

# СОДЕРЖАНИЕ

---

---

Том 40, номер 2, 2021

---

---

## Строение химических соединений, квантовая химия, спектроскопия

**Пронкин П.Г., Татиолов А.С.**

Полиметиновые красители как зонды для обнаружения коронавируса SARS-CoV-2: исследование *in silico* методом молекулярного докинга 3

**Татиолов А.С.**

Элементарные фотохимические процессы с участием *мезо*-замещенных анионных цианиновых красителей в растворах и комплексах с сывороточными альбуминами 11

**Клименко И.В., Ксенофонтов А.А., Клименко М.С.,  
Антина Е.В., Березин М.Б., Лобанов А.В.**

Новая водорастворимая форма BODIPY люминофоров на основе *кремофора*<sup>®</sup>: синтез, спектральные свойства и исследование *in vitro* 18

---

## Кинетика и механизм химических реакций, катализ

**Наумов В.В., Федорова Г.Ф., Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д.,  
Вепринцев Т.Л., Трофимов А.В., Яблонская О.И.**

Механизм хемилюминесценции при термическом распаде 2,2'-азодиизобутиронитрила в жидкой кислородсодержащей среде 24

---

## Электрические и магнитные свойства материалов

**Кривнов В.Я., Дмитриев Д.В.**

Ферримагнетизм спиновой цепочки с конкурирующими обменными взаимодействиями 29

---

## Химическая физика биологических процессов

**Климович М.А., Сажина Н.Н., Радченко А.Ш., Герасимов Н.Ю.,  
Егоров А.Е., Неврова О.В., Шibaева А.В., Шкирдова А.О.,  
Маркова А.А., Беляев Е.С., Замилацков И.А.,  
Спирidonов В.В., Кузьмин В.А., Шевелёв А.Б.**

Физико-химические характеристики и противоопухолевые свойства липосомальной формы метилового эфира пиррофеофорбида-*a* 33

**Поляков И.В., Григоренко Б.Л., Немухин А.В.**

Модель комплекса РНК-полимеразы вируса SARS-CoV-2 с фавипиравиром 44

**Меньшов В.А., Кънчева В.Д., Яблонская О.И., Трофимов А.В.**

Трансформация антиоксидантных свойств смолы табачного дыма в метаболических процессах. Модельное хемилюминесцентное исследование 49

**Герасимов Н.Ю., Иваненко Г.Ф., Бобкова Н.В., Неврова О.В., Голощанов А.Н.**

Исследование изменений микровязкости мембран эритроцитов и глутатиона в плазме крови животных при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа 53

**Константинова Т.С., Шевченко Т.Ф., Барсков И.В., Тактаров В.Г.,  
Кузнецова К.В., Аболтин П.В., Каламкаров Г.Р.**

Изменение относительного содержания оксида азота в коре головного  
мозга крысы в условиях острой ишемии

61

**Щеголихин А.Н., Васильева А.Д., Юрина Л.В., Розенфельд М.А.**

Индукцированные гипохлоритом нарушения вторичной  
структуры коагуляционного фактора XIII

66

---

### **Химическая физика полимерных материалов**

**Вассерман Л.А., Филатова А.Г., Хатефов Э.Б., Гольдштейн В.Г., Плащина И.Г.**

Некоторые структурные и термодинамические характеристики  
кукурузных крахмалов в зависимости от генотипа растений

74

---

### **Химическая физика наноматериалов**

**Алексеева О.В., Козлов С.С., Константинова М.Л., Шевалеевский О.И.**

Модификация озоном структурированных на наноуровне пленок диоксида  
титана для сенсibilизированных красителем солнечных элементов

84

---

---

## ПОЛИМЕТИНОВЫЕ КРАСИТЕЛИ КАК ЗОНДЫ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2: ИССЛЕДОВАНИЕ *IN SILICO* МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА

© 2021 г. П. Г. Пронкин<sup>1\*</sup>, А. С. Татиколов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

\*E-mail: pronkinp@gmail.com

Поступила в редакцию 02.07.2020;

после доработки 02.07.2020;

принята в печать 21.09.2020

С целью разработки эффективных зондов для обнаружения коронавируса SARS-CoV-2 методом моделирования *in silico* (молекулярный докинг) исследовано нековалентное взаимодействие полиметиновых красителей различных классов (всего 45 соединений) с одним из основных структурных компонентов вируса – спайк-протеином (S). Определены энергии взаимодействия и пространственные конфигурации комплексов молекул красителей с S. Показано, что катионные полиметиновые красители (а также нейтральные скварилиевые красители) не образуют устойчивых комплексов с S. Некоторые анионные красители, демонстрирующие отрицательные значения общей энергии  $E_{tot}$ , могут быть рекомендованы для практических исследований.

**Ключевые слова:** коронавирус SARS-CoV-2, спайк-протеин, полиметиновые красители, нековалентное взаимодействие, молекулярный докинг.

**DOI:** 10.31857/S0207401X2102014X

### ВВЕДЕНИЕ

Пандемия нового коронавируса SARS-CoV-2, начавшаяся в 2019 году и продолжающаяся в настоящее время, поставила перед исследователями всего мира актуальные задачи по поиску подходов к диагностике коронавирусной инфекции и лечению заболевших пациентов. С этой точки зрения важной является разработка эффективных экспресс-методов анализа на коронавирусную инфекцию. Одним из таких методов может служить метод спектрально-флуоресцентных зондов, а в качестве зондов можно использовать полиметиновые (цианиновые и скварилиевые) красители. Они обладают высокими коэффициентами экстинкции, поглощением и излучением в длинноволновой области спектра, охватывающей оптическое окно прозрачности биологических образцов и тканей, и их фотофизические и фотохимические свойства зависят от молекулярного окружения [1]. Цианиновые и скварилиевые красители могут взаимодействовать с биомолекулами, образуя нековалентные комплексы, сопровождаемые усилением флуоресценции, что также создает предпосылки для их использования в качестве зондов в системах, содержащих биомолекулы [2, 3]. Использование красителей (в том числе цианиновых) в качестве спектрально-флуоресцентных зондов при исследовании вирусов различных ти-

пов активно изучается [4]. На актуальность проблемы указывает, в частности, недавно появившаяся работа по изучению ассоциации некоторых цианиновых красителей с малым вирусом – бактериофагом MS2 с целью его обнаружения и охарактеризования; при этом, наряду с другими методами, применялся метод молекулярного докинга [5]. Разработка зондов для обнаружения коронавируса должна включать в себя изучение нековалентного взаимодействия красителей с его молекулярными компонентами. Разнообразие структур и свойств полиметиновых красителей (отличающихся длиной полиметиновой цепи, концевыми гетероциклами, заместителями в цепи и гетероциклах) потребовало использования моделирования *in silico* при отборе эффективных соединений – кандидатов для дальнейших исследований их взаимодействия с вирусом *in vitro*. Моделирование с помощью молекулярного докинга широко применяется при изучении взаимодействия различных терапевтических средств с белковыми компонентами SARS-CoV-2, что дает ценную информацию об энергии взаимодействия (или сродстве) молекулы субстрата с выбранными белковыми компонентами и центрах связывания субстрата с данными белками [6–8].

В настоящей работе методом молекулярного докинга *in silico* проведено исследование некова-

лентного взаимодействия различных классов полиметиновых и скварилиевых красителей (всего 45 соединений) с одним из важнейших структурных компонентов коронавируса SARS-CoV-2 – спайк-протеином (Spike protein, S), образующим “шипы” на поверхности вирусной частицы. Для выявления влияния заряда на это взаимодействие изучались как катионные, так и анионные красители.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты по молекулярному докингу проводились с использованием веб-сайта DockThor [9, 10] через веб-интерфейс. Структура белка-мишени S взята на сайте DockThor. Она также доступна на сайте Protein Data Bank (PDB ID 7BZ5) [11].

В PDB-файле структуры спайк-белка были добавлены атомы водорода и оптимизированы водородные связи (pH 7), антитела и небелковые молекулы удалены, остатки селенометионина (Se–Met) в структуре заменены на метиониновые остатки (Met) (DockThor). Предложенная структура белка-мишени использована как есть, дополнительная настройка протонирования остатков аминокислот не проводилась. Эксперименты выполняли в режиме “слепого” докинга (blind docking), размер решетки аппроксимации – 40 Å, центр  $x = -30.68$ ,  $y = 30.43$ ,  $z = 22.38$ , с шагом дискретизации, равным 0.42 Å. При анализе результатов брались в расчет шесть наилучших конфигураций.

Для создания PDB-структур красителей-лигандов и оптимизации их геометрии (силовое поле MMFF94) применяли молекулярный редактор Avogadro [12, 13]. Пакет UCSF Chimera ([14, 15] использовался для 3D-визуализации и анализа результатов докинга.

Исследовались симметричные монометин-, триметин-, пентаметин- и гептаметицианины (катионные и анионные) с различными гетероциклами (бензимидазол, бензтиазол, бензоксазол) и заместителями в гетероциклах. Триметицианины (карбоцианины) имели также различные заместители в мезо-положении полиметиновой цепи (CH<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CH<sub>3</sub>O, CH<sub>3</sub>S, Cl), поскольку мезо-замещенные тиакарбоцианины ранее были охарактеризованы как эффективные зонды для биомолекул [16]. Структуры цианиновых красителей изображены на рис. 1. Исследовали также скварилиевые красители, в том числе скварилиевые индо- и тиацианины, имеющие анионные сульфогруппы (см. рис. 2).

В качестве исходных конформаций в случаях моно-, пента- и гептаметицианинов брали транс-изомеры красителей [17]. О стабильности возможных комплексов краситель–белок судили по знаку и величине общей энергии системы  $E_{tot}$ , по-

лученной в результате докинга: образование стабильных комплексов возможно при достаточно низких (т.е. больших по абсолютной величине) отрицательных значениях энергии.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

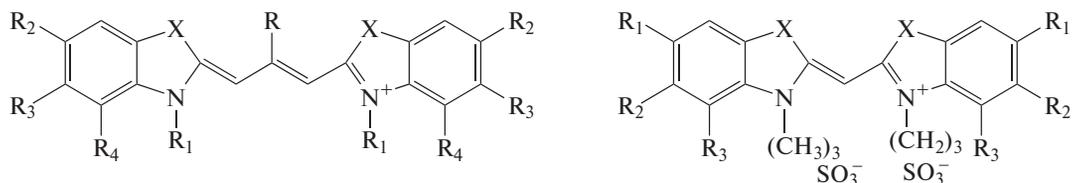
### Докинг катионных цианиновых красителей

Исследовано взаимодействие с S десяти катионных тиа- и оксатриметицианиновых красителей, отличающихся заместителями в мезо-положении полиметиновой цепи и концевых гетероциклов (структуры K1–K10, см. рис. 1). Исходные структуры мезо-замещенных триметицианинов соответствовали их цис-конфигурации как наиболее устойчивой для этих красителей в водном растворе [18]. Исследование показало, что нековалентное взаимодействие с белком может приводить к изменению изомерной конфигурации молекул красителей. В частности, для тиакарбоцианинов K1–K4 оказываются характерными искаженные транс-конфигурации, а для оксаккарбоцианина K8 – сильно скрученная цис-форма. Молекулы красителей располагаются на расстоянии 7–10 Å от остатков Leu184, Glu183, Phe131, Phe96.

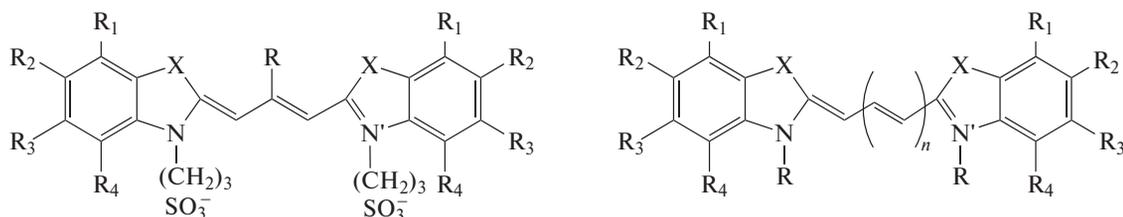
Для всех красителей характерны положительные значения общей энергии  $E_{tot}$ , которая в среднем составляет  $31.24 \pm 6.0$  ккал · моль<sup>-1</sup>; наименьшее значение  $E_{tot}$  получено для оксаккарбоцианина K8 ( $22.85 \pm 1.07$  ккал · моль<sup>-1</sup>). Высокие положительные значения  $E_{tot}$  говорят о нестабильности комплексов катионных полиметиновых красителей с S. Вследствие этого наше исследование в дальнейшем было сконцентрировано главным образом на анионных полиметиновых красителях.

### Докинг анионных цианиновых красителей

**Монометицианины.** Был проведен докинг с S ряда из шести анионных монометицианинов, имеющих бензоксазолные и бензтиазолные концевые гетероциклы и отличающихся заместителями в гетероциклических остатках (рис. 1, структуры 1.1–1.6). Молекулы красителей имеют отрицательный заряд благодаря двум сульфопропильным группам в положениях 3 и 3'. Для большинства исследованных красителей (за исключением 1.4) получены отрицательные значения  $E_{tot}$  (см. табл. 1), что указывает на способность этих красителей образовывать стабильные комплексы с S. Монометицианины располагаются на расстоянии 6–8 Å от остатков As95, Phe131, Leu185; конфигурации тиацианиновых красителей соответствуют скрученным транс-изомерам, в случае оксацианинов – более плоским транс-конфигурациям. Пространственная иллюстрация докинга комплекса красителя 1.5 с S приведена на рис. 3а.

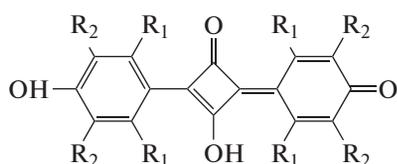


- 1 X = S, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 2 X = S, R = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub> = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 3 X = S, R = -OCH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 4 X = S, R = -SCH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 5 X = S, R = -Cl, R<sub>1</sub> = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 6 X = S, R = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub> = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = -OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 7 X = S, R = R<sub>2</sub> = -OCH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 8 X = O, R = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub> = -CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 9 X = O, R = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub> = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = -CH<sub>3</sub>  
 10 X = O, R = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub> = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>2</sub> = -OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H
- 1.1 X = S, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H  
 1.2 X = S, R<sub>1</sub> = H, R<sub>2,3</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>  
 1.3 X = S, R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = H, R<sub>2</sub> = -OCH<sub>3</sub>  
 1.4 X = S, R<sub>1,3</sub> = -OCH<sub>2</sub>O-, R<sub>2</sub> = H  
 1.5 X = O, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H  
 1.6 X = O, R<sub>1</sub> = -OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = H



- 2.1 X = S, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 2.2 X = S, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = -OCH<sub>3</sub>  
 2.3 X = S, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = -Cl  
 2.4 X = S, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>  
 2.5 X = S, R = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>2</sub> = -OCH<sub>3</sub>  
 2.6 X = S, R = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, R<sub>3,4</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>  
 2.7 X = S, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, R<sub>3,4</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>  
 2.8 X = S, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1,2</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 2.9 X = S, R = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>2,3</sub> = -OCH<sub>2</sub>O-  
 2.10 X = O, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 2.11 X = O, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = -CH<sub>3</sub>  
 2.12 X = O, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = -OCH<sub>3</sub>  
 2.13 X = O, R = -C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>  
 2.14 X = O, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, R<sub>3,4</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>  
 2.15 X = O, R = -CH<sub>3</sub>, R<sub>1,2</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H
- n = 2 R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>
- 3.1 X = S, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 3.2 X = S, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, R<sub>2,3</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>  
 3.3 X = S, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = -OCH<sub>3</sub>  
 3.4 X = S, R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>2,3</sub> = -OCH<sub>2</sub>O-  
 3.5 X = O, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = -OCH<sub>3</sub>  
 3.6 X = O, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H
- n = 3 R = -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>SO<sub>3</sub><sup>-</sup>
- 4.1 X = -C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub><sup>-</sup>, R<sub>1,2</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 4.2 X = S, R<sub>1,2</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 4.3 X = S, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, R<sub>3,4</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>  
 4.4 X = S, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = -OCH<sub>3</sub>  
 4.5 X = S, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 4.6 X = O, R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>2,3</sub> = -OCH<sub>2</sub>O-  
 4.7 X = O, R<sub>1,2</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H  
 4.8 X = O, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H, R<sub>3,4</sub> = -C<sub>4</sub>H<sub>4</sub><sup>-</sup>  
 4.9 X = O, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = -OCH<sub>3</sub>  
 4.10 X = O, R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = H

Рис. 1. Структурные формулы изученных катионных и анионных моно-, три-, пента- и гептаметицианиновых красителей.



СК1  $R_1 = R_2 = H$

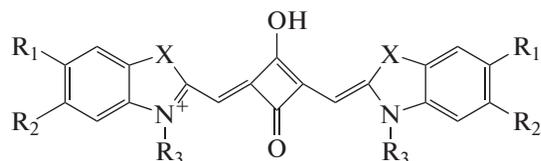
СК2  $R_1 = H, R_2 = -I$

СК3  $R_1 = -OH, R_2 = -I$

СК4  $R_1 = -OH, R_2 = H$

СК5  $R_1 = H, R_2 = -Br$

СК6  $R_1 = -OH, R_2 = -Br$



СК1.1  $X = -C(CH_3)_2-, R_1 = -SO_3^-, R_2 = H, R_3 = -C_2H_5$

СК1.2  $X = -C(CH_3)_2-, R_1 = R_2 = H, R_3 = -C(CH_2)_3SO_3^-$

СК1.3  $X = S, R_1 = R_2 = H, R_3 = -(CH_2)_3SO_3^-$

СК1.4  $X = S, R_1 = -OCH_3, R_2 = H, R_3 = -(CH_2)_3SO_3^-$

СК1.5  $X = S, R_1 = -CH_3, R_2 = H, R_3 = -(CH_2)_3SO_3^-$

СК1.6  $X = S, R_1 = R_2 = -Cl, R_3 = -(CH_2)_3SO_3^-$

СК1.7  $X = S, R_1 = -SO_3^-, R_2 = H, R_3 = -C_2H_5$

Рис. 2. Структурные формулы изученных скварилиевых красителей.

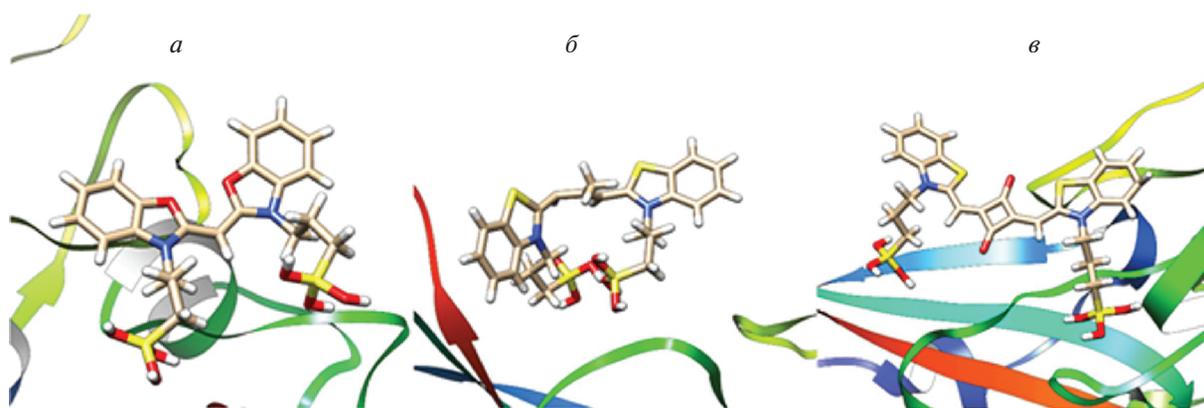


Рис. 3. Пространственные иллюстрации докинга красителей с S (структура PDB ID 7BZ5): а – окса-монометинцианина 1.5, б – тиакарбоцианина 2.1 и в – скварилиевого красителя СК1.3.

**Триметинцианины.** Изучено взаимодействие с S ряда из 15 *мезо*-замещенных анионных тиа- и оксатриметинцианиновых (карбоцианиновых) красителей, отрицательный заряд молекулам которых придает наличие двух сульфогрупп (см. рис. 1, структуры 2.1–2.15). Исходные структуры красителей соответствовали их *цис*-конфигурации как наиболее устойчивой для *мезо*-замещенных анионных карбоцианинов в водном растворе [19]. В эксперименте *in silico* получены результаты, указывающие на способность некоторых красителей ряда образовывать энергетически устойчивые комплексы с S. В частности, для соединений 2.1–2.3, 2.9–2.11, 2.13, 2.15 получены отрицательные значения общей энергии ( $E_{tot} < 0$ , см. табл. 1), причем наименьшие значения  $E_{tot}$  – для оксакрбоцианинов 2.10 и 2.11. Наличие объемистых фенильных заместителей, а также конденсированных бензольных циклов в концевых группах красителей может приводить к повы-

шению величины  $E_{tot}$  до положительных значений (для красителей 2.4–2.8, 2.14). Высокие положительные значения  $E_{tot}$  говорят о нестабильности комплексов красителей 2.4–2.8, 2.12, 2.14 с S. В связанном с S состоянии пространственные структуры оксакрбоцианиновых красителей соответствуют в основном скрученным *цис*- и перпланарным конфигурациям, для тиа-красителей могут быть также характерны перпланарные структуры и искаженные (неплоские) *транс*-изомеры. В связанных с S формах триметинцианины расположены на расстоянии 5–8 Å от Glu183 и на расстоянии 10–12 Å от остатков Phe96, Phe131. Пространственное изображение комплекса красителя 2.1 с S приведено на рис. 3б.

**Пентаметинцианины.** Молекулярный докинг ряда из шести тиа- и оксапентаметинцианиновых красителей (дикарбоцианинов; структуры 3.1–3.6 на рис. 1) показал, что такие соединения потенциально могут образовывать стабильные комплексы с

Таблица 1. Результаты молекулярного докинга анионных моно- и триметинцианиновых красителей с S: общая энергия взаимодействия  $E_{tot}$ , энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий  $E_{vdW}$  и электростатическая энергия  $E_{el}$

Краситель	X	$E_{tot}$ , ккал/моль	$E_{vdW}$ , ккал/моль	$E_{el}$ , ккал/моль
Монометинцианины				
1.1	S (тиа-)	$-41.5 \pm 2.5$	$-8.2 \pm 2.3$	$-38.6 \pm 5.7$
1.2		$-13.1 \pm 0.7$	$-11.8 \pm 6.6$	$-33.1 \pm 6.2$
1.3		$-29.3 \pm 0.9$	$-10.0 \pm 6.0$	$35.0 \pm 5.3$
1.4		$35.8 \pm 1.4$	$-12.5 \pm 3.0$	$-33.2 \pm 3.1$
1.5	O (окса-)	$-58.6 \pm 3.2$	$-11.7 \pm 5.8$	$-34.4 \pm 7.6$
1.6		$-52.3 \pm 2.8$	$-12.5 \pm 5.7$	$-35.5 \pm 5.4$
Триметинцианины				
2.1	S (тиа-)	$-13.7 \pm 1.6$	$-5.9 \pm 4.8$	$-38.6 \pm 5.9$
2.2		$-24.2 \pm 0.95$	$-18.5 \pm 1.2$	$-32.4 \pm 1.5$
2.3		$-19.1 \pm 1.6$	$-5.2 \pm 1.2$	$-41.7 \pm 4.1$
2.4		$18.8 \pm 0.47$	$-14.9 \pm 6.2$	$-41.9 \pm 9.1$
2.5		$0.38 \pm 1.02$	$-6.89 \pm 4.2$	$-41.4 \pm 5.0$
2.6		$7.06 \pm 2.8$	$-16.5 \pm 6.7$	$-30.2 \pm 8.0$
2.7		$48.3 \pm 1.3$	$-12.7 \pm 8.1$	$-37.1 \pm 5.0$
2.8		$84.5 \pm 1.0$	$-18.0 \pm 4.7$	$-31.6 \pm 5.0$
2.9		$-18.2 \pm 0.97$	$-10.2 \pm 7.0$	$-38.0 \pm 6.2$
2.10		O (окса-)	$-32.4 \pm 0.46$	$-10.4 \pm 7.9$
2.11	$-30.0 \pm 0.50$		$-10.6 \pm 6.3$	$-37.3 \pm 6.4$
2.12	$63.5 \pm 2.1$		$-6.9 \pm 5.1$	$-40.6 \pm 5.7$
2.13	$-1.05 \pm 0.78$		$-17.6 \pm 2.7$	$-34.9 \pm 5.0$
2.14	$51.9 \pm 0.71$		$-11.6 \pm 3.7$	$-35.4 \pm 4.13$
2.15	$-9.5 \pm 1.3$		$-15.8 \pm 4.8$	$-32.3 \pm 7.2$

S (см. табл. 2). Для пентаметинцианинов характерны отрицательные значения общей энергии (за исключением красителя 3.2), при этом, как и в случае триметинцианинов, наименьшие значения  $E_{tot}$  получены для окса-красителей (3.6 и 3.5, см. табл. 2).

