТМА анализ биоантипирена, выполненный в атмосфере N_2 в динамических условиях нагревания со скоростью $10^\circ/\text{мин}$.

По данным ДСК (рис. 3, кривая 1) наблюдаются две экзотермические стадии: первая стадия с температурой максимума 200°C и экзотермическим эффектом 240 Дж/г , а вторая стадия с температурой максимума 230°C сопровождается меньшим тепловыделением равным 72 Дж/г . Очевидно, что экзотермический процесс на первой стадии относится к высокотемпературной поликонденсации кислотных групп биоантипирена, а на второй стадии поликонденсационного процесса (230°C) происходит интенсивное выделение углекислого газа и воды, сопровождающееся тепловым расширением образца. При этом экзотермический эффект на второй стадии снижается по сравнению с первой стадией за счет испарения. При сопоставлении кривых ДСК и ТМА (рис. 3, кривые 1 и 2) видно, что при температуре соответствующей первой стадии термохимического превращения (200°C) происходит размягчение антипирена (рис. 3, кривая 2), а на второй стадии при температуре 230°C резкое тепловое расширение образца, отражающее физический процесс интумесценции биоантипирена.

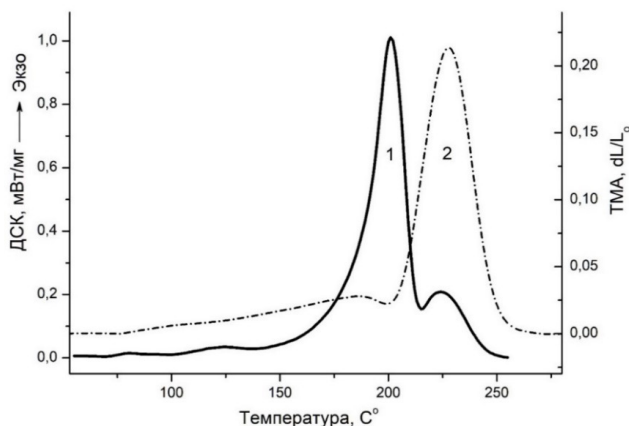


Рисунок 3. Совмещенный ДСК-ТМА анализ образца биоантипирена: 1 — ДСК кривая биоантипирена, 2 — ТМА кривая биоантипирена.

Для более детального изучения механизма интумесценции биоантипирена состоящего из раствора окисленной древесины был установлен качественный и количественный состав основных его составляющих. Известно, что основные компоненты древесины целлюлоза и лигнин обладают различной способностью к каталитическому жидкофазному окислению в щелочной среде. Можно предположить, что процессы окисления целлюлозы в первую очередь затрагивают ее аморфную зону, тогда как кристаллические области менее подвержены окислению. Аморфные области целлюлозы и гемицеллюлоза, являющиеся составными частями древесины могут претерпевать практически полную деструкцию, основными продуктами которой являются окись углерода, альдегиды и различные оксикислоты C(2)-C(6). С другой стороны, лигниновая фракция древесины полностью подвержена каталитическому окислению

в щелочной среде [25]. Основным фрагментом, являющимся наиболее предпочтительным для атаки кислорода в лигнине, могут являться фенольные кольца. В результате этого происходит образование феноксильных радикалов (I–V) (рис. 4). Феноксильные радикалы подвергается электрофильной атаке кислородом в различных положениях неспаренного электрона с образованием пероксильных радикалов (VI, X). Аналогичные превращения претерпевает также структура V. Образующиеся пероксильные радикалы участвуют в реакции передачи цепи, которая осуществляется при взаимодействии пероксильного радикала с феноксидным анионом ($R-O^-$). В результате этого взаимодействия вновь образуется пероксильный радикал ($R-O\bullet$) и пероксид-анион ($Ar-OO^-$). Посредством внутримолекулярного нуклеофильного присоединения образуется диоксетановая структура (VII, XII, XV), которая легко разрушается с образованием двух карбоксильных групп (IX), карбоксильной и концевой альдегидной группы (XIII). Альдегидная группа, которая под действием Cu^{++} или кислорода окисляется до карбоксильной группы (XIV). В случае, когда присоединение кислорода происходит по боковой (C3) цепи, в качестве конечных продуктов образуются ароматический альдегид (XVI, ванилин) и концевая альдегидная группа (XVII), принадлежащая лигнину. В дальнейшем этот альдегид может легко окисляться катионом Cu^{++} до карбоновой кислоты [25].

Таким образом, окисление древесины кислородом в щелочной среде в присутствии соединений меди (II), приводит к образованию сложной смеси продуктов. Исходя из возможных направлений реакции, приведенных на схемах (рис. 4), конечными продуктами становятся **карбоновые кислоты различного строения**, содержащие в основной цепи от двух до шести атомов углерода. Основная цепь может содержать двойные связи и различные заместители. Так, реакции окисления фе-

нольных групп лигнина, приводят к образованию муконовой кислоты (рис. 4, IX, XIV). При этом в зависимости от направления процесса образующиеся кислоты содержат различные заместители. Поскольку ароматические кольца являются частью полимерных структур лигнина, то и муконовые кислоты также сохраняют свою принадлежность полимерному лигнину. Таким образом, в процессе окисления лигнина происходит разрыв связей пропановых фрагментов (C3), что снижает его молекулярный вес, а раскрытие ароматических циклов приводит к образованию карбоксильных групп [25].

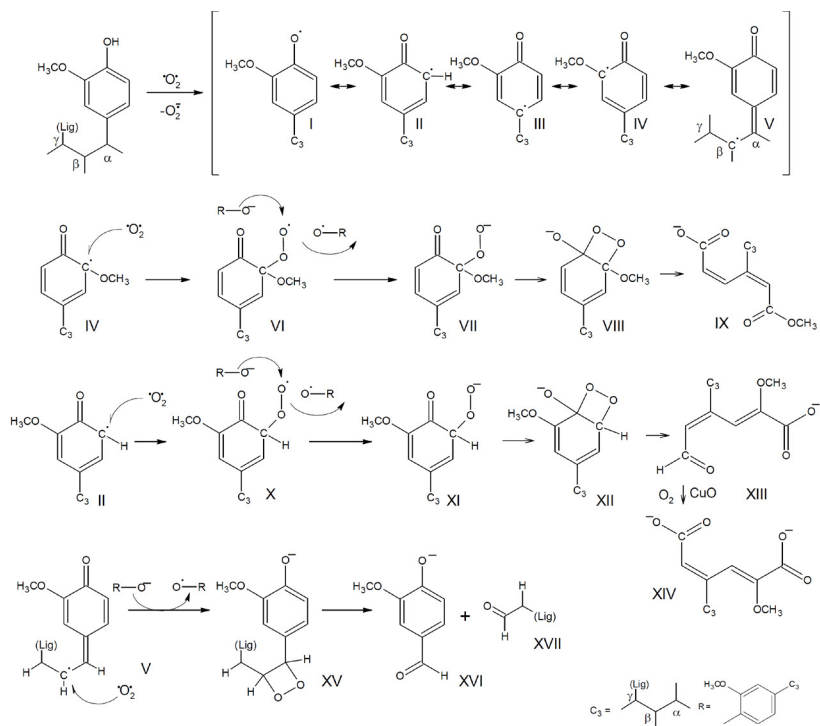


Рисунок 4. Образование резонансных структур фенокисльных радикалов и их окисление.

Состав биоантипирена на основе окисленной древесины определялся с помощью Хромато-масс спектрометрического анализа на газовом хроматографе Тгазе-1310 с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором ISQ. Хроматограмма эфирного экстракта продуктов деструкции биоантипирена приведена на рис. 5.

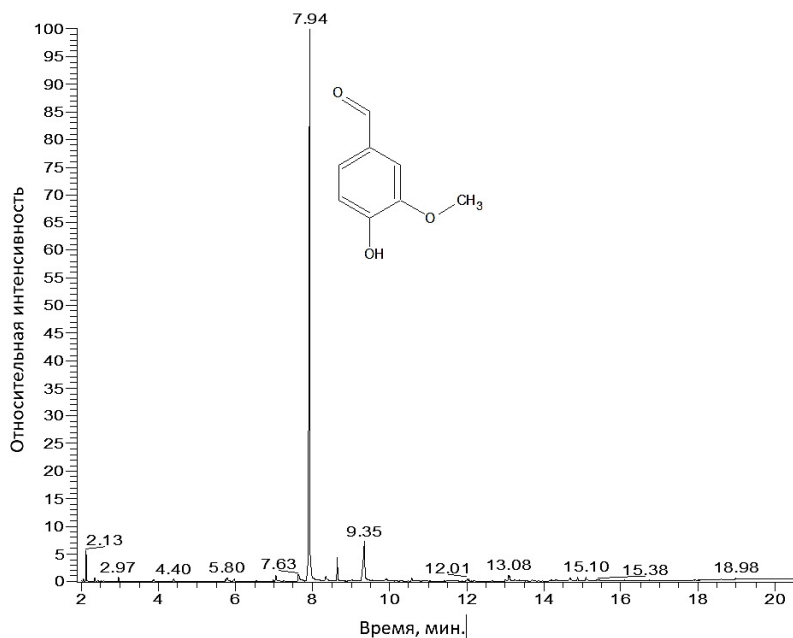


Рисунок 5. Хроматограммы эфирного экстракта биоантипирена из окисленной древесины.

В Таблице 2 представлен состав продуктов эфирного экстракта биоантипирена с указанием времен выхода и их процентного содержания относительно суммарной интенсивности пиков.

Продукты эфирного экстракта биоантипирена с указанием времен выхода и их процентного содержания относительно суммарной интенсивности пиков.

Идентифицированные соединения	Время выхода, с	Содержание в % от суммарной интенсивности пиков
1,1-диэтоксидбутан	128	2.0
капроновая кислота	178	0.3
бензиловый спирт	233	0.2
борниловый спирт	334	0.3
бензойная кислота	344	0.1
4-терпинеол	348	0.6
α -терпинеол	350	0.1
1,8-терпин	419	0.1
ванилин	476 (7.94 мин.)	76.5
ванилиновый спирт	501	0.8
ацетованилон	518	2.2
ванилиновая кислота	561	9.0
кониферилловый спирт	595	0.6
смоляные кислоты	858	1.2
неидентифицированные соединения		6.0

Из данных, представленных на рис. 5 и в Таблице 2 видно, что наиболее интенсивный пик на хроматограмме соответствует ванилину, а его содержание составляет 76.5%. Помимо того, были идентифицированы соединения, имеющие близкую к ванилину структуру — ванилиновый спирта, ацетованилона и ванилиновая кислота. Определение свободных карбоновых кислот в образцах биоантипирена на основе окисленной

древесной муки проводилось посредством получения их триметилсилильных производных. С этой целью раствор биоантипирена, содержащий натриевые соли кислот, был обработан кислотой до pH до 6÷7. После чего свободные кислоты были модифицированы с использованием ТМСИМ. Результаты хромато-масс спектрометрического анализ продуктов гексанового экстракта триметилсилильных производных биоантипирена представлены на рис. 6 и в Таблице 3.

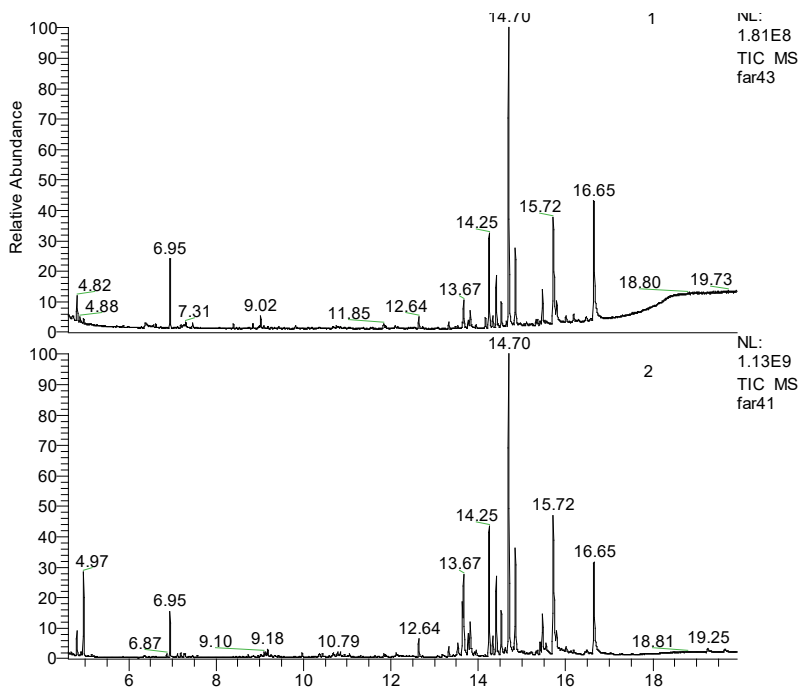


Рисунок 6. Хроматограммы гексановых экстрактов триметилсилильных производных биоантипирена на основе окисленной древесной муки.

Как видно из полученных результатов, основными летучими компонентами, содержащимися в окисленной древесной муке,

являются природные экстрактивные вещества — терпены, смоляные кислоты и жирные кислоты, источником которых являются их триглицериды. Также были зафиксированы оксикислоты — молочная и гликолевая (Таблица 3).

Таблица 3

Продукты гексанового экстракта триметилсилильных производных биоантипирена на основе окисленной древесины.

Идентифицированные соединения	Содержание в % от суммарной площади пиков
Молочная кислота	0.2
Гликолиевая кислота	5.0
Глицерин	2.3
Терпин	0.1
Ванилин	0.4
Пальмитиновая кислота	1.1
Линолевая кислота	2.9
Олеиновая кислота	6.3
Дитерпен	2.2
Пимаровая кислота	8.6
Изопимаровая кислота	5.2
Стеариновая кислота	6.4
Дегидроабиетиновая кислота	22.4
Абиетиновая кислота	7.4
Производное дитерпена	3.1
Монопальмитин	9.3
15-оксидегидроабиетиновая кислота	4.1
7-оксидегидроабиетиновая кислота	2.6
Моностеарин	9.1
неидентифицированные соединения	1.3

Полученные результаты позволяют предполагать, что механизм интумесценции биоантипирена состоит по меньшей мере из двух последовательных стадий:

На первой стадии (в районе 200°C) происходят реакции дегидратации и декарбоксилирования оксикислот алифатического строения, образующихся при окислении аморфной фазы целлюлозы и гемицеллюлозы. При этом происходит размягчение биоантипирена, являющееся необходимым условием для последующей интумесценции (рис. 3).

При дальнейшем повышении температуры на второй стадии (выше 230°C) происходят реакции поликонденсации биоантипирена, сопровождающиеся выделением углекислого газа и воды. При этом наблюдается резкое увеличение объема вследствие интумесценции биоантипирена.

При температурах выше 300°C наблюдается формирование пенококса за счет сшивания и карбонизации продуктов поликонденсации биоантипирена с участием ароматических компонентов окисления лигниновой фракции биоантипирена.

Изучение механизма огнезащитного действия биоантипиренов на основе окисленного крахмала (риса) показало в основном схожий характер интумесценции (Рис. 7, Таблица 4). В процессе пиролиза окисленного крахмала, происходит ряд последовательных реакций элиминирования гидроксильных групп, и групп, образовавшихся в ходе окисления крахмала. Первоначально происходит элиминирование части гидроксильных групп и карбонильных фрагментов — стадия (а). Эти процессы приводят к возникновению изолированных или сопряженных двойных $C=C$ связей, а выделившаяся вода частично сольватирует окисленный крахмал, придавая подвижность его цепям. Дальнейшее повышение температуры способствует выходу низкомолекулярных газообразных продуктов, включая воду, что приводит к вспучиванию и образо-

ванию пористой структуры. На следующей стадии (с) начинают происходить процессы, в которых участвуют фрагменты, имеющие *sp*²-гибридизованные сопряженные связи. В результате этого происходит сшивание и формирование углеродных цепей, содержащих остаточные углеводные фрагменты. При температурах более 400°C (е) эти цепочки трансформируются в ряд продуктов, основным компонентом которых является углерод. К таким продуктам можно отнести полиеновые структуры, ароматические соединения различного строения, включая фенольные и хиноидные фрагменты, а также аморфные и графитоподобные формы углерода. В Таблице 4 в упрощенном виде представлена структурная эволюция коксового остатка окисленного крахмала в динамических условиях пиролизе до 600°C, которая отражает трансформацию углеродного защитного слоя, выполняющего огнезащитную функцию биоантипирена.

К настоящему моменту в ИБХФ РАН разработана целая линейка антипиренов и огнезащитных добавок на основе природного возобновляемого сырья: целлюлозосодержащая биомасса (древесина), полисахариды (картофельный крахмал и рис). В мировой практике это, пожалуй, первый случай получения промышленных биоантипиренов для древесины, а также интумесцентных биодобавок, повышающих огнестойкость металлических конструкций.

Разработанный антипиреновый состав на основе целлюлозосодержащей биомассы (древесины) и риса не только позволяет достичь огнезащитной эффективности, соответствующей I группе, но также обеспечивает получение материалов, устойчивых по отношению к внешним климатическим условиям и превосходящих по прочностным характеристикам изделия из исходной необработанной древесины.

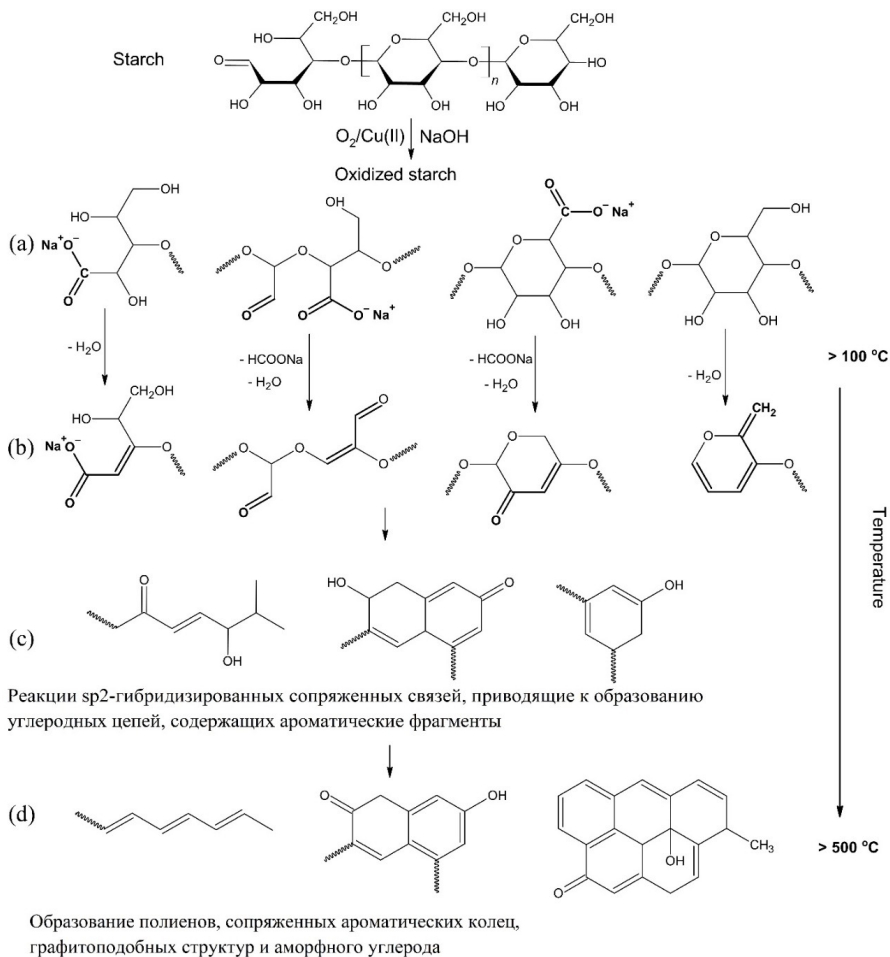
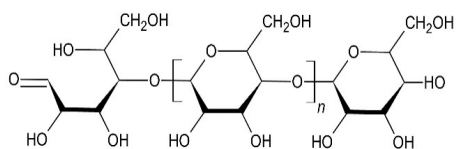
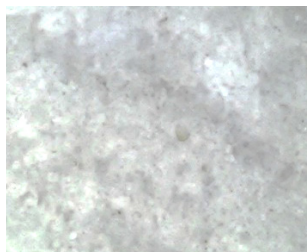
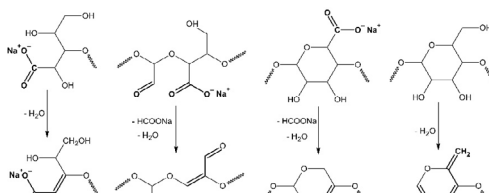


Рисунок 7. Схема термической деструкции окисленного крахмала.

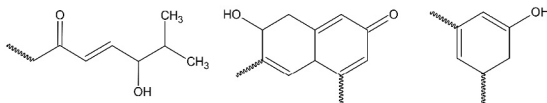
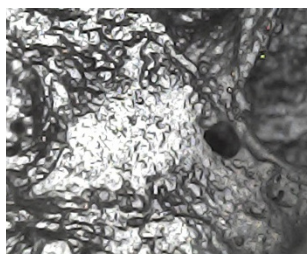
Структурная эволюция коксового остатка окисленного крахмала при пиролизе до 600°C



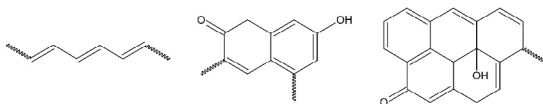
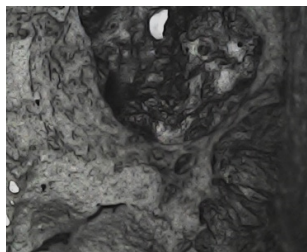
Крахмал



Продукты каталитического окисления крахмала в щелочной среде.



Основные структурные фрагменты коксового остатка, продукта пиролиза окисленного крахмала при 400°C.



Основные структурные фрагменты коксового остатка, продукта пиролиза окисленного крахмала при 600°C.

ССЫЛКИ

1. A.B Morgan, J. W. Gilman, *Fire and Materials*. **2012**, 37(4), pp. 259–279.
2. Lomakin, S. M., Zaikov, G. E. *Ecological Aspects of Flame Retardancy*; VSP International Science Publishers: Zeist, Holland, **1999**; p. 170.
3. Lomakin, S.M., Zaikov, G. E. *Modern Polymer Flame Retardancy*, London: CRC Press. **2023**, p. 266.
4. S. M. Lomakin, G. E. Zaikov, *Journal of Environmental Protection and Ecology*. **2003**. 4(1). 95.
5. S. M. Lomakin, G. E. Zaikov, *Polymer Science. Series B*. **2005**. vol. 47. no. 1–2. С. 9–21.
6. A. D. Rakhimkulov, S. M. Lomakin, I. L. Dubnikova, et. al., *Journal of Materials Science*. **2010**, 45(3), 633.
7. S. Lomakin., P. Brevnov, E. Koverzanova., et al., *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. **2017**, 128, 275.
8. *Fire Retardancy of Polymeric Materials* / Ed. by C. A. Wilkie and A. B. Morgan, CRC Press., **2010**, p. 853.
9. A. M. Sakharov, P. A. Sakharov, S. M. Lomakin, G. E. Zaikov, Ch. 7. *Novel Class of Eco-Flame Retardants*, in *Polymer Green Flame Retardants*. Amsterdam: Oxford, Elsevier, **2014**. p. 255.
10. S. D. Varfolomeev, S. M. Lomakin, P. A. Sakharov, A. V. Khvato, *Herald of the Russian Academy of Sciences*, **2019**. 89(2). p. 151.
11. C. M. Fernández, B. Redondo, J. Vicente Izquierdo, B. Galindo. *Bio-based flame retardants, Reinforced Plastics*, 2021, 65 (6), pp. 46–49.
12. Meiting Wang, Guang-Zhong Yin, Yuan Yang, Wanlu Fu, De-Yi Wang, *Bio-based flame retardants to polymers: A review, Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, **2023**, 6(2), pp. 132–155.
13. Haitang Yang, Bin Yu, Xiaodong Xu, Serge Bourbigot, Hao Wang and Pingan Song, *Green Chem.*, **2020**, 22, p. 2129.
14. Li J, et al. *Polym Degrad Stab*. **2001**, 72, 493.

15. L. Fouad, et al. *J Renew Mater.* **2018**, 6, 6.
16. M. Jimenez, et al. *J Appl Polym Sci.* **2016**, 43783, pp. 1–12.
17. G. Camino and S. M. Lomakin, *Intumescent materials*. In: *Fire Retardant Materials* / Ed. by A. R. Horrocks and D. Price: CRC Press, Woodhead Publishing Ltd, **2001**, pp. 318–337
18. J. Alongi, Z. D. Han, S. Bourbigot, Intumescence. Tradition versus novelty. A comprehensive review, *Prog. Polym. Sci.* **2015**, 51, pp. 28–73.
19. J.H. Stefan, F. Arts, J. M. Erwin, Herman van Bakkum, Roger A. Sheldon. *Hydrogen peroxide and oxygen in catalytic oxidation of carbohydrates and related compounds*. *Synthesis*, **1997** (6), pp. 597–613.
20. A. M. Sakharov, I. P. Skibida, *Chemical model of oxidases. CuI-catalyzed oxidation of secondary alcohols by dioxygen*. *Russ Chem Bull*, **1995**, 44, pp. 1872–1878.
21. С. М. Ломакин, А. В. Хватов, П. А. Сахаров, Е. В. Коверзанова, С. В. Усачев, Н. Г. Шилкина, С. Д. Варфоломеев, *Химическая физика* **2020**, 39 (11), 58–66.
22. П. А. Сахаров, С. М. Ломакин, А. В. Хватов и др. *Антипирен, способ его получения и способ огнезащитной обработки древесины*: Пат. RU 2674208 C1, Б.И. **2018**. № 34.
23. П. А. Сахаров, С. Д. Варфоломеев, С. М. Ломакин, А. В. Хватов, С. В. Усачев, Е. В. Коверзанова, Ю. К. Луканина, Н. Г. Шилкина, А. А. Миних. *Огнебиозащитное средство для древесины (варианты)* Пат. RU 2768389 C1, **2022**.
24. V. Babrauskas, R. Peacock, *Fire Safety J.* **1992**, 19, 255.
25. J. C. Villar, A. Caperos, F. García-Ochoa, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **1997**, 17(3), pp. 259–285.

22. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ФОРМИРОВАНИЯ РОССЫПНОГО ЗОЛОТА

С.Д. Варфоломеев^{1,2}, В.Н. Калининко², Ю.А. Кузнецов³,

С.Б. Цыбенова²

*¹Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова, Институт физико-химических
основ функционирования сети нейронов и искусственного
интеллекта, Москва*

*²Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля
Российской академии наук, Москва*

³ООО «РГ Иркутскгеофизика 3», Иркутск

Проблема образования россыпных месторождений золота — задача, привлекающая внимание исследователей в течение многих лет [1–6]. Золото из россыпей, как элемент с большим удельным весом, достаточно чистый, пластичный и коррозионно-устойчивый металл, добывают с древнейших времён и по настоящее время в виде самородков различного размера, а в основном в форме «золотого песка» миллиметрового и субмиллиметрового размера частиц. В большинстве случаев месторождения россыпного золота локализуются в областях с высокой (сезонной) гидрологической активностью в зонах рек, их пойм. Особенно наглядно это видно на примерах месторождений России [6]. Для россыпных месторождений золота России важной особенностью представляется сезонное накопление водных ресурсов в течение зимнего периода и устойчивое формирование водных потоков в весенне-летние периоды.

Один из важных и существенных парадоксов, обсуждаемых в геологической литературе, заключается в наличии его двух категорий: «видимого» (относительно легко добываемо-

го) и «невидимого» золота (рассеянные минеральные формы, добыча металла из которых более трудно реализуется из-за усложнения технологических процессов). Одним из первых на это указал академик В. И. Вернадский [5], детально этот парадокс обсуждается в монографии Н. В. Петровской [6] и множества других авторов. Оценки Н. В. Петровской показывают, что объёмы рассеянного «невидимого» золота, поступающего в водотоки из рудных источников, в разы превышают аккумулируемое в россыпях золото.

Исторически сложилось так, что на протяжении столетий механизм образования россыпей трактовался в основном на представлениях о ведущей роли механической сортировки и дезинтеграции рудного материала в процессе его перемещений и аккумуляции в отложениях различных фаций [1–4].

При этом подходе петрографический состав материала и минералогический состав находящихся в нём благородных металлов считается сформировавшимся, ранее, в эндогенных условиях, и, в дальнейшем, подвергающимся лишь разрушению и сортировке, по размерам и плотности, в процессе механической транспортировки и локализации в некоторых благоприятных геолого-геоморфологических условиях в зоне гипергенеза.

Химическая трактовка образования золота, в том числе и в россыпях, была впервые сформулирована В. И. Вернадским [5] в 1927 г., когда он написал: *«золото — элемент всюдный (редакция Вернадского В. И.), присутствующий во всякой почве, во всякой горной породе... находящийся в вечно подвижных равновесиях в водных растворах, оно легко переходит в раствор и так же легко из него выпадает...»*.

Общими моментами любой из этих концепций служит то, что в формировании месторождений россыпного золота (в той или иной степени) участвуют химические процессы, способствующие или определяющие переход супер-мелкодисперсного

рассеянного золота в макроформы, выражающиеся в росте частиц, или способствующих совместно с механическими процессами разрушения, полному или частичному растворению крупных частиц золота изначально находившихся в рудах разрушаемых золоторудных месторождений.