В связанном с белком состоянии конфигурации тиа-красителей (структуры 3.1–3.4) соответствуют искаженным *транс*-изомерам и скрученным перпланарным конфигурациям. Для окса-красителей 3.5 и 3.6 моделирование дает более плоские *транс*-конфигурации.

**Гептаметинцианины.** Докинг с S ряда анионных тиа- 4.2–4.6 и оксагептаметинцианинов 4.7–4.10 (трикарбоцианинов) показал для красителей без заместителей в концевых гетероциклических

ядрах молекул 4.5 и 4.10 отрицательные значения  $E_{tot}$  (см. табл. 2). Введение метокси-заместителей в концевые группы (красители 4.4, 4.9) еще снижает значение  $E_{tot}$  для тиацианина и мало влияет на  $E_{tot}$  окса-красителя. В то же время введение дополнительных конденсированных бензольных циклов в гетероциклические ядра молекул резко повышает величину  $E_{tot}$  и делает ее положительной для красителей 4.2, 4.3 и 4.8. Аналогично для индоцианина 4.1 с конденсированными бензольными циклами (индоцианинового зеленого) получено положительное значение  $E_{tot}$  (см. табл. 2). Молекулы гептаметинцианинов в комплексе с S располагаются на расстоянии 6–13 Å от остатков Pro93, AS94, Phe131, Glu183; конфигурации моле-

Таблица 2. Результаты молекулярного докинга анионных пента-, гептаметинцианиновых и скварилиевых красителей с S: общая энергия взаимодействия  $E_{tot}$ , энергия ван-дер-ваальсовых взаимодействий  $E_{vdW}$  и электростатическая энергия  $E_{el}$

Краситель	X	$E_{tot}$ , ккал/моль	$E_{vdW}$ , ккал/моль	$E_{el}$ , ккал/моль
Пентаметинцианины				
3.1	S (тиа-)	$-30.8 \pm 2.0$	$-10.5 \pm 5.6$	$-39.8 \pm 7.0$
3.2		$58.3 \pm 1.14$	$-22.4 \pm 3.4$	$-33.5 \pm 2.6$
3.3		$-34.6 \pm 2.1$	$-11.8 \pm 3.4$	$-40.5 \pm 4.8$
3.4		$-11.4 \pm 0.89$	$-10.4 \pm 5.3$	$-45.3 \pm 4.6$
3.5	O (окса-)	$-39.2 \pm 3.2$	$-5.3 \pm 7.6$	$-47.9 \pm 4.9$
3.6		$-53.4 \pm 1.42$	$-13.3 \pm 6.0$	$-37.7 \pm 6.4$
Гептаметинцианины				
4.1	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (индо-)	$15.9 \pm 0.77$	$-20.6 \pm 5.9$	$-35.7 \pm 5.3$
4.2	S (тиа-)	$10.3 \pm 1.24$	$-16.3 \pm 2.46$	$-39.4 \pm 4.3$
4.3		$60.7 \pm 2.6$	$-17.3 \pm 6.7$	$-41.0 \pm 8.5$
4.4		$-45.0 \pm 2.0$	$-18.7 \pm 3.8$	$-30.1 \pm 6.1$
4.5		$-21.7 \pm 1.1$	$-16.0 \pm 5.8$	$-36.3 \pm 6.4$
4.6		$-20.0 \pm 0.72$	$-10.9 \pm 9.0$	$-45.2 \pm 11.9$
4.7	O (окса-)	$-12.7 \pm 3.3$	$-17.2 \pm 3.7$	$-35.4 \pm 6.0$
4.8		$59.1 \pm 0.95$	$-15.6 \pm 7.2$	$-36.9 \pm 7.9$
4.9		$-32.8 \pm 1.04$	$-13.0 \pm 5.4$	$-38.8 \pm 4.3$
4.10		$-38.4 \pm 1.65$	$-8.3 \pm 4.0$	$-45.1 \pm 6.3$
Скварилиевые красители				
СК1.1	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	$19.6 \pm 1.89$	$-12.9 \pm 3.5$	$-33.4 \pm 4.6$
СК1.2		$22.7 \pm 0.86$	$-2.83 \pm 3.8$	$-49.1 \pm 5.6$
СК1.3	S	$-63.0 \pm 3.7$	$-7.84 \pm 5.1$	$-50.5 \pm 7.9$
СК1.4		$39.2 \pm 6.7$	$-2.18 \pm 2.1$	$-54.8 \pm 4.9$
СК1.5		$39.2 \pm 2.6$	$-0.91 \pm 5.6$	$-57.9 \pm 4.8$
СК1.6		$3.31 \pm 1.73$	$-13.87 \pm 5.8$	$-45.1 \pm 9.0$
СК1.7		$-60.7 \pm 2.2$	$-7.1 \pm 1.30$	$-46.0 \pm 2.4$

кул красителей соответствуют в основном *транс*-изомерам.

#### Докинг скварилиевых красителей

Наряду с классическими полиметиновыми красителями было исследовано взаимодействие с S их родственных соединений – скварилиевых красителей. Проведен молекулярный докинг с S 13 скварилиевых красителей, имеющих различную структуру и заряды молекул (нейтральные СК1–СК6 и анионные СК1.1–СК1.7 с сульфогруппами, см. рис. 2). Исходными структурами красителей СК1.1–СК1.7 служили *цис*-изомеры. Для всех нейтральных соединений (СК1–СК6)

получены положительные значения  $E_{tot}$ . Так, для СК3, имеющего ОН-группы в концевых циклах,  $E_{tot} = 45.7 \pm 1.69$  ккал · моль<sup>-1</sup>, тогда как докинг не имеющего таких заместителей красителя СК1 дал значение  $E_{tot}$  почти в 11 раз меньше ( $E_{tot} = 4.1 \pm 0.36$  ккал · моль<sup>-1</sup>). Довольно высокие положительные значения  $E_{tot}$  говорят о нестабильности комплексов таких красителей с S.

В результате докинга с S скварилиевых красителей, имеющих индольные и бензтиазольные гетерогруппы (рис. 2, СК1.1–СК1.7) и обладающих отрицательным зарядом за счет наличия двух сульфогрупп, для тиа-красителей СК1.3 и СК1.7 получены близкие, довольно низкие значения  $E_{tot}$

(табл. 2). В комплексе структура красителя **СК1.3** соответствует плоской конформации, краситель **СК1.7** скручен и концевые гетерогруппы депланированы. Молекулы красителей **СК1.3** и **СК1.7** располагаются на расстоянии 5–10 Å от остатков Pro130, Pro93, Glu132, Glu183. Для остальных скварилиевых красителей получены положительные значения  $E_{tot}$ . Пространственное строение комплекса красителя **СК1.3** с S, полученное в результате докинга, изображено на рис. 3в.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показывают, что основное влияние на стабильность нековалентных комплексов краситель–S оказывает общий заряд молекулы красителя. Для катионных (или нейтральных в случае скварилиевых красителей) молекул красителя величина  $E_{tot}$  положительна, что указывает на неустойчивость комплексов с S. В то же время отрицательные значения  $E_{tot}$ , указывающие на возможную устойчивость соответствующих комплексов, получены только для анионных красителей. Все это свидетельствует о существенной роли кулоновских взаимодействий при связывании красителя с S. К тому же, для всех изученных анионных красителей величина  $E_{el}$ , характеризующая кулоновские взаимодействия, отрицательна и по абсолютной величине превышает величину  $E_{vdW}$ , характеризующую ван-дер-ваальсовы взаимодействия в комплексе (табл. 1 и 2), что также указывает на ведущую роль кулоновских сил при образовании комплекса.

Наряду с зарядом большое влияние на устойчивость комплексов с S оказывают структурные различия. В частности, большую роль играет наличие или отсутствие дополнительных конденсированных бензольных или диоксиметиленовых циклов в концевых гетероядрах молекулы. Как можно видеть, многие красители, не имеющие таких циклов (красители **1.1**, **1.5**, **2.1**, **2.10**, **3.1**, **3.6**, **4.5**, **4.10**, **СК1.3**), демонстрируют отрицательные величины  $E_{tot}$ , что указывает на устойчивость соответствующих комплексов. В то же время введение конденсированных циклов или объемистых заместителей (например,  $-C_6H_5$ ) часто приводит к нестабильности комплексов, что выражается в положительных значениях  $E_{tot}$  (красители **1.4**, **2.4**, **2.7**, **2.8**, **2.14**, **3.2**, **4.1–4.3**, **4.8**). Это, возможно, обусловлено меньшей компактностью последних и большими стерическими препятствиями для образования комплекса, чем в случае красителей без дополнительных циклов. Кроме того, во многих случаях можно отметить более отрицательные значения  $E_{tot}$  для окса-красителей по сравнению с соответствующими тиа- (и индо-) аналогами (ср. пары красителей **1.5–1.1**, **2.10–2.1**, **2.15–2.8**, **3.6–3.1**, **3.5–3.3**, **4.10–4.5**, **4.7–4.2** и **4.1**, хотя из этого

правила есть и исключения – пары **2.12–2.2** и **4.9–4.4**). Возможно, это также связано с более компактной структурой окса-красителей по сравнению с тиа- и индо-аналогами.

По критерию устойчивости комплексов с S – существенно отрицательной величине  $E_{tot}$  – можно отобрать в качестве возможных зондов следующие красители: монометинцианины **1.1–1.3**, **1.5**, **1.6**; триметинцианины **2.1–2.3**, **2.9–2.11**, **2.15**; пентаметинцианины **3.1**, **3.3–3.6**; гептаметинцианины **4.4–4.7**, **4.9**, **4.10**; скварилиевые красители **СК1.3** и **СК1.7**.

Если красители используются в качестве спектрально-флуоресцентных зондов, тогда наряду с устойчивостью комплексов большую роль играет то, насколько резко изменяются спектрально-флуоресцентные свойства красителей при комплексообразовании. При нековалентном связывании с биомолекулами для полиметиновых красителей характерны спектральные сдвиги и усиление флуоресценции [2]. Особенно резкий рост интенсивности флуоресценции наблюдается для мезо-замещенных карбоцианинов (триметинцианинов) вследствие сдвига подвижного *цис-транс*-равновесия, что позволяет обнаруживать очень малые концентрации биомолекул при их использовании в качестве флуоресцентных зондов [20]. С этой точки зрения весьма перспективными для дальнейших практических исследований могут быть тиакарбоцианины **2.2**, **2.3** и **2.9** и оксакарбоцианины **2.10** и **2.11**.

Для использования в биологических объектах важно, чтобы красители поглощали и флуоресцировали в “окне прозрачности” биологических тканей (в области длин волн >600–650 нм [21, 22]). Этим условиям удовлетворяют красители с более длинной полиметиновой цепочкой – пента-, гептаметинцианины, скварилиевые красители. К перспективным здесь можно отнести почти все исследованные нами пентаметинцианины (кроме **3.2**), а также гептаметинцианины **4.4–4.7**, **4.9**, **4.10** и скварилиевые красители **СК1.3** и **СК1.7**.

Наряду со спектрально-флуоресцентными свойствами при связывании с биомолекулами могут изменяться и фотохимические свойства полиметиновых красителей. В частности, для триметинцианинов наблюдается рост квантового выхода в триплетное состояние [23, 24]. Это свойство в перспективе может быть использовано для фотодинамической терапии – повреждения под действием света биомолекулы-мишени, например компонента вируса, с которым связывается краситель, и, таким образом, инактивации самого вируса. В настоящее время для фотохимической инактивации коронавируса MERS-CoV и SARS-CoV-2 в сыворотке крови используется рибофлавин в сочетании с облучением УФ-светом [25, 26]. Настоящая работа открывает перспективу применения

для этой же цели триметинцианинов, образующих комплексы с биокомпонентами вирусов; при этом можно было бы использовать видимый свет, глубже проникающий в биоткани, чем ультрафиолетовое излучение. Триметинцианины в триплетном состоянии могли бы инициировать повреждение биомолекулы в таком комплексе.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Путем моделирования с помощью метода молекулярного докинга предпринято исследование нековалентного взаимодействия различных классов полиметиновых (цианиновых и скварилиевых) красителей с одним из структурных белков коронавируса SARS-CoV-2 – спайк-протеином (S). Показано, что катионные или нейтральные красители не образуют устойчивых комплексов с данным белком, но обнаружен ряд анионных красителей, которые потенциально могли бы образовывать такие комплексы. Это позволило провести отбор красителей для дальнейших практических исследований с целью разработки спектрально-флуоресцентных зондов для обнаружения SARS-CoV-2. Показана также перспектива использования триметинцианиновых красителей для фотодинамической терапии – инактивации коронавируса.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shindy H.A.* // *Dyes Pigm.* 2017. V. 145. P. 505; <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.06.029>
2. *Tatikolov A.S.* // *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 2012. V. 13. № 1. P. 55; <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.11.001>
3. *Татиколов А.С., Пронкин П.Г., Шведова Л.А., Панова И.Г.* // *Хим. физика.* 2019. Т. 38. № 12. С. 11; <https://doi.org/10.1134/S0207401X19120185>
4. *Sivaraman D., Biswas P., Cella L.N., Yates M.V., Chen W.* // *Trends Biotechnol.* 2011. V. 29. № 7. P. 307; <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.02.006>
5. *Vus K., Tarabara U., Balklava Z. et al.* // *J. Mol. Liq.* 2020. V. 302. P. 112569; <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112569>
6. *Beg M.A., Athar F.* // *Pharm. Pharmacol. Intern. J.* 2020. V. 8. № 3. P. 163; <https://doi.org/10.15406/ppij.2020.08.00292>
7. *Tazjkeh-Lemeski E., Moradi S., Raoufi R. et al.* // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020. P. 0739; <https://doi.org/10.15406/ppij.2020.08.00292>
8. *Al-Masoudi N.A., Elias R.S., Saeed B.* // *Biointerface Res. Appl. Chem.* 2020. V. 10. № 5. P. 6444; <https://doi.org/10.33263/BRIAC105.64446459>
9. *De Magalhães C.S., Barbosa H.J.C., Dardenne L.E.* *Genetic and Evolutionary Computation (GECCO 2004). Lecture Notes in Computer Science.* V. 3102. Berlin–Heidelberg: Springer, 2004; [https://doi.org/10.1007/978-3-540-24854-5\\_382004](https://doi.org/10.1007/978-3-540-24854-5_382004)
10. *De Magalhães C.S., Almeida D.M., Barbosa H.J.C., Dardenne L.E.* // *Inf. Sci.* 2014. V. 289. P. 206; <https://doi.org/10.1016/j.ins.2014.08.002>
11. *Wu Y., Wang F., Shen C. et al.* // *Science.* 2020. V. 368. № 6496. P. 1274; <https://doi.org/10.1126/science.abc2241>
12. *Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C. et al.* // *J. Cheminformatics.* 2012. V. 4. P. 17; <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
13. Avogadro: инструмент для построения молекул и визуализации с открытым исходным кодом. Версия 1.2.0; <http://avogadro.cc> (дата обращения: 11.08.2020).
14. *Yang Z., Lasker K., Schneidman-Duhovny D. et al.* // *J. Struct. Biol.* 2012. V. 179. P. 269; <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2011.09.006>
15. UCSF Chimera: система визуализации для поисковых исследований и анализа. Версия 1.13.1; <http://www.rbvi.ucsf.edu/chimera> (дата обращения: 11.08.2020).
16. *Татиколов А.С., Акимкин Т.М., Кашин А.С., Панова И.Г.* // *Химия высоких энергий.* 2010. Т. 44. № 3. С. 252.
17. *Колесников А.М., Михайленко Ф.А.* // *Успехи химии.* 1987. Т. 56. С. 466.
18. *Акимкин Т.М., Татиколов А.С., Ярмолюк С.М.* // *Химия высоких энергий.* 2011. Т. 45. № 3. С. 252.
19. *Khimenko V., Chibisov A.K., Görner H.* // *J. Phys. Chem. A.* 1997. V. 101. P. 7304; <https://doi.org/10.1021/jp971472b>
20. *Pronkin P.G., Shvedova L.A., Tatikolov A.S.* // *Biophys. Chem.* 2020. V. 261. P. 106378; <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106378>
21. *Красников И.В., Привалов В.Е., Сетейкин А.Ю., Фотиади А.Э.* // *Вестн. СПбГУ.* 2013. Сер. 11. Вып. 4. С. 202.
22. *Patterson M.S., Wilson B.C., Wyman D.R.* // *Lasers Med. Sci.* 1991. V. 6. P. 379; <https://doi.org/10.1007/bf02042460>
23. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С., Скляренко В.И., Кузьмин В.А.* // *Химия высоких энергий.* 2006. Т. 40. № 4. С. 295.
24. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С., Скляренко В.И., Кузьмин В.А.* // *Там же.* № 6. С. 451.
25. *Keil S.D., Bowen R., Marschner S.* // *Transfusion.* 2016. V. 56. P. 2948; <https://doi.org/10.1111/trf.13860>
26. *Keil S.D., Ragan I., Yonemura S. et al.* // *Vox Sang.* 2020. V. 115. P. 495; <https://doi.org/10.1111/vox.12937>

СТРОЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ,  
КВАНТОВАЯ ХИМИЯ, СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 535.35:547.97:547.96

ЭЛЕМЕНТАРНЫЕ ФОТОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ С УЧАСТИЕМ  
МЕЗО-ЗАМЕЩЕННЫХ АНИОННЫХ ЦИАНИНОВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ  
В РАСТВОРАХ И КОМПЛЕКСАХ С СЫВОРОТОЧНЫМИ АЛЬБУМИНАМИ

© 2021 г. А. С. Татиколов\*

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

\*E-mail: tatikolov@mail.ru

Поступила в редакцию 02.07.2020;

после доработки 02.07.2020;

принята в печать 21.09.2020

Методом импульсного фотолиза изучены первичные фотохимические процессы (фотоизомеризация, образование триплетного состояния) с участием мезо-замещенных анионных цианиновых красителей 3,3'-ди( $\gamma$ -сульфопропил)-4,5,4',5'-добензо-9-этилтиакарбоцианин-бетаина, 3,3'-ди( $\gamma$ -сульфопропил)-4,5,4',5'-добензо-9-метилтиакарбоцианин-бетаина, 3,3'-ди( $\gamma$ -сульфопропил)-5,5'-диметокси-9-этилтиакарбоцианин-бетаина и 3,3'-ди-( $\gamma$ -сульфопропил)-5,6,5',6'-ди-(метилндиокси)-9-этилтиакарбоцианин-бетаина, связанных в нековалентные комплексы с сывороточными альбуминами человека и быка. Для сравнения изучена фотохимия этих красителей в растворах (в воде и диоксане). Обнаружено, что при импульсном фотолизе растворов красителей в воде не наблюдается фотоизомеризации и образования триплетного состояния, однако в неполярном растворителе – диоксане образуются неустойчивые фотоизомеры. При этом не наблюдается образования триплетного состояния красителей в отсутствие кислорода. В то же время при импульсном фотолизе красителей в водном растворе в присутствии сывороточных альбуминов фотоизомеризации не наблюдается, но (в отсутствие кислорода) происходит образование (с последующей гибелью) триплетного состояния красителей. Определены константы скорости тушения триплетного состояния красителей молекулярным кислородом, которые оказались гораздо ниже константы скорости диффузионно-контролируемого тушения, что возможно объясняется затрудненным доступом кислорода к молекуле красителя в комплексе с альбумином.

*Ключевые слова:* цианиновые красители, сывороточные альбумины, *транс-цис*-изомеризация, триплетное состояние, тушение кислородом.

DOI: 10.31857/S0207401X21020163

## ВВЕДЕНИЕ

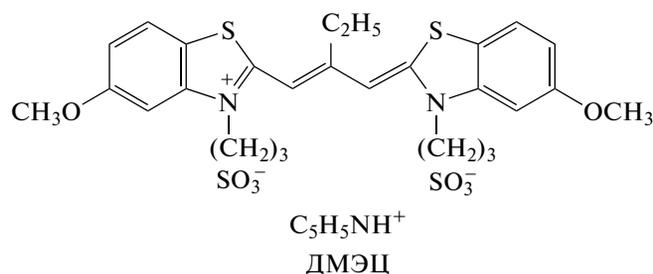
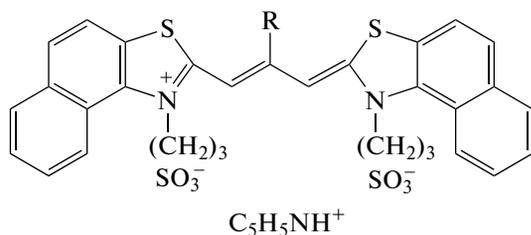
Широкое использование цианиновых (полиметиновых) красителей в науке и технике обусловлено уникальным набором спектрально-флуоресцентных и фотохимических свойств, в частности зависимостью их свойств от молекулярного окружения [1]. Это особенно характерно для мезо-замещенных карбоцианиновых красителей, для которых наблюдается подвижное равновесие между *цис*- и *транс*-изомерами красителя, которое зависит от полярности среды. При этом в полярных растворителях равновесие смещено в сторону *цис*-изомера, а в неполярных – в сторону *транс*-изомера [2]. Спектрально-флуоресцентные и фотохимические свойства *цис*- и *транс*-изомеров мезо-замещенных цианинов сильно различаются [2], что дает возможность использовать такие красители в качестве зондов для анализа и изучения различных структурно-организованных сред. В частности, мезо-замещенные карбоцианины были ис-

пользованы в качестве спектрально-флуоресцентных зондов для биомолекул: ДНК, сывороточных альбуминов, коллагенов, гиалуроновой кислоты, хондроитин-4-сульфата, солей желчных кислот [3–9]; при этом подробно изучались спектрально-флуоресцентные свойства красителей в присутствии биомолекул. Изучены также элементарные фотохимические процессы с участием цианиновых красителей в комплексах с биомолекулами, однако эти работы были посвящены главным образом красителям в комплексах с ДНК и в мицеллах солей желчных кислот [10–13]. Хотя известно, что ряд анионных полиметиновых красителей образует нековалентные комплексы с сывороточными альбуминами с высокими константами связывания [14], фотохимические процессы в таких комплексах ранее не изучались.

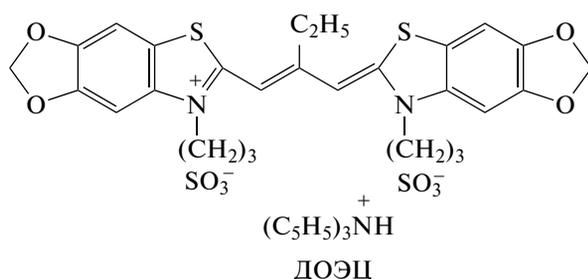
В настоящей работе методом импульсного фотолиза изучены элементарные фотохимические процессы в молекулах мезо-замещенных анион-

ных тиакарбоцианиновых красителей в комплексах с сывороточными альбуминами – человеческим и бычьим (САЧ и САБ соответственно). При этом изучались образование и гибель фотоизомеров и триплетного состояния красителей, а также тушение триплетного состояния кислородом. Были взяты анионные цианиновые красители, образующие с альбуминами комплексы с высокими константами связывания [14, 15]: 3,3'-ди( $\gamma$ -суль-

фопропил)-4,5,4',5'-дibenзо-9-этилтиакарбоцианин-бетаин (ДЭЦ), 3,3'-ди( $\gamma$ -сульфопропил)-4,5,4',5'-дibenзо-9-метилтиакарбоцианин-бетаин (ДМЦ), 3,3'-ди( $\gamma$ -сульфопропил)-5,5'-диметокси-9-этилтиакарбоцианин-бетаин (ДМЭЦ) и 3,3'-ди( $\gamma$ -сульфопропил)-5,6,5',6'-ди-(метилендиокси)-9-этилтиакарбоцианин-бетаин (ДОЭЦ). Для сравнения изучалась также фотохимия данных красителей в растворах (в воде и диоксане).



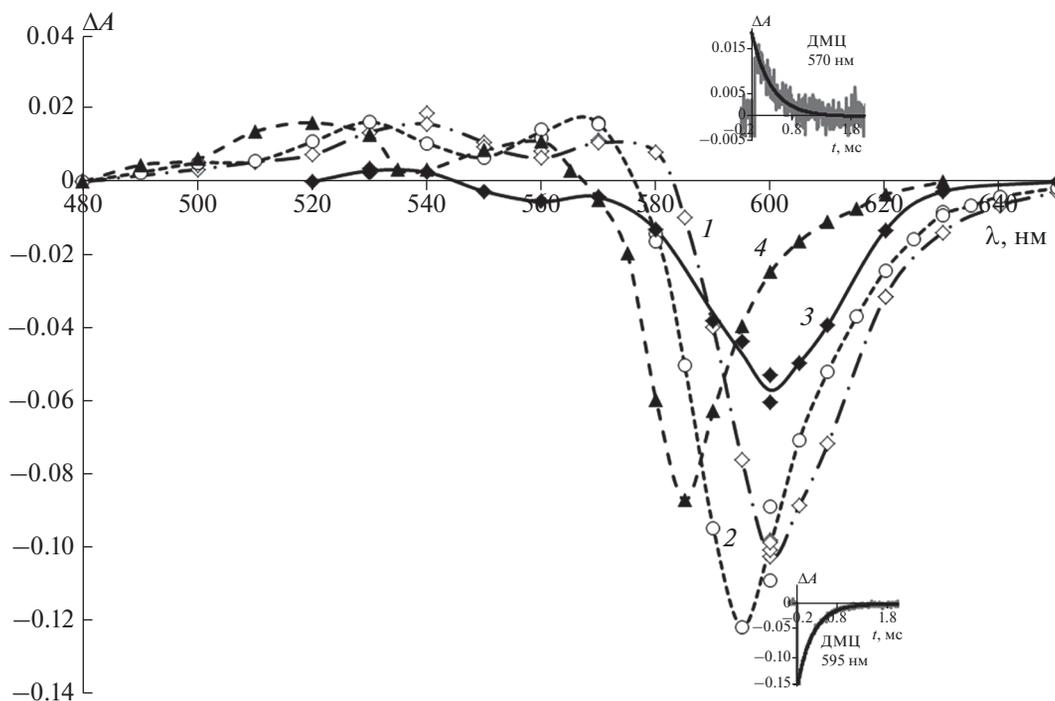
R =  $C_2H_5$  (ДЭЦ),  $CH_3$  (ДМЦ);



## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Красители ДЭЦ, ДМЦ, ДМЭЦ и ДОЭЦ представлены проф. Б.И. Шапиро (НИИ “Химфотопроект”, Москва); их чистота проверена методом тонкослойной хроматографии. Сывороточные альбумины (САЧ и САБ) приобретены у компании Sigma-Aldrich (USA). В качестве растворителей использовались: дистиллированная вода, диметилсульфоксид, диоксан (х.ч.). Для изучения фотохимии красителей в присутствии альбуминов были взяты концентрации альбуминов, достаточные для эффективного связывания красителей в комплекс с альбуминами. Для приготовления раствора красителей в диоксане предварительно готовили концентрированный раствор красителя в диметилсульфоксиде, затем его небольшой объем растворяли в диоксане (разбавление 1 : 1000, в случае ДМЦ и ДЭЦ – 1 : 16). Переход красителей в трансформу в диоксане контролировали по спектру поглощения: возникала длинноволновая полоса поглощения с максимумом при 603 нм для ДЭЦ [15], 595 нм – для ДМЦ, 585 нм – для ДМЭЦ, 600 нм

для – ДОЭЦ. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Эксперименты по импульсному фотолизу проводили на установке с возбуждением светом ксеноновой лампы типа ИФП-5000 (длительность вспышки на полувысоте – 10 мкс, энергия разряда – 50 Дж), использовали кварцевую кювету с длиной оптического пути, равной 20 см. Фотовозбуждение красителей осуществлялось через светофильтры ЗС-8. Освобождение растворов от кислорода при регистрации триплет-триплетного поглощения проводили на вакуумной установке. При определении констант скорости тушения триплетного состояния красителей кислородом изменяли давление воздуха в равновесии с раствором красителя в кювете, которое измеряли с помощью манометрической установки и использовали для определения концентрации кислорода в растворе [16] (по закону Генри с учетом парциального давления растворителя – воды). Все эксперименты выполнены при температуре  $(22 \pm 2)^\circ C$ .

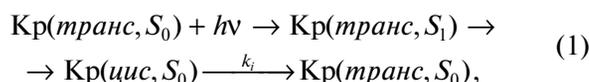


**Рис. 1.** Дифференциальные спектры поглощения фотоизомеров, полученные при импульсном фотолизе воздушно-насыщенных растворов красителей ДЭЦ (1), ДМЦ (2), ДОЭЦ (3) и ДМЭЦ (4)  $((1-2) \cdot 10^{-6}$  моль/л) в диоксане через 70 мкс после появления переднего фронта вспышки; на вставках – кинетические кривые гибели фотоизомера ДМЦ при  $\lambda = 570$  и 595 нм и их экспоненциальные аппроксимации.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Одно из основных фотохимических свойств цианиновых красителей – фотоизомеризация (в результате поворота относительно одной из С–С-связей полиметиновой цепи) при фотовозбуждении, за которым следует обратная темновая изомеризация фотоизомера – превращение в исходный изомер красителя. Процесс протекает через короткоживущее  $S_1$ -состояние красителя (время жизни  $< 1$  нс), поэтому кислород воздуха на фотоизомеризацию практически не влияет. Вследствие стерического влияния *мезо*-заместителя изучаемые красители в воде и других полярных растворителях находятся главным образом в виде *цис*-изомеров [2, 9, 15]. Как правило, *мезо*-замещенные тиакарбоцианиновые красители в форме *цис*-изомеров не фотоизомеризуются [2]. В соответствии с этим при импульсном фотолизе изучаемых красителей в водных растворах сигналы фотоизомеров не наблюдались (для ДЭЦ см. также [13]). Однако в неполярном растворителе – диоксане, где красители находятся в виде *транс*-изомеров [2, 9, 15], в присутствии воздуха наблюдаются сигналы, характерные для образования и гибели фотоизомеров красителей: отрицательное поглощение (выцветание) в области стационарного спектра поглощения *транс*-изомера красителя ( $\lambda_{max} = 585–600$  нм) и положительное поглощение в более коротковолно-

вой области ( $< 560–570$  нм). Это указывает на расхождение исходного *транс*-изомера в результате фотоизомеризации в *цис*-изомер и последующего возврата *транс*-изомера вследствие обратной темновой изомеризации образовавшегося *цис*-фотоизомера (дифференциальные спектры и кинетические кривые приведены на рис. 1):



где Кр – молекула красителя в форме *транс*- или *цис*-изомера в основном ( $S_0$ ) или возбужденном ( $S_1$ ) синглетном состоянии;  $k_i = 1/\tau_i$  – константа скорости обратной *цис*-*транс*-изомеризации ( $\tau_i$  – время жизни фотоизомера). Времена жизни *цис*-фотоизомеров изученных красителей близки и составляют 0.25–0.35 мс. Эти величины гораздо меньше, чем для *цис*-фотоизомера красителя 3,3'-диэтилтиакарбоцианина (ДТЦ), не имеющего *мезо*-заместителя (2–7 мс в различных растворителях [17]), что можно объяснить понижением изомеризационного барьера вследствие стерического влияния *мезо*-заместителя, приводящего к искажению плоской структуры *цис*-изомера красителя.

При импульсном фотолизе красителей в растворах (в воде и диоксане) в отсутствие кислорода не обнаружено сигналов помимо вышеописан-

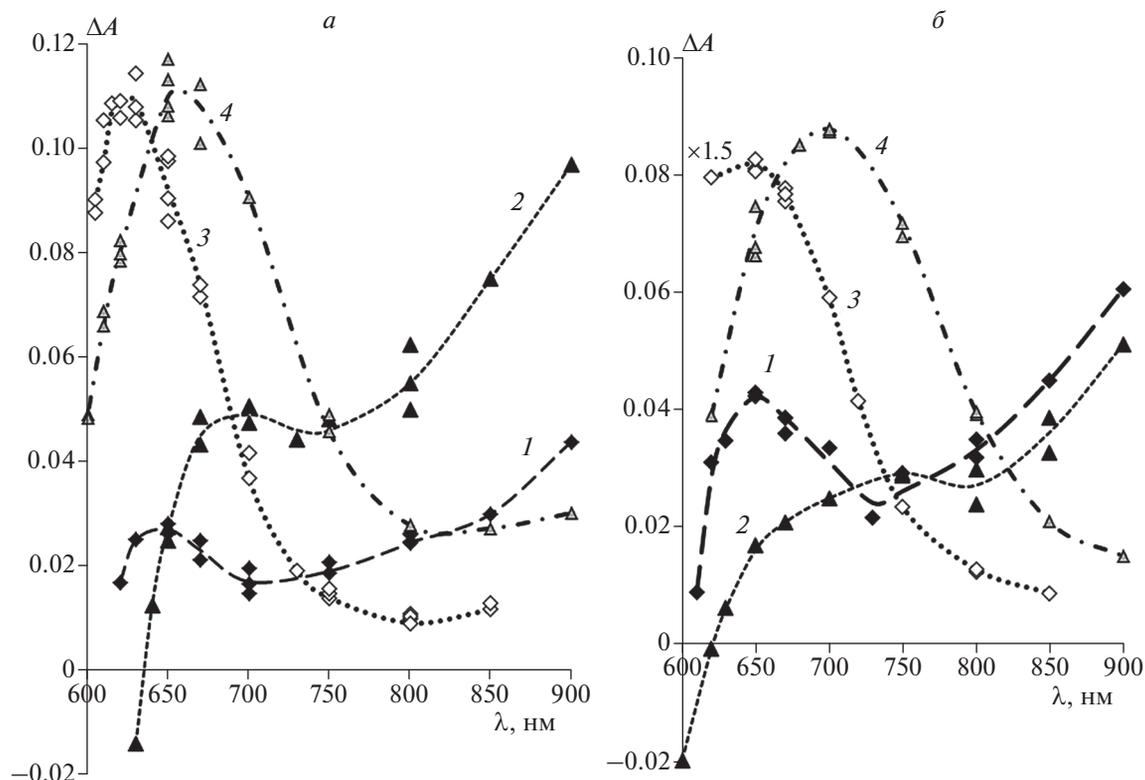
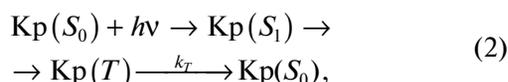


Рис. 2. Дифференциальные спектры поглощения триплетных состояний: а – ДЭЦ (1, 2) и ДМЭЦ (3, 4), б – ДМЦ (1, 2) и ДОЭЦ (3, 4) ( $(5-8) \cdot 10^{-6}$  моль/л) в водном растворе в присутствии САЧ (1, 3) или САБ (2, 4) ( $5 \cdot 10^{-3}$  моль/л) через 70 мкс после появления переднего фронта вспышки.

ных сигналов фотоизомеров в диоксане, что указывает на отсутствие интеркомбинационной конверсии красителей (в виде как *цис*-, так и *транс*-изомеров) в триплетное состояние при прямом фотовозбуждении (для ДЭЦ см. также [13]). В то же время в водном растворе в присутствии САЧ и САБ данные красители, связываясь в нековалентные комплексы с альбуминами, по крайней мере частично, переходят из *цис*-изомера (в мономерной и димерной форме) в форму *транс*-мономера, что можно наблюдать по появлению в спектре поглощения длинноволновой полосы (или плеча) с максимумом при 585–610 нм и росту интенсивности флуоресценции [15]. При импульсном фотолизе таких растворов в присутствии воздуха сигналов, которые можно было бы отнести к образованию фотоизомеров, не наблюдается, а в отсутствие воздуха регистрируются сигналы поглощения в длинноволновой области ( $> 600$  нм). Тушение сигналов кислородом, а также сопоставление сигналов для ДЭЦ и ДМЦ с сигналами, наблюдавшимися ранее для триплетного состояния ДЭЦ в присутствии солей желчных кислот [13], а для ДМЭЦ и ДОЭЦ – с сигналами триплетного состояния других *мезо*-замещенных цианинов в присутствии биомолекул [12, 13], позволяют приписать данные сигналы образованию триплетно-

го состояния красителей в результате интеркомбинационной конверсии  $S_1 \rightarrow T$ . Образование и гибель красителей в триплетном состоянии (путем интеркомбинационной конверсии  $T \rightarrow S_0$ ) можно описать следующей схемой:



где  $k_T = 1/\tau_T$  – константа скорости интеркомбинационной конверсии  $T \rightarrow S_0$ ;  $\tau_T$  – время жизни красителя в триплетном состоянии. Дифференциальные спектры триплет-триплетного поглощения красителей в присутствии САЧ и САБ приведены на рис. 2.

Усиление интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние наблюдалось ранее при импульсном фотолизе *мезо*-замещенных тиакарбодиазидов 3,3',9-триэтилтиакарбодиазидина (ТЭТЦ) и 3,3'-диэтил-9-метилтиакарбодиазидина (ДЭМТЦ) в комплексе с ДНК [18, 19], а также 3,3',9-триметилтиакарбодиазидина (Суан 2) с ДНК и хондроитин-4-сульфатом [12]. Аналогичный эффект наблюдался при связывании ДЭЦ и Суан 2 с мицеллами солей желчных кислот [13]. Рост квантового выхода в триплетное состояние для вышеперечисленных красителей в присутствии биомолекул,

так же как и рост интенсивности флуоресценции, объяснялся подавлением конкурирующих процессов безызлучательного рассеяния (путем внутримолекулярных вращений и колебаний) энергии возбуждения состояния  $S_1$  вследствие повышения жесткости молекулы красителя при ее связывании с биомолекулами [10, 11, 13]. Очевидно, аналогичным образом объясняется и рост интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние при связывании красителей ДЭЦ, ДМЦ, ДМЭЦ и ДОЭЦ с САЧ и САБ. Повышение жесткости молекул красителей в комплексах с альбуминами проявляется также в отсутствии фотоизомеризации красителей, связанных с альбуминами, хотя *транс*-изомеры красителей в растворе диоксана фотоизомеризуются.

Отметим следующие особенности генерации триплетного состояния при импульсном фотолизе изучаемых красителей в комплексах с альбуминами.

1. Дифференциальные спектры триплет-триплетного поглощения красителей ДЭЦ и ДМЦ в комплексах с САЧ и САБ качественно сходны (см. рис. 2а), хотя красители взаимодействуют с альбуминами по-разному: эффективно взаимодействуют с САЧ и гораздо менее эффективно — с САБ [6]. При этом ДЭЦ и ДМЦ в комплексе с САЧ практически полностью переходят в *транс*-изомер, в то время как в комплексе с САБ красители находятся в виде *транс*- и *цис*-изомеров (при этом в случае ДЭЦ *цис*-изомер является основным в комплексе [6]). Спектры триплет-триплетного поглощения *транс*- и *цис*-изомеров ДЭЦ близки [13]; то же можно предположить и для его близкого аналога ДМЦ. Следовательно, можно считать, что в интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние участвуют оба изомера ДЭЦ и ДМЦ в комплексах с альбуминами.

2. В случае красителей ДМЭЦ и ДОЭЦ дифференциальные спектры триплет-триплетного поглощения их комплексов с САЧ и САБ несколько различаются: спектры для комплексов с САБ более длинноволновые, чем для комплексов с САЧ (рис. 2). ДМЭЦ, как ДЭЦ и ДМЦ, в комплексе с САЧ находится главным образом в виде *транс*-изомера, тогда как в комплексе с САБ — в виде обоих (*транс* и *цис*) изомеров. Поэтому несовпадение спектров триплет-триплетного поглощения для ДМЭЦ можно объяснить различием спектров триплетного состояния *транс*- и *цис*-изомеров для этого красителя. Краситель ДОЭЦ в комплексах с обоими альбуминами практически полностью переходит в *транс*-изомер, но его спектры поглощения в комплексах с САЧ и САБ несколько различаются и имеют максимумы при 603 и 587 нм соответственно. При этом спектр поглощения ДОЭЦ в комплексе с САЧ соответствует спектру ДОЭЦ в диоксане (*транс*-изомер) с

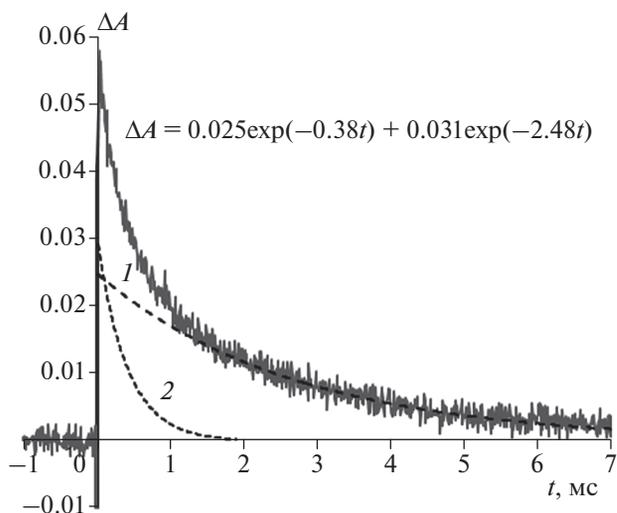


Рис. 3. Кинетическая кривая гибели триплетного состояния ДЭЦ в водном растворе в присутствии САБ ( $5 \cdot 10^{-5}$  моль/л) и ее экспоненциальные компоненты (1 и 2) (длина волны регистрации — 800 нм).

максимумом при 603 нм. Можно предположить, что ДОЭЦ в комплексе с САЧ имеет обычную *транс*-конфигурацию, в то время как коротковолновый сдвиг спектра поглощения ДОЭЦ в комплексе с САБ по сравнению с наблюдаемым в диоксане вызван несколько искаженной формой *транс*-изомера. Такое искажение конфигурации может являться причиной длинноволнового сдвига спектра триплет-триплетного поглощения красителя в комплексе с САБ.

3. Кинетические кривые гибели триплетного состояния исследованных красителей в ряде случаев несколько отклоняются от моноэкспоненциальных и хорошо аппроксимируются суммой двух экспонент, что особенно ярко проявляется для комплексов красителей ДЭЦ, ДМЦ и ДМЭЦ с САБ (рис. 3). Это также можно объяснить одновременным связыванием *транс*- и *цис*-изомеров красителей с альбумином и, соответственно, наложением кинетик гибели триплетных состояний обоих изомеров при регистрации. Следует заметить, что в случае комплексов ДЭЦ, ДМЦ и ДМЭЦ с САЧ, когда красители практически полностью переходят в единственную форму — *транс*-изомер, кинетики гибели триплетного состояния хорошо описываются моноэкспоненциальными зависимостями. Усредненные (аппроксимированные одной экспонентой) времена жизни триплетного состояния красителей в комплексах с альбуминами находятся в интервале 0.35–1.2 мс (табл. 1).

Были проведены эксперименты по тушению триплетного состояния красителей кислородом воздуха. Из наклона кривых линейных зависимостей константы скорости гибели триплетного состояния от концентрации кислорода в растворе

Таблица 1. Усредненные времена жизни триплетных состояний красителей ДЭЦ, ДМЦ, ДМЭЦ и ДОЭЦ в комплексах с САЧ и САБ

Альбумин	$\tau_T$ , мс			
	ДЭЦ	ДМЦ	ДМЭЦ	ДОЭЦ
САЧ	$0.7 \pm 0.1$	$0.54 \pm 0.05$	$0.57 \pm 0.08$	$1.2 \pm 0.4$
САБ	$1.2 \pm 0.1$	$0.39 \pm 0.05$	$1.0 \pm 0.1$	$0.35 \pm 0.04$

определены константы скорости тушения триплетного состояния изучаемых красителей молекулярным кислородом  $k_q$ :

$$k_T = k_{T0} + k_q[\text{O}_2], \quad (3)$$

где  $k_{T0}$  — усредненная константа скорости гибели триплетного состояния в отсутствие тушителя,  $k_T$  — константа скорости гибели триплетного состояния в присутствии тушителя (рис. 4).

Значения  $k_q$  оказались в интервале  $(1.3\text{--}2.5) \cdot 10^8 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , что гораздо ниже, чем у константы скорости диффузионно-контролируемого тушения триплетного состояния красителя кислородом (порядка  $1.2 \cdot 10^9 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  [18]). Низкая величина  $k_q = 3 \cdot 10^8 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , близкая к значениям, полученным в настоящей работе, наблюдалась ранее при тушении кислородом триплетного состояния красителя ДТС в комплексе с ДНК, что объяснялось затрудненным доступом кислорода к молекулам красителя в комплексе [18, 19]. Аналогичным образом, вероятно, можно объяснить низкие значения кон-

стант  $k_q$  для изучаемых красителей в комплексах с альбуминами.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При импульсном фотолизе воздушно-насыщенных растворов красителей ДЭЦ, ДМЦ, ДМЭЦ и ДОЭЦ в диоксиде наблюдаются сигналы, обусловленные фотоизомеризацией *транс*-изомеров красителей и обратной темновой изомеризацией образующихся *цис*-фотоизомеров. Времена жизни фотоизомеров красителей близки и составляют 0.25–0.35 мс. При импульсном фотолизе водных растворов данных красителей в присутствии САЧ и САБ в отсутствие кислорода наблюдается интеркомбинационная конверсия в триплетное состояние красителей и последующий возврат в исходное основное синглетное состояние. Фотоизомеризации красителей при этом не наблюдается. Предполагается, что в интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние участвуют как *транс*-, так и *цис*-изомеры красителей в комплексах с альбуминами. Кинетические кривые гибели три-

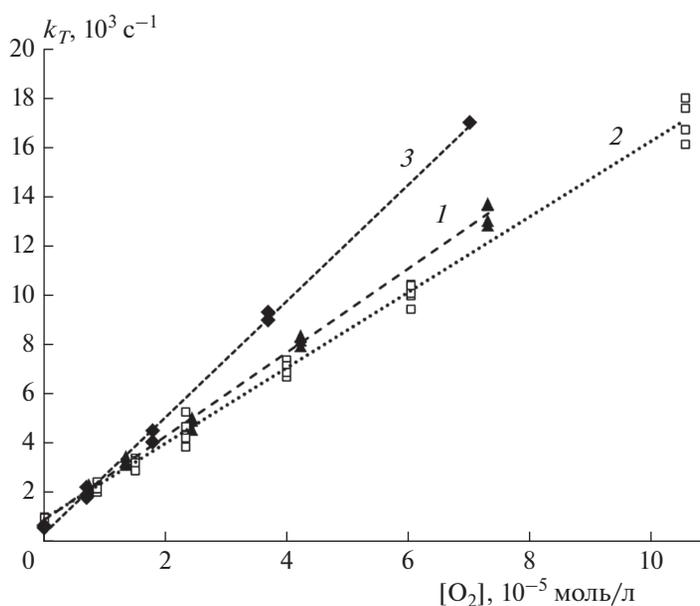


Рис. 4. Кривые линейных зависимостей из уравнения (3) тушения кислородом триплетных состояний ДЭЦ (1) и ДМЭЦ (2) в присутствии САБ и ДОЭЦ в присутствии САЧ (3), из которых были определены константы скорости тушения  $k_q = 1.7 \cdot 10^8$ ,  $1.5 \cdot 10^8$  и  $2.4 \cdot 10^8 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  соответственно; концентрации альбуминов —  $5 \cdot 10^{-5} \text{ моль/л}$ .