Хотелось бы обратить внимание на следующее: по крайней мере, для золота и платиноидов все гипотезы образования их россыпных форм предполагают их происхождение из «чистых» элементарных форм. В то время, как, только для золота, минералогам известны более 40 минералов, и более 28 — для платиноидов.

Химикам давно известно, что хотя золото и является самым благородным из благородных металлов, оно образует множество разнообразных соединений. Степень окисления золота в его соединениях колеблется от -1 до $+5$, но Au^{1+} и Au^{3+} доминируют в химии его соединений. Примерами Au^{1+} является общеизвестный цианид золота $Au(CN)^{-2}$, а Au^{3+} — калаверит ($AuTe_2$), в котором степень окисления золота $+3$ и $+2$ [7]. В результате химических реакций, они достаточно легко преобразуются из этих более сложных по химическому составу соединений, в собственно металлическое золото Au^0 .

В нашей работе [8] показано, что в золоторудных месторождениях Евразии, которые входят во все известные рудно-россыпные районы, основными минеральными формами микро и нанозолота являются формы, имеющие степень окисления от Au^{3+} до Au^{1+} .

Нам представляется, что высокую степень теоретической и практической значимости должно иметь исследование физико-химических механизмов, лежащих в основе формирования россыпных золоторудных месторождений. Очевидно, что основа этих механизмов будет базироваться на химико-

кинетических особенностях золота в различных валентных и фазовых состояниях. Данная работа посвящена обсуждению этих механизмов.

В качестве базовой основы разрабатываемой модели являются следующие положения:

- Принципиально важным для понимания механизмов формирования золоторудных россыпей являются химические реакции и кинетическое поведение основных форм золота: Au^{3+} , Au^{1+} , Au^0 в коллоидной форме нанозолота и Au^0_x в виде микрочастиц. Можно с уверенностью утверждать, что «невидимое» золото, распределённое по большим площадям, и, часто образующее в их пределах, мощные геохимические аномалии, представляет собой наночастицы и химически связанные формы, ассоциированные с основными компонентами породы. Но, при этом, сорбция наночастиц золота с породами достаточно прочна, ассоциаты распределены по большим пространствам и представлены относительно низкими концентрациями и не могут представлять интерес для добычи металла. Тем более, если они представлены мельчайшими химически связанными минеральными формами.
- Ключевое значение в формировании россыпей играют поверхностные гидропотоки. За счёт эрозии, выветривания, сезонных криогенных процессов и других разрушающих породу воздействий наноформы золота и его минеральные составляющие оказываются в подвижных поверхностных водных потоках, которые концентрируются в виде ручьёв и рек, создавая гидрологическую структуру региона. Это первая стадия концентрирования (на относительно небольших участках, по сравнению с площадью водосбора) высвобождающихся при разрушении пород минеральных форм золота. Оценки показывают,

что «сбор» химических (минеральных) форм Au, переносимых потоками, даёт возможность увеличить концентрацию реагентов на различных участках такого концентрирования в $10\text{--}10^3$ раз. Химический состав вод золоторудных месторождений — предмет давнего обсуждения в геологической литературе [9–11]. Как правило, золоторудные месторождения ассоциированы с зонами сульфидного характера (пирит, халькопирит, арсенопирит) [9–12]. Химико-аналитические работы, в зонах поверхностного разрушения пород, демонстрируют высокое содержание «подвижного» железа, в виде тио- и сульфат-ионов как продукта окисления сульфидов. Следует отметить относительно высокое содержание органических веществ (высокие показатели ХПК) [13]. Классическое, наиболее крупное по запасам золото в России и в мире месторождение Сухой Лог характеризуется как сульфидный тип, в так называемых «чёрных сланцах», с существенным обогащением пород углеводородами группы асфальтеновых кислот и других тяжёлых углеводородов [13, 14]. Принципиально важно, что воды месторождений насыщены растворимыми золотосодержащими веществами. В работе [9] показано, что подземные воды золоторудных месторождений содержат до 490 мкг/л золота в коллоидной и ионной формах, при этом среднее содержание соответствует ~ 150 мкг/л.

- Как предполагает множество авторов, начиная с В. И. Вернадского и Н. В. Петровской [5, 6], соединения золота в природных водных потоках могут существовать в виде его хлоридов, тиосульфатов и даже (не подтверждено) цианидов и металлоорганических соединений (не подтверждено). При воздействии широкого спектра восстановителей они переходят в коллоиды, которые

каким-то образом могут образовывать макрочастицы золота. Но кроме огромного количества геологических фактов, иллюстрирующих высокую вероятность наличия таких процессов в природе, кинетические характеристики физико-химических процессов формирования россыпного золота системно не изучались.

В рамках поставленной нами задачи моделирования физико-химических процессов формирования россыпного золота от области поступления его различных форм в рассматриваемую систему до областей его концентрации в виде россыпного золота представляется необходимым провести математическое моделирование кинетических закономерностей образования форм нанозолота с последующим формированием из него коагулянтов и макрочастиц, и проследить кинетическое поведение системы в потоке.

Химические основы и кинетические закономерности образования нанозолота

В последние годы интерес к физико-химическому поведению частиц нанозолота в значительной степени интенсифицировался в связи с технологическими возможностями использования наноматериалов и формированием отрасли науки и технологии получившей название «нанотехнология». Достаточное развитие получили способы использования наночастиц металлов в электронике, химическом и биологическом анализе, в медицине [15-19].

Экспериментальное образование золей золота, представляющих собой коллоидные растворы металлического золота, достаточно эффективно исследуется спектрофотометрическими методами, что заложило основы изучения кинетики формирования дисперсной фазы золей золота [20-26]. Кинетика процесса имеет сложный многофазовый характер. В одной из первых количественных работ в области кинетики формирования нано-

частиц золота [21] описан продолжительный период индукции, проведено исследование динамики процесса от концентрации реагентов и температуры. Стабильности растворов коллоидного золота и зависимость морфологического состояния частиц от pH исследовано в работах [22–24]. Гипотеза об электрохимической природе формирования твёрдой фазы нанозолота высказано в работе [25]; влияние дисперсионного состава на электрохимическую активность показано в работе [26]. Наиболее интересные и продвинутые экспериментальные данные по кинетике образования нанозолота представлены в работе [20].

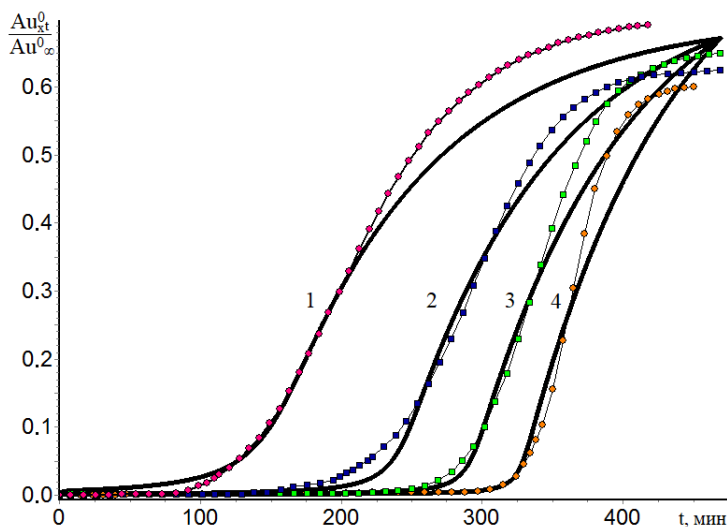


Рисунок 1. Экспериментальные и расчётные данные по кинетике образования золя золота и результаты кинетического моделирования процесса в соответствии со схемой (1)–(2) при варьировании начальной концентрации $\text{Au}^{3+}(t = 0)$: 1– $2 \cdot 10^{-5}$ М; 2– $5 \cdot 10^{-5}$ М; 3– 10^{-4} М; 4– $1.5 \cdot 10^{-4}$ М. Параметры расчёта: $k_1 R_0 = 9.4 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$; $k_3 R_0 = 2.3 \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$; $k_2 = 3 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Экспериментальные данные работы [20] были оцифрованы и представлены для сравнения с полученными расчётными данными.

Анализ экспериментальных данных обнаруживает ряд нетривиальных кинетических эффектов:

1. Формированию спектрофотометрически визуализированных наночастиц предшествует продолжительный период индукции от 100 до 400 минут.
2. Период индукции зависит от начальной концентрации Au^{3+} , при этом увеличение концентрации исходной окислительной формы Au^{3+} увеличивает период индукции. Это достаточно нетривиальный эффект. Периоды индукции в «классических» механизмах химических реакций (промежуточные соединения, автокатализ, цепные реакции) уменьшаются с увеличением исходного реагента или не зависят от концентрации [27].

С учётом наблюдаемых кинетических эффектов можно предложить кинетическую схему, которая включает следующие стадии в едином кинетическом механизме, описывающей все наблюдаемые явления. Механизм включает восстановление (в случае экспериментальных результатов [20] это лимонная кислота) сильного окислителя Au^{3+} до формы Au^{1+} с последующим восстановлением этого иона до металлического состояния. При этом Au^{3+} как сильный окислитель способен окислить Au^0 до Au^{1+} . Ионы золота Au^{3+} и Au^{1+} очень сильные окислители. Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы равны: $\text{Au}^{3+}/\text{Au}^0 = 1.5 \text{ В}$, $\text{Au}^{1+}/\text{Au}^0 = 1.7 \text{ В}$ (для сравнения: окислительная способность кислорода характеризуется стандартным окислительно-восстановительным потенциалом 1.23 В). В присутствии органического или неорганического восстановителя в системе протекают следующие химические реакции:

При расчётах в закрытой системе необходимо учитывать уравнение материального баланса:

$$Au^{3+}(0) = Au^{3+} + Au^{1+} + Au_x^0. \quad (4)$$

Система уравнений (3), (4) достаточно адекватно описывает наблюдаемые экспериментальные данные при подборе основных кинетических параметров k_1R_0 , k_3R_0 и k_2 (сравнение представлено на рис. 1). Расчёты проведены при следующем наборе значений параметров: $k_1R_0 = 9.4 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$; $k_3R_0 = 2.3 \cdot 10^{-4} \text{ мин}^{-1}$; $k_2 = 3 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1}\text{мин}^{-1}$. Начальные условия: $Au_x^0(0) = 0$, $Au^{1+}(0) = 5 \cdot 10^{-6} \text{ М}$, $Au^{3+}(0) = 1 \cdot 10^{-4} \text{ М}$.

Кинетическая модель (3), (4) описывает основные наблюдаемые эффекты, а именно наличие продолжительного периода индукции и увеличение периода индукции с ростом начальной концентрации исходного реагента Au^{3+} .

Экспериментальные данные в работе [20]) взяты за основу для сравнения результатов расчёта кинетической модели при варьировании концентраций и температуры реакционной смеси. Оцифровка графических зависимостей (рис. 5 и 6 в работе [20]) проводилась с помощью программы GetDataGraphDigitizer 2.26. Интегрирование системы дифференциальных уравнений (3), (4) проводилось (m, k)-методом вычисления ОДУ с погрешностью $\varepsilon = 10^{-9}$. Значения параметров подобраны согласно условию, что стадии 1 и 2 — медленные, стадия 3 — быстрая, а также с учётом сравнения с экспериментальными данными из [20]. Для решения системы ОДУ разработана программа вычисления в среде разработки Delphi Community Edition с визуализацией результатов расчёта.

**Природа наблюдаемого периода индукции —
окисление металлического золота Au_x^0
трёхвалентным ионом Au^{3+}**

Кинетическое моделирование даёт возможность варьировать кинетические характеристики отдельных стадий и выяснять природу кинетических эффектов. Наблюдаемый период индукции однозначно определяется процессом окисления металлического золота Au_x^0 окислителем в виде Au^{3+} . На рис. 2 представлены сравнительные данные кинетического моделирования при наличии обратного окислительного процесса ($k_2 = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$) и в его отсутствие ($k_2 = 0$). Видно, что если нет процесса обратного окисления — нет периода индукции.

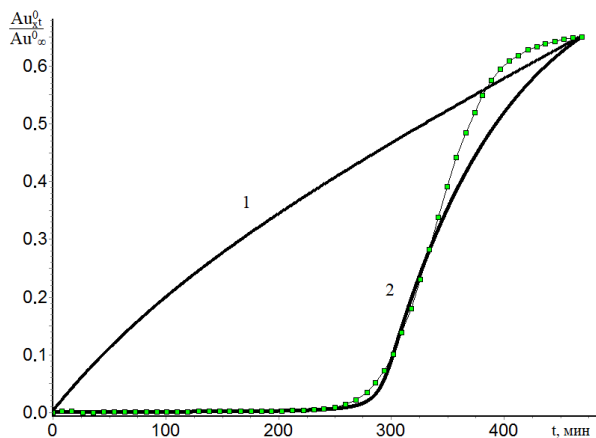


Рисунок 2. Кинетические кривые накопления дисперсной фазы золота при наличии процесса окисления Au_x^0 действием Au^{3+} (кривая 2, $k_2 = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, экспериментальные данные — линия с точками) и при отсутствии этого процесса (кривая 1, $k_2 = 0$)

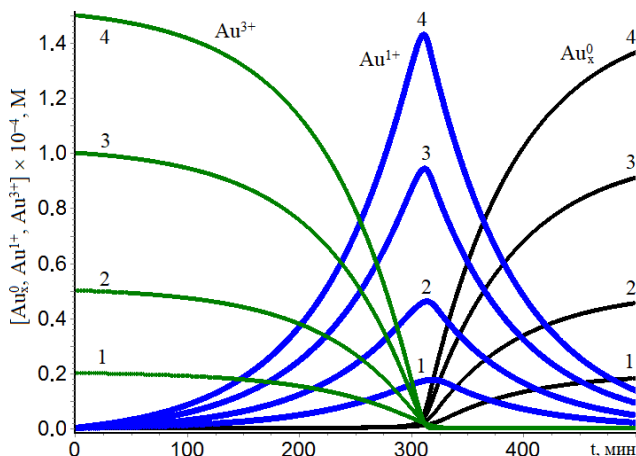


Рисунок 3. Кинетические кривые системы (3), (4) образования нанозолота Au_x^0 , промежуточного Au^{1+} и исходного Au^{3+} при вариации начальной концентрации Au^{3+} : 1- $2 \cdot 10^{-5}$ М; 2- $5 \cdot 10^{-5}$ М; 3- $1 \cdot 10^{-4}$ М; 4- $1.5 \cdot 10^{-4}$ М;

Рисунок 3 иллюстрирует результаты кинетического моделирования при вариации начальной концентрации Au^{3+} . Видно, что период индукции определяется полным исчерпанием Au^{3+} и достижением максимальной концентрации Au^{1+} . Следует подчеркнуть, что в отсутствие Au_x^0 или Au^{1+} ($Au_x^0(0) = 0$, $Au^{1+}(0) = 0$) период индукции постоянен и не зависит от начальной концентрации Au^{3+} .

Зависимость кинетического поведения системы от начальной концентрации («затравки») Au^{1+} или Au^0

Кинетическое моделирование позволило обнаружить нетривиальный кинетический парадокс, а именно поведение системы зависит от наличия в начальных условиях малых концентраций металлического золота Au_x^0 и Au^{1+} .

Это иллюстрируют рис. 4 и рис. 5. Для сравнения на рис. 3 представлены результаты математического моделирования при условии $Au_x^0(0) = 0$, $Au^{1+}(0) = 0$. Видно, что при вариации начальной концентрации исходного реагента (Au^{3+}) период индукции не зависит от его концентрации и составляет для всех случаев ~ 300 минут. Однако, если в системе находятся «затравочные» концентрации Au_x^0 или Au^{1+} , период индукции зависит от концентрации исходного реагента и в соответствии с экспериментальными данными (рис. 1), увеличивается с ростом введения в реакцию концентрации Au^{3+} .

На рис. 4 и 5 представлены расчётные данные изменения концентрации Au^{3+} , Au^{1+} и Au_x^0 при вариации «затравочных» концентраций Au^{1+} или Au_x^0 . Видно, что чем выше концентрация «затравок», тем быстрее процесс при существенном уменьшении периода индукции.

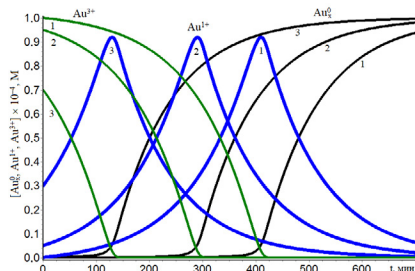


Рисунок 4. Динамика изменения концентраций Au^{3+} , Au^{1+} , Au_x^0 по времени при варьировании начальной концентрации $Au^{1+}(0)$: 1-0 M; 2- $5 \cdot 10^{-6}$ M; 3- $3 \cdot 10^{-5}$ M. Начальные концентрации $Au^{3+}(0) = 1 \cdot 10^{-4}$ M, $Au_x^0(0) = 0$

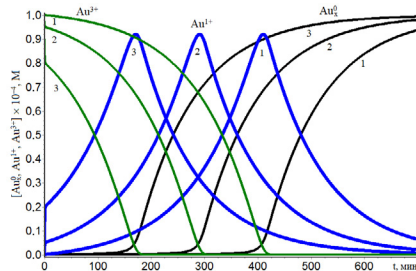
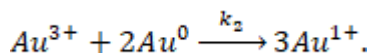


Рисунок 5. Кинетические кривые изменения концентраций Au^{3+} , Au^{1+} , Au_x^0 по времени при варьировании начальной концентрации $Au_x^0(0)$: 1-0 M; 2- $2,5 \cdot 10^{-6}$ M; 3- $1 \cdot 10^{-5}$ M. Начальные концентрации $Au^{3+}(0) = 1 \cdot 10^{-4}$ M, $Au^{1+}(0) = 0$

Представленный феномен зависимости типа кинетического поведения от каталитических количеств конечного продукта (Au_x^0) или промежуточного соединения (Au^{1+}) показывает, что в данном случае механизм реакции включает автокаталитическую стадию. Эта автокаталитическая стадия определяется скоростями и реакционными способностями образования и расходования промежуточного соединения Au^{1+} . Действительно, в системе мы имеем относительно слабореакционно способные частицы Au^0 и Au^{3+} , при этом механизм реакции включает стадию «размножения» реакционно способных частиц Au^{1+} по реакции:



Оценки констант скоростей при сравнении экспериментальных данных с результатами моделирования приводят к следующим значениям: $k_1 = 6.3 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $k_3 = 0.15 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $k_2 = 3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$.

Таким образом, механизм процесса образования нанозолота при восстановлении Au^{3+} включает относительно мало интенсивный процесс восстановления Au^{3+} в Au^{1+} (константа скорости $k_3 = 0.15 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$), более быстрый процесс восстановления Au^{1+} в Au^0 (константа скорости $k_1 = 6.3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) и относительно очень быстрый процесс окисления $2Au^0$ сильным окислителем Au^{3+} . Ключевую роль в поведении системы играет количество «затравки» Au^0 . Общий кинетический анализ автокаталитических процессов представлен в монографии [27]. Рисунок 5 иллюстрирует, что чем больше в системе $Au_x^0(0)$, тем меньше период индукции. Это признак автокатализа — продукт ускоряет процесс. Эта стадия является автокаталитической и «раскручивает» процесс образования Au_x^0 , при этом наночастицы

металлического золота не образуются в детектируемых количествах до того момента, пока в системе не исчерпается исходный реагент Au^{3+} .

Можно с определённой долей уверенности утверждать, что такого рода процессы идут в природе при образовании «россыпи» природного металлического золота.

Очевидно, что кинетическое поведение процесса зависит от реакционной способности восстановителя (k_1R_0 , k_3R_0) и скорости окисления металлического золота сильным окислителем Au^{3+} . На рис. 6–8 приведены результаты кинетического расчёта при вариации параметров k_2 (скорость окисления Au_x^0 для Au^{3+}), k_1R_0 (скорость восстановления Au^{1+} до металлического золота), k_3R_0 (скорость восстановления Au^{3+} восстановителем R_0). Стадия окисления металлического золота сильным окислителем Au^{3+} является очень быстрой и не представляет собой лимитирующую стадию.

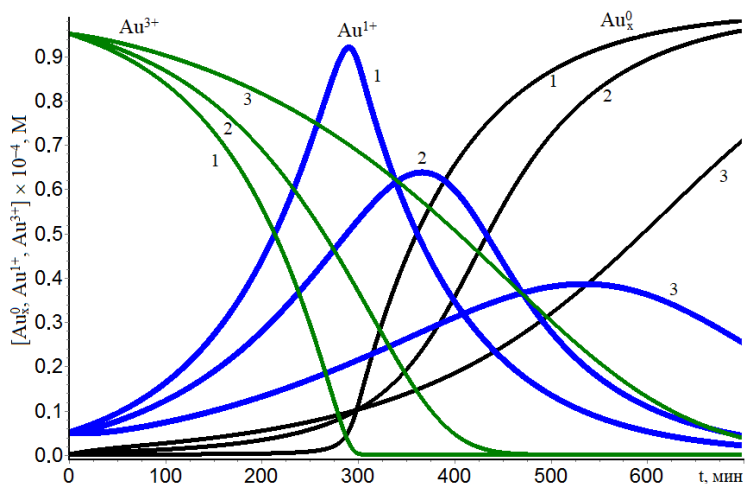


Рисунок 6. Кинетические ответы системы (3), (4) при варьировании k_2 : 1- $3 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$; 2- $1 \cdot 10^3 \text{ М}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$; 3- $2 \cdot 10^2 \text{ М}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$.

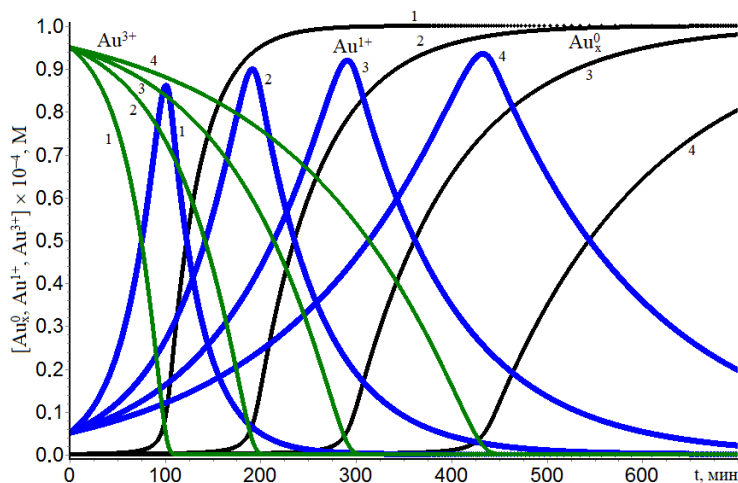


Рисунок 7. Кинетические ответы системы (3), (4) при варьировании $k_1 R_0$: 1-0.03 мин⁻¹; 2-0.015 мин⁻¹; 3-9.43·10⁻³ мин⁻¹; 4-6·10⁻³ мин⁻¹.

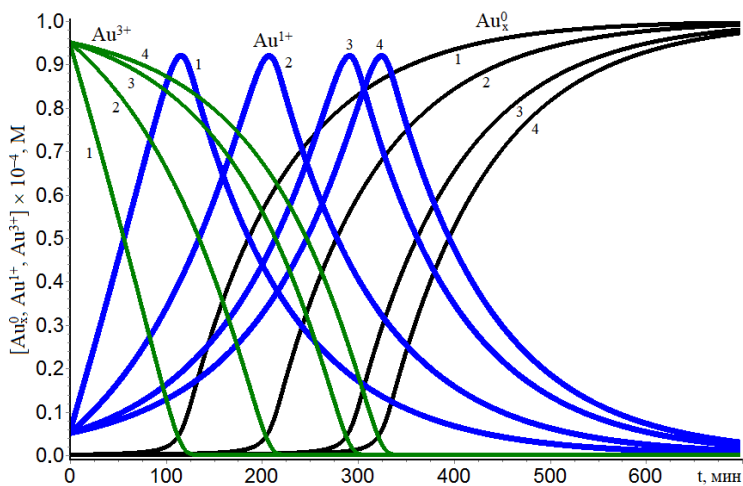


Рисунок 8. Кинетические ответы системы (3), (4) при варьировании $k_3 R_0$: 1-7.5·10⁻³ мин⁻¹; 2-1.5·10⁻³ мин⁻¹; 3-2.3·10⁻⁴ мин⁻¹; 4-1.5·10⁻⁶ мин⁻¹.

Температурная зависимость кинетики формирования нанозолота

Представляет интерес моделирование кинетических закономерностей формирования нанозолота от температуры (см. рис. 6 в работе [20]). Первое приближение оценки энергий активации ΔH (k_3) ~ 10 ккал/моль, а для $k_1 \sim 6.1$ ккал/моль и $k_2 \sim 3$ ккал/моль. Оценка констант скоростей с учётом экспериментально полученных данных [20] при температуре $T = 60^\circ\text{C}$ приводит к следующим значениям: $k_1 = 22.23 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $k_3 = 1.22 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $k_2 = 5.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Аналогично при $T = 5^\circ\text{C}$ получены значения констант скоростей $k_1 = 3.565 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $k_3 = 0.06 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $k_2 = 2.27 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Результаты расчётов системы (3), (4) при этих значениях параметров показаны на рис. 9.

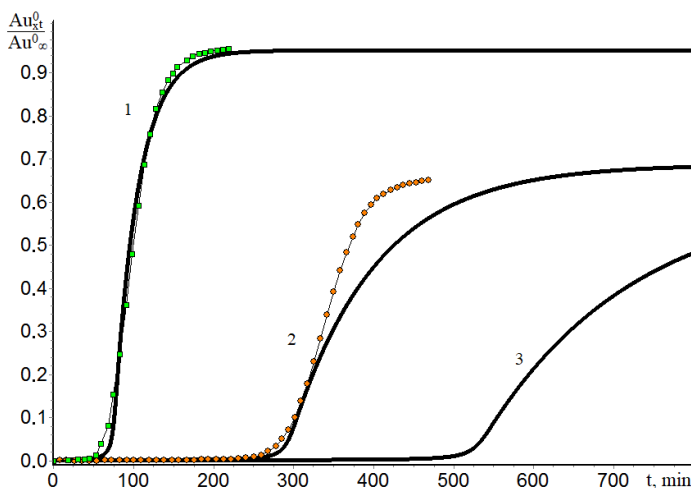


Рисунок 9. Экспериментальные (линия с точками) [20] и теоретические (сплошная линия) данные при различных температурах: 1 — $T = 60^\circ\text{C}$; 2 — $T = 20^\circ\text{C}$; 3 — $T = 5^\circ\text{C}$.

Математическая модель формирования очага россыпи золота в потоке

В развитие полученных результатов представляет интерес провести математическое моделирование кинетического поведения системы в потоке с использованием подходов развитых для проточного реактора идеального вытеснения [28].

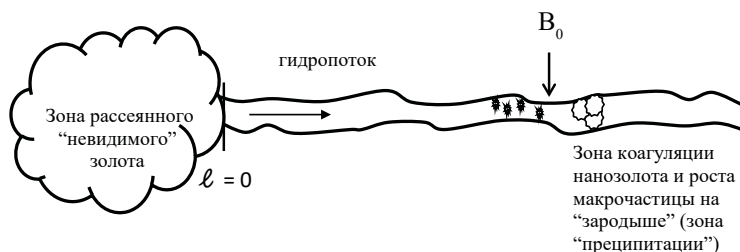


Рисунок 10. Схема формирования россыпи макрочастиц золота в процессе функционирования гидропотока

На рис. 10 представлена схема формирования «россыпи» макрочастиц в процессе образования и функционирования гидропотока содержащего рассмотренные выше формы золота. Важным представляется использование для описания системы описанных выше особенностей восстановления ионных форм до металлического золота и реакции их взаимного превращения. Модель предполагает наличие обширной зоны рассеянного «невидимого» золота и переноса его в гидропоток. При этом в гидропотоке осуществляется весь комплекс реакций, описанных выше (схема (1)–(2)). Образование макрочастиц инициируется входом в зону, содержащую реагенты — коагуляторы наночастиц и «зародышей», обеспечивающих «электрохимическую преципитацию» (рис. 11). Электрохимическая преципитация как механизм образования макрочастиц золота — предмет,

обсуждаемый в литературе [29–31]. Электрохимическая преципитация представляет собой восстановление Au^{1+} в металлическое золото на электропроводящей матрице «зародыша» с помощью восстанавливающего агента R (рис. 11).