плетного состояния ДЭЦ, ДМЦ и ДМЭЦ в комплексах с САБ хорошо описываются суммой двух экспонент, что можно объяснить одновременным связыванием *транс*- и *цис*-изомеров красителей с альбумином. Определены константы скорости тушения триплетного состояния красителей молекулярным кислородом, которые оказались гораздо ниже константы скорости диффузионно-контролируемого тушения, что, вероятно, обусловлено затрудненным доступом кислорода к молекуле красителя в комплексе с альбумином.

Автор выражает благодарность проф. Б.И. Шапиро за предоставление полиметиновых красителей.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Shindy H.A.* // *Dyes Pigm.* 2017. V. 145. P. 505; <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2017.06.029>
2. *Khimenko V., Chibisov A.K., Görner H.* // *J. Phys. Chem. A.* 1997. V. 101. P. 7304; <https://doi.org/10.1021/jp971472b>
3. *Акимкин Т.М., Татиколов А.С., Ярмолюк С.М.* // *Химия высоких энергий.* 2011. Т. 45. № 3. С. 252.
4. *Panova I.G., Sharova N.P., Dmitrieva S.B. et al.* // *Anal. Biochem.* 2007. V. 361. P. 183; <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.11.029>
5. *Татиколов А.С., Акимкин Т.М., Кашин А.С., Панова И.Г.* // *Химия высоких энергий.* 2010. Т. 44. № 3. С. 252.
6. *Татиколов А.С., Панова И.Г.* // Там же. 2014. Т. 48. № 2. С. 116.
7. *Татиколов А.С., Панова И.Г.* // Там же. 2005. Т. 39. № 4. С. 275.
8. *Татиколов А.С., Пронкин П.Г., Шведова Л.А., Панова И.Г.* // *Хим. физика.* 2019. Т. 38. № 12. С. 11.
9. *Tatokolov A.S., Pronkin P.G., Panova I.G.* // *Spectrochim. Acta, Part A.* 2019. V. 216. P. 190; <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.03.017>
10. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С., Скляренко В.И., Кузьмин В.А.* // *Химия высоких энергий.* 2006. Т. 40. № 4. С. 295.
11. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С., Скляренко В.И., Кузьмин В.А.* // Там же. № 6. С. 451.
12. *Tatokolov A.S., Akimkin T.M., Pronkin P.G., Yarmoluk S.M.* // *Chem. Phys. Lett.* 2013. V. 556. С. 287; <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2012.11.097>
13. *Татиколов А.С., Пронкин П.Г.* // *Журн. прикл. спектроскопии.* 2018. Т. 85. № 6. С. 861.
14. *Tatokolov A.S., Costa S.M.B.* // *Biophys. Chem.* 2004. V. 107. P. 33; [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(03\)00218-7](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(03)00218-7)
15. *Pronkin P.G., Shvedova L.A., Tatokolov A.S.* // *Ibid.* 2020. V. 261. P. 106378; <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2020.106378>
16. *Справочник химика 21. Химия и химическая технология.* С. 158; <https://chem21.info/>
17. *Tatokolov A.S., Costa S.M.B.* // *Chem. Phys. Lett.* 2007. V. 440. P. 73; <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2007.04.003>
18. *Anikovskiy M.Y., Tatokolov A.S., Kuzmin V.A.* // *Intern. J. Photoenergy.* 1999. V. 1. № 1. P. 35.
19. *Аниковский М.Ю., Татиколов А.С., Шведова Л.А., Кузьмин В.А.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2001. № 7. С. 1134.

СТРОЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ,  
КВАНТОВАЯ ХИМИЯ, СПЕКТРОСКОПИЯ

УДК 54.057; 541.14; 544.2

НОВАЯ ВОДОРАСТВОРИМАЯ ФОРМА ВОДИРУ ЛЮМИНОФОРОВ  
НА ОСНОВЕ КРЕМОФОР®: СИНТЕЗ, СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА  
И ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VITRO*

© 2021 г. И. В. Клименко<sup>1\*</sup>, А. А. Ксенофонтов<sup>2</sup>, М. С. Клименко<sup>3</sup>,  
Е. В. Антина<sup>2</sup>, М. Б. Березин<sup>2</sup>, А. В. Лобанов<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук, Иваново, Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>4</sup>Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова  
Российской академии наук, Москва, Россия

\*E-mail: inna@deom.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 02.07.2020;

после доработки 02.07.2020;

принята в печать 21.09.2020

Новая водорастворимая форма бор(III)дипиррометеновых люминофоров получена нами на примере 3,3',5,5'-тетрафенил-*ms*-аза-2,2'-дипиррометената бора(III) (BODIPY) и *кремофора*® (полиэтиленгликоль, ПЭГ-40). Представлены результаты исследования спектрально-люминесцентных свойств изученных систем “BODIPY–*кремофор*®–водно-спиртовая среда”. Установлено, что *кремофор*® оказался единственным из серии исследованных вспомогательных веществ (ПЭГ-400, ПЭГ-1000, поливинилпирролидон, бычий сывороточный альбумин, натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы), обеспечивающим сольubilизацию BODIPY в водной среде с сохранением интенсивных спектральных характеристик, в том числе флуоресценции, люминофора в красной области спектра. Проведено тестирование системы “BODIPY–*кремофор*®” на двух клеточных линиях мышей – метастазирующего рака молочной железы и неметастазирующего рака кожи. Установлено, что введение системы “BODIPY–*кремофор*®” в обе клеточные линии мышей приводит к отрыву клеточных культур от субстрата и подавлению развития раковых опухолей. Полученные результаты показали, что иммобилизация BODIPY в ПЭГ-40 в водно-спиртовой среде позволяет получать препараты с пролонгированным действием, которые возможно использовать в качестве фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии, а также для биовизуализации в клеточной биологии.

**Ключевые слова:** BODIPY, *кремофор*®, поглощение, флуоресценция, фотодинамическая терапия.

**DOI:** 10.31857/S0207401X21020072

## ВВЕДЕНИЕ

Фотодинамическая терапия (ФДТ) в настоящее время является одним из важнейших минимально инвазивных органосохраняющих методов лечения онкологических заболеваний. Данный метод основан на селективной деструкции целевых опухолевых тканей в результате фотохимических реакций, происходящих при облучении светом определенной длины волны накопленного в опухоли фотосенсибилизатора (ФС). Фотодинамический эффект достигается посредством генерации в процессе фотохимических реакций синглетного кислорода, а также других активных форм кислорода, обладающих цитотоксическим действием. При этом как в России, так и за рубежом в качестве фотосенсибилизаторов преимущественно используются красители порфиринового, хлоринового, пурпуринового, а также фталоцианинового и нафталоцианинового типа [1–3]. Одним из направлений

развития метода ФДТ является поиск так называемого “идеального ФС” с высокой селективностью и ускоренной фармакодинамикой [3], который должен обладать и некоторыми специфическими фотофизическими свойствами, такими как поглощение в области “фототерапевтического окна” (600–850 нм) и энергией триплетного состояния более 0.98 эВ. Кроме того, наряду с отсутствием цитотоксичности ФС должен быть термодинамически стабилен, устойчив к окислительно-восстановительным процессам, которые могут быть вызваны клеточным окружением, и не склонен к агрегированию, приводящему к падению квантового выхода генерации синглетного кислорода.

Перспективными соединениями для использования в качестве ФС оказались представители достаточно “молодого” класса флуоресцентных красителей на основе бор(III)дипиррометенатов (BODIPY) [4]. Для люминофоров BODIPY харак-

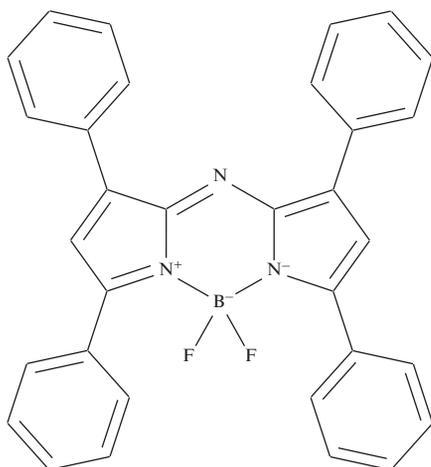


Рис.1. Структура BODIPY.

терны: поглощение и испускание в длинноволновой области видимого спектра, в которой биологические ткани наиболее оптически прозрачны; структурно регулируемые в широком диапазоне значений спектральные характеристики; высокие молярные коэффициенты экстинкции ( $\sim 10^5$  л · моль<sup>-1</sup> · см<sup>-1</sup>) и квантовые выходы флуоресценции (до 99%), а также большие термическая и кинетическая стабильность [4, 5]. Однако большинство красителей BODIPY нерастворимы в воде, поэтому их использование в медицине и биохимии сопряжено с поиском путей получения тех или иных водорастворимых форм люминофоров без изменения их спектральных характеристик [6]. Одним из путей преодоления гидрофобности BODIPY является получение супрамолекулярных структур люминофоров с транспортными белками крови [5, 7–9], так как доказано, что транспорт ФС к клетке осуществляется за счет сывороточных белков – альбуминов, глобулинов и липопротеинов, при этом местами локализации ФС в клетке являются мембранные структуры [10–12].

Следует заметить, что поиск новых BODIPY для использования их в качестве ФС в фотодинамической терапии постоянно расширяется [13–23]. Наряду с этим разработка новых эффективных лекарственных форм BODIPY на основе различных супрамолекулярных структур и других многокомпонентных систем является наиболее актуальной задачей.

Нами получены новые водорастворимые формы BODIPY с использованием серии различных вспомогательных гидрофильных соединений: полиэтиленгликоли – ПЭГ-40 (*кремофор*<sup>®</sup>), ПЭГ-400, ПЭГ-1000, поливинилпирролидон (ПВП), бычий сывороточный альбумин (БСА), натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) и изучены их фотофизические свойства. Эффективность лучшей с точки зрения фотофизических характеристик системы была протестирована на двух

клеточных линиях: линия 4Т1 – метастазирующий рак молочной железы и линия В16F0 – неметастазирующий рак кожи мышей. Первая линия клеток по своей морфологии подобна клеткам на 4-ой стадии рака молочной железы человека с аналогичным ростом и метастатическим распространением; она соответствует эпителиоцитам и растет в адгезионной культуре. Известно, что метастазы являются основной причиной смертности больных раком молочной железы, и исследования механизма возникновения метастазы и способов ее лечения являются центральными в исследовании раковых заболеваний. Вторая клеточная линия является слабоиммуногенной, что связано с низкой экспрессией МНС (главный комплекс гистосовместимости, играющий важную роль в иммунной системе и развитии иммунитета) I класса, по морфологии соответствует эпителиоцитам и растет в адгезионной культуре. Линия В16F0 была выведена от родительской линии В16F1 как клон со слабым метастатическим потенциалом, что дает возможность изучать первичный опухолевый рост [24].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе проанализированы спектральные характеристики систем на основе 3,3',5,5'-тетрафенил-*ms*-аза-2,2'-дипирролилметена (BODIPY, рис. 1) и различных водорастворимых вспомогательных веществ. Исходный BODIPY синтезирован по авторской методике и охарактеризован [25] в Институте химии растворов им. Г.А. Крестова Российской академии наук.

#### Получение систем на основе BODIPY и водорастворимых вспомогательных веществ

Для приготовления растворов BODIPY с водорастворимыми соединениями использовали 0.1%-ный спиртовой раствор люминофора. В качестве растворителя применялся 96.6%-ный этанол (ОАО “СЭПТ”, спирт этиловый ректифицированный “Экстра”, ГОСТ P51652-2000, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH). В качестве вспомогательных соединений использовали: 1%-ный (по массе) водный раствор ПВП (Sigma, (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO)<sub>n</sub>, 10 кДа); 0.5%-ный (по массе) водный раствор БСА (Sigma, USA); 0.1%-ный водный раствор Na-КМЦ (пищевая добавка E466, [C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>(OH)<sub>x</sub>(CH<sub>2</sub>COONa)<sub>y</sub>]<sub>n</sub> Acros, 250 кДа); 1%-ные (по массе) водные растворы полиэтиленгликолей (C<sub>2n</sub>H<sub>4n</sub> + 2O<sub>n</sub> + 1): *кремофора*<sup>®</sup> (солюбилизатор гидрогенизированного касторового масла, ПЭГ-40), ПЭГ-400 (пищевая добавка E1521, ООО “ПраймКемикалсГрупп”) и ПЭГ-1000 (Merck). Все растворы хранили в темноте при температуре +4°C. Выбор указанных водорастворимых вспомогательных веществ объясняется тем, что они являются распространенными биосовместимыми соединениями, входящими в состав фармакологических и косметических средств.

**Электронные спектры поглощения** (200–900 нм) регистрировали с помощью UV-vis спектрофотометра TU-1901 фирмы “Beijing Purkinje General Instrument Co., Ltd”.

**Электронные спектры испускания** (480–800 нм) регистрировали с помощью спектрофлуориметра “Флюорат-02 Панорама” фирмы “Люмэкс”,  $\lambda_{\text{возб}} = 475$  нм. Все измерения проводили при 293 К. Результаты измерений усреднены в серии из трех образцов для каждой структурной единицы.

**Клеточные линии, использованные для тестирования и изучения действия наиболее эффективной с точки зрения фотофизических свойств системы:**

1) клеточная линия 4T1 (ATCC № CRL 2539) – метастазирующий рак молочной железы мыши (*Mus musculus*, клетки молочной железы);

2) клеточная линия В16F0 (ATCC № CRL 6322) – неметастазирующий рак кожи мыши (*Mus musculus*, клетки кожи).

### Культивирование клеток

Клетки рака молочной железы 4T1 и меланомы В16F0 размораживали, отмывали от среды для криоконсервации клеток базальной средой DMEM (НПП “ПанЭко”), не содержащей сыворотку, центрифугировали (10 мин, 1260 об/мин, 277 К), ресуспендировали в 1 мл раствора бычьего сывороточного альбумина в фосфатном буфере (ФБ–БСА, рН 7.4) и переносили на чашки Петри с питательной средой DMEM. Культивирование клеток проводили в соответствии с рекомендациями ATCC (American Type Culture Collection) с регулярными пассажами с интервалом 2–3 дня в полной среде DMEM (ЭТС – 10%, L-глутамин – 2 мМ, заменимые аминокислоты, пируват натрия – 1 мМ, пенициллин – 100 ЕД/мл, стрептомицин – 100 ЕД/мл). Клетки инкубировали при 310 К в атмосфере 5%-ного  $\text{CO}_2$ . Для нового пассажа клетки наращивали до конfluenceности 80%. Чтобы снять адгезионные клетки (4T1), со дна чашки убирали питательную среду и добавляли 2 мл раствора трипсин–ЭДТА. Суспензию клеток собирали, разбавляли до 10 мл раствором ФБ–БСА. Для снятия суспензионной культуры клетки вместе со средой помещали в пробирки для дальнейшего осаждения. Клетки осаждали центрифугированием (10 мин, 1260 об/мин, 277 К). После определения концентрации клеток на проточном цитометре клетки ресуспендировали в 1 мл ФБ–БСА и переносили на чашки Петри с питательной средой по 200 тыс. на чашку.

### Порядок проведения тестирования и изучения действия наиболее эффективной системы на клетках опухолей 4T1 и В16F0

На чашку Петри диаметром 60 мм с клеточной культурой в количестве 1 млн клеток вносили 3 мл среды DMEM и добавляли 1 мл синтезированной

системы (состав системы: 100 мкг BODIPY на 3 мл водного раствора вспомогательного вещества). По прошествии 10, 30 и 60 мин проводили исследование клеток с помощью люминесцентного микроскопа “Альтами Люм 2” с тринокулярной насадкой для подключения фотоаппарата и галогенной лампой 6 В / 20 Вт. Фотографирование проводили в течение 1 мин, далее образец помещали в темный инкубатор до следующего фотографирования. Помимо фотографирования проводили подсчет клеток в 10 мкл на цитофлуориметре BD FACSAria II (BD Biosciences, USA) и параллельно – в камере Горяева. Полученные данные анализировали с использованием программных пакетов DIVA и Cytobank. Мертвые клетки отделяли от живых с помощью флуоресцентного красителя DAPI. Для дальнейшего анализа клетки отмывали 3 раза и собирали последний супернатант для контроля с помощью методов абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии отсутствия в образцах супрамолекулярной системы. После сбора супернатанта к клеткам добавили 4 мл питательной среды и оставили в инкубаторе на 2 дня ( $T = 310$  К, 5%-ный  $\text{CO}_2$ ) для исследования жизнеспособности.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Электронный спектр поглощения 0.1%-ного спиртового раствора BODIPY, представленный на рис. 2 (кривая 1), характеризуется тремя полосами. Первая, наиболее интенсивная полоса с максимумом поглощения при 646 нм обусловлена  $S_0-S_1$  электронным переходом, плечо на левом скате полосы вызвано 0–1 колебательным переходом [26]. Максимум второй, уширенной  $S_0-S_2$  полосы, находится вблизи 476 нм. Третья полоса ( $S_0-S_3$  электронный переход) с максимумом при 310 нм вызвана внутримолекулярным перераспределением электронной плотности с фенильных фрагментов на дипиррометеновое ядро BODIPY [27]. Сочетание фенильного и *ms*-аза-замещения позволяет достичь существенного смещения максимума  $S_0-S_1$ -полосы BODIPY в область “фототерапевтического окна” по сравнению со многими другими структурно-родственными дипиррометеновыми красителями [13, 28].

При исследовании спектральных свойств BODIPY в системах на основе серии изученных соединений (ПЭГ-40, ПЭГ-400, ПЭГ-1000, ПВП, БСА, Na-КМЦ) только *кремофор*<sup>®</sup> (ПЭГ-40) оказался единственным вспомогательным водорастворимым веществом, обеспечивающим солюбилизацию BODIPY в водной среде с сохранением поглощения и интенсивной флуоресценции люминофора в красной области спектра. ПЭГ-400 и ПЭГ-1000, как и другие выше перечисленные вспомогательные вещества, такой способности не обладали. Поэтому в дальнейшем обсуждение всех по-

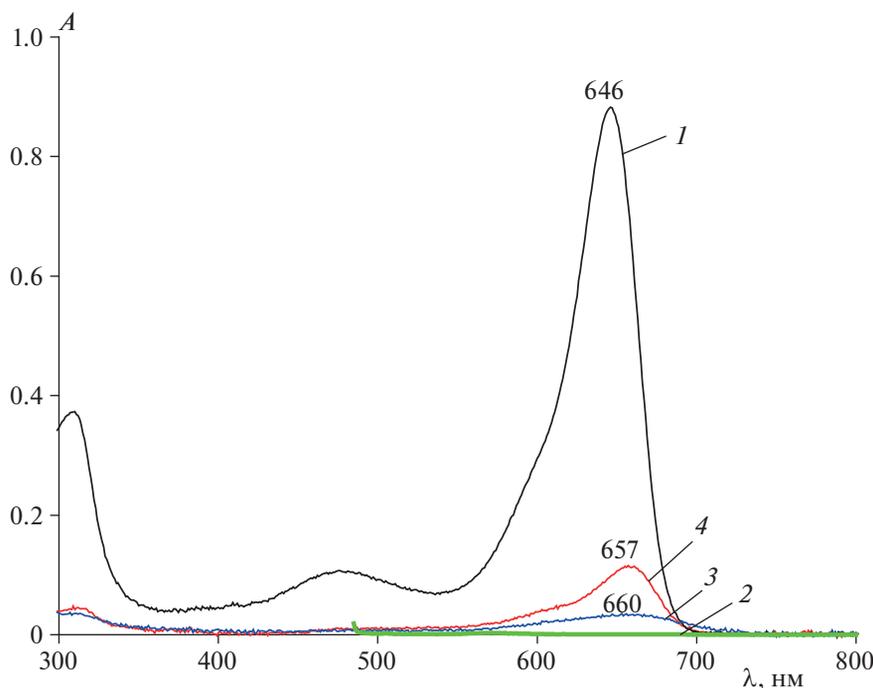


Рис. 2. Электронные спектры поглощения: 0.1%-ного спиртового раствора VODIPY (1), 1%-ного водного раствора кремофора® (2), водно-спиртового раствора VODIPY (0.1%) (3) и системы “VODIPY (0.1%)–кремофор®” (4).

лученных экспериментальных данных будет связано только с системой VODIPY–кремофор® (ПЭГ-40).

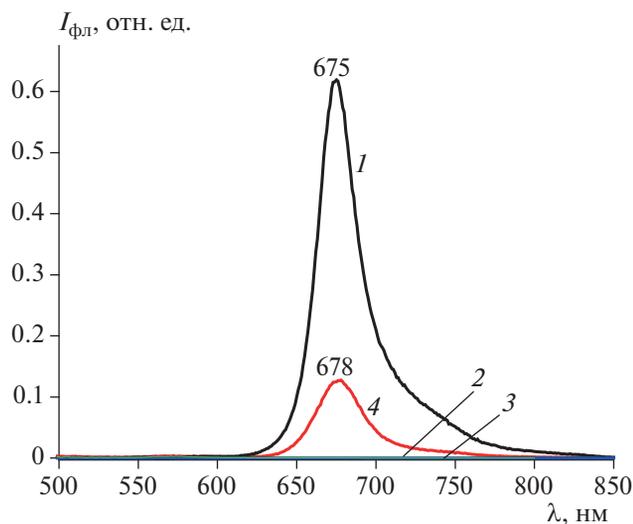
В представленных для сравнения на рис. 2 электронных спектрах поглощения спиртового раствора VODIPY, водного раствора кремофора®, водно-спиртовых растворов VODIPY и системы “VODIPY–кремофор®” необходимо отметить отсутствие поглощения в видимой области спектра для водного раствора кремофора® и значительное (на 96%) снижение интенсивности полосы поглощения с красным сдвигом ее максимума на 14 нм в спектре VODIPY в водно-спиртовом растворе по сравнению с раствором в спирте. Причина наблюдаемого эффекта заключается в значительной агрегации гидрофобных молекул VODIPY вследствие низкой растворимости и плохой сольватруемости в водной среде.

В системе “VODIPY (0.1%)–кремофор®” красный сдвиг составляет 11 нм, а интенсивность полосы поглощения люминофора — более чем в два раза выше, чем в водно-спиртовом растворе. Отметим, что наблюдаемый красный сдвиг на величину 11–14 нм максимума спектра поглощения играет существенную роль для повышения эффективности ФДТ [1, 3, 29]. Анализ спектров испускания исследуемых систем (рис. 3) подтвердил отсутствие флуоресценции водного раствора кремофора® и показал, что в водно-спиртовом растворе флуоресценция VODIPY полностью потушена. Солюбилизация VODIPY кремофором® сопровождается незначительным (на 3 нм) bathochromным сдвигом максимума полосы испускания VODIPY и разгоранием флуо-

ресценции в ~1000 раз по сравнению с водно-спиртовым раствором люминофора. Наблюдаемые особенности электронных спектров поглощения и испускания системы “VODIPY–кремофор®” могут быть обусловлены дезагрегацией молекул VODIPY в менее полярном сольватном окружении кремофора® в отличие от плохо сольватирующей высокополярной водно-спиртовой среды. Необходимо отметить, что увеличение концентрации VODIPY в системе “VODIPY–кремофор®–водно-спиртовая среда” сопровождается увеличением интенсивности поглощения и испускания.

Известно, что изменением состава среды и концентрации люминофора можно влиять на спектральные характеристики систем [30] за счет варьирования вероятности интеркомбинационных переходов молекул красителей в триплетные состояния. Поэтому для апробирования полученной системы на клеточных линиях необходимо было подобрать наиболее оптимальную концентрацию водно-спиртового раствора “VODIPY–кремофор®”. По результатам серии спектральных исследований выбран следующий оптимальный состав системы: 100 мкл спиртового раствора VODIPY на 3 мл 1%-ного водного раствора кремофора®.

На рис. 4 представлены фотографии двух клеточных культур, сделанные до начала эксперимента и во время его проведения в течение 60 мин. Обе культуры обладают адгезионными свойствами (“липкостью” к субстрату), однако часть клеток культуры 4T1 более “ошаренные” (круглые), чем клетки V16F0. При культивировании клеток, ко-



**Рис. 3.** Спектры флуоресценции: 0.1%-ного спиртового раствора BODIPY (1), 1%-ного водного раствора *кремофора*<sup>®</sup> (2), водно-спиртового раствора BODIPY (0.1%) (3) и системы “BODIPY (0.1%)–*кремофор*<sup>®</sup>” (4).

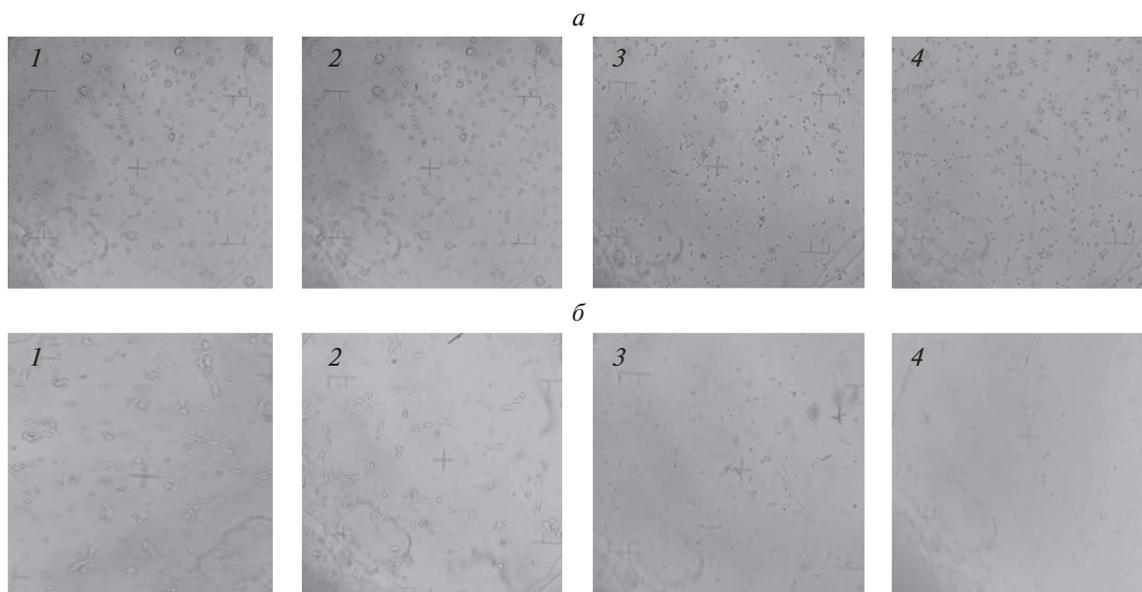
гда они не прикреплены к твердой поверхности или субстрату, на их способность к делению влияет их форма. Клетки, имеющие круглую форму, почти никогда не делятся. Исходное количество клеток до начала эксперимента составляло 1.33 млн/мл для 4Т1 и 1.57 млн/мл для В16F0.

Через 10 мин после начала эксперимента в культуре 4Т1 наблюдается большое количество суспензионных (не прикрепленных к субстрату) клеток. Клетки, отделившиеся от субстрата, на котором они росли, уже, как правило, не способ-

ны к росту в суспензии и обычно деградируют. В культуре В16F0 также наблюдается “ошаривание” (округление) клеток и их отрыв от субстрата, что приводит к уменьшению количества видимых на фотографии клеток. Такой процесс может происходить за счет изменения энергии клеточной поверхности в результате включения в мембрану изнутри клетки веществ из раствора, а именно системы “BODIPY–*кремофор*<sup>®</sup>”. Это предположение также подтверждается данными спектрального анализа последнего супернатанта, на которых не были обнаружены даже следы исследуемой системы. Вероятно, в дальнейшем в процессе проведения тестирования действия системы на клетки опухолей практически все полученное нами вещество было включено в клетки.

Спустя 30–60 мин от начала эксперимента в культуре 4Т1 изменений не наблюдается. Клетки не прикреплены к субстрату (количество прикрепленных к субстрату клеток равно 0), но находятся около его поверхности. В культуре В16F0 все больше клеток теряют морфологические признаки и отрываются от субстрата, и через 60 мин почти все клетки переходят из адгезионного состояния в суспензионное и оказываются равномерно распределенными в растворе. Количество адгезионных клеток в данной культуре составило всего 20 тыс.

После окончания эксперимента проводили отмывание клеточных культур. Вместе с культуральной средой были смыты и все суспензионные клетки. Была поставлена проверка на жизнеспособность клеток: спустя два дня после инкубации (310 К, 5% CO<sub>2</sub>) ни одна из клеточных культур не выжила. Подсчет в камере Горяева подтвердил эти данные.



**Рис. 4.** Фотографии клеточных культур 4Т1 (а) и В16F0 (б): 1 – до начала эксперимента; 2 – спустя 10 мин после начала эксперимента; 3 – спустя 30 мин после начала эксперимента; 4 – спустя 1 ч после начала эксперимента. Увеличение микроскопа –  $\times 100$ .

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Таким образом, проведенные спектральные исследования различных систем на основе VODIPY позволяют сделать вывод о перспективности дальнейших исследований для поиска новых сенсбилизаторов для фотодинамической терапии. Полученная новая водорастворимая форма VODIPY в составе системы с *кремофором*<sup>®</sup> при тестировании на клеточных линиях мышей показала обнадеживающие результаты. Система вызывает отрыв клеточных культур карциномы 4T1 и меланомы V16F0 от субстрата, и клетки теряют свои адгезионные свойства. Скорость перехода из адгезионного в суспензионное состояние выше для клеточных культур карциномы 4T1 мышей. Введение системы “VODIPY–*кремофор*<sup>®</sup>” в обе клеточные линии мышей приводит к подавлению развития раковых опухолей. Вероятно, данная водорастворимая система “VODIPY–*кремофор*<sup>®</sup>” обладает цитотоксическим действием и приводит к структурным повреждениям клетки и в дальнейшем к ее гибели. И хотя полученные в работе результаты требуют дальнейшего изучения, спектральные свойства системы “VODIPY–*кремофор*<sup>®</sup>”, а также данные цитологического мониторинга ясно демонстрируют перспективность подобных систем для биовизуализации клеток и ФДТ.

Авторы выражают благодарность д-ру биол. наук К.О. Муранову за помощь в планировании эксперимента и критическое обсуждение результатов.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИБХФ РАН (№ гос. регистрации 01201253304) и государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема 0082-2018-0006, регистрационный номер АААА-А18-118020890097-1).

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. *Клименко И.В., Лобанов А.В.* // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 1. С. 13.
2. *Klimenko I.V., Lobanov A.V.* // J. Biomed. Photonics Eng. (Samara). 2016. V. 2(4). P. 040310-1-5.
3. *Klimenko I.V., Lobanov A.V.* // Macroheterocycles. (Ivanovo). 2020. 13(2); <https://doi.org/10.6060/mhc200390k>
4. *Kamkaew A., Lim S.H., Lee H.B. et al.* // Chem. Soc. Rev. 2013. № 1(42). P. 77; <https://doi.org/10.1039/c2cs35216h>
5. *Ksenofontov A.A., Bocharov P.S., Antina E.V.* // J. Photochem. Photobiol., A. 2019. V. 368. P. 254.
6. *Kue C.S., Ng S.Y., Voon S.H. et al.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2018. Issue 17. P. 1691; <https://doi.org/10.1039/c8pp00113h>
7. *Jameson L.P., Smith N.W., Annunziata O. et al.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2016. V. 18. P. 14182; <https://doi.org/10.1039/c6cp00420b>
8. *Solomonov A.V., Rumyantsev E.V., Kochergin B.A. et al.* // Biophysics. 2014. V. 59(1). P. 35; <https://doi.org/10.1134/S0006350914010217>
9. *Chen Y., Liu J., Song M. et al.* // Spectrochim. Acta A. 2018. V. 203. P. 158; <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.103>
10. *Kessel D.* // J. Photochem. Photobiol., B. 1998. V. 42. № 2. P. 89.
11. *Плотникова О.А., Мельников А.Г., Мельников Г.В. и др.* // Хим. физика. 2017. Т. 36. № 8. С. 48; <https://doi.org/10.7868/S0207401X17080106>
12. *Власова И.М., Салецкий А.М.* // Хим. физика. 2009. Т. 28. № 12. С. 66.
13. *Kritskaya A.Yu., Berezin M.B., Antina E.V. et al.* // J. Fluoresc. 2019. V. 29. P. 911; <https://doi.org/10.1007/s10895-019-02403-2>
14. *Молчанов Е.Е., Марфин Ю.С., Румянцев Е.В. и др.* // Изв. вузов. Химия и хим. технология. 2019. Т. 62. Вып. 12. С. 13; <https://doi.org/10.6060/ivkkt.20196212.6017>
15. *Ksenofontov A.A., Stupikova S.A., Bocharov P.S. et al.* // J. Photochem. Photobiol. 2019. V. 382. P. 111899; <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.111899>
16. *Tao J., Sun D., Sun L. et al.* // Dyes Pigm. 2019. V. 168. P. 166; <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.04.054>
17. *Antina L.A., Ksenofontov A.A., Kalyagin A.A. et al.* // Spectrochim. Acta., A. 2019. V. 218. P. 308; <https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.03.117>
18. *Dong B., Zhong K., Lu Y.* // Dyes Pigm. 2019. V. 164. P. 156; <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2019.01.017>
19. *Sevinç G., Küçüköz B., Elmali A. et al.* // J. Mol. Struct. 2020. V. 1206. P. 127691; <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127691>
20. *Mazzone G., Quartarolo A.D., Russo N.* // Dyes Pigm. 2016. V. 130. P. 9; <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2016.02.021>
21. *Kamkaew A., Lim S.H., Lee H.B. et al.* // Chem. Soc. Rev. 2013. V. 42 P. 77.
22. *Awuah S.G., You Y.* // RSC Adv. 2012. V. 2. P. 11169.
23. *Valdez-Calderón A., Farfán-Paredes M., Araujo-Padilla X. et al.* // Polyhedron. 2020. V. 176. P. 114207; <https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.114207>
24. *Overwijk W.W., Restifo N.P.* // Curr. Protoc. Immunol. 2000. V. 39(1). P. 20.1.1; <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2001s39>
25. *Kuznetsova R.T., Aksenov Iu.V., Prokopenko A.A.* // J. Mol. Liq. 2019. V. 278. P. 5; <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.01.049>, <https://doi.org/10.1007/s10895-019-02403-2>
26. *Uppal T., Hu X., Fronczek F.R. et al.* // Chem. Eur. J. 2012. V. 18. № 13. P. 3893; <https://doi.org/10.1002/chem.201103002>
27. *Jiao L., Wu Ya., Ding Y. et al.* // Chem. Asian J. 2014. V. 9. № 3. P. 805; <https://doi.org/10.1002/asia.201301362>
28. *Антина Е.В., Березин М.Б., Дудина Н.А. и др.* // Журн. неорган. химии. 2014. Т. 59. № 10. С. 1427.
29. *Генина Э.А.* Методы биофотоники: Фототерапия. Уч. пос. Саратов: Новый ветер, 2012.
30. *Левшин Л.В., Салецкий А.М.* Люминесценция и ее измерения. Молекулярная люминесценция. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989.

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ  
ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ, КАТАЛИЗ

УДК 535.37:542.92

МЕХАНИЗМ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ПРИ ТЕРМИЧЕСКОМ  
РАСПАДЕ 2,2'-АЗОДИИЗОБУТИРОНИТРИЛА В ЖИДКОЙ  
КИСЛОРОДСОДЕРЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

© 2021 г. В. В. Наумов<sup>1</sup>, Г. Ф. Федорова<sup>1</sup>, Р.Ф. Васильев<sup>1</sup>, В. Д. Кънчева<sup>2</sup>,  
Т. Л. Вепринцев<sup>1</sup>, А. В. Трофимов<sup>1,3\*</sup>, О. И. Яблонская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт органической химии с центром фитохимии Болгарской академии наук, София, Болгария

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Московская обл., Россия

\*E-mail: avt\_2003@mail.ru

Поступила в редакцию 02.07.2020;

после доработки 14.09.2020;

принята в печать 21.09.2020

На основе кинетических данных по нестационарной хемилюминесценции, сопровождающей термический распад 2,2'-азодиизобутиронитрила в бензоле, разработана математическая компьютерная модель детального механизма этого хемилюминесцентного процесса. Модель, включающая 16 элементарных стадий, позволяет оценить константы скорости этих реакций и проиллюстрировать взаимодействие элементарных процессов.

*Ключевые слова:* 2,2'-азодиизобутиронитрил, кинетика, термическое разложение, хемилюминесценция, математическая модель.

DOI: 10.31857/S0207401X21020126

## ВВЕДЕНИЕ

Наиболее значимые направления использования хемилюминесценции, сопровождающей процессы окисления, относятся к изучению действия активных форм кислорода в разнообразных химических и биологических процессах и системах, а также к исследованию влияния антиоксидантов различной природы на окислительные взаимодействия [1–13]. Часто хемилюминесцентные окислительные процессы легко и удобно инициировать с помощью термического распада инициаторов цепных реакций окисления, среди которых наиболее часто используется 2,2'-азодиизобутиронитрил (АИБН). Необходимо отметить, что АИБН вообще широко применяется в науке и технике как источник свободных радикалов – в процессах радикальной полимеризации, цепного свободнорадикального окисления различных органических субстратов и при тестировании разнообразных химических и биохимических систем. Свободные радикалы, образующиеся при термическом распаде молекулы АИБН, способны участвовать в дальнейших цепных окислительных превращениях, включающих стадии диспропорционирования свободных радикалов, сопровождающиеся образованием электронно-возбужденных продуктов – эмиттеров хемилюминесценции [1–4, 6, 8–10, 12, 13].

В настоящей работе проанализирована возможность применения хемилюминесцентного метода совместно с компьютерным моделированием для детального анализа возможного механизма термического распада АИБН и оценки вкладов в кинетику процесса элементарных реакций с участием свободных радикалов, образующихся из АИБН в жидкой кислородсодержащей среде.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследовали кинетику хемилюминесценции бензольных растворов АИБН [3, 14, 15] в концентрации  $4 \cdot 10^{-4}$  М при температуре 60°C. Смесь насыщали кислородом путем барботирования воздуха, поступающего через капилляр. Слабое первичное свечение усиливали за счет переноса энергии на специально вводимый люминофор – 1,10-фенантролин-трипс(теноилтрифторацетонат) трехвалентного европия (хелат европия) в концентрации  $2 \cdot 10^4$  моль/л [13], испускающий свет в узкой спектральной полосе 613 нм (90% всех квантов люминесценции) [16]. Специальными опытами было установлено, что присутствие хелата европия в использованных концентрациях не влияет на форму кинетических кривых хемилюминесценции. Методика измерения хемилюминесценции.

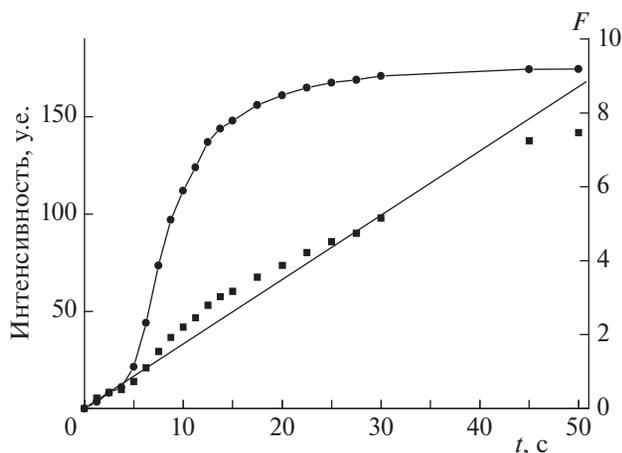


Рис. 1. Кинетическая кривая хемилюминесценции при введении инициатора АИБН в бензол, логарифмическая анаморфоза в координатах  $F(t)$  и ее линейная аппроксимация.

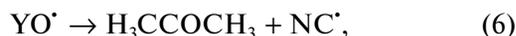
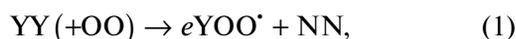
ции и экспериментальная установка описаны в работах [8–10]. Концентрированный бензольный раствор АИБН при помощи микрошприца резко вводили в реакционную ячейку хемилюминесцентной установки, содержащую бензол, с таким расчетом, чтобы конечный объем реакционной смеси составлял 5 мл. Скорость зарождения свободных радикалов ( $5.2 \cdot 10^{-9} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$ ) была рассчитана, исходя из концентрации АИБН [14] и температуры реакционной смеси.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При резком вводе концентрированного раствора АИБН в реакционную ячейку с бензолом возникало свечение с быстро возрастающей интенсивностью. Типичная кинетическая кривая хемилюминесценции приведена на рис. 1, из которого видно, что в течение 1 мин устанавливается стационарный уровень свечения, тогда как основные изменения интенсивности происходят уже в первые 10 с после ввода АИБН. На том же графике приведена анаморфоза этой кривой,  $F(t)$ , где  $F = \ln\{(J_{st}^{1/2} + J^{1/2})/(J_{st}^{1/2} - J^{1/2})\}$ ,  $t$  – время,  $J$  – интенсивность свечения, а  $J_{st}$  – ее стационарный уровень, достигаемый при выравнивании скоростей зарождения и расщепления свободных радикалов. Такая форма зависимости интенсивности от времени используется для определения константы скорости ( $k_t$ ) хемилюминесцентной реакции диспропорционирования перекисных радикалов:  $\text{ROO} \cdot + \text{ROO} \cdot \rightarrow \text{RO}^* + \text{RON} + \text{OO}$ , где  $\text{RO}^*$  – продукт реакции в электронно-возбужденном состоянии, впоследствии испускающий фотон. При этом было показано [17], что выполняется соотношение  $k_t = A^2/8W$ , в котором  $A$  – уг-

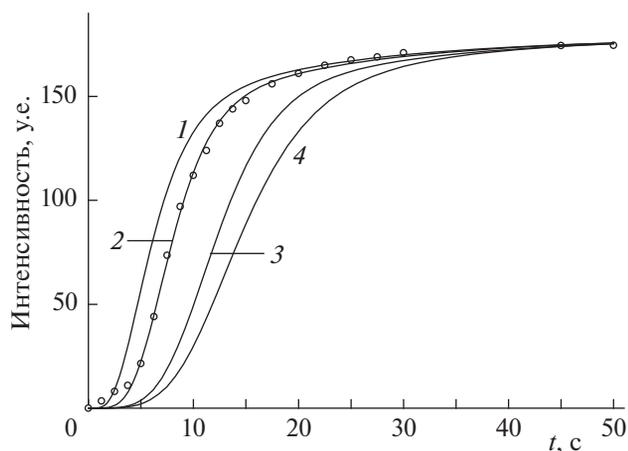
ловой коэффициент наклона зависимости  $F(t)$ , а  $W$  – скорость образования радикалов  $\text{ROO} \cdot$  (скорость иницирования). Приняв условно линейную зависимость  $F$  от  $t$ , представленную на рис. 1, можно получить значение  $k_t = 7.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ . Однако такой подход правомерен лишь в случае, когда радикалы  $\text{ROO} \cdot$  присутствуют в хемилюминесцентной системе в преобладающем количестве и не участвуют в побочных реакциях. В случае же распада АИБН ситуация выглядит более сложной, поскольку литературные данные указывают на присутствие в реакционной системе целого ряда побочных реакций и нескольких элементарных процессов, приводящих к образованию эмиттеров хемилюминесценции [15].

На основе литературных данных по термическому разложению АИБН [3, 14, 15] нами была принята следующая кинетическая схема возможного механизма процесса:



В данной схеме символом  $Y$  обозначен фрагмент  $\text{NC}(\text{CH}_3)_2\text{C}$  молекулы АИБН,  $e$  – коэффициент выхода свободных радикалов из клетки растворителя, символ  $*$  обозначает электронно-возбужденный продукт, способный излучать свет.

Схема реакций (1)–(16) была положена в основу математического компьютерного моделирования [18–21] кинетики хемилюминесцентного процесса при резком вводе концентрированного

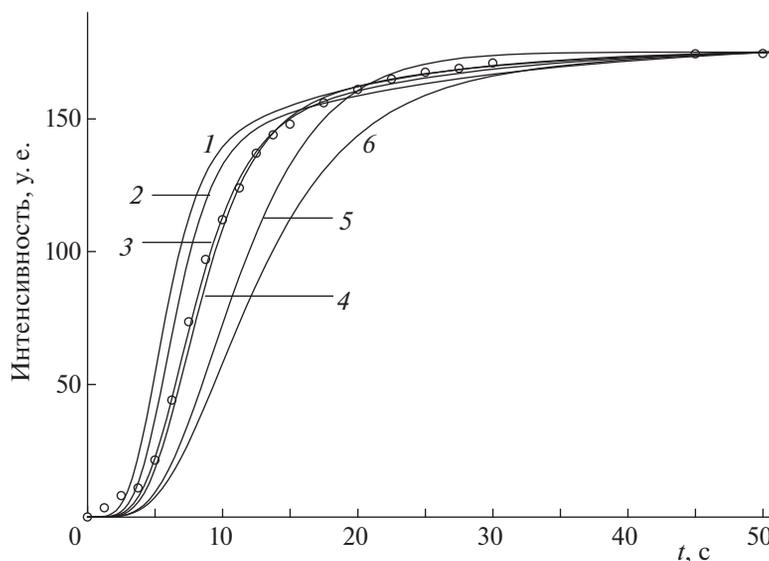


**Рис. 2.** Кинетические кривые хемилюминесценции при различных значениях константы  $k_3$ :  $5 \cdot 10^7$  (1),  $7 \cdot 10^6$  (2),  $1 \cdot 10^6$  (3),  $5 \cdot 10^5 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  (4). Остальные значения констант скорости реакций соответствуют базовой модели процесса. Точками показаны экспериментальные данные.

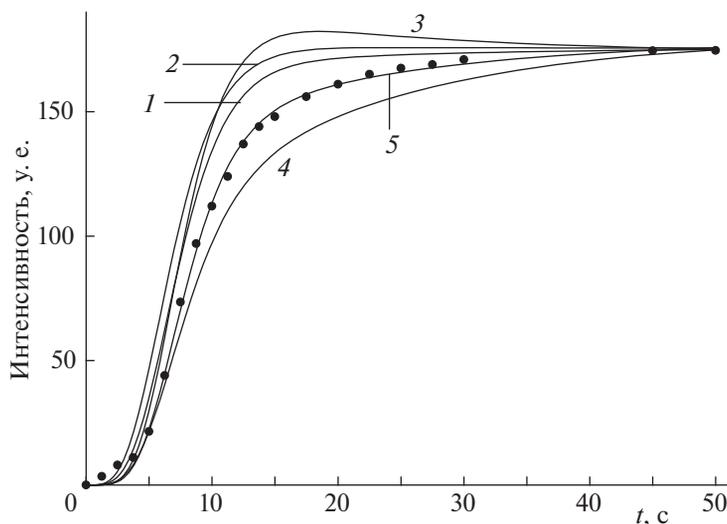
раствора АИБН в бензол. В схему включены реакции радикалов  $\text{H}_3\text{C}^\cdot$  и  $\text{NC}^\cdot$  только с кислородом, поскольку в присутствии кислорода при атмосферном давлении, когда  $[\text{H}_3\text{C}^\cdot] \ll [\text{H}_3\text{COO}^\cdot]$  и  $[\text{NC}^\cdot] \ll [\text{NCOO}^\cdot]$ , так как константы скорости  $k_8$  и  $k_9$  близки к диффузионным [3, 15, 22], побочные реакции имеют минимальное значение [2, 22, 23]. Значения констант скорости приведенных реакций, взятые из литературных источников [3, 15, 22, 23], были пересчитаны к температуре опыта ( $60^\circ\text{C}$ ). В

случае отсутствия литературных данных использовали значения констант скорости аналогичных процессов или сравнительные данные по реакционной способности [22, 23]. Термодимические оценки [15, 24] позволили сделать предположение о возможности образования электронно-возбужденных продуктов в реакциях (10), (12) и (13). Значения констант скорости элементарных реакций варьировали на 1–2 порядка в ходе сопоставления модельных и экспериментальных кинетических кривых хемилюминесценции. Поскольку кинетическая схема предполагает образование электронно-возбужденного продукта в трех элементарных процессах, корректировали также соотношения квантовых выходов хемилюминесценции в этих реакциях.