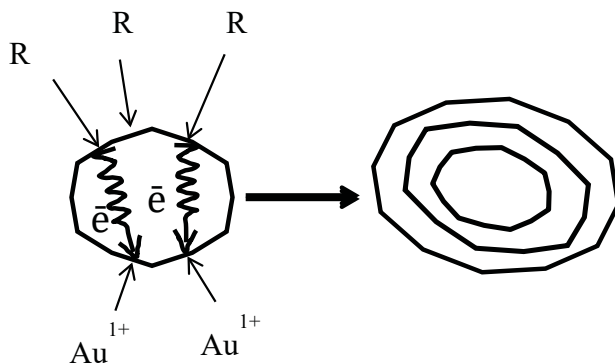


Рисунок 11. Механизм электрохимической преципитации

Базовая система уравнений имеет вид:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial Au^0}{\partial t} + v \frac{\partial Au^0}{\partial \ell} &= k_1 R_0 Au^{1+} - k_2 Au^0 Au^{3+} - k_c B_0 Au^0, \\
 \frac{\partial Au^{1+}}{\partial t} + v \frac{\partial Au^{1+}}{\partial \ell} &= k_3 R_0 Au^{3+} - k_1 R_0 Au^{1+} + 2k_2 Au^0 Au^{3+}, \\
 \frac{\partial Au^{3+}}{\partial t} + v \frac{\partial Au^{3+}}{\partial \ell} &= -k_3 R_0 Au^{3+} - k_2 Au^0 Au^{3+}, \\
 \frac{\partial Au^{0*}}{\partial t} + v \frac{\partial Au^{0*}}{\partial \ell} &= k_c B_0 Au^0 - k_g Au^{0*}.
 \end{aligned} \tag{5}$$

где B_0 — концентрация реагента, участвующего в росте макрочастиц на «зародыше»; k_c — константа скорости коагуляции и роста «зародыша»; k_g — константа скорости гравиметрического осаждения макрочастиц; Au^{0*} — преципитат металлического золота.

Для системы уравнений (5) заданы следующие начальные и входные условия:

$$t = 0: \quad Au^{3+} = Au_0^{3+}(\ell), \quad Au^{1+} = Au_0^{1+}(\ell),$$

$$Au^0 = Au_0^0(\ell) = 0, \quad Au^{0*} = Au_0^{0*}(\ell) = 0,$$

$$0 \leq \ell \leq \ell_k;$$

$$\ell = 0: \quad Au^{3+} = Au^{3+}(t) = 7.5 \cdot 10^{-7} M,$$

$$Au^{1+} = Au^{1+}(t) = 0, \quad Au^0 = Au^0(t) = 0, \quad Au^{0*} = Au^{0*}(t) = 0,$$

$$0 \leq t \leq t_k;$$

где $Au_0^{3+}(\ell)$, $Au_0^{1+}(\ell)$, $Au_0^0(\ell)$, $Au_0^{0*}(\ell)$ — начальные распределения концентраций Au^{3+} , Au^{1+} , Au^0 , Au^{0*} по длине потока; $Au^{3+}(t)$, $Au^{1+}(t)$, $Au^0(t)$, $Au^{0*}(t)$ — концентрации на входе проточной системы.

В качестве параметров для модельных расчётов было принято следующее:

– Скорость потока (v) 0.1–3 м/сек;

– Начальная концентрация золота (Au^{3+}) принята равной $7.5 \cdot 10^{-7} M$ (~ 0.15 г/м³), что соответствует измерениям, представленными в работе [9]. В качестве варианта рассмотрен случай поведения системы при низком исходном содержании золота в потоке $7.5 \cdot 10^{-8} M$;

– Длина активной части потока 3 км;

– Зона вхождения потока в область коагуляции и роста «зародышей» (зона преципитации) находится на втором километре общей длины. Химические агенты коагуляции и формирование макрочасти представляют собой «классические коагулянты» типа сульфатов, ионов железа и др., «зародышей» электропроводящие частицы типа микрогранулы золота.

– Концентрация природных восстановителей (сульфиды, сульфиты, органические молекулы и т. п.) существенно превышает концентрацию золота и поэтому принята постоянной (параметр R_0).

Численные расчёты проведены при следующих значениях параметров: $k_1 R_0 = 5.35 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$, $k_3 R_0 = 9 \cdot 10^{-5} \text{ мин}^{-1}$, $k_2 = 2.27 \cdot 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $k_c = 10^{-3} \text{ М}^{-1} \text{ мин}^{-1}$, $k_g = 0.01 \text{ мин}^{-1}$, $B_0 = 4 \text{ М}$, $v = 1 \text{ м/с}$.

Зависимость профилей распределения реагентов от концентрации восстановителя R . Профильные концентрации Au^0 , Au^{1+} , Au^{3+} , Au^{0*} при варьировании параметров $k_3 R_0$ в момент времени $t = 1300 \text{ мин}$ показаны на рис. 12. Видно, что чем выше концентрация R_0 (увеличение параметров $k_3 R_0$ или $k_1 R_0$), тем выше концентрация Au^0 в зоне коагуляции и роста «зародышей». Увеличение параметров $k_3 R_0$ в 12 раз увеличивает максимально концентрацию Au^0 в 6 раз. Увеличение концентрации восстанавливающих агентов (сульфитов, тиосульфитов, органических соединений) существенным образом повышает уровни концентраций восстановленных форм золота и накопление преципитата.

Зависимость профилей распределения реагентов от скорости потока. При увеличении скорости потока существенным образом возрастает зона повышения концентрации

Au^{3+} и доля целевого продукта из зоны коагуляции и роста «зародышей» (сравнение рис. 12 и рис. 13).

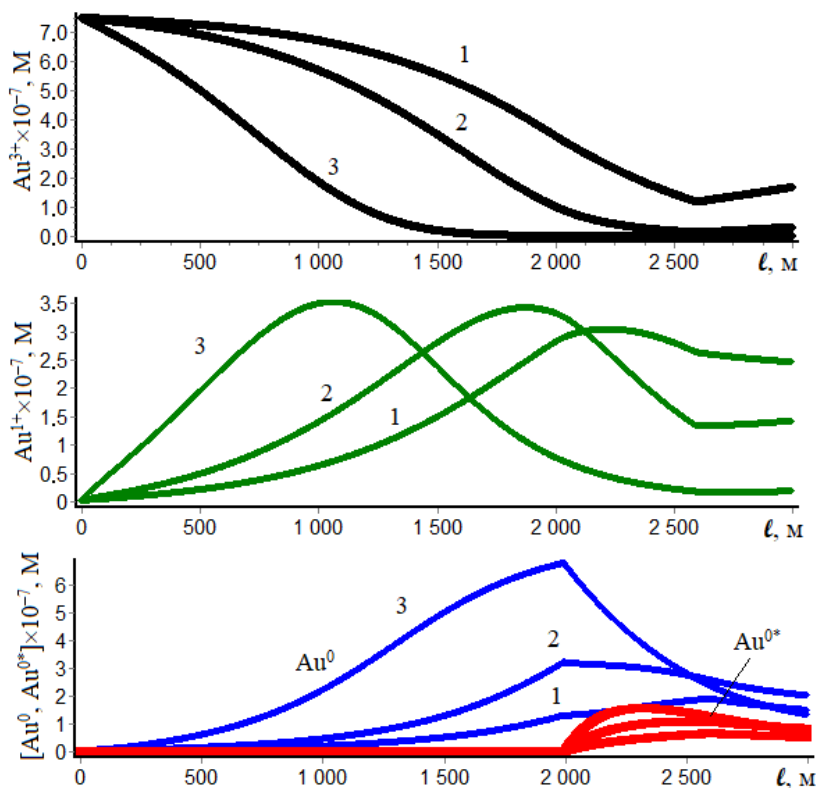


Рисунок 12. Профили изменения концентраций Au^0 , Au^{1+} , Au^{3+} , Au^{0*} по длине потока (ℓ) при вариации $k_3 R_0$: 1- $9 \cdot 10^{-5}$ мин $^{-1}$; 2- $2.25 \cdot 10^{-4}$ мин $^{-1}$; 3- $11.25 \cdot 10^{-4}$ мин $^{-1}$.

Скорость потока существенным образом влияет на кинетическое поведение системы (рис. 13). При низких скоростях потока химические реакции Au^{3+} , Au^{1+} заканчиваются на начальных участках потока (сравни рис. 12 и рис. 13).

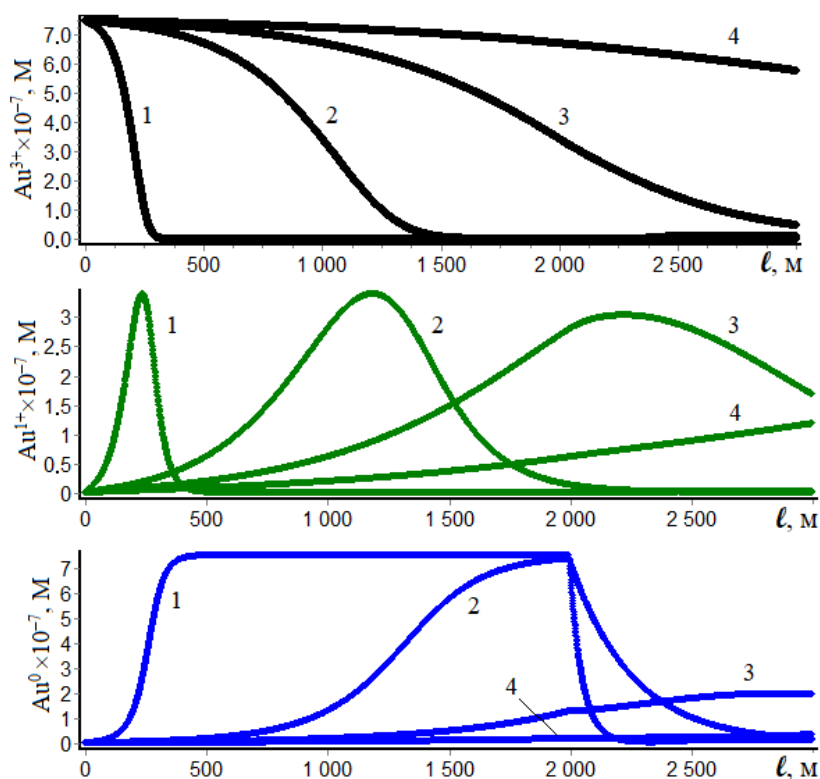


Рисунок 13. Профили изменения концентраций Au^0 , Au^{1+} , Au^{3+} по длине протока (ℓ) в момент времени $t = 3000$ мин при вариации скорости протока v : 1-0.1 м/с; 2-0.5 м/с; 3-1 м/с; 4-2 м/с.

Зависимость профилей концентрации реагентов от концентрации коагулянтов и концентрации «зародышей» (параметр B_0) (зона преципитации). Динамика изменения концентраций по длине гидротока в разные моменты времени представлены на рис. 14. Видно, что введение дополнительных концентраций B_0 практически не влияет на максимальную концентрацию Au^0 , однако су-

щественно уменьшает «вымывание» целевого продукта из зоны реакции.

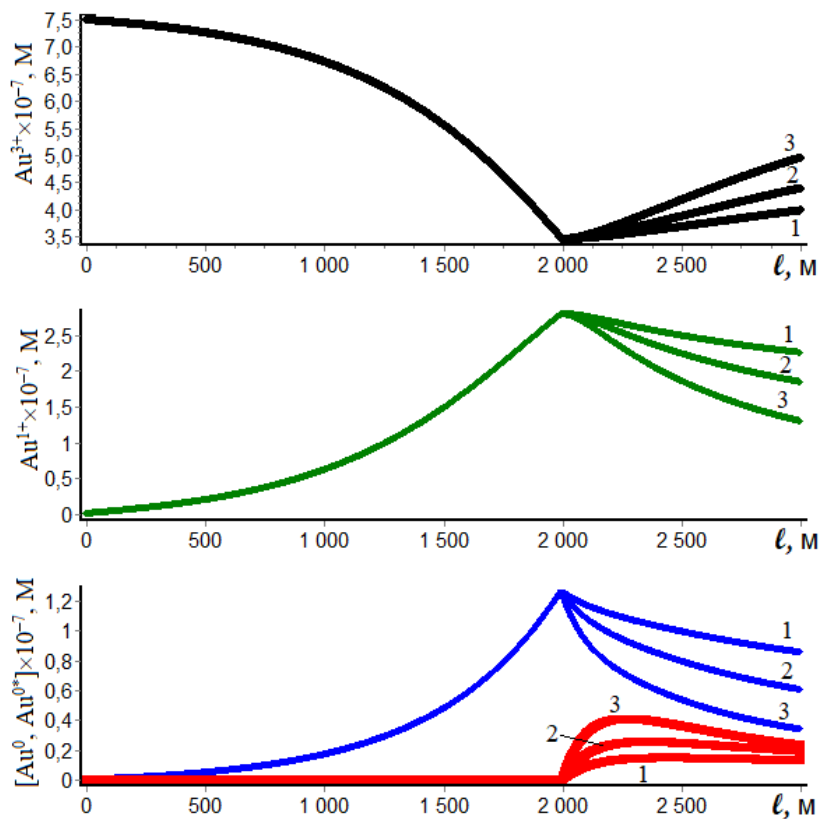


Рисунок 14. Профили изменения концентраций Au^0 , Au^{1+} , Au^{3+} по длине потока (ℓ) при вариации концентрации коагулянтов-«зародышей» B_0 : 1-2 М; 2-4 М; 3-8 М.

Кинетическое поведение системы при существенном обеднении потока исходным растворимым золотом (уменьшение исходной концентрации в 10 раз). Профили изменения концентрации реагентов и кинетического измене-

ния их концентрации в зоне преципитации (2500 м) представлены на рис. 15. Общий характер поведения системы существенным образом не изменился (сравни рис. 12 и рис. 15). Однако, как и следовало ожидать уровень накопления целевого преципитата (Au^{0*}) существенно падает.

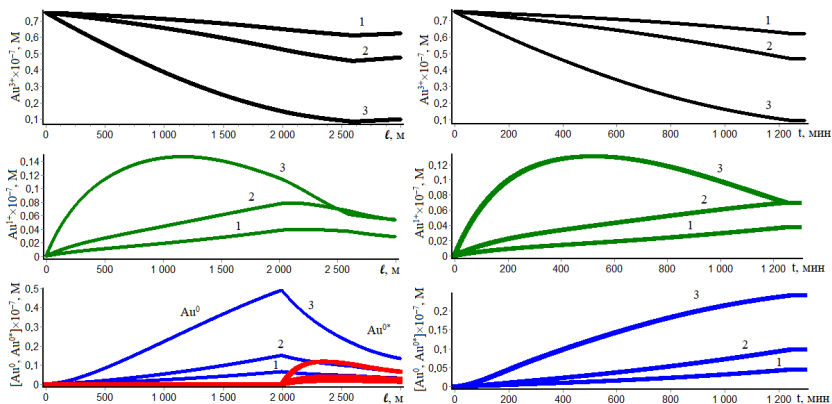


Рисунок 15. Профили изменения концентраций Au^0 , Au^{1+} , Au^{3+} , Au^{0*} по длине потока (ℓ) (слева) в момент времени $t = 1300$ мин и зависимости изменения концентраций $\text{Au}^0(t)$, $\text{Au}^{1+}(t)$, $\text{Au}^{3+}(t)$ от времени (справа) при $\ell = 2500$ м и начальной концентрации на входе $\text{Au}^{3+}(0) = 7.5 \cdot 10^{-8}$ М при вариации $k_3 R_0$: 1- $9 \cdot 10^{-5}$ мин $^{-1}$; 2- $2.25 \cdot 10^{-4}$ мин $^{-1}$; 3- $11.25 \cdot 10^{-4}$ мин $^{-1}$.

Таким образом, математическое моделирование поведения системы образования Au^0 в потоке демонстрирует, что положительными факторами увеличивающими выход целевого продукта (Au^0 и макрочастиц золота) являются увеличение концентрации восстановителя (R_0), увеличение концентрации инициатора коагуляции и роста «зародышей» (R_0) и уменьшение скорости потока (v).

Авторы выражают благодарность компании «Иликан» за финансовую поддержку исследования. Кинетическое моделирование процессов формирования макрочастиц золота выполнено

в рамках государственного задания Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова № 121041500039-8 и Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской академии наук № 122041300210-2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. А. Билибин. *Основы геологии россыпей*. М.: Изд-во Акад. наук СССР, **1955**. 472 с.
2. Н. А. Шило. *Учение о россыпях. Теория россыпеобразующих рудных формаций и россыпей*. Изд. 2-е, Владивосток: Дальнаука, **2002**. 576 с.
3. Г. В. Нестеренко. *Происхождение россыпных месторождений*. Новосибирск: Наука, **1977**. 313 с.
4. И. Д. Избеков. *Образование и эволюция россыпей*. Новосибирск: Наука, **1985**. 189 с.
5. В. И. Вернадский. *История минералов земной коры*. Т. 1. Вып. II. Л.: Научн. хим.-техн. изд-во, **1927**. 197 с.
6. Н. В. Петровская. *Самородное золото (общая характеристика, типоморфизм, вопросы генезиса)*. М.: Наука, **1973**. 347 с.
7. S. V. Streltsov, V. V. Roizen, A. V. Ushakov, A. R. Oganov, D. I. Khomskii, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **2018**, 115 (40), 9945–9950. <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1802836115>
8. Ю. А. Кузнецов, А. А. Дубков, В. Н. Калинин, А. В. Жабин, С. Д. Варфоломеев, *Недра Поволжья и Прикаспия* **2023**, 111, 27–36.
9. В. К. Бернатонис, П. А. Попов, *Изв. Томского политех. ин-та* **1977**, 287, 6–9.
10. Б. А. Воротников, Л. М. Попова, Н. А. Росляков, И. В. Рослякова, В. Г. Цимбалист, *Изв. Томского политех. ин-та* **1968**, 134, 188–195.

11. Л. Л. Шабынин, *Изв. Томского политех. ин-та* **1967**, 167, 67–71.
12. С. С. Сердюк, Автореф. дис. ... докт. геол.-мин. наук. Красноярск: КНИИГИМС, **2004**. 60 с.
13. В. В. Евсеев, В. К. Немеров, О. В. Серебренникова, *Нефтегазовое дело* **2008**, 1–9.
14. В. Л. Таусон, В. К. Немеров, Э. А. Развозжаева, А. М. Спиридонов, С. В. Липко, А. Е. Будяк, *Докл. Акад. наук*, **2009**, 426 (4), 529–532.
15. Г. Б. Сергеев. *Нанохимия: учебн. пособие*. М.: Изд-во КДУ, **2015**. 384 с.
16. R. Lo Nigro, P. Fiorenza, B. Pécz, J. Eriksson, *Nanomaterials* **2022**, 12(19), 3319. <https://doi.org/10.3390/nano12193319>
17. В. В. Апяри, С. Г. Дмитриенко, М. В. Горбунова, А. А. Фурлетов, Ю. Ф. Золотов, *Журн. аналит. химии* **2019**, 74(1), 26–38.
18. Е. А. Дурович, Е. Г. Евтушенко, О. В. Сенько, Н. А. Степанов, Е. Н. Ефременко, А. В. Еременко, И. Н. Курочкин, *Вестн. Росс. гос. мед. ун-та* **2018**, 6, 27–35.
19. С. Д. Варфоломеев. *Молекулярные основы интеллекта*. М.: Изд-во МГУ, **2024**. 290 с.
20. А. В. Коршунов, Г. В. Кашкан, Х.Т.Т. Нгуен, Ш. В. Зыонг, *Изв. Томского политех. ун-та* 2011, 318 (3), 12–18.
21. J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discussions of the Faraday Society* **1951**, 11, 55–75.
22. M. K. Chow, C. F. Zukoski, *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, 165, 97.
23. W. Patungwasa, J. H. Hodak, *Mater. Chem. Phys.* **2008**, 108 (1), 45–54.
24. N. V. Vityuk, A. M. Eremenko, N. M. Rusinchuk, V. Z. Lozovski, M. M. Lokshyn, V. S. Lysenko, Iu. P. Mukha, *Himia, Fizika ta Tehnologija Poverhni*, **2023**, 14 (3), 310–323. <https://doi.org/10.15407/hftp14.03.310>

25. B. Rodriguez-Gonzalez, P. Mulvaney, L. M. Liz-Marzan, *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. **2007**, 221 (3), 415.
26. А. В. Коршунов, Д. О. Перевезенцева, Т. В. Коновчук, Е. В. Миронец, *Изв. Томского политех. ун-та* 2010, 317 (3), 6–13.
27. С. Д. Варфоломеев. *Динамика неустойчивости. Кинетическое моделирование и методы управления*. М.: Научный мир, **2021**. 282 с.
28. С. Д. Варфоломеев, К. Г. Гуревич. *Биокинетика. Практический курс*. М.: Фаир-Пресс, **1999**. 720 с.
29. А. Ш. Хусаинова. Автореф. дис. ... канд. гео.-мин. наук. Новосибирск: ИГМ СО РАН, **2020**. 19 с.
30. А. Е. Воробьев, Т. Хоноре, *Вестник РУДН*, сер. Инженерн. исслед. **2016**. 1. 78–82.
31. В. Л. Таусон, Р. Г. Кравцова, С. В. Липко, А. С. Макшаков, К. Ю. Арсентьев, *Докл. Акад. наук* **2018**, 480 (2), 210–216.

ФОТОХИМИЯ. ФОТОБИОЛОГИЯ

Молекулярные основы фотохимических и фотобиологических процессов

23. ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ЗРЕНИЯ КАК ПРОБЛЕМА БИОХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ: РОДОПСИН

М. А. Островский^{1,2}

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

*²Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова*

Биохимическая физика в отношении зрения — это классический пример междисциплинарного подхода, позволяющего исследовать и подойти к объяснению того, каким образом энергия поглощённого кванта света молекулой зрительного пигмента родопсина приводит к возникновению физиологического, фоторецепторного сигнала.

Более полувека лаборатория физико-химических основ рецепции, активно сотрудничая с физиками и химиками высочайшей квалификации Института химической физики АН СССР, а затем имени Н. Н. Семёнова РАН, а затем и Института биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, работает в этом направлении. Исследования ведутся, в основном, в области фотохимии и супрамолекулярной организации родопсина в фоторецепторной мембране, его конформационных перестроек при действии света, а также подробно изучаются механизмы фотоповреждения сетчатки и ретинального пигментного эпителия и системы защиты от такого рода повреждений.

В настоящей статье представлен обзор, в основе которого результаты работ, выполненных в Лаборатории в последние годы, и касающийся зрительного пигмента родопсина, запускающего первичный процесс зрения.

Первичный процесс зрения

Под первичным процессом зрения (зрительной фоторецепцией) понимается цепь событий от поглощения кванта света молекулой зрительного пигмента родопсина в зрительной клетке сетчатки глаза позвоночных животных и человека или в рабдоме глаза беспозвоночных животных и до возникновения в них электрического сигнала (фоторецепторного потенциала), который передаётся затем следующим нервным элементам зрительной системы. В случае зрительной клетки сетчатки позвоночных животных и человека фоторецепторный сигнал в первом, фоторецепторном синапсе передаётся химическим путём следующим за ними горизонтальным и биполярным клеткам. Далее, от этих клеток зрительная сигнализация передаётся, также синаптически, т. н. амакриновым и ганглиозным клеткам, и от ганглиозных клеток по их длинным отросткам (аксонам) — волокнам зрительного нерва в зрительные центры мозга. В нервных слоях сетчатки происходит огромная обработка зрительной информации. Когда великий испанский гистолог, основоположник современной нейробиологии, Лауреат Нобелевской премии по физиологии и медицине 1906 года Сантьяго Рамон-и-Кахаль писал: «Сетчатка — это часть центральной нервной системы, периферическая часть мозга», он не мог даже предположить, насколько был прав, насколько велика, посылаемая в мозг, степень обработки информации в сетчатке глаза.

Молекулярный механизм фоторецепции в кратчайшем изложении выглядит следующим образом (Рис. 1 и 2).

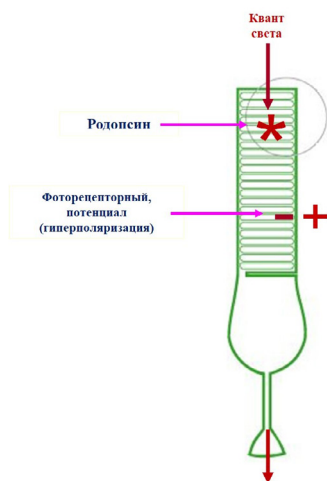


Рисунок 1. Принципиальная схема процесса фототрансдукции в зрительной клетке.

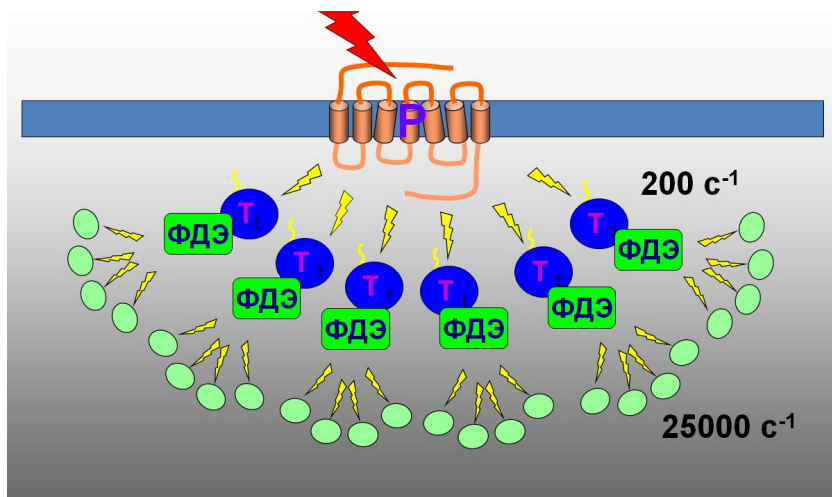


Рисунок 2. Схема ферментативного каскада усиления светового сигнала

Квант света поглощается хромофорной группой молекулы родопсина — 11-*цис* ретиналем и изомеризует его. Фотоизомеризация 11-*цис* ретиналя вызывает серию конформационных перестроек в белковой части молекулы — опсине. Эти перестройки переводят родопсин в физиологически активное состояние. Активированный родопсин запускает ферментативный каскад усиления светового сигнала. Первым этапом каскада является взаимодействие родопсина с G-белком (в фоторецепции он называется трансдуцином) и его активация. На втором этапе каскада активированный трансдуцин, а именно его альфа-субъединица, взаимодействует и активирует фермент фосфодиэстеразу. Активированная фосфодиэстераза с высокой скоростью гидролизует циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ). Падение в цитоплазме зрительной клетки концентрации цГМФ приводит к блокированию ионных каналов в её плазматической мембране и, как следствие, к возникновению на ней гиперполяризационного потенциала. Распространяясь до пресинаптического окончания, этот потенциал (фоторецепторный потенциал) вызывает замедление, а на ярком свете прекращение выделения в синаптическую щель нейромедиатора (глутамата). Замедление или прекращение высвобождения нейромедиатора из пресинаптического окончания зрительной клетки — палочки или колбочки и служит сигналом о поглощении кванта света молекулой родопсином. Таким «странным» способом передаётся зрительная информация в первом фоторецепторном синапсе сетчатки позвоночных животных и человека от зрительной к следующим за ней нервным клеткам — биполярным и горизонтальным.

Зрительный родопсин в ряду ретиналь-содержащих белков

Название «родопсин» происходит от двух греческих слов: «rhodo» — розовый и «opsis» — видеть. До конца 50-х-начала 60-х годов он назывался «зрительным пурпуром», а еще ранее Sehestoff — «зрительным веществом» как его назвал в 1876 г. автор открытия Ференц Болл. В настоящее время название родопсины распространилось на большое семейство ретиналь-содержащих белков — и на родопсины многоклеточных, включая зрительные родопсины (родопсины II типа по современной классификации), и на микробные родопсины (родопсины I типа).

Родопсины в настоящее время обнаружены во всех доменах живой природы — бактериях, археях и эукариотах, а также в гигантских вирусах. Родопсины I типа характерны для бактерий, архей и низших эукариот; они очень разнообразны по выполняемым функциям, основные из которых фотоэнергетическая (ионные насосы) и фотоинформационная (сенсорные родопсины, катионные и анионные каналы). Родопсины II типа характерны для высших животных, в большинстве случаев они представляют собой специализированные G-белок-связывающие рецепторы, которые обеспечивают, в основном, фотоинформационные функции, основная из которых — зрительная. Родопсины III типа широко распространены в живых организмах из тех же доменов, что и родопсины I типа, и предположительно выполняют сенсорную функцию [для обзора см. 1, 2].

Общим для них являются, во-первых, структура апо-белка — опсина с его семьёй трансмембранными α -спиральными «тяжами» и, во-вторых, кофактор (хромофор) — ретиналь, поглощающий кванты света (Рис. 3 и 4).

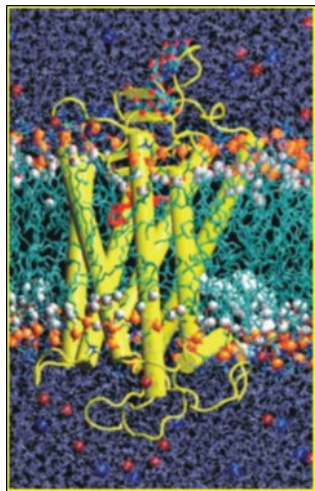


Рисунок 3. Трёхмерная организация белковой части молекулы родопсина (опсина) в фоторецепторной мембране: 7 α -спиральных «тяжей».

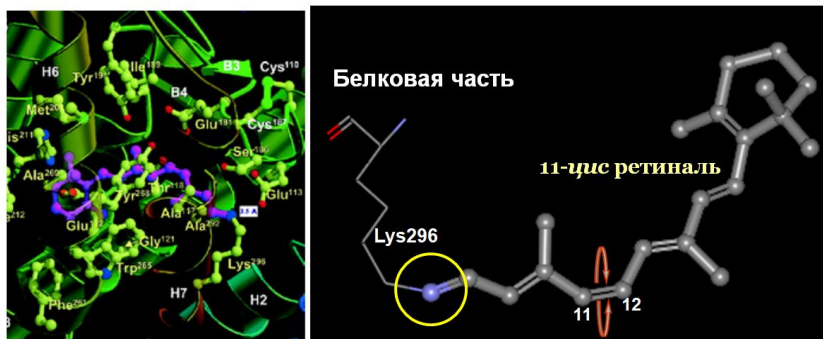


Рисунок 4. Слева: Трёхмерная организация хромофорного центра молекулы родопсина (опсина), в котором расположен 11-цис ретиналь, ковалентно связанный с аминогруппой лизина296 в 7-м α -спиральном «тяже». Справа: Молекула 11-цис ретиналя, ковалентно связанная с аминогруппой лизина296. Показано, что фотоизомеризация происходит вокруг 11-12 двойной связи.

7- α -спиральный белковый каркас родопсинов и консервативен, и, одновременно, пластичен. Ретиналь как правило, ковалентно связан протонированным шиффовым основанием с лизиновым остатком опсина в седьмой α -спирали (TM7) и находится в полностью-*транс* (родопсины I и III типов) или 11-*цис* (родопсины II типа) изомерной форме. Хромофорный центр — это наиболее консервативный домен опсина. Ближайшее белкового окружение является принципиально важным как для спектральной настройки молекулы родопсина, так и для осуществления сверхбыстрой и эффективной фотохимической реакции изомеризации хромофора, лежащей в основе функционирования всех родопсинов. Рассматривая роль ближайшего белкового окружения в хромофорном центре опсина, допустимо говорить о белковом катализе процесса фотоизомеризации. При этом вопрос о природе взаимодействия белок-хромофор — стерическом, электростатическом, водородном и гидрофобном — остаётся предметом активного изучения (для обзора см. [3]).

Что касается топологии в мембране белковой части молекулы, то, если в родопсинах I и II типов N-конец обращен наружу клетки, а C-конец — внутрь, то в родопсинах III типа наблюдается противоположное расположение, при котором N-конец обращен внутрь клетки, а C-конец — наружу. Причина и биологический смысл такого расположения родопсинов III типа в мембране клетки остаются неясными.

Родопсины бактерий и архей I типа, включая бактериородопсин, осуществляющий простейший фотосинтез, — одни из самых древних белков биосферы, они возникли в клетках прокариот около 3.8 млрд лет назад. Родопсины II типа, включая, ответственный за фотоинформационный процесс зрительный родопсин, появились в многоклеточных эукариотах около 2 млрд лет назад.

В рамках теории конвергентной эволюции родопсинов предполагается, что предшественниками микробных родопсинов были лизосомальные переносчики цистеина, имеющие 7- α -спиральную структуру. Предшественниками животных родопсинов считаются цАМФ G-белок-связывающие рецепторы с классической 7- α -спиральной структурой, т. е. ретиналь-несодержащие рецепторы. Иными словами, ретиналь в качестве хромофора был «вставлен» в хромофорный центр зрительных опсинов позже.

Совокупность накопленных к настоящему времени данных позволяет рассматривать, как предпочтительную, независимую, конвергентную эволюцию всех трёх типов родопсинов — I, II и III типов. Подавляющее большинство родопсинов II типа функционируют как G-белок связывающие рецепторы. В основном, но необязательно, они несут фоторецепторную функцию. Идентифицировано несколько подгрупп незрительных опсинов. К ним, в частности, относятся светочувствительный меланопсин, найденный в ганглиозных клетках сетчатки и ответственный за циркадные ритмы и зрачковый рефлекс.

Родопсин: фотохимия

Фототрансдукция запускается реакцией фотоизомеризации хромофорной группы родопсина — 11-*цис*-ретиналя. Переход 11-*цис*-ретиналевого хромофора в его полностью-*транс* форму в качестве фотохимической реакции зрения был установлен Дж. Уолдом еще в 50-х годах (Нобелевская премия 1967 года). Выяснение детального механизма этой важнейшей реакции родопсина и других ретиналь-содержащих белков особенно активизировался в последнее время в связи с развитием техники фемтосекундной лазерной спектроскопии.

Уникально организованный хромофорный центр ретиналь-содержащих белков обеспечивает исключительно высокую скорость и эффективность реакции фотоизомеризации. Квантовый выход реакции зрительного родопсина — 0.65; в ходе реакции в молекуле запасается 58% поглощенной энергии кванта. Сама изомеризация происходит в суб-пикосекундной временной шкале. Родопсин в этом отношении становится парадигмой не только для фотобиологии, но и для фотохимии вообще. Тепловой барьер изомеризации ретиналевого хромофора исключительно высок (45 ккал/моль) [4]. Физиологический смысл столь высокого теплового барьера изомеризации 11-*цис* ретиналя и столь высокой скорости и эффективности его фотоизомеризации состоит в том, чтобы, с одной стороны, исключить ложное срабатывание родопсина в темноте и, с другой стороны, чтобы использовать энергию поглощенного кванта именно для фотохимической реакции изомеризации с минимальной возможностью ее рассеяния в виде тепла или высвечивания в виде флуоресценции (квантовый выход флуоресценции родопсина исключительно мал — 5×10^{-3}) (для обзора см. 5, 6]. В отличие от изомеризации ретиналя в газовой фазе, т. е. в свободном, ничем не ограниченном пространстве, фотоизомеризация ретиналя как хромофорной группы совершается в теснейшем белковом окружении хромофорного центра, объем которого составляет всего 660 \AA^3 , а поверхность взаимодействия 11-*цис* ретиналя с белковым окружением равна, примерно, 230 \AA^2 [7]. Это означает, что тесное белковое окружение 11-*цис*-ретиналя не только не препятствует, а наоборот активно способствует сверхбыстрому и эффективному процессу фотоиндуцированного изменения геометрии хромофорной группы. Еще предстоит выяснить, каким именно образом столь тесное белковое окружение способствует ускорению и повышению эффективности этой фотохимической реакции

Реакция изомеризации 11-*цис* ретиналя в хромофорном центре родопсина происходит через коническое пересечение поверхностей потенциальной энергии, которое связывает электронно-возбужденное состояние ретиналя в опсине с основным состоянием первого продукта реакции — фотородопсина, в котором хромофор находится в искаженной, но уже полностью-*транс*оидной форме. Переход из *цис*- в *транс*-конфигурацию совершается за фантастически короткое время — в пределах 50 фемтосекунд (Рис. 5).

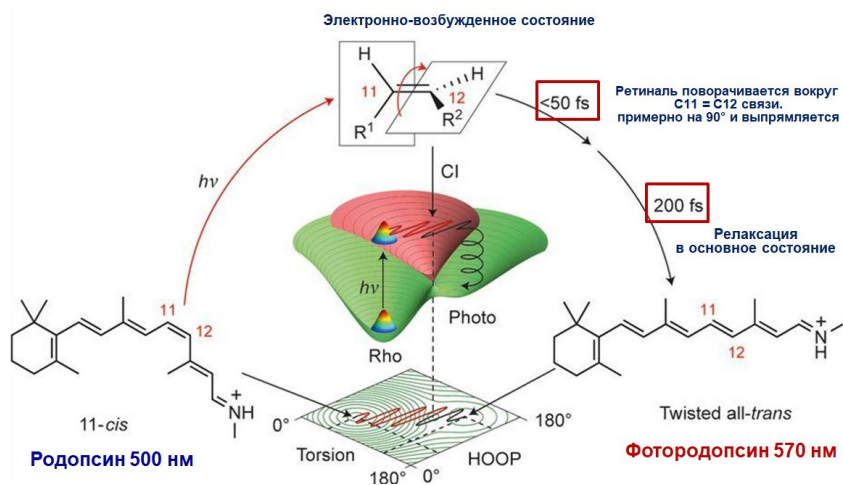


Рисунок 5. Схема реакции фотоизомеризации 11-*цис* ретиналя в хромофорном центре родопсина как безбарьерного перехода через коническое пересечение, осуществляемого с исключительно высокой скоростью и высокой степенью когерентности (модифицировано из работы: [24]).

Коротко: изомеризация происходит через коническое пересечение поверхностей потенциальной энергии, которое связывает возбужденное состояние ретиналя (S1) с первым продуктом реакции, фотородопсином (Фото), в основном состоянии (S0). В зрительном родопсине когерентная

реакция *цис-транс*-перехода совершается за фантастически короткое время — 50–100 фс. Становится очевидным, что высочайшая скорость и эффективность этого перехода обеспечивается взаимодействием хромофорной группы с ее ближайшим белковым окружением в хромофорном центре молекулы родопсина. От взаимодействия ретиналя с его ближайшим белковым окружением в тесном хромофорном центре прямо зависят такие фундаментальные характеристики молекулы родопсина как положение максимума спектра поглощения, время жизни возбужденного состояния, квантовый выход изомеризации и колебательная когерентность, наблюдаемые в первом фотопродукте реакции — фотородопсине.

Нами методом фемтосекундной поляризационной абсорбционной лазерной спектроскопии было проведено подробное сравнение спектральных характеристик, изомерного состава ретиналей, скоростей и квантовых выходов прямой фотохимической реакции зрительного родопсина как родопсина II типа и двух представителей микробиальных родопсинов как родопсинов I типа — бактериородопсина галофильной археобактерии *Halobacterium salinarum* и родопсина почвенной психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (для обзора этих работ см. [8, 2]).

Важным результатом сравнения скоростей прямой фотохимической реакции зрительного родопсина как родопсина II типа и микробиальных родопсинов как родопсинов I типа стало то, что релаксация возбужденного состояния и образование первичных продуктов изомеризации зрительного родопсина происходит быстрее, чем в обоих микробиальных родопсинах. Это чётко следует из сравнения кинетических кривых накопления продуктов их изомеризации, представленных на рис. 6.

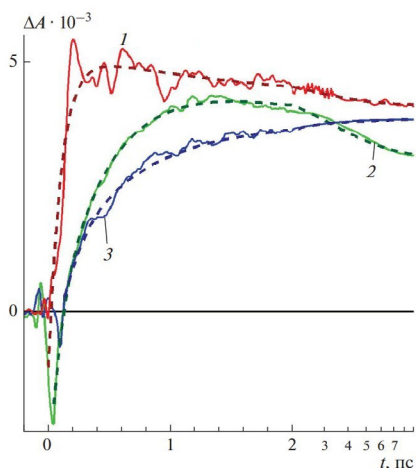


Рисунок 6. Ненормированные кинетические кривые образования продуктов изомеризации зрительного родопсина (Rh) (1), бактериородопсина галофильной археобактерии *Halobacterium salinarum* (BR) (2) и психротрофной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR) (3). Кинетические кривые представлены в линейном (–0.2–2 пс) и логарифмическом (2–9 пс) масштабах времени задержки.

Сравнение времён достижения конического пересечения показывает, что для зрительного родопсина как позвоночных животных (бычий родопсин), так и беспозвоночных (родопсин осьминога), оно в несколько раз короче, чем для микробного родопсина археобактерий бактериородопсина [для обзора см. [8]]. Это различие может быть связано как с разными *цис-транс*- и *транс-цис*-переходами в зрительном и микробном родопсинах соответственно, так и с различной структурой их хромоформных центров. Первое предположение подтверждается тем, что в газовой фазе фотоизомеризация 11-*цис*-ретиная в полностью-*транс*-форму совершается почти в восемь раз быстрее, чем фотопереход из полностью-*транс*-ретиная в *цис*-и-

зомеры. Нет сомнения, что различная структура их хромофорных центров, ближайшее белковое окружение ретиналя в этих центрах по-разному и в несколько раз ускоряет эту реакцию. (для обзора см. [2,8–10]).

Большую скорость прямой реакции фотоизомеризации 11-*цис*-ретиналя в молекуле зрительного родопсина по сравнению с фотоизомеризацией *транс*-ретиналя в бактериальном родопсине можно рассматривать как свидетельство большего совершенства хромофорного центра зрительного родопсина как эволюционно более «молодого» ретиналь-содержащего белка, функционально предназначенного для запуска фотоинформационного процесса.

В последнее время существенно возрос интерес к фотообратимым реакциям родопсинов. В частности, это связано с тем, что фотохромные реакции ретиналь-содержащих белков рассматриваются в качестве прообраза молекулярных фотопереклюкателей, обладающих исключительно высокой скоростью, высоким квантовым выходом и спектрально разнесенными исходной темновой и светоиндуцированной формами. Нами даже был получен патент, на оптический логический элемент, основанный на сверхбыстром фотопереклучении ретиналь-содержащего белка (Патент на изобретение № 2420773. Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 10 июня 2011года).

Исследования фотохромных реакций зрительного родопсина нами были начаты давно. Вначале были исследованы фотохромные реакции родопсина позвоночных при сравнительно низких температурах (на стадии метародопсина I) [11–13]. В этих работах, в частности, впервые было обнаружено явление изохромии фоторегенерированного родопсина, когда одна его часть стабильна при комнатной температуре, а другая часть нестабильна, хотя спектр поглощения у них один и тот же.

Далее, нами были проведены исследования фотохромных реакций родопсина беспозвоночных. Естественная способность родопсина беспозвоночных к фотообратимости с поздней стадии фотопревращения (стадии метародопсина) лежит в основе физиологического механизма регенерации (фоторегенерации) зрительного пигмента после поглощения света. Это отличает механизм регенерации зрительного пигмента беспозвоночных от позвоночных, у которых регенерация зрительного пигмента — это сложный, многоступенчатый процесс, совершающийся в отсутствие света как в клетках ретиального пигментного эпителия, лежащего в глазном бокале за сетчаткой, так и в фоторецепторных клетках самой сетчатки. Способность родопсина беспозвоночных к фотообратимости послужила основой для многочисленных попыток его использования в биотехнологии. Например, нами в ситуации *in vitro* были продемонстрированы многократные фотохромные переходы родопсина осьминога в метародопсин и обратно в течение длительного времени при комнатной температуре [14]. Важно при этом отметить, что спектры поглощения родопсина и метародопсина осьминога далеко разнесены друг от друга.

Однако наибольший интерес, естественно, привлекают сверхбыстрые фотохромные реакции ретиаль-содержащих белков — родопсинов I и II типов. Нами в последние годы были проведены подробные исследования фотохромной фотореакции зрительного родопсина на стадиях фото- и батородопсина в области фемто- и пикосекундных времен. При этом, как и в случае прямой фотореакции, проводилось сравнение с микробными родопсинами.

Представление элементарного акта процесса фотоизомеризации ретиналя в ретиаль-содержащих белках как прохождение через коническое пересечение предполагает возможность осуществления обратных фотореакций как зрительного

родопсина, а именно: полностью-*транс* (Батородопсин) \rightarrow 11-*цис* (Родопсин), так и бактериородопсина, а именно: 13-*цис* (интермедиат К) \rightarrow полностью-*транс* (Бактериородопсин). Возможность таких переходов, инициированных в раннем пикосекундном диапазоне времени, а также оценка их квантовых выходов, была показана нами в работах [15–17]. На рис. 7 представлены условия эксперимента со зрительным родопсином, а также реакционный путь его прямой и обратной фотореакций.

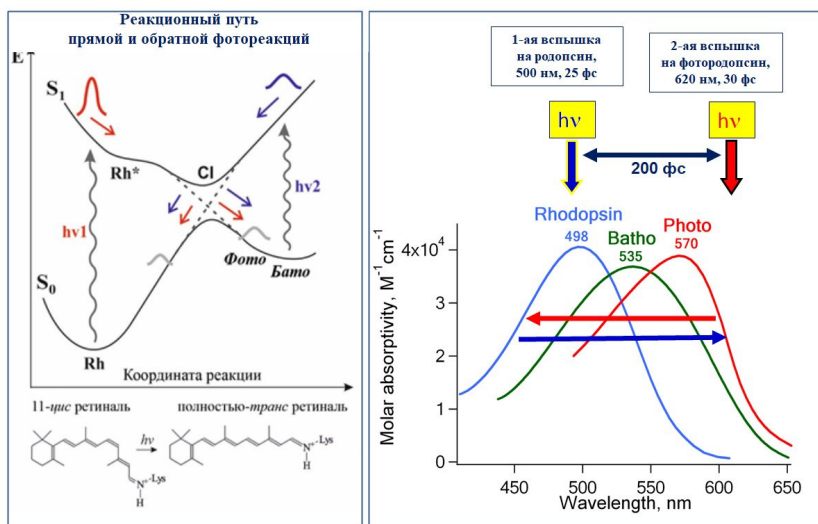


Рисунок 7. Исследование прямой и обратной фотореакций хромофорной группы зрительного пигмента родопсина: 11-*цис* ретиналь \leftrightarrow полностью-*транс* ретиналь.

Слева: реакционный путь прямой и обратной фотореакций. Справа: условия эксперимента и спектры поглощения родопсина (Rh), фотородопсина (Photo) и батородопсина (Batho) (модифицировано из работ [8,17]).

Для проведения этих экспериментов в лаборатории В. А. Надточенко в Институте химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН была создана установка трёхим-

пульсной фемтосекундной абсорбционной лазерной спектроскопии. Первый импульс действия с длиной волны поглощения 11-*цис* ретиналя в зрительном родопсине запускал реакцию изомеризации. После образования продукта изомеризации — батородопсина подавался второй импульс накачки, спектрально настроенный на длину волны поглощения образовавшегося батородопсина. Этот второй импульс инициировал обратную фотореакцию. Третий, спектрально широкий импульс белого континуума позволял измерить количество перешедшего в исходное состояние ретиналя и, таким образом, оценить квантовый выход. Аналогичная схема эксперимента была применена и при исследовании бактериородопсина. Основной результат этих экспериментов по исследованию фотообратимых реакций зрительного и бактериального родопсинов сводится следующему. Квантовый выход обратной фотореакций в случае зрительного родопсина $\phi(\text{Бато} \rightarrow \text{Rh})$ равен 0.15, а в случае бактериородопсина — $\phi(\text{K} \rightarrow \text{BR})$ он равен 0.81. При этом, квантовые выходы прямой фотореакции у них практически совпадают (0.65). Одно из возможных объяснений того, что, несмотря на практически одинаковые значения квантовых выходов прямой фотореакции зрительного родопсина и бактериородопсина, обратная фотореакция зрительного родопсина гораздо менее эффективна, может состоять в том, что при обратной реакции изомеризация полностью-*транс* ретиналя в 11-*цис*-форму затруднена по сравнению с изомеризацией 11-*цис*- → полностью-*транс*-ретиналь при прямой реакции. Скорее всего, различия в эффективности обратной фотохимической реакции родопсина и бактериородопсина связаны не только с характеристиками полностью-*транс*- ретиналя у батородопсина и 13-*цис*-ретиналя у интермедиата **К** бактериородопсина, но и с различным влиянием на хромофорную

группу белкового окружения в хромофорном центре каждого из этих родопсинов.

Биологический смысл существенно меньшей эффективности обратной фотореакции зрительного родопсина может состоять в том, что, такими образом, повышается надежность его прямой фотореакции. Это позволительно рассматривать как один из аргументов в пользу отбора в ходе конвергентной эволюции 11-*цис*-изомера в качестве хромофорной группы всех зрительных пигментов беспозвоночных и позвоночных животных. При этом, конечно, следует иметь в виду, что вероятность поглощения второго кванта света той же самой молекулой родопсина в зрительной клетке глаза чрезвычайно мала.

Еще одним важнейшим преимуществом 11-*цис* изомерной формы ретиналя в качестве хромофорной группы животных родопсинов как G-белок-связывающих рецепторов является то, что 11-*цис*-ретиналь является мощным лигандом-антагонистом. Благодаря этому, будучи в 11-*цис*-форме, он препятствует активации молекулы родопсина в темноте. А это является принципиально важным условием для поддержания низкого теплового, «темнового шума» фоторецепторной клетки, что совершенно необходимо для ее работы в условиях низких освещенностей. В то же время фотоизомеризованный полностью *транс*-ретиналь действует в долгоживущем продукте фотолиза родопсина — метародопсине II как мощный агонист, способствующий запуску процесса фототрансдукции. Представляется очевидным, что фотобиологический механизм преобразования света в информационный процесс в эволюционно более «молодых» зрительных родопсинах (родопсинах II типа) должен быть надежнее, нежели механизм преобразования света в фотоэнергетический процесс в эволюционно более «древних» микробных родопсинах (родопсинах I типа).

Родопсин: супрамолекулярная организация в мембране

Как уже было сказано, родопсин является членом большого семейства связанных с G-белком рецепторов. Структура всех этих рецепторов очень похожа. Исследования родопсина в этой связи принципиально важны для понимания механизмов активации и инактивации рецепторов всего семейства. Фоторецепторный каскад усиления светового сигнала представляет собой архетип системы G-белок-связывающих рецепторов. Образование полностью-*транс*-ретинала в результате фотоизомеризации 11-*цис*-ретинала согласно классической схеме функционирования G-белок-связывающих рецепторов соответствует связыванию диффундирующей молекулы-агониста, активирующей G-белок в других рецепторах, например, гормональной и нервной системах. При этом фоторецепторный каскад усиления представляет собой простейшую форму, содержащую только один тип G-белка (трансдуцин), и только один эффектор, циклическую ГМФ-фосфодиэстеразу (ФДЭ6 — PDE6). Исходя из важности понимания механизма функционирования родопсина в запуске фоторецепторного усилительного каскада, нарушения классической, устоявшейся картины вызывают горячие дискуссии и инициируют активные исследования.

До сравнительно недавнего времени не вызывало сомнения, что родопсин взаимодействует и активирует G-белок (трансдуцин) и другие белки фоторецепторного каскада, например, связывает арестин, в мономерной форме (для обзора см. [5]). Действительно, традиционное представление о механизме фототрансдукции у позвоночных основано на свободном перемещении белков в жидкой (вязкость около 2 пуаз) фоторецепторной мембране. При этом свободное перемещение оказывается возможным несмотря на исключительно высокую плотность мо-

лекул родопсина в фоторецепторной мембране. Действительно, из совокупности многочисленных работ следует, что плотность родопсина в фоторецепторной мембране диска порядка $\sim 20\,000$ родопсина/ $\mu\text{м}^2$, и при этом такая необыкновенная плотность оказывается оптимальной для нормального функционирования зрительной клетки. Совокупность независимых методов определения диффузии родопсина в фоторецепторной мембране указывают на его быструю вращательную ($20\,\mu\text{s}$) и весьма быструю латеральную (от 0.1 до $0.6\,\mu\text{м}^2/\text{s}$) диффузии (для обзора см. [18]). Всё это явно свидетельствует в пользу мономерной формы родопсина в мембране.

Вместе с тем, за последние годы появилась целая серия работ, выполненных, методами атомно-силовой и крио-электронной микроскопии, согласно которым родопсин в фоторецепторной мембране находится в димерной или, скорее даже, в олигомерной форме. Суммируя результаты этих работ, можно выделить четыре иерархических уровня олигомерной организации родопсина в фоторецепторной мембране: (а) диффузное распределение мономеров по всему диску, (б) диффузное распределение мономеров в центре диска, (в) диффузное распределение рядов димеров, (г) параллельное расположение полос, состоящих из 2-х рядов димеров родопсина (Рис. 8).

В целом ряде работ, выполненных с помощью самых различных биофизических методов, приведены доказательства существования олигомеров родопсина и обсуждаются преимущества его паракристаллической организации для осуществления процесса фототрансдукции. Вместе с тем, в других работах, выполненных, например, методами ЭПР и калориметрии, показано, что родопсин находится в мембране фоторецепторного диска явно в мономерном состоянии (для обзора см. [18]).

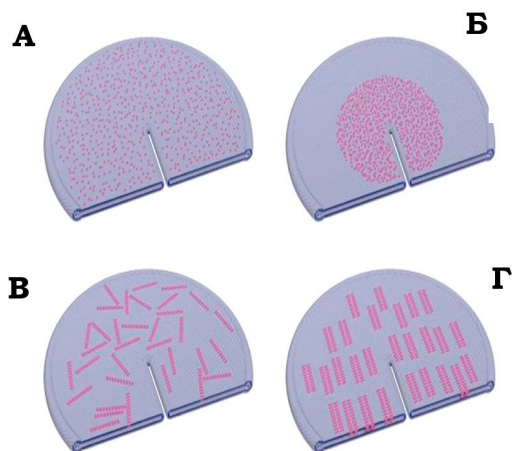


Рисунок 8. Четыре иерархических уровня (модели) олигомерной организации родопсина в фоторецепторной мембране диска наружного сегмента фоторецепторной клетки.

Нами совместно с сотрудниками ОИЯИ в Дубне и Физтеха было проведено сравнительное малоугловое нейтронное и малоугловое рентгеновское исследование супрамолекулярной организации родопсина в фоторецепторной мембране нативных дисков палочек сетчатки быка [19, 20]. Были получены данные, указывающие на то, что ни димерных цепочек, ни, тем более, полос из димеров в плоскости диска нет. Судя по нашим данным, родопсин в жидкой фоторецепторной мембране находится в равновесной мономерной/димерной формах. Во всяком случае, можно утверждать, что структуризация молекул родопсина в фоторецепторной мембране отсутствует. При этом молекулы родопсина, как следует из наших данных, расположены в фоторецепторной мембране диффузно, с исключительно высокой плотностью и совершенно очевидно без какой-либо регулярной упаковки (Рис. 9).

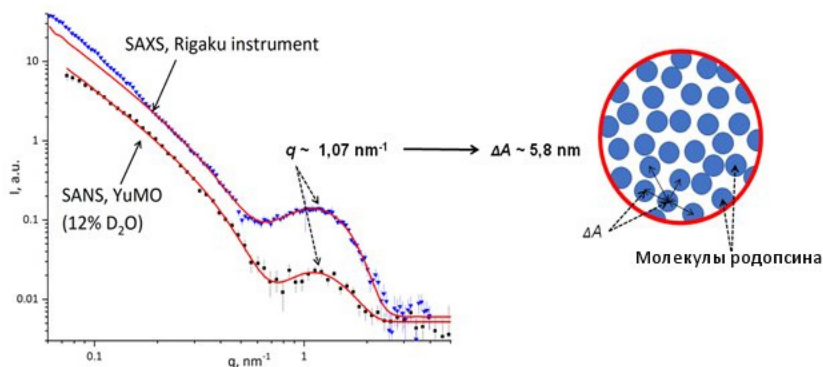


Рисунок 9. Супрамолекулярная организации молекул родопсина в фоторецепторном диске по результатам малоуглового нейтронного и малоуглового рентгеновского анализов (модифицировано из работы [20]). Молекулы родопсина неупорядоченно распределены в плоскости мембраны диска с высокой плотностью, без какой-либо регулярной упаковки в виде мономеров и димеров.

Иными словами, судя по нашим данным, справедлива модель диффузного распределения мономеров\димеров родопсина по всему диску (Рис. 8). В этой связи следует обратить внимание на рентгеноструктурную работу, выполненную на родопсин-содержащих нанодисках [21]. В этой работе было показано, что родопсин, будучи в мономерной форме, при переходе к метародопсину II претерпевает конформационные изменения. Именно такой результат — светоиндуцированные конформационные перестройки в гидрофильной области родопсина на его цитоплазматической стороне — был впервые получен нами ещё в середине 80-х годов с помощью метода спиновых меток и ЭПР-спектроскопии с переносом насыщения [22]. Однако, при димеризации, в резуль-

тате взаимодействия между двумя молекулами родопсина, на стадии образования метародопсина II происходит затормаживание этих конформационных перестроек. Речь в этой работе [21] идёт о подавлении конформационных перестроек в ключевых для активации родопсина трансмембранных, альфа-спиральных «тяжах». Таким образом, конформационные изменения, характерные для перехода родопсина в метародопсин II, при димеризации существенным образом затормаживаются.

Можно полагать, что в механизме фототрансдукции работает именно «классическая» мономерная форма родопсина, а димерные и, тем более, олигомерные формы родопсина в процессе фототрансдукции прямого участия не принимают. На это указывают многочисленные функциональные и структурные исследования *in vitro*, согласно которым всего одной молекулы родопсина достаточно для взаимодействия и образования функциональных комплексов с молекулами ферментативного каскада фототрансдукции, такими как трансдуцин, арестин и родопсинова киназа (для обзора см. [5, 18])

Однако, существование «классической» мономерной формы родопсина, судя по всему, может не противоречить со-существованию олигомерных структур, наличие которых также экспериментально подтверждено значительным числом работ, выполненных различными методами. Так, например, димерная форма родопсина может обеспечивать аллостерические взаимодействия, как это следует из ряда модельных работ и экспериментальных данных (для обзора см. [5]). Не исключено, что регулируемую светом олигомеризацию родопсина можно рассматривать как один из физиологических механизмов адаптации (механизмом регуляции работы ферментативного каскада фототрансдукции) зрительной клетки к меняющимся условиям освещения. Действительно,

исследования самого последнего времени, выполненные методом атомно-силовой микроскопии [23], указывают на то, что супрамолекулярная организации родопсина внутри мембраны, изменяющаяся как при различных физиологических условиях, в том числе различных уровнях освещения, так и при патологии, становится новым важным фактором для понимания механизмов адаптации зрительной клетки в норме и понимания патогенеза ряда нейродегенеративных заболеваний сетчатки. В любом случае, функциональная роль олигомерной супрамолекулярной организации родопсина в фоторецепторной мембране зрительной клетки и роль соотношения моно- и олигомерной организации ещё ждёт своего изучения и объяснения.