Набор констант скорости элементарных реакций и квантовых выходов хемилюминесценции, при котором наблюдалось оптимальное совпадение экспериментальной и модельной кинетических кривых хемилюминесценции, мы обозначим как *базовую кинетическую модель*. Значения констант скорости элементарных реакций в *базовой модели* составляли:  $k_2 = 4 \cdot 10^4$ ,  $k_3 = 7 \cdot 10^6$ ,  $k_4 = 1 \cdot 10^7$ ,  $k_5 = 1 \cdot 10^6$ ,  $k_6 = 1.2 \cdot 10^4$ ,  $k_7 = 6.4 \cdot 10^4$ ,  $k_8 = 1 \cdot 10^9$ ,  $k_9 = 1 \cdot 10^9$ ,  $k_{10} = 2.5 \cdot 10^6$ ,  $k_{11} = 5 \cdot 10^5$ ,  $k_{12} = 4 \cdot 10^6$ ,  $k_{13} = 3 \cdot 10^6$ ,  $k_{14} = 5 \cdot 10^4$ ,  $k_{15} = 1 \cdot 10^6$ ,  $k_{16} = 1 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ , соотношение квантовых выходов реакций (10), (12) и (13) равнялось 3 : 14 : 26 соответственно. Влияние изменений констант скорости отдельных элементарных реакций на кинетику хемилюминесценции проиллюстрировано на рис. 2 и 3, а квантовых выходов — на рис. 4.

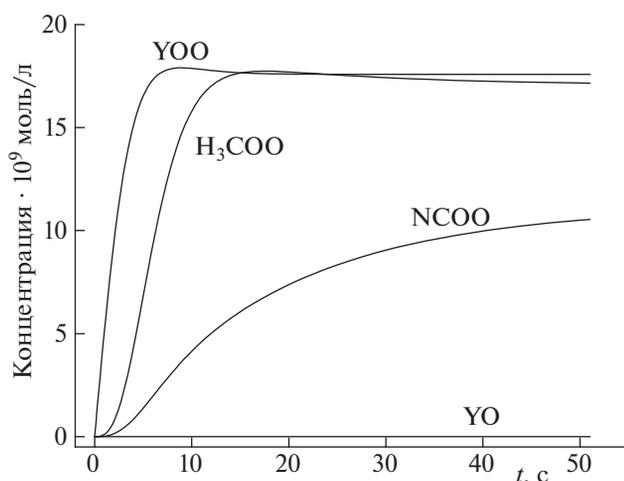


**Рис. 3.** Кинетические кривые хемилюминесценции при различных значениях констант  $k_{10}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{13}$ :  $k_{10} = k_{12} = k_{13} = 1 \cdot 10^7$  (1),  $k_{12} = 1 \cdot 10^7$  (2), базовая модель (3),  $k_{10} = 1 \cdot 10^6$  (4),  $k_{10} = k_{12} = 1 \cdot 10^6$  (5),  $k_{10} = k_{12} = k_{13} = 1 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$  (6). Остальные значения констант скорости реакций соответствуют базовой модели процесса. Точками показаны экспериментальные данные.



**Рис. 4.** Сопоставление модельных кинетических кривых хемилюминесценции с экспериментальными данными (показаны точками) при различных предполагаемых соотношениях квантовых выходов хемилюминесценции реакций (10), (12) и (13), соответственно: 1 : 1 : 1 (1), 3 : 1 : 1 (2), 1 : 6 : 1 (3), 1 : 1 : 6 (4), 3 : 14 : 26 (5). Значения констант скорости реакций соответствуют базовой модели.

Компьютерное математическое моделирование показало, что в присутствии кислорода воздуха свободнорадикальные компоненты системы представлены в основном радикалами перекисного типа:  $\text{YOO}^\bullet$ ,  $\text{H}_3\text{COO}^\bullet$  и  $\text{NCOO}^\bullet$ . Остальные свободные радикалы присутствовали в незначительных количествах (рис. 5). Максимальная концентрация как цианизопропилперекисных, так и метилперекисных радикалов составляла  $(1.6\text{--}1.7) \cdot 10^8 \text{ M}$  и была достигнута уже на 8-й и 16-й секундах опыта, соответственно, тогда как концентрация радикалов  $\text{NCOO}^\bullet$  нарастала постепенно в течение всего опыта (рис. 5).



**Рис. 5.** Изменение во времени концентраций свободных радикалов в базовой модели процесса.

Изменение константы скорости  $k_2$  в пределах одного порядка и констант  $k_4$ ,  $k_{15}$ ,  $k_{16}$  в пределах  $(1\text{--}100) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  практически не влияло на форму кинетических кривых хемилюминесценции. Ключевую роль в развитии процесса, как показывает рис. 2, играет реакция (3) рекомбинации цианизопропилперекисных радикалов с образованием цианизопропилоксирадикалов, определяющая форму и положение кинетической кривой хемилюминесценции. Как видно из рис. 3, константы скорости  $k_{10}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{13}$  хемилюминесцентных реакций определяют в основном наклон кинетических кривых. Наиболее соответствующими эксперименту следует принять значения констант скорости этих реакций, находящиеся в диапазоне  $(2\text{--}4) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ . Они вдвое превышают значение константы скорости гибели свободных радикалов ( $k_t$ ), определенное по методике из работы [17] без учета побочных реакций. Квантовый выход в реакции (13), по-видимому, превышает соответствующие выходы в реакциях (10) и (12), что иллюстрирует более плавный выход кинетических кривых хемилюминесценции на стационарный уровень (рис. 4), наилучшим образом соответствующий эксперименту. На это указывает и кинетика изменений концентраций свободных радикалов (рис. 5), показывающая гораздо более медленное нарастание концентраций цианперекисных радикалов по сравнению с ростом концентраций радикалов  $\text{YOO}^\bullet$  и  $\text{H}_3\text{COO}^\bullet$ .

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе кинетических данных по нестационарной хемилюминесценции, сопровождающей термический распад АИБН, разработана математическая компьютерная модель для детального описания механизма этого процесса. Модель включает 16 элементарных стадий, позволяет оценить константы скорости реакций и проиллюстрировать взаимодействие элементарных процессов.

Полученная информация важна для понимания механизмов взаимопревращений свободных радикалов – продуктов термического распада АИБН. Разработанная модель является удобным инструментом для изучения особенностей действия АИБН в качестве инициатора цепных свободнорадикальных процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-53-18019 Болг\_а) и Национальным научным фондом Болгарии (грант № КП-06-Русия-28).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vassil'ev R.F.* // Nature. 1962. V. 196. № 4855. P. 668.
2. *Vassil'ev R.F.* // Progr. React. Kinet. 1967. V. 4. P. 305.
3. *Шляпинтох В.Я., Карпунин О.Н., Постников Л.М. и др.* Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М.: Наука, 1966.
4. *Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Трофимов А.В.* // Хим. физика. 1994. Т. 13. № 11. С. 74.
5. *Цаплев Ю.Б., Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д. и др.* // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 7.
6. *Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д., Наумов В.В. и др.* // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 36.
7. *Жигачева И.В., Русина И.Ф., Генерозова и др.* // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 11. С. 68.
8. *Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V. et al.* // Analyst. 2009. V. 134. № 10. P. 2128.
9. *Васильев Р.Ф., Венринцев Т.Л., Долматова Л.С. и др.* // Кинетика и катализ. 2014. Т. 55. № 2. С. 157.
10. *Slavova-Kazakova A.K., Angelova S.E., Denev P. et al.* // Beilstein J. Org. Chem. 2015. V. 11. P. 1398.
11. *Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V. et al.* // Photochem. Photobiol. 2017. V. 93. № 2. С. 579.
12. *Fedorova G.F., Menshov V.A., Naumov V.V. et al.* // Photochem. Photobiol. 2019. V. 95. № 3. P. 780.
13. *Fedorova G.F., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F. et al.* // ARKIVOC. 2007. № 8. P. 163.
14. *Van Hook J.P., Tobolsky A.V.* // J. Amer. Chem. Soc. 1958. V. 80. № 4. P. 779.
15. *Vasvary G., Kuramshin E.M., Holly S. et al.* // J. Phys. Chem. 1988. V. 92. № 13. P. 3810.
16. *Wildes P.D., White E.H.* // J. Amer. Chem. Soc. 1971. V. 93. № 23. P. 6286.
17. *Vichutinskii A.A.* // Nature. 1965. V. 206. № 4981. P. 292.
18. *Mendes P.* // Comput. Appl. Biosci. 1993. V. 9. № 5. P. 563.
19. *Mendes P.* // Trends Biochem. Sci. 1997. V. 22. № 9. P. 361.
20. *Mendes P., Kell D.B.* // Bioinformatics. 1998. V. 14. № 10. P. 869.
21. *Hoops S., Sahle S., Gauges R. et al.* // Ibid. 2006. V. 22. № 24. P. 3067.
22. *Denisov E.T.* Liquid-Phase Reaction Rate Constants. London: Springer, 1974.
23. *Denisov E.T., Afanas'ev I.B.* Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology. Boca Raton: CRC Press, 2005.
24. *Benson S.W.* Thermochemical Kinetics. N. Y.: Wiley & Sons, 1976.

ФЕРРИМАГНЕТИЗМ СПИНОВОЙ ЦЕПОЧКИ С КОНКУРИРУЮЩИМИ  
ОБМЕННЫМИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯМИ© 2021 г. В. Я. Кривнов<sup>1\*</sup>, Д. В. Дмитриев<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 02.07.2020;  
после доработки 26.08.2020;  
принята в печать 21.09.2020

Изучена квантовая спиновая модель дельта-цепочки с обменными взаимодействиями ферро-(F) и антиферромагнитного (AF) типов. Свойства модели существенно зависят от параметра фрустрации  $\alpha$  (отношения констант AF- и F-взаимодействий). При  $\alpha < 1/2$  основное состояние ферромагнитно, а при  $\alpha = 1/2$  происходит квантовый фазовый переход в другую фазу. На основании численных расчетов и анализа модели при больших значениях  $\alpha$  сделан вывод о том, что основное состояние при  $\alpha > 1/2$  магнитоупорядоченно и полный спин основного состояния равен половине максимально возможного. Сравнение свойств основного состояния классической и квантовой моделей показывает, что рассматриваемая модель есть пример системы, в которой квантовые эффекты ответственны за появление порядка из беспорядка.

**Ключевые слова:** спиновая дельта-цепочка, фрустрированные спиновые системы, ферро- и ферри-магнетизм.

DOI: 10.31857/S0207401X21020102

## ВВЕДЕНИЕ

Низкоразмерные квантовые магнетики на геометрически фрустрированных решетках вызывают значительный интерес как с экспериментальной, так и с теоретической точек зрения [1–3]. Важным классом таких объектов являются соединения, состоящие из треугольных кластеров магнитных ионов. К ним, например, относятся магнетики на двумерных и квазиодномерных решетках кагоме, решетках пирохлора и ряде других. Простейшим и типичным примером такой системы является так называемая дельта-цепочка, представляющая собой линейную цепь треугольников с магнитными ионами со спином  $1/2$  в их узлах (рис. 1). Магнитные свойства такой системы описываются моделью Гейзенберга, имеющей вид

$$H = J_1 \sum S_i S_{i+1} + J_2 \sum S_{2i-1} S_{2i+1}. \quad (1)$$

Квантовая дельта-цепочка, со спином  $s = 1/2$  с обоими антиферромагнитными (AF) взаимодействиями:  $J_1 > 0$ ,  $J_2 > 0$ , достаточно хорошо изучена и обладает рядом интересных свойств [2, 4–7]. В частности, 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.

В то же время дельта-цепочка с  $s = 1/2$ , ферромагнитным взаимодействием  $J_1$  и антиферромагнитным взаимодействием  $J_2$  ( $J_1 < 0$ ,  $J_2 > 0$ ) (F–AF-модель) также весьма интересна, но до недавнего времени была изучена существенно меньше. Особый интерес вызывает изучение ее магнитных свойств в зависимости от значения параметра фрустрации  $\alpha = J_2/|J_1|$ . Ранее было лишь известно, что основное состояние F–AF-цепочки ферромагнитно, если параметр фрустрации  $\alpha < 1/2$ , но структура основного состояния при  $\alpha > 1/2$  до конца оставалась невыясненной, хотя и предполагалось, что основное состояние магнитоупорядоченно (ферримагнитно) при  $\alpha > 1/2$ . Критическое значение параметра фрустрации  $\alpha_{cr} = 1/2$  разделяет эти две фазы.

Дополнительной мотивацией для изучения F–AF-дельта-цепочки стало появление реальных

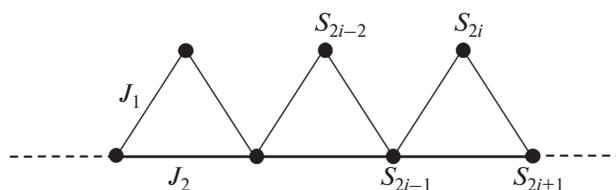


Рис. 1. Спиновая модель дельта-цепочки.

соединений, описываемых этой моделью. Примером такого рода соединений являются комплексы  $[\text{CuH}_2\text{O}] \cdot [\text{Cu}(\text{mal})\text{H}_2\text{O}](\text{ClO}_4)_2$ , содержащие магнитные ионы  $\text{Cu}^{2+}$  со спином  $1/2$  [8, 9]. Из анализа экспериментальных данных было установлено, что параметр фрустрации  $\alpha$  в этом соединении примерно равен единице.

Другим очень интересным примером соединений, описываемых F–AF-моделью, являются недавно синтезированные циклические комплексы, содержащие магнитные молекулы  $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$  с рекордным значением спина основного состояния молекулы:  $S = 60$  [10]. Оценка значения параметра фрустрации для этой молекулы показывает, что  $\alpha = 0.46$  [10]. Имеются также и другие примеры ферромагнитных молекулярных магнетиков [11].

Как было отмечено выше, при  $\alpha < 1/2$  основное состояние  $s = 1/2$  F–AF-цепочки является ферромагнитным, т.е. спин основного состояния  $S = N/2$  ( $N$  – число спинов цепочки). Значение параметра фрустрации  $\alpha_{cr} = 1/2$  соответствует квантовой критической точке; F–AF-модель при  $\alpha = \alpha_{cr}$  была детально исследована в наших работах [12–14]. В частности, подробный анализ этой весьма нетривиальной модели был недавно приведен в работе [15]. Напомним кратко об основных особенностях F–AF-цепочки при  $\alpha = \alpha_{cr}$ . Точными основными состояниями модели (1) являются как локализованные многомагнетонные состояния, так и связанные состояния магнонов специального класса. Основное состояние реализуется при любом значении полного спина, и число всех основных состояний экспоненциально велико. Вследствие этого энтропия, приходящаяся на один спин, при нулевой температуре конечна и равна  $\ln(2)/2$ . Спектр возбуждений имеет экспоненциально малую щель, что приводит к необычному поведению низкотемпературной термодинамики. Эти свойства модели представляют несомненный интерес. Однако едва ли можно ожидать, что в настоящее время возможен синтез соединений, описываемых F–AF-моделью с параметром фрустрации, в точности равным критическому. (Заметим, тем не менее, что в магнитной молекуле  $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$  параметр фрустрации близок к критическому значению.) Поэтому возникает вопрос о свойствах модели при произвольных значениях параметра  $\alpha$ . Свойства модели в ферромагнитной фазе при  $\alpha < 1/2$  исследованы достаточно подробно. В частности, было изучено низкотемпературное поведение модели в этой фазе [14, 15], и был проведен анализ экспериментально наблюдаемых свойств магнитной молекулы  $\text{Fe}_{10}\text{Gd}_{10}$ , параметр фрустрации которой  $\alpha < 1/2$ .

В настоящей работе мы остановимся на изучении F–AF-дельта-цепочки при  $\alpha > 1/2$ . Как мы отмечали выше, вопрос о природе основного со-

стояния в этой фазе остается открытым, хотя есть определенные основания ожидать, что основное состояние при  $\alpha > 1/2$  ферромагнитно, т.е. величина магнитного момента, приходящегося на один узел, отлична от нуля, но меньше максимального значения, равного  $1/2$ . Например, в нашей работе [13] по изучению F–AF-дельта-цепочки в случае предельной величины анизотропии обменных взаимодействий показано, что фазовая диаграмма основного состояния состоит из ферромагнитной и ферримагнитной фаз с критической линией между ними, и такая картина может также сохраниться и для изотропной модели (1). Тем не менее, этот вопрос требует дополнительного исследования.

### ФЕРРИМАГНИТНАЯ ФАЗА

Для начала интересно рассмотреть этот вопрос для классической версии модели (1). В классическом приближении операторы спина  $s = 1/2$  заменяются векторами с длиной  $s$ :  $\mathbf{S}_i = s\mathbf{n}_i$  ( $\mathbf{n}_i$  – единичный вектор), и квантовый гамильтониан (1) сводится к классическому. Для дальнейшего рассмотрения удобно представить этот гамильтониан в виде суммы гамильтонианов отдельных треугольников:

$$H = s^2 \sum H_i, \quad (2)$$

где  $H_i$  – гамильтониан  $i$ -того треугольника, имеющий вид (с заменой  $\mathbf{S}$  на  $\mathbf{n}$ )

$$H_i = -(n_{2i-1} + n_{2i+1})n_{2i} + \alpha n_{2i-1}n_{2i+1}, \quad (3)$$

где мы приняли, что  $J_1 = -1$ , а  $J_2 = \alpha$ .

Легко убедиться, что для  $\alpha \leq 1/2$  основное состояние гамильтониана (2) является тривиальным ферромагнитным с параллельной ориентацией всех спинов. При  $\alpha > 1/2$  минимальная энергия (3) отдельного треугольника соответствует ферримагнитной конфигурации, показанной на рис. 2, в которой все спины треугольника,  $\mathbf{n}_1$ ,  $\mathbf{n}_2$ ,  $\mathbf{n}_3$ , лежат в одной плоскости и угол между спинами  $\mathbf{n}_1$ ,  $\mathbf{n}_3$  и вершинным спином  $\mathbf{n}_2$  равен  $\theta_0$ , где

$$\cos\theta_0 = \frac{1}{2\alpha}. \quad (4)$$

Согласно (4), магнитный момент  $m$  каждого треугольника равен

$$m = 1 + \frac{1}{\alpha}, \quad (5)$$

и параллелен спину  $\mathbf{n}_2$ .

На первый взгляд кажется, что полный магнитный момент цепочки равен  $nm$ , где  $n$  – число треугольников. Этот результат был бы справедлив, если бы все треугольники цепочки лежали в одной плоскости и все вершинные спины были бы параллельны. В действительности, конфигурация основного состояния необязательно долж-

на быть компланарной. Рассмотрим, например, два соседних треугольника со спинами  $(\mathbf{n}_1, \mathbf{n}_2, \mathbf{n}_3)$  и  $(\mathbf{n}_3, \mathbf{n}_4, \mathbf{n}_5)$ . Спины треугольника  $(\mathbf{n}_1, \mathbf{n}_2, \mathbf{n}_3)$  лежат в одной плоскости, и их конфигурация удовлетворяет условию (4). Спины соседнего треугольника  $(\mathbf{n}_3, \mathbf{n}_4, \mathbf{n}_5)$  также образуют ферримагнитную конфигурацию, но они могут лежать в любой плоскости, полученной в результате вращения этого треугольника вокруг спина  $\mathbf{n}_3$  на произвольный угол, так что основное состояние второго треугольника вырождено по углу между плоскостями  $(\mathbf{n}_1, \mathbf{n}_2, \mathbf{n}_3)$  и  $(\mathbf{n}_3, \mathbf{n}_4, \mathbf{n}_5)$ . Затем плоскость третьего треугольника  $(\mathbf{n}_5, \mathbf{n}_6, \mathbf{n}_7)$  может быть повернута на произвольный угол вокруг спина  $\mathbf{n}_5$  и т.д. В результате основное состояние классической дельта-цепочки при  $\alpha > 1/2$  бесконечно вырождено. Все конфигурации основного состояния могут быть описаны как случайные блуждания конечной длины на поверхности сферы. Усреднение по всем конфигурациям основного состояния приводит к нулевой намагниченности, несмотря на конечную намагниченность каждого треугольника. Магнитный момент в слабом магнитном поле ( $h \ll T$ ) растет линейно с увеличением напряженности поля [14]:

$$\frac{m}{n} = \chi h, \quad \chi = \frac{2\alpha + 1}{6T(2\alpha - 1)}. \quad (6)$$

В отличие от классической модели, которая допускает аналитическое рассмотрение, квантовая F–AF–дельта-цепочка при  $\alpha > 1/2$  может быть изучена лишь на основе приближенных методов или численных расчетов конечных цепочек. В проведенных нами численных расчетах спина основного состояния мы использовали как точную диагонализацию (exact diagonalization (ED)) соответствующих матриц, так и высокоэффективные приближенные методы, основанные на ренорм-групповой процедуре (DMRG), позволяющие существенно увеличить размеры цепочки по сравнению с доступными для ED-вычислений.

Оказалось, однако, что результаты расчетов основного состояния зависят от граничных условий (т.е. от того, являются ли цепочки циклическими или открытыми) и от четности числа треугольников в цепочке. Например, спин основного состояния  $S_{tot}$  циклической цепочки с четным числом треугольников уменьшается постепенно или скачками от  $S_{tot} = (N/4 + 1)$  до  $S_{tot} = 0$  при увеличении  $\alpha$  от  $1/2$  до величины  $\alpha_0$ , зависящей от  $N$ . Согласно численным расчетам,  $\alpha_0 \sim 1, \sim 2, \sim 3$  для  $N = 20, 24$  и  $36$  соответственно. Такая же ситуация наблюдается и для открытых цепочек с нечетным числом треугольников. С другой стороны, для открытых цепочек с четным числом треугольников спин  $S_{tot}$  был равен  $(N + 1)/4$  при всех значениях параметра  $\alpha > 1/2$  и для рассчитанных нами цепочек (до  $N \sim 60$ ). (Заметим, что подобное различие в

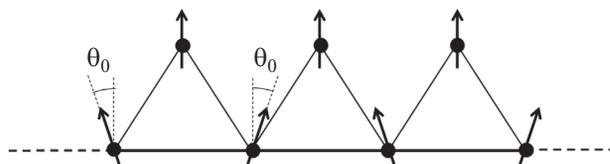


Рис. 2. Ферримагнитное состояние классической дельта-цепочки.