В целом, проблема супрамолекулярная организация родопсина в фоторецепторной мембране дисков наружного сегмента зрительных клеток — это ставшая чрезвычайно актуальной, дискуссионной и требующей дальнейших исследований проблема молекулярной физиологии и патологии зрения. Ее решение принципиально важно, как для понимания на новом уровне устоявшихся механизмов фототрансдукции и адаптации зрительной клетки в норме и при патологии, так и для понимания механизма функционирования всего родопсин-подобного А-класса G-белок-связывающих рецепторов.

Механизмы фотоповреждения сетчатки и ретинального пигментного эпителия, связанные с конечной стадией фотолиза родопсина и высвобождением свободного полностью-*транс* ретиналя, и системы защиты (спектральной, антиоксидантной) от опасности такого рода повреждений, а также медицинские приложения результатов исследований в этом направлении, требуют отдельного рассмотрения.

Список литературы

1. М. А. Островский, *Палеонтол. журн* **2017**, 5, 103–113.
2. М. А. Островский, О. А. Смитиенко, А. В. Боченкова, Т. Б. Фельдман, *Биохимия* **2023**, 88 (10), 1847–1866.
3. М. А. Островский, Т. Б. Фельдман, *Успехи химии* **2012**, 81(11): 1071–1090.
4. D. A. Baylor, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1987**, 28(1): 34–49.
5. М. А. Островский. *Рос физиол журн им И М Сеченова*. **2020**, 106(4), 401–420.
6. K. P. Hofmann, T. D. Lamb, *Prog Retin Eye Res.* **2023**, 93, 101–116.
7. J. Li, P. C. Edwards, M. Burghammer, *J. Mol. Biol.* **2004**, 343(5): 1409–1438.
8. М. А. Островский, В. А. Надточенко, *Хим. физика*, **2021**, 40, 4:76–84.
9. O. A. Smitienko, T. B. Feldman, L. E. Petrovskaya et al, *J Phys Chem B.* **2021**, 125(4):995–1008.
10. В. А. Кронгауз, Р. Р., Шифрина, И. Б. Федорович, М. А. Островский, *Биофизика*. **1975**, 20 (2), 219–224.
11. В. А. Кронгауз, Р. Р., Шифрина, И. Б. Федорович, М. А. Островский, *Биофизика*. **1975**, 20 (3), 419–424.
12. В. А. Кронгауз, Р. Р., Шифрина, И. Б. Федорович, М. А. Островский, *Биофизика*. **1975**, 20 (3), 426–430.
13. M. A. Ostrovsky, H. H. Weetall, *Biosens Bioelectron.* **1998**, 13 (1): 61–65.
14. М. Н. Мозговая, О. А. Смитиенко, И. В. Шелаев и др, *Доклады Академии наук* **2010**, 435 (2): 262–266.
15. O. A. Smitienko, V. A. Nadtochenko, T. B. Feldman et al, *Molecules* **2014**, 19, 18351–18366.
16. T. B. Feldman, O. A. Smitienko, I. V. Shelaev et al, *J. Photochem. Photobiol. B.* **2016**, 164, 296–305.
17. P. S. Park, *Pflugers Arch.* **2021**, 473(9):1361–1376.

18. T. B. Feldman, O. I. Ivankov, T. N. Murugova et al, *Dokl. Biochem. Biophys.* **2015**, 465: 420–423.
19. T. B. Feldman, O. I. Ivankov, A. I. Kuklin et al, *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr* **2019**, 1861(10): 183000.
20. Y. Imamoto, K. Kojima, T. Oka, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2015**, 14(11): 965–1973.
21. И. Д. Погожева, В. А. Кузнецов, В. А. Лившиц, И. Б. Федорович, М. А. Островский, *Биологические мембраны* **1985**, 9, 880–896.
22. S. Senapati, P. S. Park, *Chem Rec.* **2023**, e202300113. doi:10.1002/tcr.202300113.
23. D. Polli, P. Altoè, O. Weingart, *Nature* **2010**, 467(7314): 440–443.

24. ХИМИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА С УЧАСТИЕМ ЭЛЕКТРОННОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ

А.В. Трофимов^{1,2}, Ю.Б. Цаплев¹, О.И. Яблонская¹

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

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

Среди наиболее фундаментальных физических аспектов химических процессов — вопрос о преобразовании энергии из одной формы в другую. Важнейшими случаями этого являются преобразование энергии химических связей реагентов, находящихся в основном состоянии, в энергию электронного возбуждения продуктов и далее — в свет и, наоборот, утилизация энергии электронного возбуждения, возникающего при поглощении молекулой кванта света, в процессах перестройки химической структуры. Таким образом, установление общих закономерностей химических процессов в электронно-возбужденных состояниях или с их участием представляет собой одну из наиболее актуальных задач физической химии, химической и биохимической физики.

Существует два основных сценария участия электронно-возбужденных состояний в химическом процессе. Первый из них имеет своим *началом* вертикальный переход молекулы реагента в возбужденное состояние (например, при поглощении кванта света), который, собственно, и инициирует химическое превращение. Во втором сценарии генерация электронно-возбужденного продукта является, напротив, *результатом* химической трансформации невозбужденных реагентов. К процессам, происходящим по первому сценарию, относятся *фотохимические* превращения, ко второму —

хемилюминесцентные, последние сопровождаются неравновесным испусканием кванта света (хемилюминесценция). Прочие пути химических превращений с участием возбужденных состояний являются ничем иным, как вариантами либо же «симбиозом» двух вышеописанных сценариев. Так фотохимически можно инициировать цепочку темновых стадий, приводящих к электронно-возбужденным продуктам и испусканию света (фотохемилюминесцентные реакции), а первичные хемивозбужденные продукты могут вызывать последовательность вторичных процессов, которые по своей природе могут быть как химическими, так и физическими (например, перенос энергии электронного возбуждения).

Что объединяет фотохимические и хемилюминесцентные реакции? Помимо того, что первые, как и последние, происходят с участием электронно-возбужденных состояний, в обоих случаях важна роль безызлучательных переходов между основным и возбужденными уровнями определенных интермедиатов, образующихся на пути от реагентов (**Rg**) к продуктам (**Pr**) [1]. То обстоятельство, что фотохимическая реакция начинается с поглощения фотона, вертикального перехода, за которым следует изменение конфигурации ядер, а хемилюминесцентный процесс, наоборот, представляет собой перестройку ядерной конфигурации, завершающуюся образованием возбужденного продукта («горизонтальный» переход) и испусканием кванта света, позволяет рассматривать хемилюминесценцию как обращение фотохимии. Это, пожалуй, главное, что связывает оба этих явления. Однако, механизмы электронного возбуждения для каждого из этих случаев различны. Если в фотохимическом процессе акт возбуждения заключается в простом франк-кондоновском поглощении кванта света,

то в хемилюминесцентном процессе это сложная последовательность стадий. Сначала реагент активируется при столкновениях с «быстрыми» молекулами из «хвоста» максвелловского распределения. Далее, если приобретенная таким образом энергия превышает активационный барьер реакции $\mathbf{Rg} \rightarrow \mathbf{Pr}$, то реагирующие молекулы, достигнув и миновав переходное состояние, продолжают движение по поверхности потенциальной энергии (ППЭ) основного состояния (S_0) продукта. Электронное возбуждение продукта происходит, если на пути реакции по ППЭ существуют области, в которых энергия S_0 близка энергии какого-нибудь из возбужденных состояний (S_1 или T_1). Для понимания процессов преобразования химической энергии в свет (хемилюминесценция) и, наоборот, световой энергии в химическую (перегруппировку атомов, разрыв прежних и образование новых связей в молекулах под действием света) знания об энергиях, координатах переходных областей и структуре интермедиатов играют ключевую роль. Именно поэтому изучению природы интермедиатов и их динамики вблизи пересечения S_0 , S_1 и T_1 состояний и принадлежит центральное место в любом систематическом исследовании.

Выяснение общих закономерностей фотохимических и хемилюминесцентных процессов дает возможность отнести их изучение к одной области знания, которую можно было бы назвать *химической фотоникой*, формирующей общий подход к описанию химических превращений, путь которых протекает по ППЭ как основного, так и возбужденных состояний.

Так как хемилюминесцентные процессы — способ темновой генерации возбужденных молекул, их удобно использовать и в фотофизических целях [2–6].

Стратегия выбора модельных процессов с участием электронного возбуждения основывается на возможности установления общих закономерностей их протекания при разных способах инициирования и различии в химической природе реагентов и интермедиатов. Так, задача о механизме хемилюминесцентного распада того или иного пероксида всякий раз сводится к вопросу о том, происходит ли такой процесс последовательно или же синхронно [7–9].

Раскрытие гетероциклов, вызванное поглощением кванта света, можно во многом считать процессом, обратным упомянутым выше хемилюминесцентным реакциям. Для исследования таких процессов фотохимическая фрагментация азот-углеродных циклов может служить наиболее подходящей модельной системой. Элементарный акт раскрытия таких циклов под действием света происходит в области пересечения (или, во всяком случае, сближения) потенциальных поверхностей основного и возбужденных состояний. Следовательно, эта химическая система совершает, в известном смысле, свой путь в пространстве ППЭ в обратном направлении по отношению к акту хемивозбуждения при фрагментации кислород-углеродных циклов. Более того, задача о механизме раскрытия азот-углеродных и кислород-углеродных циклов сводится к одной и той же дилемме, а именно, является ли раскрытие этих гетероциклов синхронным или последовательным. Рис. 1 схематически иллюстрирует аналогию механизмов раскрытия цикла для диоксетана (*слева*) [7] и бициклического азоалкана (*справа*) [10] в области пересечения (сближения) термов основного (S_0) и возбужденных (S_1 и T_1) состояний.

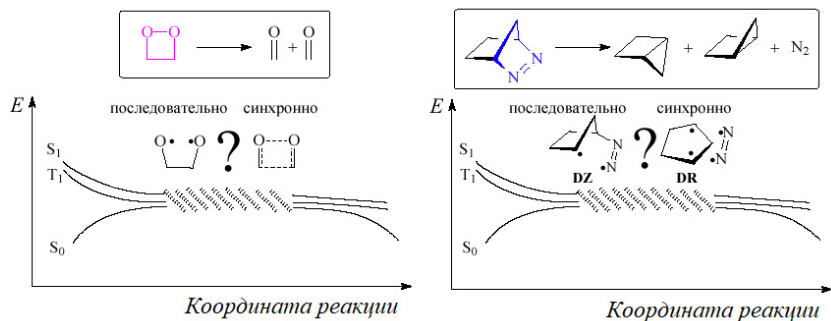


Рисунок 1. Иллюстрация аналогии механизмов раскрытия цикла для 1,2-диоксетана (слева) [7] и бициклического азоалкана (справа) [10] в области пересечения (сближения) термов основного (S_0) и возбужденных (S_1 и T_1) состояний.

Квантовохимическое моделирование актов распада цикла СООС диоксетана и диоксетанона (α -пероксилактона), инициированных термически и переносом электрона, выявило две важные особенности протекания этих элементарных актов. Во-первых, как для диоксетана, так и для α -пероксилактона длина О-О связи существенно увеличивается при переносе электрона на эти молекулы (с 1.6 до 1.9 Å) [7]. Во-вторых, перенос электрона на диоксетан приводит к существенному снижению энергии активации распада такого циклопероксида (с 20 до 11 ккал/моль), в то время как в случае α -пероксилактона активационный барьер почти полностью исчезает вслед за переносом электрона на пероксидную группу [7].

Удлинение связи О-О в кислород-углеродном цикле при переносе на него электрона находится в соответствии с известным фактом эндотермичности такого процесса при *равновесной* конформации пероксида; следовательно, для «захвата» электрона пероксидом необходимо изменение геометрии пероксида, не в последнюю очередь, путем увеличения

расстояния О-О, что действительно имеет место, как показывают расчеты [7].

То обстоятельство, что с переносом электрона энергетический барьер для распада диоксетана лишь понижается (хотя и довольно значительно), а для распада диоксетанона (α -пероксилактона) и вовсе исчезает, соответствует тому, что α -пероксилактоны более склонны к распаду в присутствии доноров электрона, чем 1,2-диоксетаны, их «собратья» по семейству четырехчленных циклопероксидов [7].

Таким образом, концепция переноса электрона на пероксидную группу адекватно описывает процесс распада кислород-углеродного цикла при взаимодействии последнего с электронодонорными реагентами (или электронодонорными заместителями в молекуле диоксетана).

Для сравнительного исследования термического и электронообменного способов хемивозбуждения было важно использовать один и тот же объект, способный к генерации возбужденных состояний и тем, и другим путем. Триггерные диоксетаны — химические аналоги предшественника эмиттера биолюминесценции светляка, общая структура которых изображена на Схеме 1, естественным образом удовлетворяют этому требованию [7]. Действительно, высвободить энергию, заключенную в диоксетановом цикле, можно двояко: посредством термического распада и путем внутримолекулярного переноса электрона (ПЭл) с арильного фрагмента (фенолят-ионного заместителя) на пероксидную группу. Для того, чтобы таким процессом можно было управлять, к атому кислорода фенолятной группы (O^-) должен быть присоединен защитный фрагмент (R на Схеме 1), препятствующий спонтанному переносу электрона на диоксетановый цикл. Устранение защитной группы R с помощью специально подобранного реагента (триггера) высвобождает фенолят-ион (внутримолекулярный донор электрона), запуская

таким образом процесс т. н. химически инициируемой электронообменной люминесценции (ХИЭОЛ) [7].



Схема 1

Кроме защиты от спонтанного переноса электрона посредством заместителя R диоксетаны, выбранные в качестве объектов для практических применений, должны быть также защищены и от слишком быстрого термического разложения при комнатной температуре. Известно, что введение адамантового фрагмента в молекулу диоксетана в непосредственной близости к пероксидной цепочке обеспечивает требуемую термическую устойчивость [6,7]. В отличие от неселективного химического возбуждения при термическом распаде таких диоксетанов, когда возможно возбуждение синглетных и триплетных состояний обоих фрагментов распада (n, p*- и п, п*-типов) [6], электронное возбуждение в ХИЭОЛ-процессе селективно и локализовано на арильном фрагменте распада [7,11-18]. Возбужденное синглетное состояние этого фрагмента заселяется

в ходе обратного переноса электрона между фрагментами двухстадийного распада диоксетана, следующего за прямым внутримолекулярным переносом электрона с фенолят-иона на диоксетановый цикл, как следует из работ с участием нашей лаборатории [7,11–18].

Особый интерес к фрагментации циклоазосоединений объясняется загадочной инверсией стереохимии в ходе этого процесса: выделение молекулы азота сопровождается образованием двух стереоизомерных продуктов (см. Рис. 1), один из которых сохраняет исходную геометрию реагента, другой же обладает стереохимией, «перевернутой» по отношению к исходному азосоединению [10]. Это удивительное явление было обнаружено Ротом (Roth) и Мартином (Martin) еще в 1967 г. [19]. Для обращения молекулярного «скелета» в литературе выдвигалось несколько гипотез — вплоть до нарушения равновесного распределения энергии по степеням свободы в ходе отщепления N_2 от остова молекулы (при этом процессу приписывался динамический характер, к которому не применимы статистические модели, составляющие основу химической кинетики) [10].

В работах с участием нашей лаборатории [20–29] показано, что процесс выделения азота адекватно описывается *стадийным* механизмом, в соответствии с которым сначала происходит разрыв одной из двух связей C–N с образованием азотсодержащей (диазенильной) бирадикальной структуры, за которым следует выделение N_2 и образование новой C–C-связи. Обращение стереохимии при фотолитическом выделении азота из циклоазоалканов (явление стереохимической инверсии, обнаруженное Ротом и Мартином) происходит в соответствии с механизмом S_N2 (замещение азота при «тыловой атаке» радикальным центром в промежуточном азотсодержащем бирадикале). Переворот метиленового мо-

стика в ходе стереохимической инверсии при выделении N_2 не связан нарушением равновесного распределения энергии по степеням свободы, как предполагалось ранее в литературе, однако, нарушение этого распределения возможно на самом начальном участке пути реакции деазатирования (т. е. в ходе формирования экзо-аксиальной конформации диазенильной структуры). Стереоселективность процесса образования продукта с «обращенной» геометрией контролируется вязкостью среды (η) по закону $\sim \eta^{-\alpha}$, в котором α соответствует доле критического свободного объема жидкости, необходимой для осуществления пространственной трансформации молекулярного скелета. Показано, что параметром α , по сути, универсальной характеристикой мономолекулярного процесса в жидкости, можно пользоваться как для количественного описания вязкостного взаимодействия реагирующей молекулы со средой, так и для исследования самого пути реакции [10,20–29]. В частности, на изучении зависимости этого параметра от строения реагента основан метод диагностики координаты реакции, предложенный в работах с участием нашей лаборатории [10,27–29], а сопоставление величин α , измеренных при температурной и изотермической вариациях вязкости среды, позволяет определять низкие активационные барьеры химических превращений или малые их различия [22,29]. Ясно, что при вариации η важно учитывать возможность изменения других ее характеристик [10,24,29].

Следует отметить то, что способ диагностики координаты реакции по зависимости вязкостного профиля процесса от структуры реагента, развитый в работах с участием нашей лаборатории, нашел широкое применение в исследовании движений молекулярных фрагментов в самых разнообразных системах — от энзиматических процессов [30] до молекулярных моторов [31] и внутримолекулярной перестройки интермедиатов

в ходе химического превращения [32,33]. Эти подходы были использованы, в числе прочего, в работах Феринги [31] по молекулярным машинам, удостоенных Нобелевской премии по химии в 2016-м году.

Возвращаясь к хемилюминесцентным процессам, нельзя не сказать об изучении природы возникновения электронного возбуждения и закономерностей хемилюминесценции в реакциях модуляторов кислородного метаболизма и развития окислительного стресса [8,9,34]. Известно, что живые организмы производят свет — от сверхслабого спонтанного свечения клеток и тканей до яркой биолуминесценции светляков и целого ряда морских существ. Понять химическую и физическую природу биологического свечения во всех его разнообразных проявлениях и то, как можно воспользоваться этим свойством живого — фундаментальные задачи современного естествознания, продиктованные практикой. В связи с этим необходимо упомянуть, что «живые» фотоны рождаются в окислительных взаимодействиях, то есть в процессах, без которых жизнедеятельность организмов была бы совершенно немыслима, а предшественники возбужденных частиц — источников света — продукты реакций биомолекул с кислородом. Следует отметить и то, что действие многих лекарственных средств напрямую или опосредованно связано с регулированием кислородного метаболизма, что, в свою очередь, влияет на возникновение света в таких биологических процессах. Этот факт лежит в основе использования био- и хемилюминесцентных методов в современной биомедицинской практике [34]. Однако, на самом деле, удобнее использовать в этих целях не сами «светящиеся» биопроцессы, а их химические модели — свечения в более простых и управляемых реакциях, повторяющие в основных своих чертах генерацию света в их биохимических прототипах (от биолуминесценции

светляков и других организмов [7,11–18] до низкоинтенсивного свечения липидов и белков [8,9,34–48]), но не требующие для своего осуществления легко портящихся биологических материалов. В этом контексте, изучаются взаимодействия с испусканием света, представляющие собой, фактически, химические модели биолюминесценции, модулирующие процессы кислородного метаболизма в живом организме и развитие окислительного стресса, и возможности их использования в качестве инструментов для оценки окислительного и антиоксидантного потенциалов биологически активных сред и химических соединений (от вдыхаемого воздуха и компонентов табачного дыма и никотинсодержащих аэрозолей до пищевых и лекарственных ингредиентов). В некоторых случаях удается использовать прямую генерацию света в биологически активных средах [49]. Результаты хемилюминесцентных исследований биологически значимых свободнорадикальных процессов дополняются экспериментальными и теоретическими (математическое моделирование) данными по кинетике образования продуктов и интермедиатов в изучаемых взаимодействиях [40,42,45].

Альтернативой хемилюминесцентным методам с использованием цепных процессов окисления углеводородных субстратов в определенных случаях (например, в контексте исследования антиоксидантных свойств биологически активных соединений) можно считать хемилюминесцентные методы с использованием окисления люминола [50,51]. В этой связи следует отметить, что новые аспекты хемилюминесценции люминола также представляют собой предмет исследований, ведущихся в нашей лаборатории в настоящее время [52–57].

Касаясь развития общих подходов к исследованию сложных хемилюминесцентных процессов с возможной генерацией более одного источника света следует упомянуть метод

спектрально-кинетической регистрации хемилюминесценции, разработанный и активно применяемый в нашей лаборатории [49,52,53,56–58]. Метод основан на регистрации хемилюминесценции по двум спектральным каналам посредством двухканального хемилюминометра, в каналах которого установлены оптические фильтры с различными полосами пропускания (Рис. 2). Например, в одном канале расположен фильтр, пропускающий свет в синей, а в другом — в зеленой области спектра. Отношение интенсивностей хемилюминесценции, регистрируемых по синему (В) и зеленому (G) каналам определяет величину спектрального отношения ($\delta = B/G$). В присутствии только одного хемилюминофора и, соответственно, одного эмиттера света величина имеет вполне определенное, характерное для него, значение в течение всего хемилюминесцентного процесса. Если же значение спектрального отношения не является постоянным, то это служит указанием на сложный характер процесса с образованием более одного эмиттера. Эти различные ситуации проиллюстрированы на Рис. 3.

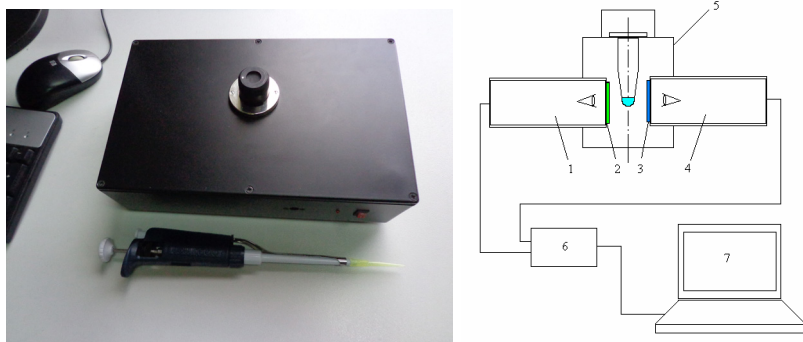


Рисунок 2. Двухканальный хемилюминометр (слева) и его принципиальная схема (справа): 1 и 4 — фотодетекторы, 2 и 3 — светофильтры, 5 — светонепроницаемая камера, 6 — счетчик импульсов, 7 — компьютер.

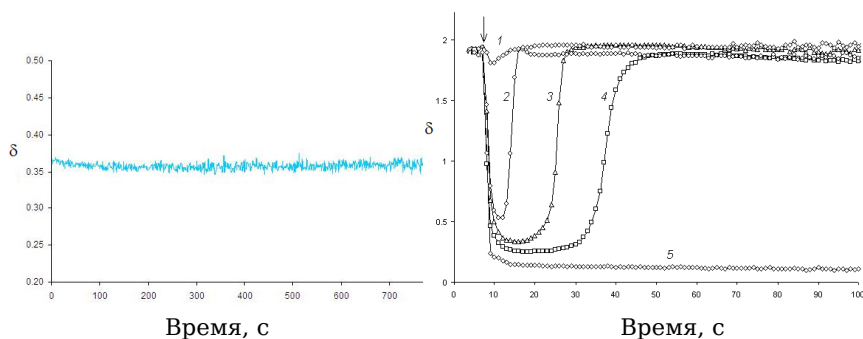


Рисунок 3. Иллюстрация использования спектрально-кинетического метода исследования хемилюминесценции в сложных химических системах. Случай одного эмиттера света (слева) — отношение интенсивностей свечения в «синем» (В, 440–490 нм) и «зеленом» (G, 490–550 нм) спектральных каналах постоянно: 1 затяжка сигаретного дыма, растворенная в 1 мл ДМСО при 22 °С [49]. Случай двух эмиттеров света (справа) — отношение интенсивностей свечения в «синем» (В, 440–490 нм) и «зеленом» (G, 490–550 нм) спектральных каналах меняется во времени: совместная хемилюминесценция люминола и лопина в присутствии пероксида водорода и гема при 22 °С (к 75 мкл раствора NaOH с концентрацией 0.07 М, содержащего смесь гема, 15 мкМ, и 0.8 мкМ люминола, добавляли 25 мкл ДМСО, содержащего смесь лопина и пероксида водорода, 100 мкМж; концентрации лопина — 0 (1), 3.8 (2), 7.3 (3), 10.8 (4) и 37.8 (5) мкМ). [53].

По сути дела, спектрально-кинетическая регистрация хемилюминесценции является компромиссом между спектральной регистрацией с накоплением сигнала при больших концентрациях хемилюминофора на длительных интервалах времени и, как следствие, с потерей кинетической информации и кинетической регистрацией, при которой спектральная информация оказывается недоступной.

К числу интереснейших явлений, обнаруженных и исследованных в нашей лаборатории, следует отнести феномен хемилюминесценции, создаваемой светом (ХЛСС) [59–62]. Суть

его состоит в том, что некоторые химические процессы, не сопровождающиеся испусканием света в темноте, можно «превратить» в хемилюминесцентные под воздействием дневного света на определенные реагенты (гидразон салицилового альдегида, антрон), приводящим к обратимому образованию соответствующих изомеров или димеров, реакции которых сопровождаются образованием электронно-возбужденных продуктов.

Выше упоминалось об управлении изучаемыми процессами с помощью рационального выбора условий их протекания, прежде всего, свойств среды. В этом же контексте необходимо упомянуть серию недавних работ нашей лаборатории с использованием суперосновных условий в молекулярной фотонике.

Химия процессов, происходящих в основном состоянии в суперосновных средах, отмечена яркими и неожиданными результатами [63,64]. В нашей же лаборатории исследовались процессы в щелочном (суперосновном) ДМСО с участием электронного возбуждения, возникающего как при поглощении света, так и при его генерации в хемилюминесцентных системах. Наиболее интересные результаты этих работ, полученных к настоящему времени, описаны ниже.

Изучение спектрально-люминесцентного поведения куркумина и родственных соединений в щелочном ДМСО привело к обнаружению его свойств, совершенно отличных от тех, что наблюдаются в других средах. Куркумин — это и краситель, и пищевая добавка, и аналитический реагент, и соединение, интересное для медицины во множестве аспектов (с этим, во многом, связано и наше внимание к куркумину и его производным [39,44,65]). К тому же, производные куркумина — это и новые материалы для оптоэлектроники. ДМСО является очень хорошим растворителем для этого соединения и его про-

изводных, но, к удивлению, их свойства в такой среде до настоящего времени оставались совершенно неизученными. При исследовании куркумина в щелочном ДМСО обнаружено в точности следующее [66,67]. Оказалось, что две крайние формы этого соединения — нейтральная (CurH_3) и трижды депротонированная (Cur^{3-}) обладают фотолюминесцентными свойствами, причем флуоресценция трижды депротонированной формы обнаружена впервые в ходе упомянутой работы [66]. Промежуточные формы — моно- и дважды депротонированная — люминесцентными свойствами не обладают, но коэффициент экстинкции у дважды депротонированной формы принимает в красной области спектра рекордную величину ($110000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при 622 нм), совершенно нетипичную для таких относительно «простых» молекул [66]. Визуально растворы куркумина в щелочном ДМСО проявляют контрастные цветовые переходы депротонированных форм (Рис. 4), чего не наблюдается в водных средах [66].



Рисунок 4. Graphical abstract к статье [66]: контрастные цветовые переходы между формами куркумина в щелочном ДМСО.

Эти находки позволяют использовать данное соединение в такой среде в качестве удобного и колориметрического, и флуоресцентного индикатора (первая работа такого свойства выполнена также в нашей лаборатории [68]). Совершенно неожиданной оказалась и рекордная устойчивость этого соединения к автоокислению в обсуждаемых условиях [66]. Это особенно удивительно, имея в виду, во-первых, известную высокую окисляемость куркумина в щелочных водных средах и, во-вторых, то обстоятельство, что в ДМСО процессы окисления многих соединений протекают особенно быстро. Мы связываем обнаруженную инертность куркумина к окислению в супероксидном окружении с координационными взаимодействиями с катионами щелочных металлов [66,67]. Этими же взаимодействиями объясняется и обнаруженный в нашей лаборатории феномен катинохромизма — положение максимума люминесценции Cur^{3-} и ее квантовый выход определяются катионом металла щелочи (LiOH, NaOH, KOH) [67] (Рис. 5).

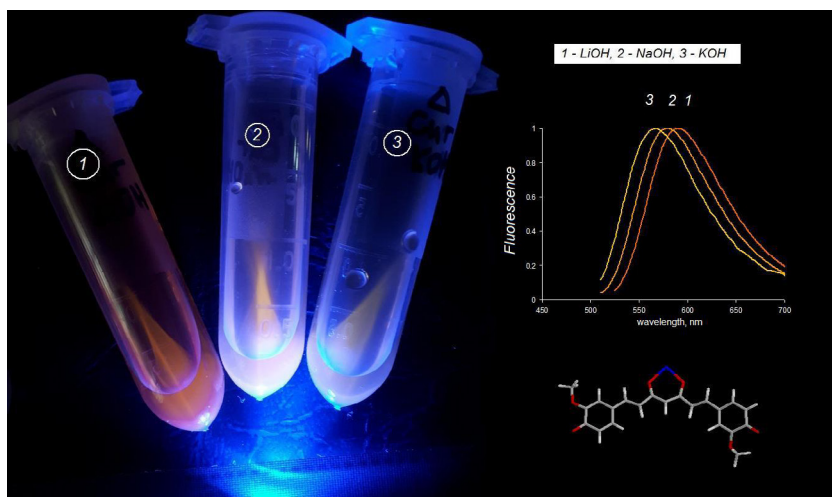


Рисунок 5. Graphical abstract к статье [67]: проявление феномена катинохромизма куркумином в щелочном ДМСО.

Исследование люминесцентного катиохромизма куркумина и модельных соединений показало, что его причиной является комплексообразование между катионом щелочного металла и β -дикетонной (кето-енольной) группировкой куркумина и его производных [67]. Ранее флуоресценция, зависящая от катионов щелочных металлов, была обнаружена лишь у флуорофоров с краун-заместителями. Более того, селективное действие ионов щелочных металлов ранее связывали исключительно с различием их размеров (в Na/K-АТФазе, в краун-эфирах), но не с участием в донорно-акцепторных взаимодействиях.

Преимущества использования суперосновной среды хорошо видны и на примере изучения природы хемилюминесцентных процессов. В этом контексте в нашей лаборатории нами была исследована хемилюминесценция люминола в щелочном ДМСО [52]. Для сравнения этой среды с водными системами необходимо отметить, что анионы с локализованным зарядом (HO^- , $t\text{-BuO}^-$) в воде дают прочные водородные связи, а в биполярных апротонных растворителях они не стабилизированы водородными связями и охотно вступают в реакции нуклеофильного замещения, присоединения и депротонирования. Депротонирование люминола — важная стадия в рассматриваемом хемилюминесцентном процессе. Первая константа ионизации люминола ($\text{p}K_{\text{a1}}$) равна 6.7, и в большинстве хемилюминесцентных реакций в водных средах люминол участвует в виде моноаниона. Вторая же константа ионизации люминола $\text{p}K_{\text{a2}} = 15.1$ (при ионной силе 5), и для перевода люминола в дважды депротонированную форму просто необходима суперосновная среда, например, щелочной ДМСО. Такие исследования и были выполнены в работе [52]. В результате удалось определить условия и способы замедления (ингибирования), тушения и последующего разжигания хемилюминесценции люминола в щелочном азириванном ДМСО с помощью пероксида водорода

и впервые установить детальный механизм такого хемилюминесцентного процесса, ключевым моментом которого является перенос электрона с дианиона люминола на кислород в ходе автоокисления [52].

Таким образом, использование суперосновных условий расширяет возможности не только для химии процессов, протекающих в основном состоянии, но и для молекулярной фотоники.

Подводя итог описанному выше можно заключить, что пионерские работы по изучению химической генерации и переносу электронного возбуждения [2–4,69–71], начатые в ИХФ АН СССР на рубеже 1950-х и 1960-х годов и после возникновения ИБХФ РАН продолженные во вновь созданном институте, вылились в большую междисциплинарную область исследований как фундаментального, так и прикладного (аналитического и биоаналитического) характера, востребованных в физике, химии и биомедицине.

Ссылки

1. Р. Ф. Васильев, *Кинетика и катализ* **1999**, 40, 192–200.
2. R. F. Vassil'ev, *Nature* **1963**, 200, 773.
3. V. A. Belyakov, R. F. Vassil'ev, *Photochem. Photobiol.* **1970**, 11, 179–192.
4. V. A. Belyakov, G. F. Fedorova, R. F. Vassil'ev, *Spectrosc. Lett.* **1978**, 11, 549–561.
5. В. А. Беляков, Р. Ф. Васильев, А. В. Трофимов, *Хим. физика* **1994**, 13 (11), 8–15.
6. A. V. Trofimov, R. F. Vasil'ev, K. Mielke, W. Adam, *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 35–43.
7. W. Adam, A. V. Trofimov, In: *The Chemistry of Peroxides* (Ed. Z. Rappoport), V. 2, Part 2, *Patai Series: The Chemistry of*

Functional Groups, **2006**, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, Chapter 15, pp. 1171–1209.

8. G. F. Fedorova, A. V. Trofimov, R. F. Vasil'ev, T. L. Veprintsev, *ARKIVOC* **2007**, № 8, 163–215.

9. I. Volodyaev, A. Trofimov, Yu. A. Vladimirov, In: *Ultra-Weak Photon Emission from Biological Systems* (Eds. I. Volodyaev, E. van Wijk, M. Cifra, Yu. A. Vladimirov), **2023**, Springer, Cham, pp. 131–155.

10. W. Adam, M. Diederling, A. V. Trofimov, *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, 17, 643–655.

11. A. V. Trofimov, K. Mielke, R. F. Vasil'ev, W. Adam, *Photochem. Photobiol.* **1996**, 63, 463–467.

12. W. Adam, I. Bronstein, B. Edwards, T. Engel, D. Reinhardt, F. W. Schneider, A. V. Trofimov, R. F. Vasil'ev, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 10400–10407.

13. W. Adam, I. Bronstein, A. V. Trofimov, *J. Phys. Chem. A* **1998**, 102, 5406–5414.

14. W. Adam, I. Bronstein, A. V. Trofimov, R. F. Vasil'ev, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 958–961.

15. W. Adam, M. Matsumoto, A. V. Trofimov, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 2078–2082.

16. W. Adam, M. Matsumoto, A. V. Trofimov, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 8631–8634.

17. W. Adam, A. V. Trofimov, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 6474–6478.

18. В. Адам, И. Бронстин, Р. Ф. Васильев, А. В. Трофимов, *Изв. АН, сер. хим.* **2000**, № 4, 655–661.

19. W. R. Roth, M. Martin, *Liebigs Ann. Chem.* **1967**, 702, 1–5.

20. W. Adam, V. Martí, C. Sahin, A. V. Trofimov, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5002–5003.

21. W. Adam, V. Martí, C. Sahin, A. V. Trofimov, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 340, 26–32.

22. W. Adam, M. Grüne, M. Diederling, A. V. Trofimov, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 7109–7112.

23. W. Adam, M. Diedering, A. V. Trofimov, *Chem. Phys. Lett.* **2001**, 350, 453–458.
24. W. Adam, M. Diedering, A. V. Trofimov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2002**, 4, 1036–1039.
25. W. Adam, M. Diedering, A. V. Trofimov, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5427–5430.
26. W. Adam, D. A. Corley, A. V. Trofimov, R. C. White, *Org. Lett.* **2002**, 4, 4277–4280.
27. W. Adam, M. C. Sajimon, A. V. Trofimov, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2003**, 2, 677–680.
28. W. Adam, M. Diedering, M. C. Sajimon, A. V. Trofimov, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5, 329–332.
29. W. Adam, A. V. Trofimov, *Acc. Chem. Res.* **2003**, 36, 571–579.
30. Y. Kanosue, S. Kojima, K. Ohkata, *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, 17, 448–457.
31. J. Chen, J.C.M. Kistemaker, J. Robertus, B. L. Feringa, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 14924–14932.
32. W. Adam, C. Librera, A. V. Trofimov, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 11936–11939.
33. W. Adam, C. Librera, A. V. Trofimov, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 5741–5744.
34. G. F. Fedorova, V. D. Kancheva, V. A. Menshov, V. V. Naumov, R. F. Vasil'ev, T. L. Veprintsev, A. V. Trofimov, Yu. B. Tsaplev, O. I. Yablonskaya, *Stud. Nat. Prod. Chem.* **2016**, 47, 357–385.
35. G. F. Fedorova, V. A. Menshov, A. V. Trofimov, R. F. Vasil'ev, *Analyst* **2009**, 134, 2128–2134.
36. Р. Ф. Васильев, В. Д. Кънчева, Г. Ф. Федорова, Д. И. Бътовска, А. В. Трофимов, *Кинетика и катализ* **2010**, 51, 533–541.
37. Р. Ф. Васильев, А. В. Трофимов, Ю. Б. Цаплев, *Усп. химии* **2010**, 79, 91–103.

38. Р. Ф. Васильев, Т. Л. Вепринцев, Л. С. Долматова, В. В. Наумов, А. В. Трофимов, Ю. Б. Цаплев, *Кинетика и катализ* **2014**, *55*, 157–162.

39. A. K. Slavova-Kazakova, S. E. Angelova, T. L. Veprintsev, P. Denev, D. Fabbri, M. A. Dettori, M. Kratchanova, V. V. Naumov, A. V. Trofimov, R. F. Vasil'ev, G. Delogu, V. D. Kancheva, *Beilstein J. Org. Chem.* **2015**, *11*, 1398–1411.

40. G. F. Fedorova, V. A. Lapina, V. A. Menshov, V. V. Naumov, A. V. Trofimov, Yu. B. Tsaplev, R. F. Vasil'ev, O. I. Yablonskaya, *Photochem. Photobiol.* **2019**, *95*, 780–786.

41. Р. Ф. Васильев, В. Д. Кънчева, В. В. Наумов, А. К. Славова-Казакова, А. В. Трофимов, Г. Ф. Федорова, О. И. Яблонская, *Хим. физика* **2020**, *39* (6), 36–40.

42. В. В. Наумов, Г. Ф. Федорова, Р. Ф. Васильев, В. Д. Кънчева, Т. Л. Вепринцев, А. В. Трофимов, О. И. Яблонская, *Хим. физика* **2021**, *40* (2), 24–28.

44. V. D. Kancheva, M. A. Dettori, D. Fabbri, P. Alov, S. E. Angelova, A. K. Slavova-Kazakova, P. Carta, V. A. Menshov, O. I. Yablonskaya, A. V. Trofimov, I. Tsakovska, L. Saso, *Antioxidants* **2021**, *10*, 624.

45. V. V. Naumov, A. V. Trofimov, G. F. Fedorova, O. I. Yablonskaya, R. F. Vasil'ev, *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 8486.

46. I. V. Zhigacheva, I. F. Rusina, N. I. Krikunova, A. N. Goloschapov, T. L. Veprintsev, O. I. Yablonskaya, A. V. Trofimov, *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 13172.

47. S. Saha, L. Saso, A. V. Trofimov, O. I. Yablonskaya, *Biomedicines* **2023**, *11*, 1377.

48. И. Ф. Русина, О. Т. Касаикина, Ю. В. Кузнецов, А. В. Трофимов, Т. Л. Вепринцев, Ю. Н. Егорова, *Патент РФ* **2024**, № 2817094.

49. G. F. Fedorova, V. A. Menshov, A. V. Trofimov, Yu. B. Tsaplev, R. F. Vasil'ev, O. I. Yablonskaya, *Photochem. Photobiol.* **2017**, *93*, 579–589.

50. E. L. Bastos, P. Romoff, C. R. Eckert, W. J. Baader, *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 7481–7488.
51. E. L. Bastos, L. F. M. L. Ciscato, F. H. Bartoloni, L. H. Catalani, W. J. Baader, *Luminescence* **2007**, 22, 113–125.
52. Ю. Б. Цаплев, А. В. Трофимов, *Ж. физ. химии* **2020**, 94, 1716–1722.
53. Ю. Б. Цаплев, Р. Ф. Васильев, В. Д. Кънчева, А. В. Трофимов, *Хим. физика* **2020**, 39 (6), 7–12.
54. Н. Г. Бердникова, А. В. Загурская, В. А. Меньшов, А. В. Трофимов, О. И. Яблонская, В. Д. Кънчева, Р. М. Балански, *Практ. онкол.* **2020**, 21 (3), 230–248.
55. В. А. Меньшов, В. Д. Кънчева, О. И. Яблонская, А. В. Трофимов, *Хим. физика* **2021**, 40 (2), 49–52.
56. Ю. Б. Цаплев, А. В. Трофимов, *Ж. физ. химии* **2022**, 96, 739–746.
57. Yu. B. Tsaplev, A. V. Trofimov, *Photochem. Photobiol.* **2024**, 100, doi: 10.1111/php.13948.
58. Ю. Б. Цаплев, *Ж. физ. химии* **2011**, 85, 1371–1376.
59. Ю. Б. Цаплев, *Хим. выс. энергий* **2005**, 39, 129–134.
60. Ю. Б. Цаплев, *Хим. выс. энергий* **2005**, 39, 255–258.
61. Ю. Б. Цаплев, Р. Ф. Васильев, *Ж. физ. химии* **2011**, 80, 913–917.
62. Ю. Б. Цаплев, Р. Ф. Васильев, *Усп. химии* **2006**, 75, 1103–1118.
63. Б. А. Трофимов, Ю. А. Шмидт, *Усп. химии* **2014**, 83, 600–619.
64. E. Yu. Schmidt, N. V. Semenova, E. V. Ivanova, I. A. Bidusenko, B. A. Trofimov, *Mendeleev Commun.* **2020**, 30, 109–111.
65. R. Balansky, S. La Maestra, V. D. Kancheva, A. V. Trofimov, L. Djongov, S. De Flora, *Food Chem. Toxicol.* **2021**, 155, 112383.
66. Yu. B. Tsaplev, V. A. Lapina, A. V. Trofimov, *Dyes Pigm.* **2020**, 177, 108327.
67. Yu. B. Tsaplev, V. A. Lapina, A. V. Trofimov, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2021**, 405, 112967.

68. Yu. B. Tsaplev, A. V. Trofimov, *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2021**, 251, 119425.
69. R. F. Vassil'ev, *Nature* **1962**, 194, 1276.
70. V. Ja. Shliapintokh, R. F. Vasil'ev, O. N. Karpukhine, L. M. Postnikov, L. A. Kibalko *J. Chim. Phys.* **1960**, 57, 1113-1122.
71. A. A. Vichutinskii, *Nature* **1965**, 206, 292-293.

25. КИНЕТИКА БЫСТРЫХ ФОТОХИМИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ КРАСИТЕЛЕЙ

Кузьмин В.А.

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

Лаборатория процессов фотосенсибилизации была образована в ИХФ АН СССР в 1979 году в соответствии с Распоряжением Президиума АН СССР. Основным направлением исследований лаборатории процессов фотосенсибилизации стало изучение механизма и кинетики быстропротекающих элементарных фотохимических процессов с участием молекул красителей и родственных соединений. С 1996 года лаборатория процессов фотосенсибилизации входит в состав Института биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН. Основным методом исследования спектрально-кинетических закономерностей сложных фотохимических процессов, который используется в лаборатории, является метод импульсного фотолиза и кинетической спектроскопии. Методом импульсного фотолиза были исследованы механизм и кинетика элементарных стадий фотосенсибилизированных реакций с участием триплетных состояний красителей и родственных гетероциклических соединений. Были установлены спектрально-кинетические характеристики короткоживущих интермедиатов в фотохимических процессах переноса электрона, атома водорода, протона и переноса энергии в гомогенных и структурно-организованных системах.

Принцип импульсного фотолиза заключается в том, что в результате короткой и мощной импульсной вспышки света в растворе создаётся высокая мгновенная концентрация различных промежуточных короткоживущих возбужденных состояний или радикалов. Эти интермедиаты могут быть зарегистрированы с по-

мощью спектров поглощения в УФ или видимой области. К таким интермедиатам относятся триплетные состояния, фотоизомеры, радикалы и ион-радикалы различных органических соединений.

В лаборатории был создан новый вариант модернизированной установки импульсного фотолиза, в которой вместо импульсных ламп и конденсаторов для фотовозбуждения, используются сменные наборы мощных светодиодов (Рис. 1). Применение светодиодов позволило отказаться от использования всего высоковольтного блока с конденсаторами. Временное разрешение светодиодного модуля составляет менее 1 мкс, при полном отсутствии рассеянного света от возбуждающего импульса, так как светодиоды излучают свет в очень узком спектральном диапазоне. В отличие от ксеноновых импульсных ламп светодиоды могут работать в стробоскопическом режиме, что позволяет осуществлять накопление результатов кинетических измерений и улучшить отношение сигнал/шум и в результате увеличить в 10 раз чувствительность прибора. На Рис. 2 представлены осциллограммы эксперимента по триплет-триплетному переносу энергии от антрацена на цианиновый краситель в растворе при фотовозбуждении УФ светодиодами при 365 нм.



Рис. 1 Светодиодные модули для фотовозбуждения (365 нм, 620 нм) и кювета с образцом в блоке для фотооблучения

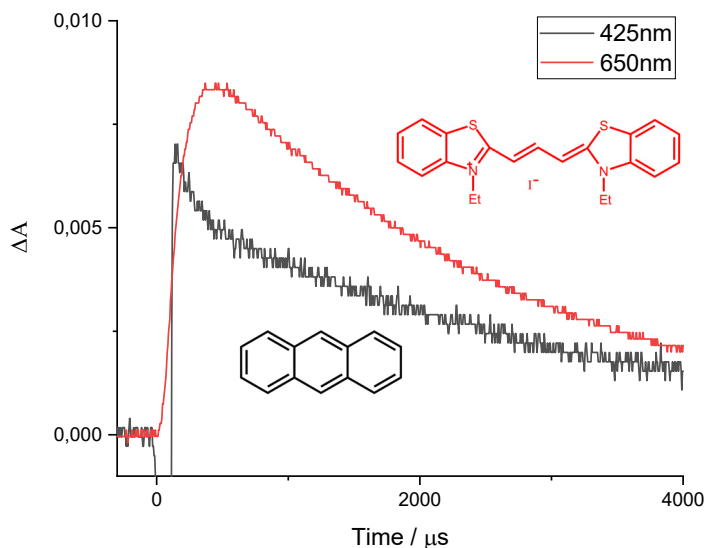


Рис. 2 Фотооблучение светодиодом 365 нм раствора антрацена и цианинового красителя. Осциллограмма при 425 нм (черный): кинетика гибели триплетного антрацена в результате триплет-триплетного переноса энергии на 3,3'-диэтил-бензотиа-карбоцианиновый краситель $T_{\text{anth}} + S_{0 \text{ dye}} \rightarrow S_{0 \text{ anth}} + T_{\text{dye}}$ ($k_{\text{TT}} = 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Осциллограмма при 600 нм (красный): кинетики образования триплетного состояния 3,3'-диэтил-бензотиа-карбоцианинового красителя в результате триплет-триплетного переноса энергии от триплетного антрацена на краситель: $T_{\text{anth}} + S_{0 \text{ dye}} \rightarrow S_{0 \text{ anth}} + T_{\text{dye}}$, и кинетика гибели триплетного красителя $T_{\text{dye}} \rightarrow S_{0 \text{ dye}}$ $k_{\text{T}} = 3 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$.

Для структурно-организованных систем был описан эффект сверхэффективного тушения люминесценции (супертушение) в растворах биомакромолекул. В лаборатории была разработана микрофазная модель супертушения, которая по-

звolyет учитывать различия локальных концентраций флуорофора и тушителя в микрофазе, образованной субстратом биомакромолекул, и в объемной фазе раствора. Локальные концентрации люминесцентного соединения и тушителя в микрофазе, образованной полиэлектролитами, могут на несколько порядков превышать концентрацию в растворе. В микрофазе создаются условия для агрегации центров, что обеспечивает значительное увеличение констант тушения ($\sim 10^2$ – 10^5). Микрофазный подход обеспечивает хорошее количественное описание всех особенностей супертушения люминесценции и открывает новые возможности для контроля кинетики реакций в ДНК и повышения чувствительности люминесцентных сенсоров [1].

Одним из важнейших направлений исследований, проводимых в лаборатории процессов фотосенсибилизации, являются исследования фотофизики и фотохимии цианиновых красителей в гомогенных и структурно-организованных системах, в том числе в составе комплексов с ДНК и белками. Были исследованы процессы комплексообразования цианиновых красителей с биомакромолекулами и фотохимические свойства этих комплексов. Исследования кинетики быстрых фотохимических процессов цианинов, порфиринов, хлоринов и других классов красителей с молекулами альбумина имеют большое значение для понимания механизма фотосенсибилизированных процессов, происходящих в раковых клетках при фотодинамической терапии в онкологии. Была установлена важная роль триплетных состояний красителей и таких интермедиатов, как активные формы кислорода — синглетный кислород и супероксид радикал, ион-радикальные пары, окисленные и восстановленные радикальные формы красителей.

В лаборатории ведется разработка нового поколения фотосенсибилизаторов и флуорофоров для ближнего

ИК диапазона. Уникальные фотохимические и фотофизические свойства бискарбоцианиновых красителей с двумя сопряженными хромофорами заслуживают внимание исследователей. Диполь-дипольное взаимодействие между хромофорами приводит к Давыдовскому расщеплению первого возбужденного синглетного уровня, и определяет наличие полосы поглощения в красной или в ближней ИК области спектра, высокий квантовый выход триплетного состояния, фотохимические и фотобиологические свойства бискарбоцианиновых красителей. Квантовые выходы (ϕ_T) и энергии (E_T) первого триплетного состояния T_1 для четырех молекул бисцианиновых красителей были исследованы методами стационарной и импульсной спектроскопии. Эти красители являются перспективными фотоактивными соединениями для различных применений в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии и для флуоресцентной диагностики. Бисцианиновые красители различаются строением центрального гетероцикла, который соединяет хромофоры и определяет угол между хромофорами. Наряду с моделью диполь-дипольного взаимодействия между хромофорами, следует учитывать также эффект туннелирования электронов между хромофорами. Структура центрального гетероцикла отвечает за туннелирование электронов между хромофорами и эффективность этого воздействия можно охарактеризовать синглет-триплетным расщеплением уровней энергии бисцианиновых красителей ΔE_{ST} . Увеличение эффективности туннелирования приводит к возрастанию квантового выхода интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние фТ. Этот аспект имеет важное значение для выбора структуры при синтезе новых эффективных фотосенсибилизаторов на основе цианиновых красителей с двумя взаимодействующими хромофорами [2].

Комплексы фотосенсибилизаторов с белками крови (альбумин, липопротеины низкой плотности) играют существенную роль в доставке фотосенсибилизаторов в опухолевую клетку, и влияют на эффективность фотодинамической терапии. Значение константы нековалентного связывания бискарбоцианинового красителя ВВС²⁺ с сывороточным альбумином человека составляет $K_b = 5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, что свидетельствует о возможности эффективной доставки фотосенсибилизатора в опухолевые клетки.

Согласно данным флуоресцентной спектроскопии коррелированного счета одиночных фотонов (TCSPC) между красителем и альбумином образуются два типа комплексов со временем жизни флуоресценции $\tau_1 = 1,0 \text{ нс}$ и $\tau_2 = 2,5 \text{ нс}$, что указывает на взаимодействие с альбумином в двух различных сайтах связывания [3]. Эти комплексы характеризуются временем жизни флуоресценции, которое значительно больше времени жизни флуоресценции для несвязанного красителя, что обусловлено образованием более жесткой структуры красителя в комплексе с альбумином и уменьшением вклада колебательной релаксации в процесс внутренней конверсии. Гидрофобность полиметиновой цепи и наличие двух положительных зарядов в молекуле бискарбоцианинов ВВС²⁺ способствует эффективному связыванию красителей с альбумином и проникновению в клетки. Бискарбоцианиновые красители имеют незначительную цитотоксичность, проникают во все жизненно важные органеллы клетки, включая митохондрии, лизосомы и эндоплазматический ретикулум, имеет высокий антипролиферативный потенциал, а при воздействии света краситель проявляет высокую фотцитотоксичность даже при концентрации ниже 1 мкМ [3].

Фотохимическое действие фотосенсибилизатора в фотодинамической терапии может происходить по двум различным

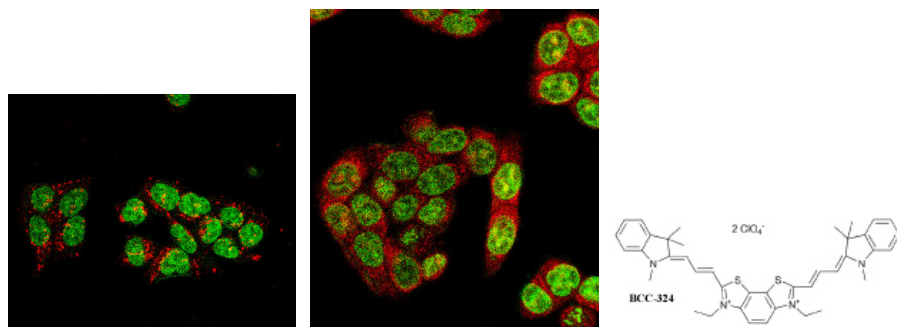
механизмам. Ключевым короткоживущим интермедиатом является триплетное состояние красителя, которое образуется из синглетного возбужденного состояния в результате интеркомбинационной конверсии после фотовозбуждения фотосенсибилизатора. Взаимодействие триплета с кислородом в результате процесса переноса энергии приводит к образованию синглетного кислорода, который и может разрушать различные клеточные структуры, вступая в прямое химическое взаимодействие. Малое время жизни синглетного кислорода и его невысокая реакционная способность, вероятно, может объяснить невысокий вклад этого механизма в процесс фотодинамической терапии.

Другим механизмом действия фотосенсибилизатора является фотоперенос электрона на триплетное состояние фотосенсибилизатора от донора электрона. Таким донором электрона могут быть ароматические аминокислоты тирозин или триптофан, входящая в структуру белка (например, в альбумине, который в комплексе с красителем осуществляет доставку фотосенсибилизатора в клетку). Процесс фотопереноса электрона на фотосенсибилизатор может быть эффективным процессом, так как не требует диффузионного столкновения триплета с белком, а краситель уже находится в комплексе с альбумином и расстояние между центрами фотопереноса электрона фотосенсибилизатором и ароматической аминокислотой минимально. В результате реакции между кислородом и восстановленной формой фотосенсибилизатора внутри клетки происходит перенос электрона от анион-радикала красителя на кислород с образование активной формы кислорода — супероксид радикала. Дальнейшие взаимодействия супероксида с внутриклеточными структурами приводят к необратимым последствиям и гибели клетки в результате некроза или апоптоза. В результате физического процесса гибели синглетного кислорода

образуется стабильное основное триплетное состояние кислорода. Гибель синглетного кислорода происходит с образованием основного триплетного состояния кислорода при прямом переходе в результате люминесценции или деградации энергии, а также в комплексе столкновения при реакции синглетного кислорода с другими молекулами — физическое тушение в основное триплетное состояние кислорода является доминантным путем по сравнению с химическим взаимодействием. Для анион-радикала супероксида его гибель при реакции с внутриклеточными структурами не приводит к исчезновению свободного электрона. Происходит образование другого более стабильного радикала. Однако, образование радикального продукта в любом компартменте клеточной структуры неизбежно ведет к гибели клетки. Именно по этой причине механизм гибели раковых клеток в процессе фотодинамической терапии с участием супероксида анион-радикала является наиболее вероятным механизмом, инициирующим некроз и апоптоз. Методом конфокальной микроскопии было доказано образование супероксид радикала ($O_2^{\cdot-}$) при фотооблучении красным светом клеток НСТ116 в присутствии бискарбоцианинового красителя ВСС-324 ($\alpha=90^\circ$ — угол между хромофорами) в качестве фотосенсибилизатора [3,4].

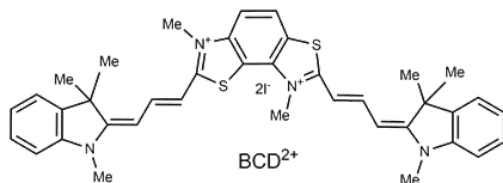
Образованию супероксида должен предшествовать процесс фотопереноса электрона на триплетное состояние фотосенсибилизатора от донора электрона. На модельной системе был исследован процесс фотопереноса электрона с участием триплета бискарбоцианинового красителя. Процесс фоторазрушения хромофорной системы бискарбоцианина в присутствии донора электрона (аскорбиновой кислоты), происходящий с участием триплетного состояния красителя, моделирует образование радикальной полувосстановленной формы бискарбоцианина. Одним из путей гибели радикальной формы бискарбоцианина

может быть реакция с молекулярным кислородом, в результате которой при переносе электрона на кислород образуется супероксид радикал. Этот интермедиат может взаимодействовать с различными клеточными структурами и приводить к гибели опухолевых клеток.



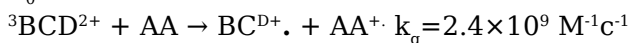
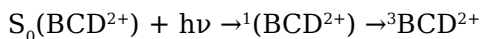
(А) (Б) BCC-324
Рис. 3 Детекция супероксид-анион радикала ($O_2^{\cdot-}$) в intactных клетках НСТ116 (А) и в клетках НСТ116 с фотоактивированной ($\alpha=90^\circ$) (0,5 мкМ) (Б). Красным цветом обозначен сигнал флуоресценции сенсора супероксид-аниона MitoSOX Red; зеленым цветом обозначен ядерный краситель Hoechst 33342. BCC-324 ($\alpha=90^\circ$) активировали лазером 514 нм в течение 5 с [3,4].

Фотоиндуцированный перенос электрона на триплетное состояние дикатиона бискарбоцианинового красителя 3BCD2⁺ от аскорбиновой кислоты был доказан методом импульсного фотолиза [5, 6].

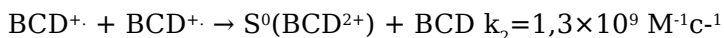


BCD²⁺

Фотоперенос электрона от аскорбиновой кислоты на триплет бискарбоцианина происходит с константой скорости близкой к диффузионной константе $k_q = 2.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. В результате происходит разрушение хромофорной структуры бискарбоцианинового красителя с образованием радикала красителя.