поведении спина основного состояния было обнаружено ранее в работе [16].) Как будет обсуждено ниже, это различие в поведении  $S_{tot}$  обусловлено эффектом конечномерности, и при  $N \gg 1$  полный спин  $S_{tot}$  не должен зависеть от типа цепочки. Для решения этого вопроса полезно рассмотреть дельта-цепочку при больших значениях параметра фрустрации. В пределе  $\alpha = \infty$  модель распадается на две несвязанные подсистемы: антиферромагнитную цепочку и подсистему невзаимодействующих спинов на вершинах треугольников. При больших, но конечных значениях  $\alpha$  взаимодействие между подсистемами можно учесть в рамках теории возмущений по величине  $1/\alpha$ . В этом случае удобно принять  $J_2 = 1, J_1 = -1/\alpha$ , и гамильтониан (1) будет иметь вид

$$H = H_0 + V, \quad (7)$$

$$V = -\frac{1}{\alpha} \sum (S_{2i-1} + S_{2i-1}) S_{2i}, \quad (8)$$

где  $H_0$  – гамильтониан антиферромагнитной цепочки спинов основания, а  $V$  – их взаимодействие со спинами вершин. Пусть циклическая цепочка содержит  $n$  треугольников и  $n$  спинов основания ( $n = N/2$ ) и  $n$  четно. Тогда основное состояние  $H_0$  является синглетом, и в силу его симметрии поправка первого порядка равна нулю. При этом вершинная подсистема вырождена по спину. Однако для триплета с  $S_{tot} = 1$  поправка первого порядка отлична от нуля. Она равна среднему  $\langle V \rangle$  по триpletу, которое имеет вид

$$\langle V \rangle = -\frac{1}{\alpha} \sum \langle S_{2i-1}^z + S_{2i+1}^z \rangle S_{2i}^z. \quad (9)$$

Среднее  $\langle S_{2i}^z + S_{2i+1}^z \rangle$  по триpletному состоянию равно  $2/n$ , и минимум (9) достигается при  $S_{2i}^z = 1/2$ , т.е. подсистема вершинных спинов находится в ферромагнитном состоянии и  $S_{tot} = (n/2 + 1)$ . (Заметим, что именно такое значение  $S_{tot}$  имеют циклические цепочки с  $n \sim 10$  при  $\alpha \sim 1$ .) При этом  $\langle V \rangle = -1/\alpha$ . Разность энергий  $\Delta E$  нижайшего триплета и синглета AF-цепочки Гейзенберга, как известно, равна  $\Delta E = \pi^2/n$ , и переход из состояния с  $S_{tot} = 0$  в состояние с  $S_{tot} = (n/2 + 1)$  при большом значении  $\alpha$  происходит при  $n > \pi^2\alpha$ . Для  $\alpha = 10$  соответствующее  $n \sim 100$  ( $N \sim 200$ ), но численные

расчеты таких больших цепочек пока нельзя провести. Что касается открытых дельта-цепочек с четным числом треугольников, то АF-подсистема имеет нечетное число спинов, ее основное состояние имеет спин  $1/2$  и вклад первого порядка отличен от нуля. Подсистема вершинных спинов находится в ферромагнитном состоянии, и  $S_{tot} = n/2 + 1/2$ , как и наблюдается в численных расчетах таких цепочек. Таким образом, при больших значениях  $\alpha$  спин основного состояния открытых и достаточно больших циклических цепочек равен  $N/4$ . Необходимо, однако, отметить, что выше мы рассматривали вклады первого порядка по  $V$  для состояний антиферромагнитной цепочки с  $S = 1$  и  $S = 1/2$  для циклической и открытой цепочек соответственно. Это правильно, когда число спинов составляет сотни или тысячи. Если, однако, цепочка имеет макроскопические размеры, стартовым является состояние с также макроскопическим спином  $S$  АF-цепочки. В этом случае  $\langle V \rangle = -S/\alpha$  и полная энергия равна

$$E = E(S) - \frac{S}{\alpha}, \quad (10)$$

где  $E(S)$  — энергия нижайшего состояния со спином  $S$  АF-цепочки Гейзенберга, которая при  $S \ll n$  равна [17]

$$E(S) = E_0 + \frac{\pi^2 S^2}{2n}. \quad (11)$$

Здесь  $E_0$  — энергия основного состояния АF-цепочки.

Минимизация (10) по  $S$  дает оптимальное значение спина АF-подсистемы:

$$S^* = \frac{n}{\pi^2 \alpha}, \quad (12)$$

и полный спин  $S_{tot}$  равен

$$S_{tot} = \left( \frac{1}{2} + \frac{1}{\pi^2 \alpha} \right) n. \quad (13)$$

Таким образом, при больших значениях  $\alpha$  спин основного состояния составляет половину от максимального значения, равного  $N/2$ . При этом магнитные моменты, приходящиеся на один узел антиферромагнитной цепочки и вершинной подсистемы, равны  $1/\pi^2 \alpha$  и  $1/2$  соответственно. Хотя полученный результат относится к области больших значений  $\alpha$ , можно ожидать, что спин основного состояния  $S_{tot}$  будет описываться формулой (13) при всех  $\alpha > 1/2$ , и это имеет место как для открытых цепочек с четным числом треугольников, так и для достаточно больших циклических цепочек.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы изучили модель дельта-цепочки с ферро- и антиферромагнитными обменными взаимодей-

ствиями. Основное внимание уделено области значений параметра фрустрации  $\alpha > 1/2$ . Показано, что некоторые противоречия в результатах численных расчетов обусловлены эффектом конечности рассчитываемых цепочек. На основании анализа модели при больших значениях  $\alpha$  сделан вывод о том, что основное состояние при  $\alpha > 1/2$  ферромагнитно и его полный спин  $S_{tot}$  зависит от  $\alpha$  и превышает  $N/4$ . Недавние численные расчеты, проведенные в работе [18], подтверждают этот вывод. Таким образом, основное состояние квантовой F–AF-модели при  $\alpha > 1/2$  является магнитоупорядоченным в отличие от классической модели, где оно бесконечно вырождено и разупорядоченно. Таким образом, рассматриваемая модель принадлежит к классу систем, в которых реализуется явление “порядок из беспорядка” (“order by disorder”), когда квантовые флуктуации формируют упорядоченное состояние из разупорядоченного.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Diep H.T.* Frustrated Spin Systems. Singapore: World Scientific, 2013.
2. *Derzhko O., Richter J., Maksymenko M.* // Intern. J. Modern Phys. 2015. V. 29. № 12. P. 1530007.
3. *Дмитриев Д.В., Кривнов В.Я.* // Хим. физика. 2009. Т. 28. № 3. С. 24.
4. *Zhitomirsky M.E., Tsunetsugu H.* // Phys. Rev. B. 2004. V. 70. № 10. P. 100403.
5. *Schnack J., Schmidt H.-J., Richter J., Schulenburg J.* // Eur. Phys. J. B. 2001. V. 24. № 4. P. 475.
6. *Richter J., Schulenburg J., Honecker A., Schnack J., Schmidt H.J.* // J. Phys.: Condens. Mater. 2004. V. 16. № 11. P. S779.
7. *Derzhko O., Richter J.* // Phys. Rev. B. 2004. V. 70. № 10. P. 104415.
8. *Ruiz-Perez C., Hernandez-Molina M., Lorenzo-Luis P. et al.* // Inorg. Chem. 2000. V. 39. № 17. P. 3845.
9. *Inagaki Y., Narumi Y., Kindo K. et al.* // J. Phys. Soc. Jpn. 2005. V. 74. № 10. P. 2831.
10. *Baniodeh A., Magnani N., Lan Y. et al.* // Npj Quant. Mater. 2018. V. 3.1. P. 10.
11. *Моргунов П.Б., Tanimoto Y., Inoue K., Yoshida Y., Курман М.В.* // Хим. физика. 2007. Т. 26. № 5. С. 89.
12. *Krivnov V.Ya., Dmitriev D.V., Nishimoto S., Drechsler S.-L., Richter J.* // Phys. Rev. B. 2014. V. 90. № 1. P. 014441.
13. *Dmitriev D.V., Krivnov V.Ya.* // Phys. Rev. B. 2015. V. 92. № 5. P. 054407.
14. *Dmitriev D.V., Krivnov V.Ya., Richter J., Schnack J.* // Phys. Rev. B. 2019. V. 99. № 9. P. 094410.
15. *Кривнов В.Я., Дмитриев Д.В., Эрхман Н.С.* // Хим. физика. 2019. Т. 28. № 12. С. 24.
16. *Tonegawa T., Kaburagi M.* // J. Magn. Magn. Mater. 2004. V. 272–276. P. 898.
17. *Griffiths R.B.* // Phys. Rev. 1964. V. 133. № 3. P. A768.
18. *Yamaguchi T., Drechsler S.-L., Ohta Y., Nishimoto S.* // Phys. Rev. B. 2020. V. 101. № 10. P. 104407.

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ  
И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ  
МЕТИЛОВОГО ЭФИРА ПИРОФЕОФОРБИДА-а**

© 2021 г. М. А. Климович<sup>1</sup>, Н. Н. Сажина<sup>1</sup>, А. Ш. Радченко<sup>1</sup>, Н. Ю. Герасимов<sup>1</sup>, А. Е. Егоров<sup>1</sup>,  
О. В. Неврова<sup>1</sup>, А. В. Шибаева<sup>1</sup>, А. О. Шкирдова<sup>1,3</sup>, А. А. Маркова<sup>2</sup>, Е. С. Беляев<sup>3</sup>,  
И. А. Замилацков<sup>3</sup>, В. В. Спиридонов<sup>4</sup>, В. А. Кузьмин<sup>1\*</sup>, А. Б. Шевелёв<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>3</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>4</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*E-mail: vak@sky.chph.ras.ru

Поступила в редакцию 02.07.2020;

после доработки 02.07.2020;

принята в печать 21.09.2020

Для повышения биодоступности нерастворимого в воде метилового эфира пиррофеофорбида-а (PPP-а) была приготовлена его липосомальная форма и изучены физико-химические и фотохимические свойства. Было установлено, что квантовый выход  $^1\text{O}_2$  имел колоколообразную зависимость от концентрации PPP-а в липидной фазе липосом с максимумом при ее значении 31.6 мкмоль/г липидов. С помощью ИК-спектроскопии показано фотоиндуцированное образование альдегидных групп в липидной фазе липосом. Методом конфокальной микроскопии подтверждено внутриклеточное накопление PPP-а.

*Ключевые слова:* липосомы, фотосенсибилизатор, фотодинамическая терапия.

DOI: 10.31857/S0207401X21020084

**ВВЕДЕНИЕ**

Фотодинамическая терапия (ФДТ) является в настоящее время одним из перспективных методов лечения злокачественных опухолей. Этот метод отличается от традиционных методов лечения опухолей высокой избирательностью воздействия, отсутствием тяжелых системных осложнений при лечении, возможностью многократного повторения процедур [1]. Поглощение энергии света фотосенсибилизатором (ФС) приводит к фотохимическим реакциям с образованием активных форм кислорода (АФК): синглетного кислорода  $^1\text{O}_2$  и анион-радикала супероксида  $\text{O}_2^-$ , действие которых на опухолевые клетки ведет к их гибели.

Производные хлорофилла-а являются перспективными ФС для ФДТ. Метилловый эфир пиррофеофорбида-а (PPP-а) является фотосенсибилизатором второго поколения на основе хлорофилла-а, имеет полосу поглощения в красной области спектра при 668 нм в дихлорметане с коэффициентом молярной экстинкции  $45000 \text{ см}^{-1} \cdot \text{М}^{-1}$  [2]. Последние 20 лет активно исследуются влияние данного ФС

на внутриклеточные сигнальные системы [3] и эффективность использования его в терапии карциномы толстой кишки НСТ 116 и других карцином [4–6]. Пиррофеофорбид-а нерастворим в водной среде, а добавление к его раствору в этаноле воды до концентрации в 30% приводит к агрегации красителя и снижению квантового выхода  $^1\text{O}_2$  на два порядка по сравнению с мономерной формой, для которой квантовый выход  $^1\text{O}_2$  составляет 50–80% [7].

При добавлении неионного ПАВ к водному раствору феофорбида агрегированные формы PPP-а преимущественно переходят в мономерную форму [8]. Для повышения биодоступности, фотосенсибилизирующих свойств PPP-а и селективности к опухолевым клеткам используются различные наноконтейнеры [9–12]. Распространенным типом контейнеров для доставки лекарственных средств являются липосомы на основе природных лецитинов, которые хорошо растворимы в биологических жидкостях, имеют повышенное сродство к опухолевым клеткам, защищают ФС от разрушения и не вредны для организма [13–16]. Липосомы позволяют донести включенные в них

фотосенсибилизаторы по кровеносному руслу до опухоли. Это расширяет возможности их применения в фотодинамической терапии, в основе которой лежат фотоиндуцированные окислительные процессы, приводящие к гибели опухолевых клеток по апоптотическому и некротическому путям.

Ключевой проблемой разработки противоопухолевых средств, обеспечивающих продление жизни больных, является обеспечение избирательности действия цитотоксических агентов в отношении раковых клеток при минимальной токсичности в отношении нормальных клеток организма [1]. В случае свободных фотосенсибилизаторов порфиринового ряда селективность достигается за счет того, что *in vivo* эти гидрофобные соединения практически полностью включаются в комплексы с альбумином, имеющим специальные карманы или полости, или с липопротеинами низкой плотности, за счет взаимодействия с их гидрофобными областями, для транспортировки водонерастворимых соединений (жирных кислот, стеролов, билирубина и других) по кровяному руслу.

Аномально высокая по сравнению с нормальными клетками катаболическая активность опухолевых клеток приводит к ускоренному поглощению ими транспортных белков крови, выполняющих в организме трофическую функцию, в результате чего происходит ускоренное накопление порфиринов в очагах опухолевого роста. При включении ФС в липосомы этот эффект полностью исключается [17], однако при использовании липидов определенного состава, в частности димиристоил-L- $\alpha$ -фосфатидилхолина, удается достигнуть эффективной передачи ФС из липосом в плазматическую мембрану опухолевой клетки без слияния и даже прямого контакта клеточной и липосомной мембран между собой [18].

Целью настоящей работы было изучение физико-химических основ, обеспечивающих бесконтактную передачу PPP-*a* из липосом в опухолевые клетки, в частности выбор концентрации ФС, обеспечивающей наибольшую стабильность липосомных наноконтейнеров при их хранении и циркуляции в кровяном русле. Выполнено исследование темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности липосомальной формы PPP-*a* на культуре клеток карциномы толстой кишки человека НСТ 116.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Приготовление липосом*

Для приготовления липосом использовали суспензию соевого лецитина в концентрации 1 мг/мл (1.29 мМ) марки L- $\alpha$ -фосфатидилхолин производства компании Sigma-Aldrich (USA) в фосфатном буфере (1 мМ, pH 7.4). В состав леци-

тина данной марки входило два основных фосфолипида: фосфатидилхолин – 63% и фосфатидилэтаноламин – 32%. Содержание жирных кислот в % к общему их количеству составило: пальмитиновая – 17, стеариновая – 4, олеиновая – 9, линолевая – 60, линоленовая – 7.

Смесь перемешивали в течение 20 мин в шейкере, добавляя от 7 до 100 мкл раствора PPP-*a* с концентрацией 9.1 мМ в толуоле. Липосомы формировали с использованием ультразвукового гомогенизатора VCX-130 производства компании Sonic & Materials (USA) в течение 15 мин при мощности 70 Вт. Для предохранения липосом от окисления во время ультразвуковой обработки сосудов с суспензией помещали в смесь воды со льдом. Дисперсию липосом центрифугировали при  $T = 4^\circ\text{C}$  в течение 20 мин при 13000 об/мин. Для регистрации люминесценции синглетного кислорода суспензии липосом были приготовлены с применением тяжелой воды.

### *Спектральные измерения*

Спектры поглощения и флуоресценции снимали в кварцевых кюветах размером 10 мм  $\times$  4 мм на спектрофотометрах Shimadzu UV-3101 PC (Япония), Perkin Elmer Lambda-25 (США) и на спектрофлуориметре Флюорат-02-Панорама (Россия) [19, 20]. Для инициирования окисления липосом использовали водорастворимый инициатор ААРН – 2,2'-азо-бис(амидинопропан)дигидрохлорид производства компании Acros Organics (USA). Кинетику образования продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – диеновых конъюгатов регистрировали на длине волны максимума их поглощения  $\lambda = 234$  нм при физиологической температуре ( $37^\circ\text{C}$ ) [20]. Диеновые конъюгаты являются начальными продуктами ПОЛ и образуются в результате миграции двойных связей при отрыве протона от метиленовой группы, окруженной двойными связями.

Времена жизни флуоресценции PPP-*a*, включенного в липосомы, измеряли при 678 нм на времяразрешенном спектрофлуориметре Fluotime 300 PicoQuant (Germany): фотовозбуждение от лазера Solea при 507 нм. Времена жизни люминесценции синглетного кислорода измеряли на этом же приборе при 1275 нм. Фотовозбуждение PPP-*a* проводили с помощью ксеноновой лампы при 543 нм. Образцы разводили до значений поглощения 0.065–0.07 на длине волны  $\lambda = 543$  нм. Для расчета квантового выхода синглетного кислорода аналогичные измерения были сделаны и для раствора бенгальского розового в тяжелой воде.

Анизотропию флуоресценции свободного PPP-*a* в дихлорметане и в составе водной суспензии липосом измеряли также на Fluotime 300 PicoQuant: фотовозбуждение поляризованным све-

том от лазера LDH 405 при 398 нм, флуоресценция (поляризованный свет) при 680 нм.

### *Метод динамического светорассеяния*

Для определения размеров липосом в суспензии использовался метод динамического светорассеяния. Измерения среднего диаметра липосом проводили на высокочувствительном приборе Zetasizer Nano ZS (Great Britain) по оценке корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного на липосомах под углом  $173^\circ$  лазерного излучения с  $\lambda = 633$  нм. Концентрация лецитина в суспензии липосом составляла 0.5 мг/мл, температура –  $25^\circ\text{C}$ , индекс полидисперсности варьировался в пределах 0.21–0.26. Для каждого размера выполняли регистрацию 5–10 распределений интенсивности по размерам частиц с 15 накоплениями в каждом измерении; усреднение проводили по размерам частиц с максимальной интенсивностью рассеяния. Для измерения  $\zeta$ -потенциала ( $Z$ ) липосом этот же прибор использовался в режиме регистрации электрофоретической подвижности частиц. Усреднение максимальных значений  $\zeta$ -потенциала выполняли по результатам трех измерений, погрешность измерений не превышала 10%.

### *Определение вязкости компонентов в липосомах*

Текучесть липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зонда использовали стабильные нитроксильные радикалы 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксипиперидин-1-оксил, синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН. Глубина расположения нитроксильного радикала в липосомах составляла 0.2–0.4 нм. Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной диффузии ( $\tau_c$ ), характеризующее микровязкость компонентов мембраны. Регистрацию спектров ЭПР проводили на радиоспектрометре ER 200D-SRC компании Bruker (Germany).

### *ИК-спектроскопия*

Измерение методом ИК-спектроскопии проводили на приборе Specord (M80 Carl Zeiss, Germany). Спектры регистрировали в диапазоне волновых чисел от 1000 до 2000  $\text{см}^{-1}$ . Образцы наносили в виде водных суспензий на стекло марки КРС-5 (объем суспензии составлял 3 мкл) и прижимали вторым таким же стеклом. Условия облучения красным светом кювет с суспензиями липосом аналогичны условиям опытов, проведенных с клетками (светофильтр КС-11, 30 Дж/см<sup>2</sup>).

### *Культивирование клеток НСТ 116*

В работе использовали клеточную линию аденокарциномы кишки НСТ 116. Клетки культивировали в питательной среде DMEM производства компании ПанЭко (Россия). В культуральную среду добавляли 10% эмбриональной телячьей сыворотки (GE LifeSciences, USA), 2 мМ L-глутамин (ПанЭко, Россия), 100 ед/мл пенициллина (ПанЭко, Россия) и 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия), инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием  $\text{CO}_2$ . В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста.

Для проведения экспериментов на клетках карциномы толстой кишки НСТ 116 была приготовлена суспензия липосом с концентрациями лецитина и PPP-а в них соответственно 1 мг/мл и 31.7 мкМ. Данная концентрация PPP-а была выбрана как наиболее эффективная по результатам спектральных исследований.

### *Конфокальная спектроскопия*

Для определения локализации PPP-а и подтверждения генерации АФК использовался метод конфокальной микроскопии. Клетки НСТ 116 инкубировали с липосомами в конечной концентрации PPP-а, равной 3.5 мкМ, в течение 24 ч в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. Далее их (клетки) промывали и инкубировали с флуоресцентными клеточными маркерами: Hoechst 33342 (концентрация – 0.01 мг/мл,  $\lambda_{ex} = 405$  нм/ $\lambda_{em} = 415$ –470 нм), LysoTracker™ Green DND-26 (0.05 мкМ,  $\lambda_{ex} = 488$  нм/ $\lambda_{em} = 500$ –580 нм), ER-Tracker™ Green (1 мкМ,  $\lambda_{ex} = 488$  нм/ $\lambda_{em} = 510$ –570 нм), Dihydrorhodamine 123 (10 мкМ,  $\lambda_{ex} = 488$  нм/ $\lambda_{em} = 510$ –570 нм), пропидия иодид (0.1 мг/мл) согласно методике производителя (Thermo Fisher Scientific, USA). Регистрацию результатов осуществляли на конфокальном микроскопе Leica TCS SPE 5 (Leica Microsystems GmbH, Germany).

### *Проведение экспериментов in vitro*

Клетки НСТ 116 инкубировали в суспензии липосом с конечными концентрациями 0.06–0.33 мг/мл в течение 24 ч в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. Затем клетки освещали галогеновой лампой через красный светофильтр КС-11 (Оптические лазерные технологии, Россия) с пропусканием в области выше 610 нм. Дозы освещения составили 0–60 Дж/см<sup>2</sup>. Для предотвращения нагревания использовали теплоотведение насыщенным раствором нитрата натрия. В темновом варианте эксперимента клетки не освещали, оставляя в инкубаторе. После освещения или темновой инкубации клетки инкубировали в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе в течение 24 ч для развития эффектов гибели и анали-

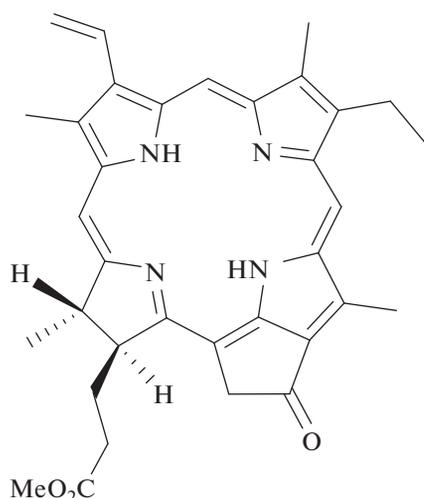


Рис. 1. Структурная формула метилового эфира пиррофеорбида-а.

зировали жизнеспособность клеток методом МТТ-теста. Показатели выживаемости рассчитывали в процентах как отношение оптической плотности растворов формазана в диметилсульфоксиде в экспериментальных лунках к среднему значению в контрольных лунках (клетки без препаратов). Каждую пробу анализировали в трех повторах, погрешность измерений не превышала 5%.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Физико-химические свойства суспензий липосом с различной концентрацией в них метилового эфира пиррофеорбида-а

Метилловый эфир пиррофеорбида-а, обозначаемый в зарубежных источниках как РРМЕ, является тетрапиррольным соединением, практически нерастворимым в воде (его структурная

формула приведена на рис. 1). Для исследования фотохимических и физико-химических свойств липосомальной формы РРР-а были приготовлены шесть видов липосом: “чистые” липосомы (без РРР-а) и липосомы с концентрациями РРР-а в липидной фазе, составляющими 3.4, 9.1, 32.9, 48 и 75 мкмоль/г липидов; так как концентрация лецитина в водной суспензии составляла 1 мг/мл, то молярные концентрации РРР-а в липидной фазе численно совпадают с молярными в водной суспензии. На спектрах РРР-а (рис. 2) видны две основные полосы поглощения: Сорэ с максимумом при  $\lambda = 417$  нм и Q-полосы в красной области спектра с максимумом при  $\lambda = 673$  нм; последняя используется для возбуждения ФС при выполнении ФДТ. Кроме этих полос, РРР-а имеет несколько менее выраженных максимумов поглощения при 512, 542 и 615 нм.