Экспериментально доказано, что кинетика гибели радикала $\text{BCD}^{\cdot+}$ подчиняется закону 2-го порядка с константой $k_2 = 1,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, которая также близка к диффузионной константе $k_{\text{diff}} = 8RT/3000\eta$ для пропанола при комнатной температуре, что указывает на высокую эффективность этого процесса. Гибель радикалов красителя $\text{BCD}^{\cdot+}$ происходит в результате рекомбинации двух катион-радикалов с образованием исходной молекулы красителя и восстановленной формы красителя и это приводит к деструкции красителя, о чем свидетельствует сильное уменьшение поглощения красителя при облучении в присутствии аскорбиновой кислоты (Рис. 5).



Эта реакция между двумя положительно заряженными частицами константа и поэтому $k_2 < k_q$, так как в реакции фотопереноса электрона на триплет красителя участвует молекула аскорбиновой кислоты, которая не несет заряда.

Взаимодействие между радикалом красителя и молекулярным кислородом может привести к образованию цитотоксического супероксид радикала. Способность молекулы BCD^{2+} действовать как фотосенсибилизатор по механизму переноса электрона может иметь важное значение для исследований механизмов фотодинамической терапии [6].

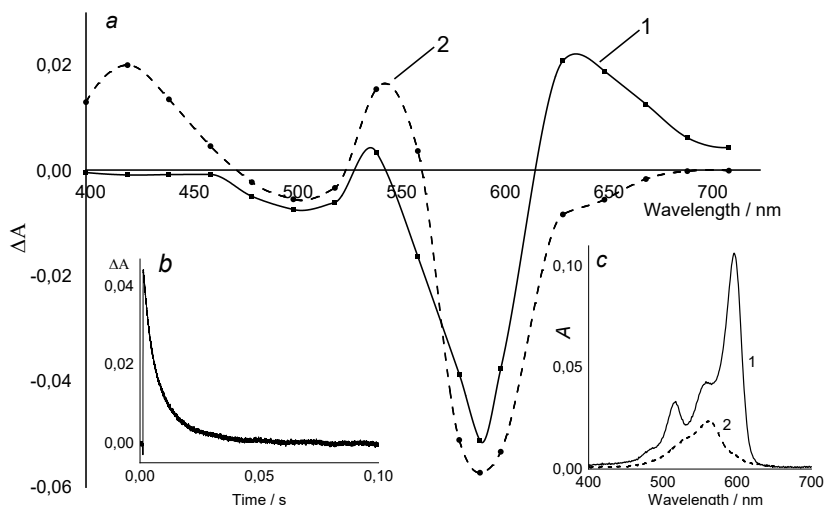
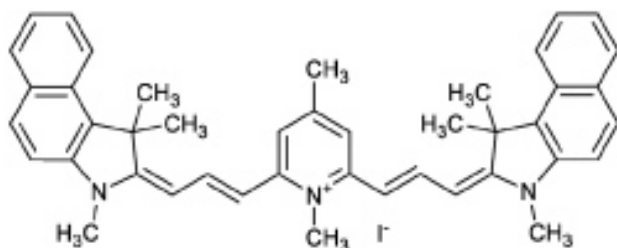


Рис. 4 (а) Дифференциальные спектры триплет-триплетного поглощения ${}^3\text{BCD}^{2+}$ в пропанол-1 (через 200 мкс после фотовозбуждения раствора BCD^{2+} (3×10^{-7} М) в отсутствие (1) и дифференциальный спектр поглощения радикала красителя BCD^{+} . (2) в присутствии аскорбиновой кислоты (1×10^{-2} М). На вставке (b) показана кинетика гибели катион-радикала BCD^{+} при 420 нм в результате необратимой рекомбинации с другим катион-радикалом BCD^{+} ($k_2 = 1,3 \times 10^9 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$). (c) Спектры поглощения BCD^{2+} после фотолиза в отсутствие (1) и в присутствии аскорбиновой кислоты (2).

Синтезирован новый бискарбоцианиновый краситель ВСС, способный связываться с альбумином и ДНК [7]. При комплексообразовании бискарбоцианина с биомакромолекулами происходит образование жесткой структуры красителя и резко увеличивается квантовый выход флуоресценции, что делает эти красители также перспективными флуоресцентными агентами для визуализации *in vivo* в ангиографии.



ВСС

Константы связывания ВСС с биомакромолекулами для ЧСА составили $8,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, для ДНК $2,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. Молекулярный докинг и молекулярно-динамический анализ показали, что ВСС, связанный с ЧСА, расположен в широком умеренно полярном кармане между субдоменами альбумина IIA и IIIA. ВСС продемонстрировал быстрое проникновение во внутреннюю часть клеток НСТ116 и исключительно низкую фототоксичность по отношению к этим клеткам. Это объясняется отсутствием триплетного состояния ВСС при прямом фотовозбуждении. Это делает ВСС перспективным флуоресцентным агентом для визуализации *in vivo* в ангиографии. В области медицинской диагностики существует запрос на создание флуоресцентные метки с флуоресценцией в диапазоне 650–700 нм для существующего оборудования, не требующего ИК-лазеров и камеры [7].

В исследованиях фотохимических и фотобиологических свойств новых фотосенсибилизаторов на основе порфиринов, хлоринов для фотодинамической терапии Лаборатория активно сотрудничает с кафедрой медицинской химии и тонкого органического синтеза Химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова, ИНЭОС РАН, МИТХТ МИРЭА, ИХФ РАН, ФИЦ Коми НЦ УрО РАН, Институтом химии ДВО РАН,

НИИ канцерогенеза НМИЦ им. Н. Н. Блохина. Фотодинамическая терапия эффективный и неинвазивный метод в медицине позволяет элиминировать опухолевые клетки, которые не поддаются конвенциональным подходам в противоопухолевой терапии.

Были получены спектрально-кинетические свойства триплетных состояний нековалентных комплексов альбумина и липопротеинов низкой плотности для конъюгатов порфиринов и карборанов с триазиновым гетероциклом, показана фотоиндуцированная цитотоксичность данных соединений на опухолевых клетках [8]. Показано увеличение флуоресценции конъюгатов хлоринов и карборанов при связывании с альбумином, что связано с увеличением жесткости молекулярной структуры красителя при комплексообразовании, продемонстрированы фоторадиосенсибилизирующие свойства конъюгата на животной модели [9]. Для синтезированных s-триазинов, содержащих порфириновые и карборановые кластеры, на клеточной линии аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 была установлена внутриклеточная локализация и исследована темновая и фотоцитотоксичность [10]. Исследованы флуоресцентные фотохимические свойства новых конъюгатов красителей BODIPY с карборанами, и показана фотоцитотоксичность их на раковых клетках [11].

Исследованы фотохимические свойства ряда новых октафенокси-замещенных цинк пиразинопорфиразинов, а также химически модифицированных субфталоцианинов, охарактеризованы их флуоресцентные свойства и методом импульсного фотолиза получены спектрально-кинетические характеристики триплетных состояний. Установлено, что новые красители при фотовозбуждении эффективно генерируют синглетный кислород, что позволяет рассматривать их в качестве новых фотосенсибилизаторов [12, 13].

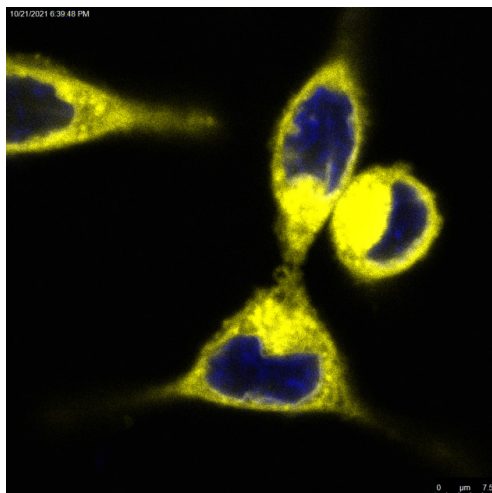


Рис. 5 Перекисное окисление липидов в клетках HCT116 вследствие фотоиндуцированного образования активных форм кислорода при фотовозбуждении фотосенсибилизатора BODIPY с карборанами [11]. Детектируется сигнал от коммерчески доступного красителя BODIPY 581/591 C11 (Lipid Peroxidation Sensor — желтый цвет). Ядра окрашены ядерным красителем Hoechst 33342 — синий цвет.

Другим классом красителей перспективным для использования в методах флуоресцентной визуализации является куркуминоиды дифторида бора. Установлено что введение электронодонорных заместителей в молекулу красителей приводит к увеличению квантового выхода люминесценции. Показано что полученные красители способны проникать и накапливаться в клетках [14].

Были охарактеризованы фотохимические свойства ряда новых субфталоцианинов бора [15], фталоцианина эрбия [16] и пиразинопорфиразинов цинка [17]. Методом импульсного фотолиза показана ключевая роль триплетных состояний красителей в процессах фотосенсибилизации. Установлены спектрально-кинетические характеристики синглетного и три-

плетного возбужденных состояний 2,3,9,10,16,17,23,24-октафенилфталоцианината эрбия ацетата, соединение обладает высокими значениями квантовых выходов флуоресценции (0,50) и синглетного кислорода (0,43). Определены значения времени жизни возбужденного синглетного (4,9 нс) и триплетного состояний (1,4 мс). Высокое значение константы связывания фталоцианина с бычьим сывороточным альбумином ($5,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) указывает на сильное взаимодействие с этим белком, что обуславливает эффективную доставку фотосенсибилизатора в опухолевые клетки. На модельной клеточной линии аденокарциномы толстой кишки (линия клеток HCT116) было установлено преимущественное накопление фотосенсибилизатора в цитоплазме клеток. Методом конфокальной микроскопии установлена локализация фталоцианина в митохондриях и структурах эндоплазматического ретикулума [16]. Новые октафеноксизамещенный и октахлорзамещенный пиразинопорфиразины цинка демонстрируют интенсивное триплетное поглощение и эффективную генерацию синглетного кислорода ($\Phi_{\Delta}=0,34$), что позволяет рассматривать эти соединения как потенциальные фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии [17]. Были исследованы фотохимические свойства ряда новых субфталоцианинов бора, в том числе трет-бутилзамещенного и галогензамещенных комплексов. Введение фтора, хлора и иода в структуру субфталоцианинов приводит к повышению эффективности переноса энергии на кислород вследствие возрастающего внутримолекулярного эффекта тяжелого атома, что выражается в усилении их фотодинамических свойств. Эффективность генерации синглетного кислорода для иодзамещенного субфталоцианина достигает до $\Phi_{\Delta}=0,85$ в толуоле. Для оценки возможности доставки субфталоцианиновых производных в клетки был охарактеризован процесс комплексообразования с транспортной белко-

вой молекулой альбумина. Исследуемые соединения образуют нековалентные комплексы с альбумином, что сопровождается тушением флуоресценции триптофана в сайте связывания белка. В комплексах с альбумином происходит стабилизация синглетно-возбужденных состояний красителей за счет увеличения жесткости структуры красителя при встраивании в биомакромолекулу, и это обуславливает возможность установить локализацию фотосенсибилизатора в клетках. Методом МТТ-теста на клеточных линиях А431 и НСТ116 показано высокое фототоксическое действие ряда субфталоцианинов: трет-бутилзамещенный краситель обладает лучшими характеристиками, чем эталонный краситель роза бенгальская со значением цитотоксичности $IC_{50}=1,2$ мкМ. Высокая флуоресценция субфталоцианинов, возможность их комплексообразования с альбумином, а также наличие триплетного состояния и эффективной генерации синглетного кислорода при фотовозбуждении обуславливает применение этих соединений в терапии и диагностике заболеваний [15].

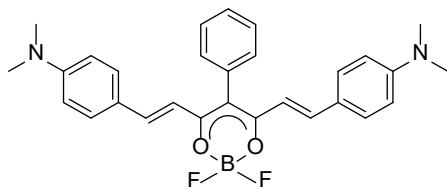
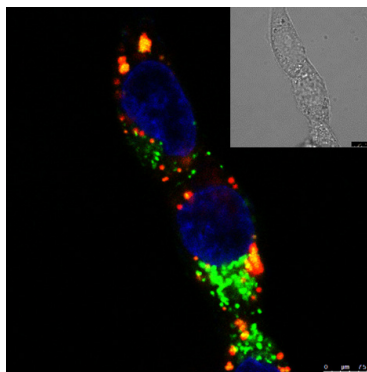


Рис. 6 Клетки НСТ116, окрашенные 2,2-Difluoro-4-(p-dimethylaminostyryl)-6-(9H-fluoren-2-yl)-1,3,2-dioxaborine (красный цвет), лизосомальным клеточным маркером (Lyso Tracker Green DND-26 — зеленый цвет) и ядерным красителем (Hoechst 33342 — синий цвет) [14].

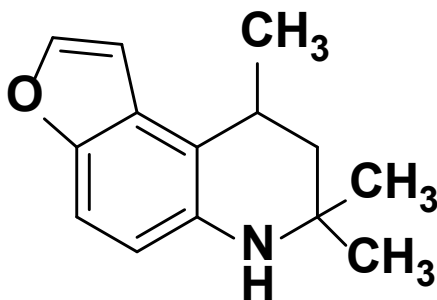
В лаборатории было проведено исследование фотохимических и кинетических характеристик нового метакрилатного производного бис-бензилиденциклопентанона для использования в качестве фотоинициатора в процессе фотополимеризации [18]. Для кетоцианиновых красителей установлено, что новое метакрилатное производное имеет более высокий квантовый выход синглетного кислорода ($\phi_{\Delta}=0,08$) по сравнению с незамещенным соединением. Показана более высокая эффективность генерации радикальных интермедиатов для нового соединения. Метакрилатное производное является более эффективным фотоинициатором для применения в аддитивных технологиях. Установлено увеличение генерации радикальных интермедиатов для метакрилатного производного. Используя данный фотоинициатор методом DLW-фотолитографии удалось изготовить микролинзы для рентгеновского излучения с минимальным размером элемента — аксиального 1,5 мкм, латерального 0,5 мкм. Полученный в работе фотоинициатор может быть использован для 3D печати различных микроструктур [18].

Разработка новых флуоресцентных зондов с высокими квантовыми выходами флуоресценции и низким выходом триплетного состояния является важной задачей современной химии красителей и родственных соединений для разработки методов диагностики и оценки проводимой терапии. При ишемическом реперфузионном повреждении возникает клеточная метаболическая и тканевая структурная дисфункция. Новый зонд А-01 был синтезирован для оценки защитного действия плюмбагина на клетки, подвергшиеся ишемическому реперфузионному повреждению. Наличие электроноакцепторной цианогруппы и электронодонорной трифениламин группы в структуре делает это соединение чувствительным к полярности растворителя, а низкий квантовый выход триплетного состояния А-01 указывает на то, что облучение видимым светом не приводит к фо-

тодинамическому эффекту и выгоранию компонентов клетки. С помощью этого зонда А-01 было установлено защитное действие ряда хинонов на клетки во время ишемического реперфузионного повреждения [19].

ПУВА-терапия (PUVA) представляет собой метод лечения ряда кожных заболеваний с использованием фотосенсибилизаторов, поглощающих в УФ-А области (320–390 нм). Механизм терапевтического действия псораленов на клетки кожи человека связывают с образованием продуктов [2+2]-фотоциклоприсоединения в результате взаимодействия между триплетным электронно-возбужденным состоянием псоралена и тиминовым основанием ДНК. Длительное применение псораленов при лечении кожных заболеваний выявило возникновение побочных токсических эффектов ПУВА-терапии. Способность псораленов при фотовозбуждении образовывать ковалентные связи (кросс-сшивки) между двумя пиримидиновыми основаниями, расположенными на противоположных нитях ДНК, является причиной нарушения клеточной пролиферации, с возможным дальнейшим развитием онкологических заболеваний.

Была синтезирована серия фуоропроизводных дигидрохинолинов ФДГХ с различным положением фуранового цикла и заместителями в ароматическом кольце.



ФДГХ

Методом импульсного фотолиза было зарегистрировано образование триплетного возбужденного состояния ФДГХ со спектром поглощения с $\lambda_{\max} = 600\text{--}700$ нм и временем жизни ~ 200 мкс. Триплетные состояния ФДГХ активно взаимодействуют с тиминовыми основаниями ДНК. ТМР тушит триплетное состояние ФДГХ константой скорости, близкой к диффузионной ($k_q \sim 2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$).

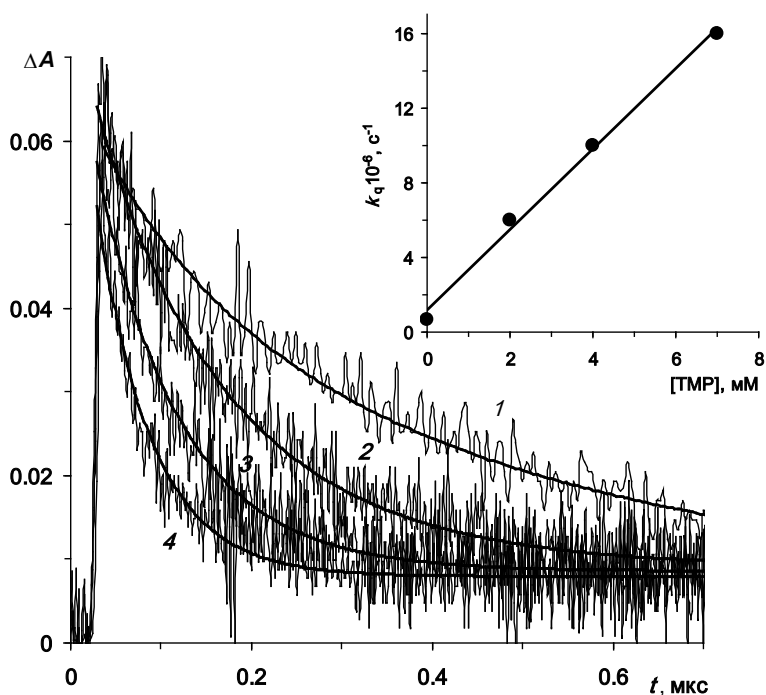
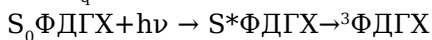


Рис. 7 Гибель триплетного поглощения в ФДГХ ($\lambda = 620$ нм) в отсутствие (1), и в присутствии ТМР, мМ: (2) 2, (3) 4 и (4) 7; вставка: зависимость константы скорости первого порядка тушения триплетного состояния от концентрации ТМР

При взаимодействии триплетов ФДГХ и тимином образуются только моноаддукты с тиминовым основанием ДНК и отсутствуют диаддукты, которые могут приводить к фотогенотоксичности, как это происходит при использовании линейного псоралена 8-MOP. Все синтезированные ФДГХ не проявляют темновой токсичности в концентрациях до 50 мкМ. Гибель клеток наблюдается только при сочетанном действии соединения и облучения. Таким образом, фуродигидрохинолины представляют перспективный класс соединений с точки зрения их дальнейшего исследования в качестве препаратов для фотохимиотерапии [20].

Статьи лаборатории

1. G. Kuzmin, I. V. Soboleva, N. A. Durandin, E. S. Lisitsyna, V. A. Kuzmin, Microphase Mechanism of «Superquenching» of Luminescent Probes in Aqueous Solutions of DNA and Some Other Polyelectrolytes, *J. Phys. Chem. B* 2014, 118, 4245–4252

2. I. E. Borissevitch, P. J. Gonçalves, L. P. Ferreira, A. A. Kostyukov, V. A. Kuzmin, Characterization of Triplet State of Cyanine Dyes with Two Chromophores Effect of Molecule Structure, *Technologies* 2023, 11, 90

3. A. S. Radchenko, A. A. Kostyukov, A. A. Markova, A. A. Shtil, T. D. Nekipelova, I. E. Borissevitch, V. A. Kuzmin, Photoactivated biscarbocyanine dye with two conjugated chromophores: complexes with albumin, photochemical and phototoxic properties, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2019, 18, 2461.

4. A. A. Kostyukov, A. Sh. Radchenko, T. D. Nekipelova, A. A. Markova, A. A. Shtil, I. E. Borissevitch, V. A. Kuzmin, Photochemical activity of biscarbocyanine dye: triplet state, complex formation with albumin and cytotoxic action, *International Symposium on Photochemistry*, Dublin, Ireland, 2018.

5. A. E. Egorov, A. A. Kostyukov, T. D. Nekipelova, A. Sh. Radchenko, A. V. Shibaeva,

M. A. Klimovich, I. E. Borissevitchb, V. A. Kuzmin, Photoreduction of the Triplet State of Biscarbocyanine Dye, High Energy Chemistry, 2020, 54, № 2, 142–144.

6. A. E. Egorov, A. A. Kostyukov, I. E. Borissevitch, V. A. Kuzmin, Photoinduced electron transfer from electron donor to bis-carbocyanine dye in excited triplet state, Mendelev Comm., 2021, 31, 68–69

7. A. A. Kostyukov, M. G. Mestergazi, A. E. Egorov, A. M. Shmykova, A. V. Shibaeva, A. A. Markova, T. A. Podrugina, V. I. Pogonin, E. V. Radchenko, V. A. Palyulin, A. A. Shtil, T. D. Nekipelova, I. E. Borissevitch, V. A. Kuzmin, Biscarbocyanine dye for fluorescence imaging: Binding with albumin and DNA, cell accumulation, intracellular distribution and molecular modeling, Dyes and Pigments, 2023, 210, 111043.

8. V. A. Oleshevskaya, A. V. Zaitsev, A. V. Makarenkov, E. G. Kononova, A. A. Markova, A. A. Kostyukov, A. E. Egorov, M. A. Klimovich, O. A. Koroleva, V. A. Kuzmin, Synthesis of boronated meso-arylporphyrins via copper-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition reaction and their binding ability towards albumin and low density lipoproteins, Journal of Organometallic Chemistry, 2020, 121248.

9. V. A. Olshevskaya, A. V. Zaitsev, A. S. Petrova, A. Y. Arkhipova, M. M. Moisenovich, A. A. Kostyukov, A. E. Egorov, O. A. Koroleva, G. V. Golovina, Y. L. Volodina, E. V. Kalinina, V. A. Kuzmin, Y. Sakurai, H. Tanaka, N. Miyoshi, A. A. Shtil, The synthetic fluorinated tetracarboranylchlorin as a versatile antitumor photoradiosensitizer, Dyes and Pigments, 2021, 186, 108993.

10. V. M. Alpatova, E. G. Rys, E. G. Kononova, E. A. Khakina, A. A. Markova, A. V. Shibaeva, V. A. Kuzmin, V. A. Olshevskaya, Multicomponent Molecular Systems Based on Porphyrins, 1,3,5-Triazine and Carboranes: Synthesis and Characterization, Molecules 2022, 27, 6200.

11. A. V. Zaitsev, E. G. Kononova, A. A. Markova, A. V. Shibaeva, A. A. Kostyukov, A. E. Egorov, V. A. Kuzmin, A. A. Shtil, V. A. Olshevskaya, A straightforward approach to carborane-substituted BODIPY derivatives via nucleophilic aromatic substitution: Synthesis and photodynamic properties, *Dyes and Pigments*, 2022, 110711.

12. A. D. Kosov, I. D. Burtsev, E. O. Moiseeva, M. Y. Seliverstov, D. N. Finogenov, P. A. Stuzhin, A. E. Egorov, A. A. Kostyukov, A. V. Trofimov, V. A. Kuzmin, T. V. Dubinina, Post-macrocyclization strategy to octaphenoxy-substituted zinc pyrazinoporphyrazine, its photochemical and electrochemical properties, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2024, 455, 115767.

13. I. D. Burtsev, T. V. Dubinina, A. E. Egorov, A. A. Kostyukov, A. V. Shibaeva, A. S. Agranat, M. M. Ivanova, L. R. Sizov, N. V. Filatova, A. Y. Rybkin, E. V. Varakina, A. S. Bunev, A. A. Antonets, E. R. Milaeva, V. A. Kuzmin, Substituted boron subphthalocyanines — prospective compounds for theranostics: Synthesis, photochemical properties and in vitro cytotoxicity, *Dyes and Pigments*, vol. 207, p. 110690, 2022.

14. A. G. Mirochnik, Z. N. Puzyrkov, E. V. Fedorenko, I. V. Svistunova, A. A. Markova, A. V. Shibaeva, I. D. Burtsev, A. A. Kostyukov, A. E. Egorov, V. A. Kuzmin, Fluorescent boron difluoride curcuminoides as perspective materials for bio-visualization, *Spectrochimica Acta — Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, 122319.15. I. D. Burtsev, T. V. Dubinina, A. E. Egorov, A. A. Kostyukov, A. V. Shibaeva, A. S. Agranat, M. M. Ivanova, L. R. Sizov, N. V. Filatova, A. Y. Rybkin, E. V. Varakina, A. S. Bunev, A. A. Antonets, E. R. Milaeva, V. A. Kuzmin, Substituted boron subphthalocyanines — prospective compounds for theranostics: Synthesis, photochemical properties and in vitro cytotoxicity, *Dyes and Pigments*, 2022, 207, 110690.

16. И. Д. Бурцев, А. Е. Егоров, А. А. Костюков, А. В. Шибеева, М. А. Климович, А. Д. Косов, М. Ю. Селиверстов, Т. В. Дубинина, А. А. Маркова, В. А. Кузьмин, Фотохимические свойства

октафенилзамещенного фталоцианина эрбия, Химическая физика, 2022, 41, № 2, с. 41–50.

17. A. D. Kosov, I. D. Burtsev, E. O. Moiseeva, M. Y. Seliverstov, D. N. Finogenov, P. A. Stuzhin, A. E. Egorov, A. A. Kostyukov, A. V. Trofimov, V. A. Kuzmin, T. V. Dubinina, Post-macrocyclization strategy to octaphenoxy-substituted zinc pyrazinoporphyrine, its photochemical and electrochemical properties, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2024, 455, 115767.

18. A. E. Egorov, A. A. Kostyukov, D. A. Shcherbakov, D. A. Kolymagin, D. A. Chubich, R. P. Matital, M. V. Arsenyev, I. D. Burtsev, M. G. Mestergazi, E. R. Zhiganshina, S. A. Chesnokov, A. G. Vitukhnovsky, V. A. Kuzmin, Benzylidene cyclopentanone derivative photoinitiator for two-photon photopolymerization-photochemistry and 3D structures fabrication for x-ray application, Polymers, 2023, 15, 1, p. 71.

19. Y. Ai, W. Song, A. A. Kostyukov, Y. Yin, V. A. Kuzmin, W. Lin, Fluorescent probe for evaluating the preventive utility of plumbagin in ischemia-reperfusion injury, Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry 2024, 454, 115723.

20. В. А. Кузьмин, Т. Д. Некипелова, Е. Н. Ходот, В. В. Шахматов, Фотохимические и фотофизические процессы в фототиотерапии, поиск новых препаратов, Химия высоких энергий, 2024, 58, № 1, 88–107.

26. НОВЫЕ ФОТОАКТИВИРУЕМЫЕ МЕТКИ И МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ БИОНАНОФОТОНИКИ

О. В. Демина¹, С. Д. Варфоломеев¹, А. А. Ходонов¹

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

Дизайн и разработка эффективных методов получения новых гибридных молекулярных структур и систем, содержащих фотохромные или флуорофорные фрагменты в качестве активных элементов, рабочие характеристики которых существенно изменяются под действием света, представляют особый интерес для нужд бионанопотоники, фотофармакологии и биосенсорных технологий [1–3].

Цель данного цикла работ заключалась в дизайне и разработке методов получения и комплексного изучения свойств нового поколения гибридных фотоуправляемых меток и зондов и материалов на их основе. Перспективным способом разработки таких гибридных фотоактивных и фотоуправляемых систем и материалов является формирование этих систем при селективном или неселективном связывании фотохромных / флуоресцентных меток с мишенью с помощью нековалентной (caged) или ковалентной (tethered) «иммобилизации» [1–5]. Для реализации этого подхода необходимо было разработать новое поколение фотохромных меток и зондов, содержащих заместители с соответствующими типами функциональных групп.

В качестве мишеней были выбраны субстраты различной природы от биологических до неорганических, например, рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCRs), относящиеся к семейству А: белки из семейства микробных родопсинов и простагландинный рецептор тромбоксана A_2 ($ТхA_2$), полимеры, квантовые точки и катионы металлов.

В течение 30 лет в лаборатории 0501 ИБХФ им. Н. М. Эмануэля РАН под руководством член-корр. РАН Варфоломеева С. Д. нашей группой был впервые проведен широкий поиск оригинальных фотохромных / флуоресцентных систем с новыми функциональными возможностями с успешной разработкой эффективных методов синтеза и модификации компонентов для получения целевых фотоактивных меток и зондов [4,5].

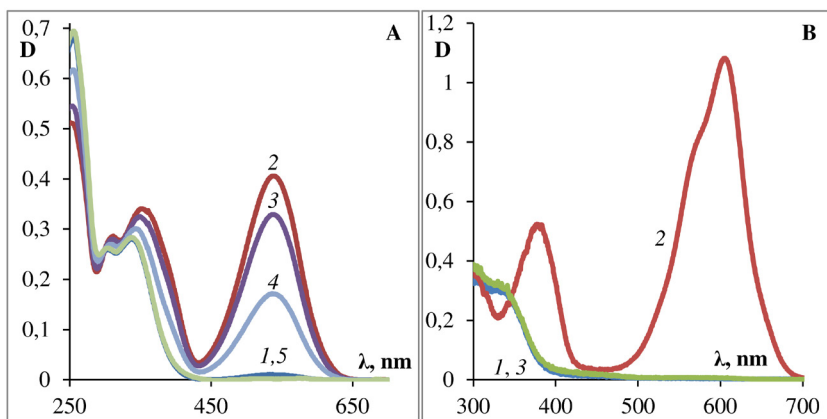
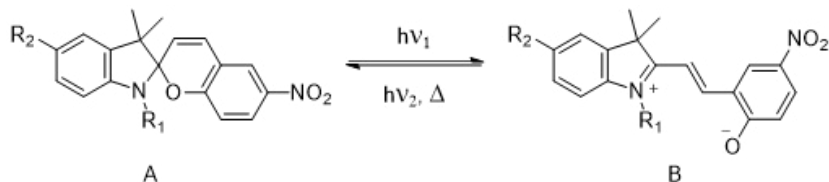


Рисунок 1. Фототрансформации молекулы спиропирана (верхняя панель) и электронные спектры поглощения 5'-замещенного спиропирана в этаноле (А) и толуоле (В). Кривые на графиках (А): 1 — до освещения; 2 — через 30 с освещения светом через фильтр УФС-2; 3, 4 — через 10 и 45 мин в темноте соответственно; 5 — через 30 с освещения видимым светом. Кривые на графиках (В): 1 — до освещения; 2 — через 10 с освещения светом через фильтр УФС-2; 3 — через 30 с в темноте.

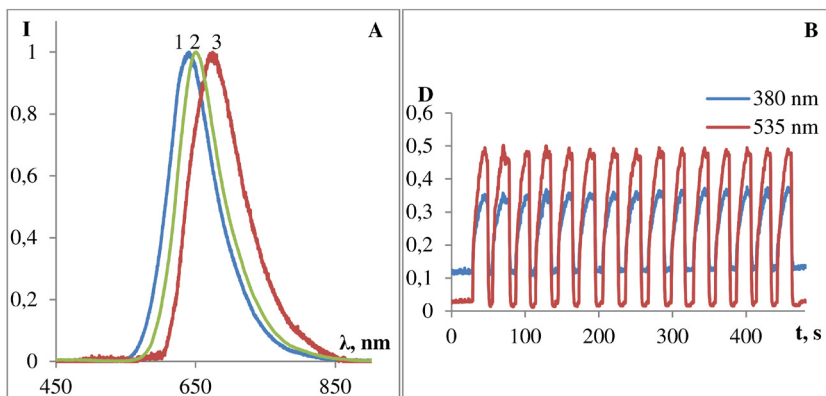


Рисунок 2. Спектры флуоресценции фотоиндуцированной формы мероцианиновой формы (MC) 5'-замещенного спиропирана (A): в этаноле (1), ацетонитриле (2) и толуоле (3) при возбуждении светом с $\lambda_{ex} = 280\text{--}370$ нм. (B) Воспроизводимость кинетики фотоокрашивания / фотообесцвечивания 5'-замещенного спиропирана в этаноле, 15 циклов, 25 °С.

В качестве перспективных предшественников для синтеза фотоактивных меток и зондов для мишеней различных типов нами были предложены фотохромы из нового класса 5'-замещенных производных спиропирана. Эти исходные молекулы необходимо было модифицировать, чтобы придать им способность образовывать прочные ковалентные связи или обеспечить селективное нековалентное (лиганд-специфическое) взаимодействие с различными типами мишеней путем введения различных активных концевых групп или «молекулярных адресов» в заданное положение молекулы метки.

Спектральные свойства и параметры фотопревращений 5'-замещенного спиропирана сильно зависят от имеющихся в молекуле заместителей, поэтому направленное изменение их природы позволяет проводить дизайн новых фотохромов

с заданными свойствами и различными стимул-реагирующими структурными элементами. Дополнительным преимуществом фотохромных меток на основе 5'-замещенных спиропиранов является наличие у них бинарного набора 2-х разных типов аналитических сигналов: поглощение в области 560–600 нм и индукция флуоресценции у фотоиндуцированной мероцианиновой формы (MC). Индолиновые спиробензопираны являются одним из наиболее изученных и перспективных классов фотохромных соединений (см. рисунки 1 и 2).

Известно, что структура потенциальных целевых мишеней определяет природу реакционноспособной якорной группы. Для спиропиранов ранее были известны работы по прямой модификации уже готового исходного фотохромного звена, но структурное разнообразие молекул было ограничено и создавалось, в основном, введением соответствующего амфифильного спейсера по N₁-атому азота индолинового фрагмента путем кватернизации галогенпроизводными с различной структурой. Для создания молекул фотохромных меток с заданными спектральными и фотохимическими параметрами также необходимо введение дополнительного электроноакцепторного заместителя (EWG), например, нитро-группы по положению 6 молекулы. В настоящее время достигнут существенный прогресс в синтезе и изучении свойств полифункциональных фотохромных органических соединений из класса спиропиранов [4].

В результате данного исследования нами был разработан ряд методов синтеза новых производных 5'-замещенных спиробензопиранов, содержащих заданные целевые реакционноспособные якорные группы с помощью прямых процедур введения заместителей (см. схему 1 и рисунки 3–6) [4–5].

Выбор структуры целевой реакционноспособной группы определялся типом и природой целевой мишени. Были использованы следующие варианты процедуры конъюгации:

(а). Для мишеней в ряду микробных родопсинов была использована стратегия селективного самопроизвольного ковалентного связывания (tethered) молекулы-зонда с целевым сайтом белка по принципу самораспознавания (см. рисунок 4 [6,7]). Конкретная цель этого направления состояла в исследовании влияния отдельных типов модификации хромофорной группы на структуру и функцию 2 представителей микробных родопсинов: бактериородопсина (BRh) из экстремального галофильного микроорганизма *Halobacterium salinarum* и нового объекта — протеородопсина (тундра-родопсина) (TRh) из микроорганизма *Exiguobacterium sibiricum*, выделенного из почвы тундры.

Природа и структура молекул аналогов хромофоров микробных родопсинов определялась выбором конкретной мишени, которую планировалось модифицировать: для BRh и TRh — фрагмент полиеновой цепи ретиноида, содержащий систему 4 C=C-связей с *E*-конфигурацией и с 2 метильными группами, сопряженную с терминальной формильной группой, которая обеспечивает эффективное взаимодействие ретиноида с ϵ -аминогруппой остатка Lys. На основе литературных данных и результатов наших собственных исследований была создана база данных «Properties of artificial bacteriorhodopsin analogs. From 1975 to 2019» [6,7], суммирующая сведения о способности апобелка (бактериоопсина — ВО) к образованию ковалентных и нековалентных комплексов с различными полиеновыми соединениями и данные об их фотохимических свойствах. Проведенный нами анализ взаимосвязи структура хромофора-фотохимические свойства аналогов BRh позволил существенно расширить запланированную выборку наиболее перспективных структур аналогов ретиналя **Ret2** — **Ret10** для тестирования (см. рисунок 4), и в результате этого были определены ключевые элементы структуры аналогов ретиналя, ответственные за связывание с белками—

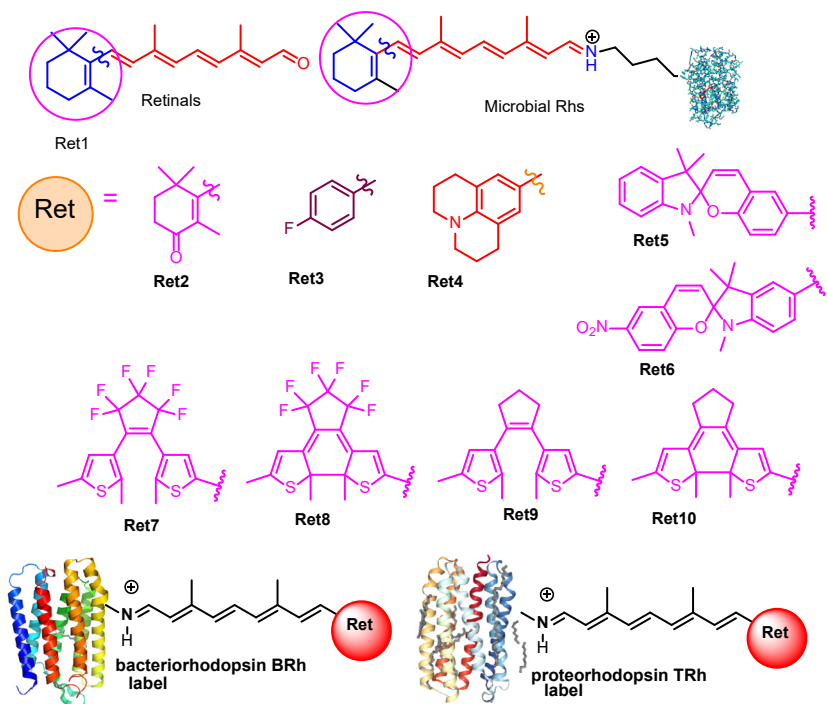


Рисунок 4. Структуры целевых фотоактивных лигандов — аналогов ретиналя **Ret2** — **Ret10**.

В результате проведенных исследований были определены структурные ограничения, накладываемые 2 различными белковыми матрицами на строение молекулы хромофора и на фотохимические свойства искусственных пигментов BRh и TRh, и впервые была успешно продемонстрирована возможность избирательного фоторегулирования процесса образования аналогов BRh из ретиналей **Ret7** и **Ret8** [6-10].

(б). Ковалентное связывание (tethered) молекулы метки с белковой мишенью посредством селективной терминальной активной группы: для специфического связывания с сульфгидрильными группами остатков Cys белков-мишеней была

синтезирована серия фотохромных спиропиранов с малеинимидным фрагментом в молекуле [11];

(в). Ковалентное связывание (tethered) молекулы зонда с мишенью через концевую активную группу: для маркирования разнообразных органических молекул нами был разработан и использован целый набор оригинальных синтетических методов и подходов (см. рисунок 3) [12,13].

(г). Для целевых белков-мишеней: нековалентное аффинное связывание (caged) молекулы-зонда с мишенью через «молекулярный адрес», введенный в молекулу зонда (фотоактивные ингибиторы рецепторов тромбосана A_2). Простанойдный рецептор TxA_2 относится к классу А суперсемейства семитяжевых трансмембранных рецепторов (GPCRs) и является наиболее привлекательной целью для комплексной терапии сердечно-сосудистых дисфункций [14]. Этот необычный рецептор взаимодействует не с одним, а с довольно обширным набором G-белков. На основании филогенетического и экспериментального анализа установлено, что рецептор TxA_2 как G_q -сопряженный рецептор активирует сигнальный каскад $PLC\beta - IP_3/DAG - Ca^{2+}/PKC$, хотя показано, что он также взаимодействует с G_s , G_i и $G_{12/13}$ [14]. У людей рецептор TxA_2 существует в двух изоформах, имеющих одни и те же первые 328 аминокислот: $TxA_2\alpha$ (343 остатка, в тромбоците) и $TxA_2\beta$ (407 остатков, в клетках эндотелия сосудов). Взаимодействие TxA_2 со своим рецептором имеет большое патофизиологическое значение для сердечно-сосудистой системы, поскольку активация рецептора TxA_2 вызывает изменение формы и агрегацию тромбоцитов, обеспечивая благоприятные условия для тромбообразования. Нарушение равновесия между производимым тромбоцитами TxA_2 и эндотелиально вырабатываемым простаглицлином является главной причиной сердечно-сосудистых дисфункций,

таких как атеросклероз, рак, инсульт и инфаркт, но вредные сердечно-сосудистые эффекты $\text{TxA}_2\alpha$ могут частично нивелироваться при гетеродимеризации с $\text{TxA}_2\beta$ или рецептором простаглицина, которые регулируют его транспортировку и сопряжение с G-белком [14].

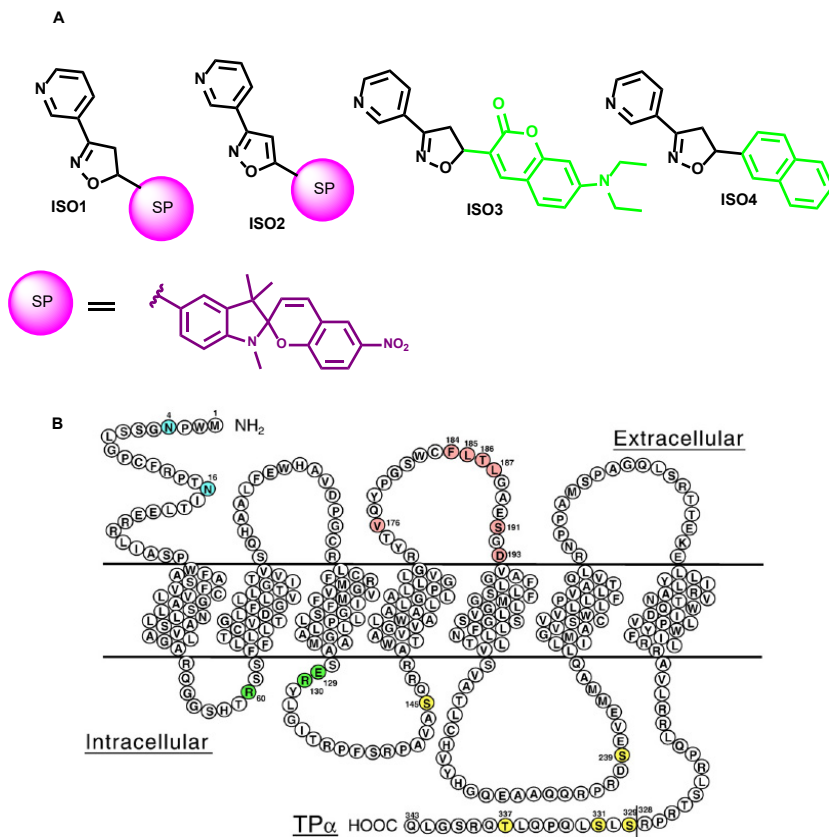


Рисунок 5. Фотоактивные лиганды — ингибиторы агрегации тромбоцитов человека. **(А)** Структуры целевых фотоактивных лигандов **ISO 1 — ISO 4**, **(Б)** строение рецептора тромбоксана A_2

Деминой О. В. с сотр. был открыт новый класс ингибиторов агрегации тромбоцитов (5-замещенные 3-пиридили-

зоксазолы), были разработаны методы их синтеза и создана библиотека из более чем 120 соединений классов 3,5-замещенных изоксазолов и их 4,5-дигидропроизводных, содержащих 2-, 3- и 4-пиридиновые фрагменты в положении 3 и заместители различной природы в положении 5 изоксазольного кольца. Для детального изучения механизма действия этого класса ингибиторов агрегации тромбоцитов человека был синтезирован набор меток на основе спиропиранов и флуорофоров, содержащих молекулярный адрес в различной пространственной ориентации по отношению к фотоактивному фрагменту и исследован процесс их связывания с рецепторами мембраны тромбоцитов человека (см. рисунок 5) [15–19].

(д). Ковалентное связывание (tethered) молекулы метки с неорганической наноразмерной мишенью с помощью селективной терминальной реакционноспособной группы: для специфичного связывания с мишенями (квантовые точки CdSe, CdTe и катионы металлов), были использованы различные производные терминальных моно- и дитиолов и были изучены различные варианты линкеров для их введения в молекулы целевых фотохромов (см. рисунок 6) [20–25].

Нами была разработана и оптимизирована технология получения линейки препаратов модифицированных квантовых точек (QDs состава CdTe) с запрограммированными оптическими параметрами флуоресценции от 520 до 642 нм. Были исследованы несколько вариантов введения по 5'-положению молекулы фотохрома фрагментов разной длины и полярности, содержащих терминальную меркапто- или карбоксильную группы (**SP1** — **SP6**, см. рисунки 3,6), которые проявляют ионофорные или хелатофорные свойства по отношению к целому ряду неорганических мишеней: катионов металлов и/или квантовых точек.

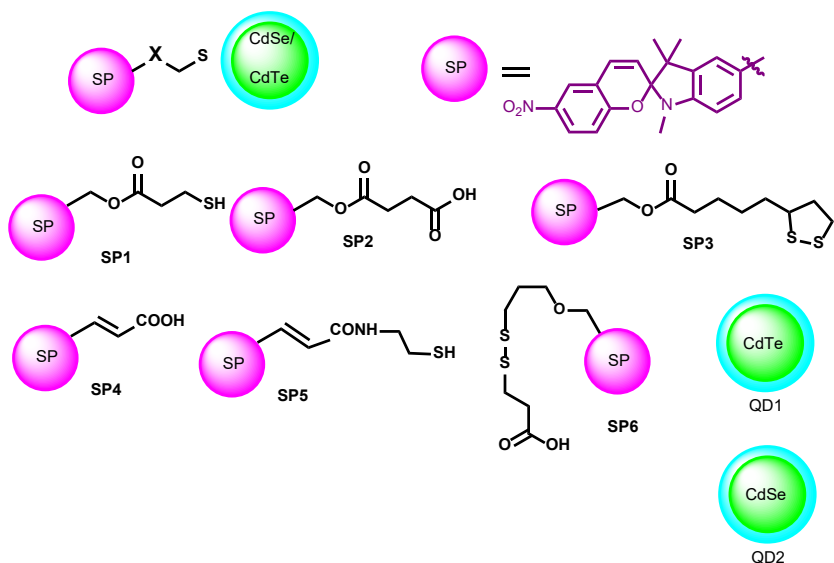


Рисунок 6. Структуры целевых фотохромных лигандов **SP1** — **SP6**, использованных для связывания с квантовыми точками CdTe и CdSe.

В области химии производных спиропиранов основное достижение этого цикла работ заключается в разработке стратегии введения заместителей разнообразного строения при помощи запатентованного нами нового метода селективного формилирования по Даффу 6-нитроспиропирана (**SP 7**) с последующей модификацией формильной функции в 5'-м положении молекулы (см. рисунок 3 и схему 1) [4, 26, 27]. Для получения необходимых фотохромов ряда спиропирана был исследован и существенно расширен потенциал синтетического применения нового ключевого синтона — 6-нитро-5'-формилспиропирана (**SP 8**) путем направленной модификации его молекулы по C5'-положению с использованием набора хорошо известных реакций: олефинирования по Виттигу и Хорнеру-Эммонсу, нуклеофильного присоединения

по карбонильной группе реагентами, обладающими активной метильной или метиленовой группами, восстановительного аминирования, реакции [3+2]-циклоприсоединения, восстановления и последующей этерификации и др.) [4, 11-13, 21-27].

Второй ключевой интермедиат — 5'-гидроксиметил-6-нитроспиропиран (SP 9) был получен с выходом 46% по разработанному нами методу восстановлением 6-нитро-5'-формилспиропирана (SP 8) боргидридом натрия (см. схему 1) [4].

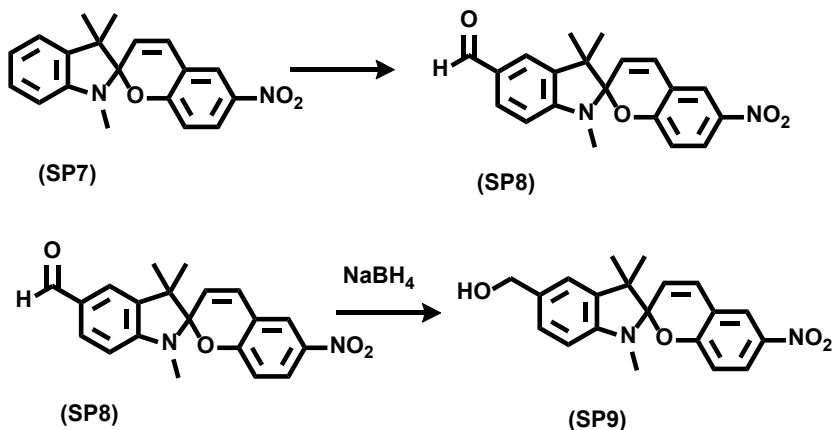


Схема 1. Пути синтеза 5'-формил- (SP 8) и 5'-гидроксиметил-6-нитроспиропиранов (SP 9).

Результаты проведенных фундаментальных исследований явления фотохромизма в ИБХФ РАН могут быть использованы как для фундаментальных исследований явления фотохромизма в нанопластике, так и для прикладных исследований в области информационных технологий, биосенсорики и бионанопластики, а также медицины.

Особенности этой технологии открывают новое направление в области получения фотопереключаемых фотоактивных компонентов для оптогенетики и фотофармакологии на основе микробных родопсинов и других фоточувствительных белков с заданными и/или прогнозируемыми спектрально-кинетическими параметрами.

Необходимо отметить особые перспективы для подобных систем маркирования мишеней различной природы при замене достаточно широко применяемых радиоактивных меток на более безопасные фотохромные; при разработке целого ряда прототипов технических smart-устройств на основе меченых белков в бионанопотонике и сенсорных технологиях, средств визуализации различных бионанообъектов в реальном времени и в многопараметрических (многоцветных) системах фотоуправляемых средств контроля строения и функции бионанообъектов (фотохромные сшивки, многопараметрические протоколы гибридизации нуклеиновых кислот, фотоуправляемые средства доставки биологически активных соединений и др.).

Авторы выражают благодарность своим коллегам с. н. с., к. х. н. Беликову Н. Е. (ИБХФ РАН) и доценту каф. биотехнологии и промышленной фармации РТУ-МИРЭА, к. х. н. Лукину А. Ю. за многолетнее плодотворное сотрудничество.

Исследования были частично выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 20-03-00139, № 17-04-01326 и № 14-04-01701.

Литература

1. Organic Photochromic and Thermochemical Compounds. (Crano J. C., Gugliemetti R. J. Eds.), v. 1, 2, N.Y., London: Plenum Press. 1999.
2. Photosensitive Molecules for Controlling Biological Function. Neuromethods, (Chambers J. J., Kramer R. H. Eds), Springer, 2011, vol. 55.
3. Papazoglou E. S., Parthasarathy A. Bionanotechnology. Morgan&Claypool, 2007.
4. A. A. Khodonov, N. E. Belikov, A. Yu. Lukin, A. V. Laptev, V. A. Barachevsky, S. D. Varfolomeev, O. V. Demina, *Colorants*, **2023**, 2, 264–404.
5. О. В. Демина, Н. Е. Беликов, И. А. Мельникова, А. Ю. Лукин, С. Д. Варфоломеев, А. А. Ходонов, *Химическая физика*, **2019**, 38 (12), 44–47.
6. A. A. Khodonov, N. E. Belikov, O. V. Demina Properties of artificial bacteriorhodopsin analogs. From 1975 to 2019, Eds: Chupin V. V., Varfolomeev S. D. Version 2, **2020**; IBSP/MIPT, Moscow, Russia 186 pp., линк доступа: http://biochemphysics.ru/assets/upload/documents/docs/BRDT_v2.pdf
7. А. А. Ходонов, Н. Е. Беликов, А. Ю. Лукин, Л. Е. Петровская, В. В. Чупин, О. В. Демина, *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, **2020**, 5 (1), 91–100.
8. N. E. Belikov, I. A. Melnikova, O. V. Demina, L. E. Petrovskaya, E. A. Kryukova D. A. Dolgikh, P. K. Kuzmichev, V. V. Chupin, A. Yu. Lukin, A. N. Shumsky, I. Chizhov, P. P. Levin, M. P. Kirpichnikov, S. D. Varfolomeev, A. A. Khodonov, *Mendeleev Communications*, **2018**, 28 (4), 406–408.
9. Н. Е. Беликов, Л. Е. Петровская, Е. А. Крюкова, Д. А. Долгих, Е. П. Лукашев, А. Ю. Лукин, О. В. Демина, С. Д. Варфоломеев, В. В. Чупин, А. А. Ходонов, *Биоорганическая химия*, **2022**, 48 (6), 694–706.

10. Н. Е. Беликов, О. В. Демина, И. И. Левина, А. Ю. Лукин, А. Я. Сафинова, Л. Е. Петровская, С. Д. Варфоломеев, А. А. Ходонов, *Труды XXII ежегодной молодежной конференции с международным участием ИБХФ РАН-вузы «Биохимическая физика»*. Москва, 14–16 ноября 2022 г., С. 142–144.

11. A. V. Laptev, A. Yu. Lukin, N. E. Belikov, O. V. Demina, A. A. Khodonov, V. I. Shvets, *Mendeleev Communications*, **2014**, 24, 245–246.

12. А. В. Лаптев, А. Ю. Лукин, Н. Е. Беликов, К. В. Звездин, О. В. Демина, В. А. Барачевский, С. Д. Варфоломеев, А. А. Ходонов, В. И. Шве́ц, *Известия Академии наук. Серия химическая*, **2014**, (9), 2026–2035.

13. A. V. Laptev, A. Yu. Lukin, N. E. Belikov, V. A. Barachevsky, O. V. Demina, A. A. Khodonov, S. D. Varfolomeev, V. I. Shvets, *Mendeleev Communications*, **2013**, 23 (3), 145–146.

14. V. Capra, M. Busnelli, A. Perenna, M. Ambrosio, M. R. Accomazzo, C. Gale's, B. Chini, G. E. Rovati, *PLoSOne*, **2013**, 8 (3), e60475.

15. О. В. Демина А. А. Ходонов, В. И., Шве́ц С. Д. Варфоломеев, *Биологические мембраны*, **2002**, 19 (2), 115–152.

16. Демина О. В., Ходонов А. А., Синауридзе Е. И., Шве́ц В. И., Варфоломеев С. Д. 5-Замещенные пиридилизоксазолы — эффективные ингибиторы агрегации тромбоцитов, *Известия АН. Сер. Химическая*, **2014**, (9), 2092–2113.

17. Демина О. В., Беликов Н. Е., Варфоломеев С. Д., Ходонов А. А. 3-Пиридилизоксазолы — прототипы антиагрегационных средств, *Известия АН. Сер. Химическая*, **2018**, (5), 866–877.

18. Демина О. В., Беликов Н. Е., Шве́ц В. И., Варфоломеев С. Д., Ходонов А. А. 5-Алкил-3-(пирид-3-ил)изоксазолы и их 4.5-дигидропроизводные, обладающие антиагрегационной активностью. Патент РФ № 2565754, опубл. 20.10.2015 г., Бюл. № 29.

19. Демина О. В., Беликов Н. Е., Варфоломеев С. Д., Ходонов А. А. Производные изоксазола, обладающие антиагрегационной активностью. Патент РФ № 2726127, опубликовано: 09.07.2020, Бюл. № 19.

20. К. В. Звездин, Н. Е. Беликов, А. В. Лаптев, А. Ю. Лукин, О. В. Демина, П. П. Левин, С. Б. Бричкин, М. Г. Спирин, В. Ф. Разумов, В. И. Шве́ц, А. А. Ходонов, *Российские нанотехнологии*, **2012**, 7 (5-6), 112-118.

21. А. А. Ходонов, Н. Е. Беликов, А. Ю. Лукин, П. П. Левин, Варфоломеев С. Д., Демина О. В. Фотохромные производные 5'-гидроксиметил-6-нитро-1',3',3'-триметилспиро[2Н-1-бензопиран-2,2'-индолина]. Патент РФ № 2694904, опубликовано: 18.07.2019, Бюл. № 20.

22. Н. Е. Беликов, О. В. Демина, А. Ю. Лукин, Л. Е. Петровская, Д. А. Складнев, С. Д. Варфоломеев, А. А. Ходонов, *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, **2021**, 6 (1), 88-96.

23. P. P. Levin, N. E. Belikov, I. I. Levina, A. S. Tatikolov, A. A. Khodonov, I. V. Khudyakov, *J. Phys. Org. Chem.*, **2019**, 32 (12), e4012.

24. Н. Е. Беликов, А. Ю. Лукин, С. Д. Варфоломеев, И. И. Левина, Л. Е. Петровская, О. В. Демина, В. А. Барачевский, А. А. Ходонов, *Оптика и спектроскопия*, **2022**, 130 (5), 681-689.

25. Н. Е. Беликов, О. В. Демина, И. И. Левина, А. Ю. Лукин А. Я. Сафинова, Л. Е. Петровская, С. Д. Варфоломеев, А. А. Ходонов, *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, **2022**, 7 (1), 113-122.

26. А. В. Лаптев, А. Ю. Лукин, Н. Е. Беликов, В. И. Шве́ц, О. В. Демина, В. А. Барачевский, А. А. Ходонов, 5-Формилзамещенные индолиновые спиробензопираны и способ их по-

лучения. Патент РФ № 2358977. Опубликовано 20.06.2009, Бюл. № 17.

27. А. В. Лаптев, А. Ю. Лукин, Н. Е. Беликов, М. А. Фомин, О. В. Демина, В. И. Шве́ц, А. А. Ходонов, Фотохромные производные 5'-винил-6-нитро-спиробензопирана и способы их получения. Патент РФ № 2458927. Опубликовано 20.08.2012, Бюл. № 23.

БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА СЕГОДНЯ

Сборник статей

Под редакцией
член-корреспондента РАН,
доктора химических наук,
профессора С.Д. Варфоломеева
(научный руководитель ИБХФ РАН)
и доктора химических наук,
профессора И.Н. Курочкина
(директор ИБХФ РАН)

*Главный редактор В. Б. Дерновой
Компьютерная верстка: Т. К. Лукина
Корректор: О. В. Якупова*

Подписано в печать 2024 г. Формат 60/90 1/16
Бумага офсетная. Печать офсетная
Объем 12 п.л. Тираж 1000 экз. Заказ №

Издательский дом
«НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА»
Телефон 8 (495) 592-2998
idnb11@yandex.ru, info@s-lib.com



<https://s-lib.com>