Кинетические кривые инициированного ААРН окисления липосом с приведенными в подписи к рис. 2 концентрациями РРР-а представлены на рис. 3. Видно, что РРР-а дозозависимо тормозит окисление, что свидетельствует о проявлении этим ФС антиокислительных свойств. Еще, по-видимому, РРР-а значительно структурирует бислою липосом, что способствует уменьшению проникновения кислорода в липосому и снижению скорости окисления (происходит ингибирование окисления липидов в липосоме). Аналогичные эффекты были ранее описаны в работах [20, 21]. Применяя хемилюминесцентные методы, можно получить более точную картину антиокислительного действия РРР-а. Особенности изучения ингибированного окисления подробно рассмотрены в работе [22]. Результаты по измерению вязкости бислою липосом приведены на рис. 4.

Пиррофеорбид-а, встроенный в липидную мембрану, сложным образом изменяет ее микровязкость. Порфирины в малых концентрациях

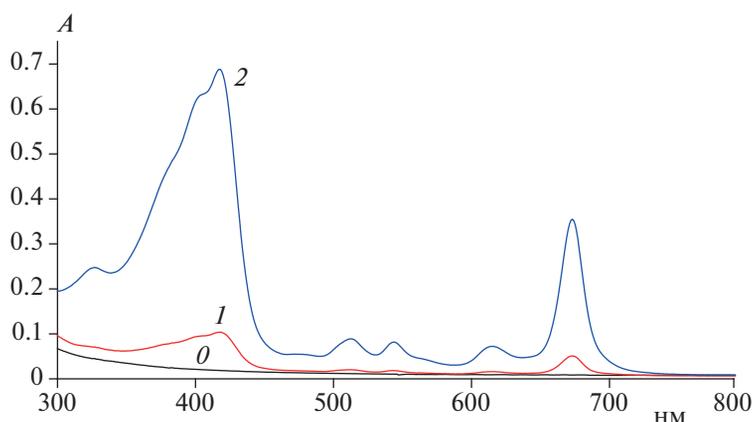


Рис. 2. Спектры поглощения липосом: 0 – без РРР-а, 1 – с концентрацией РРР-а, равной 3.42 мкмоль/г липидов, 2 – 32.9 мкмоль/г липидов. Разбавление исходных липосом в 4 раза.

координируют вокруг себя молекулы липидов, способствуя их более плотной упаковке в мембране. При концентрации PPP-a, равной 32.9 мкмоль/г липидов, наоборот, микровязкость снижается, а выход на плато происходит при концентрациях более 48 мкмоль/г липидов. Липидные фазы “чистых” липосом и липосом, содержащих 9.1 мкмоль/г липидов PPP-a, имели близкие значения микровязкости. Механизмы данных эффектов рассмотрены в работе [23], а локальная динамика и локальная организация мицеллярной фазы показаны в работе [24].

Влияние различного содержания PPP-a в липосомах видно и по изменению размеров липосом и их  $\zeta$ -потенциала (рис. 5). При малых концентрациях PPP-a наблюдался рост среднего диаметра  $D$  липосом, однако уже при концентрации 32.9 мкмоль/г липидов значение  $D$  становится сопоставимым с диаметром “чистых” липосом и далее уменьшается с увеличением концентрации PPP-a. Наибольшее абсолютное значение отрицательного  $\zeta$ -потенциала и максимальный размер липосом достигались при концентрации PPP-a, равной 9.1 мкмоль/г липидов, при которой, по-видимому, значительно структурируется бислой липосом. Увеличение их поверхностного заряда способствовало уменьшению агрегации частиц. Следует отметить, что значения  $\zeta$ -потенциала липосом менее  $-30$  мВ свидетельствуют о высокой стабильности суспензии.

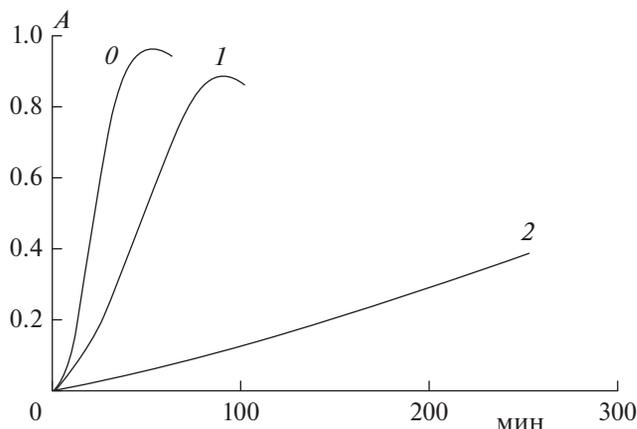
**Люминесцентные характеристики водной суспензии липосом с PPP-a**

При формировании водной суспензии липосом PPP-a включался в липидную фазу мицелл, что доказывается данными анизотропии флуоресценции: для “свободного” PPP-a, растворенного в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , время вращательной корреляции  $\tau_c = (0.09 \pm 0.013)$  нс, а для PPP-a в составе водной суспензии липосом ввиду более высокой вязкости липидов  $\tau_c = (4.7 \pm 0.24)$  нс (рис. 6).

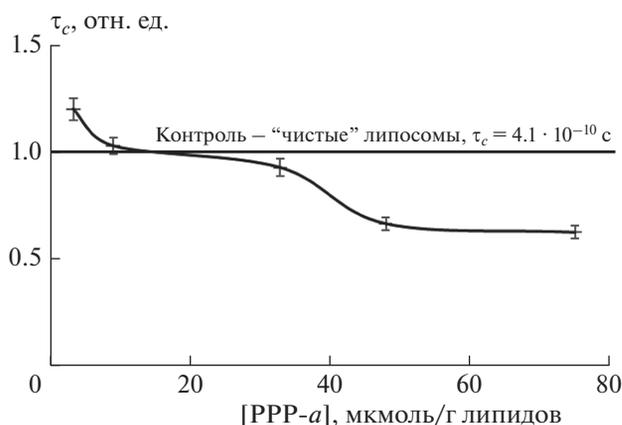
Растворенный в  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  PPP-a при возбуждении лазерным излучением с длиной волны  $\lambda = 410$  нм имел квантовый выход возбужденного синглетного состояния  $\phi_f = 0.66$ , время жизни  $\tau_{1f} = 6.5$  нс и  $\phi(\Delta^1\text{O}_2) = 0.78$ . При включении PPP-a в состав бислоя липосом времена жизни  $\tau_{1f}$  снижались при увеличении его концентрации в липидной фазе (табл. 1).

Были получены спектры флуоресценции липосом (рис. 7). Видно, что интенсивность флуоресценции PPP-a в составе липосом имеет колоколообразную зависимость от концентрации ФС с максимумом ее значения при 32.9 мкмоль/г липидов.

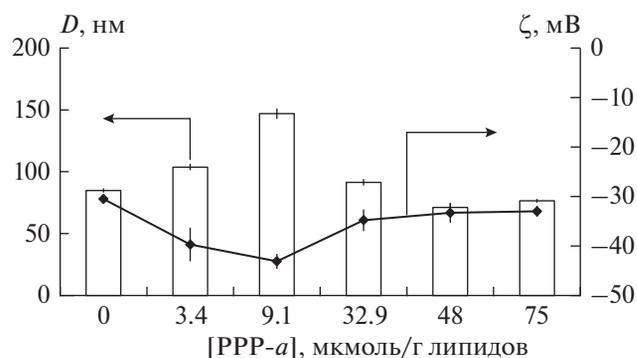
Для определения квантового выхода  $\phi(\Delta^1\text{O}_2)$  были приготовлены суспензии липосом в тяжелой



**Рис. 3.** Кинетические кривые образования диеновых конъюгатов при инициированном ААРН окислении липосом: 0 – без PPP-a, 1 – с концентрацией PPP-a, равной 3.42 мкмоль/г липидов, 2 – 32.9 мкмоль/г липидов; A – оптическая плотность ДК при  $\lambda = 234$  нм, [лецитин] = 0.1 мг/мл, [ААРН] = 0.3 мМ.



**Рис. 4.** Зависимость времени корреляции вращательной диффузии ( $\tau_c$ ) зонда от концентрации PPP-a в липидной фазе липосом.



**Рис. 5.** Зависимость среднего размера  $D$  и  $\zeta$ -потенциала липосом от концентрации PPP-a.

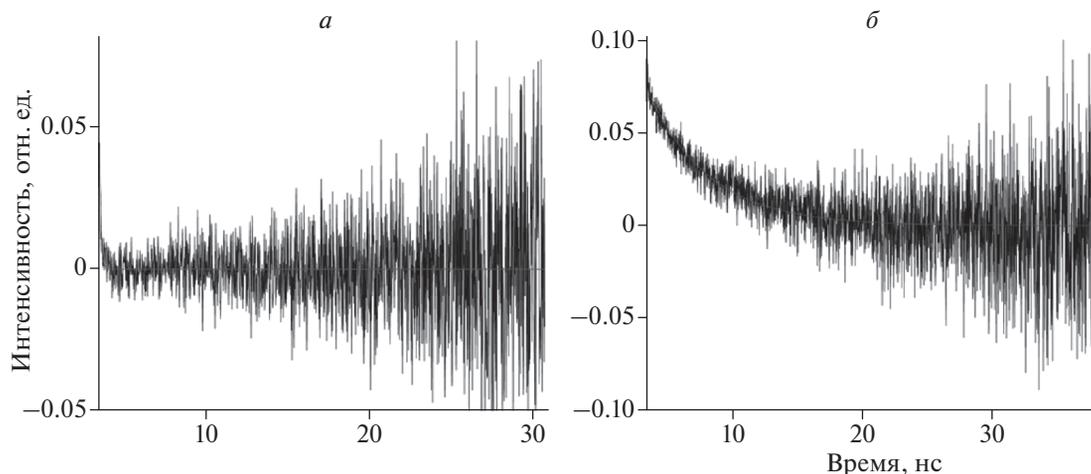


Рис. 6. Анизотропия флуоресценции PPP-а в растворе  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (а) и в составе водной суспензии липосом (б).

воде с сопоставимыми концентрациями PPP-а. Время жизни  $^1\text{O}_2$  в тяжелой воде в среднем составляет 60–68 мкс, что на порядок больше, чем в водных растворах (3.9 мкс). Результаты, представленные на рис. 8, показывают, что наибольший квантовый выход  $^1\text{O}_2$  был в суспензии липосом с концентрацией PPP-а, равной 31.6 мкмоль/г липидов.

Образование димеров и агрегатов при высоких концентрациях PPP-а в липидной фазе приводило к уменьшению выхода триплетных состояний мономерного соединения PPP-а и, следовательно, к падению квантового выхода синглетного кислорода.

#### **Фотосенсибилизаторы, иницирующие процессы перекисного окисления липидов**

В основе фотохимических реакций II типа лежит генерация триплетным ФС синглетного кислорода, который окисляет ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов до их гидропероксидов. Продукты более глубокого окисления липидов являются ре-

зультатом фотохимических реакций I типа, связанных с переносом электронов. Так, триплетный ФС образует из гидропероксидов жирных кислот высокорекреационные пероксильные или алкоксильные радикалы, последние из которых превращаются в альдегиды [25]. Непосредственный отрыв протона от ненасыщенной жирной кислоты триплетным ФС приводит к образованию алкильного радикала и далее — пероксильного радикала, который участвует в разветвленных цепных реакциях ПОЛ. Наиболее цитотоксичными продуктами окисления липидов являются спирты, кетоны и особенно альдегиды, которые деформируют липидный бислой [26]. Для определения вклада фотохимических реакций I типа в окислении липидов методом ИК-спектроскопии были проведены исследования образцов суспензий липосом с различными концентрациями PPP-а.

#### **ИК-спектры поглощения суспензий липосом**

Окисление липидов контролировали по появлению характерной полосы (плеча) в ИК-спектре при  $1740\text{ см}^{-1}$  (указана стрелкой на рис. 9). Эта полоса свидетельствует об образовании фрагмента, содержащего группу  $\text{C}=\text{O}$  в процессе окисления липидов. Обнаруженный результат свидетельствует, очевидно, о появлении альдегидной группы в составе окисленных липидов после фотоактивации суспензии липосом с концентрацией PPP-а, равной 3.42 мкмоль/г липидов.

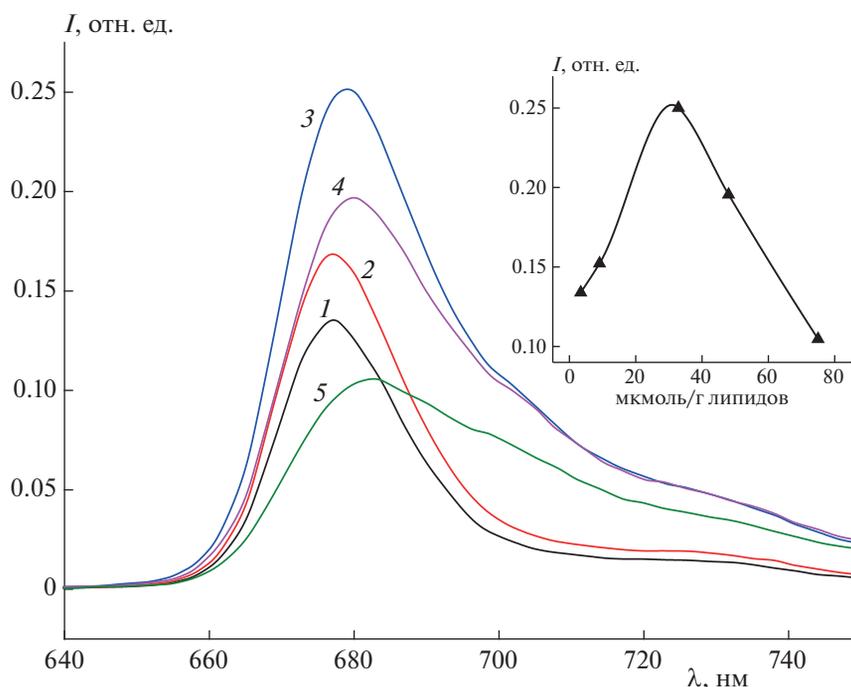
#### **Исследование темновой и фотоиндуцированной цитотоксичности липосомальной формы PPP-а на клетках карциномы толстой кишки человека HCT 116**

В настоящее время вопрос о распределении ФС ряда порфиринов среди клеточных компарт-

Таблица 1. Фотохимические характеристики липосом с различной концентрацией PPP-а

[PPP-а], мкмоль/г липидов	$\tau_{1f}$ , нс	$\chi^2$
3.42	$7.90 \pm 0.03$	0.82
9.1	$5.38 \pm 0.03$	1.19
32.9	$4.20 \pm 0.01$	1.06
48	$3.24 \pm 0.04$	1.33
75	$2.07 \pm 0.04$	1.09

Примечание:  $\chi^2$  — параметр оценки сходства экспериментальных данных с ожидаемыми значениями.



**Рис. 7.** Спектры флуоресценции водной суспензии липосом с различной концентрацией PPP-а, мкмоль/г липидов: 1 – 3.4, 2 – 9.1, 3 – 32.9, 4 – 48, 5 – 75. На вставке – интенсивность флуоресценции ( $I$ ) липосом при 678 нм (разведение суспензии в 10 раз).

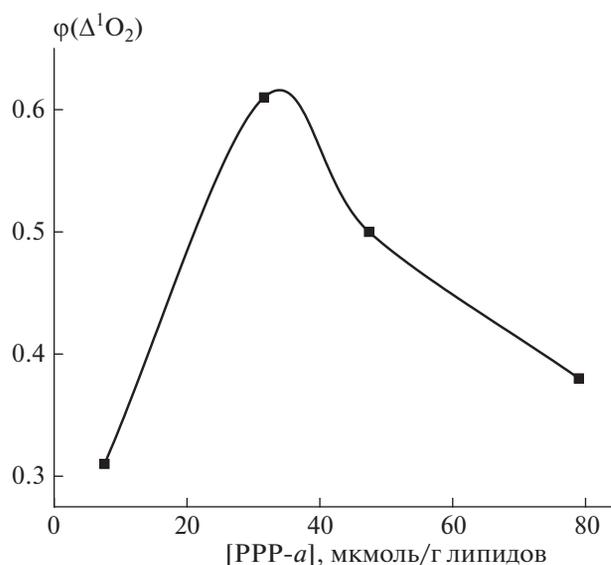
ментов не решен. Одни авторы [18, 27] обнаружили преимущественно митохондриальную локализацию порфиринов, тогда как другие [28, 29] указывали на их тропность к мембранам эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи. В работе [18] было показано, что облучение клеток НСТ 116, нагруженных PPP-а с использованием липосом, приводит к их гибели преимущественно по пути некроза, а не апоптоза, что ставит под сомнение факт преимущественного накопления этого ФС в митохондриях.

Полученные нами результаты показали, что краситель локализован главным образом в цитоплазме, в ядре сигнала практически не наблюдалось (рис 10). В результате наложения сигнала от PPP-а на сигналы от клеточных красителей DHR 123, ER-Tracker и Lysotracker (LT) не удалось установить точную локализацию PPP-а ввиду его высокой фотосенсибилизирующей активности, которая приводила к быстрому нарушению нормальной морфологии клетки при возбуждении лазером в ходе выполнения микроскопического исследования. Во всех случаях наблюдалось перекрытие сигналов (рис. 11).

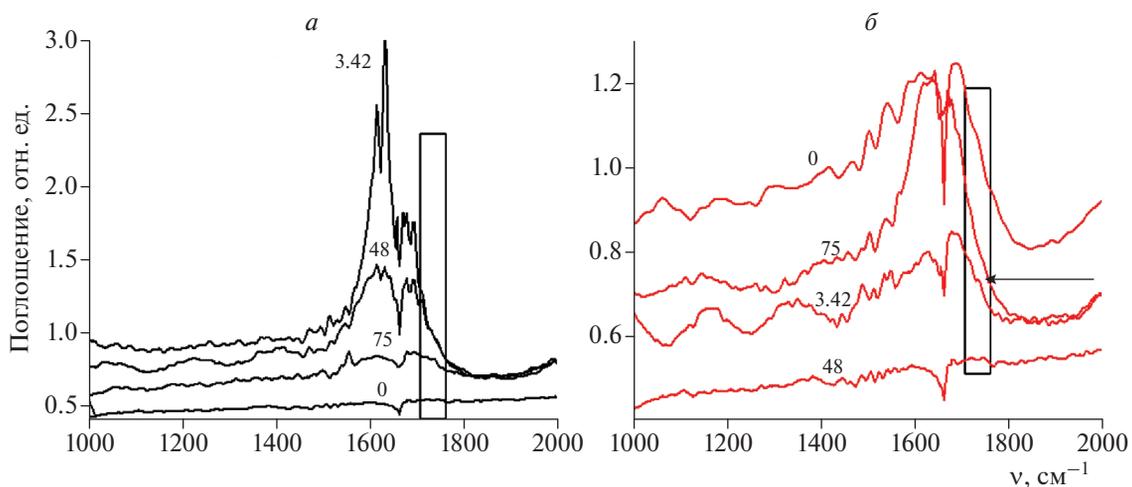
Краситель DHR 123 способен улавливать АФК в клетке, в результате чего он переходит в флуоресцирующую форму (родамин 123), а его катионная природа способствует накоплению этого красителя в митохондриях клеток. На рис. 12 для контрольного образца (а) и образца с “чистыми”

липосомами (б) виден сигнал от митохондрий клеток. В образце с PPP-а наблюдалось “разгорание” сигнала, связанного с генерацией АФК.

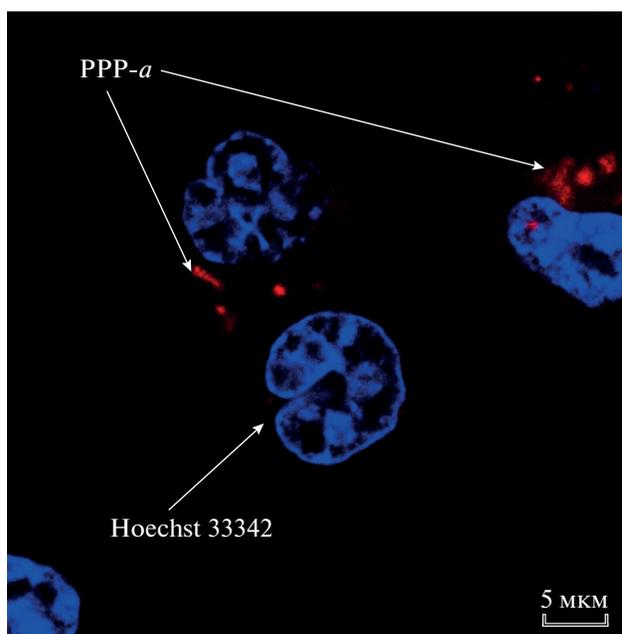
Облучение клеток красным светом в присутствии PPP-а приводило к образованию АФК, что



**Рис. 8.** Квантовый выход  $^1\text{O}_2$  в суспензии липосом, приготовленных на тяжелой воде ( $\text{D}_2\text{O}$ ), в зависимости от концентрации PPP-а в липидной фазе.



**Рис. 9.** ИК-спектры поглощения водных суспензий липосом с различными концентрациями PPP-*a* в мкмоль/г липидов (числа у кривых) в липидной фазе до (*a*) и после (*б*) облучения красным светом.



**Рис. 10.** Распределение PPP-*a* в клетке.

вызывало окислительную деструкцию и деградацию мембранных систем клетки. Это отчетливо видно по остаткам эндоплазматического ретикулума, окрашенного красителем ER-tracker, и по слабому сигналу от лизосом, окрашенных красителем LT. В контрольных пробах и в пробах с липосомами сохранялась нормальная морфология клеток НСТ 116.

Главным подтверждением фотоиндуцированной гибели содержащих PPP-*a* клеток карциномы НСТ 116 после инкубации с липосомами является проникновение в ядра клеток йодида пропидия PI

(рис. 13). Этот флуоресцентный краситель не способен проникать через мембрану живых клеток, и окрашивание ядра возможно только в результате перфорации клеточных мембран.

Используя питательную среду DMEM, готовили серию разведений суспензии липосом с концентрацией липидов в фосфатном буфере 0.06, 0.11, 0.2 и 0.33 мг/мл, которые соответствовали содержанию PPP-*a* в водных растворах 1.9, 3.5, 6.3 и 10.5 мкМ. Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что липосомальная форма PPP-*a* в исследованных концентрациях не имела темновой

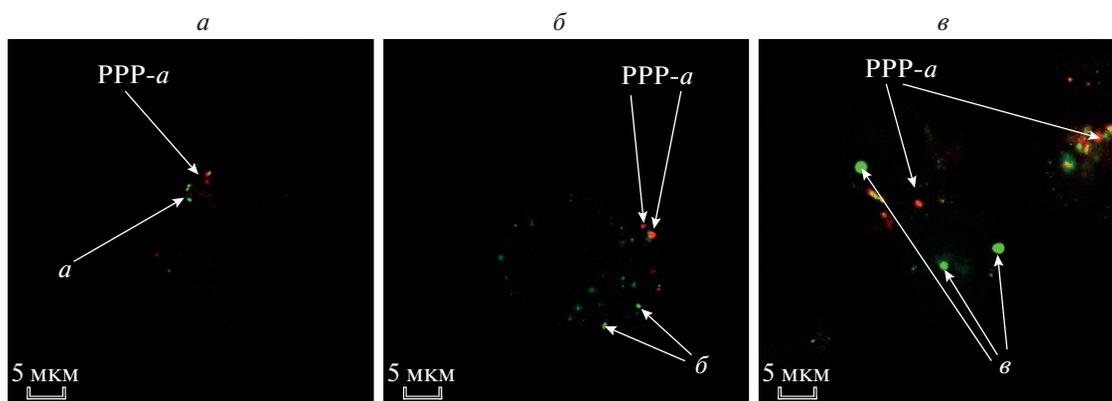


Рис. 11. Наложение флуоресцентного сигнала от PPP-*a* и клеточных маркеров: *a* – DHR 123, *б* – ER-Tracker, *в* – LT.

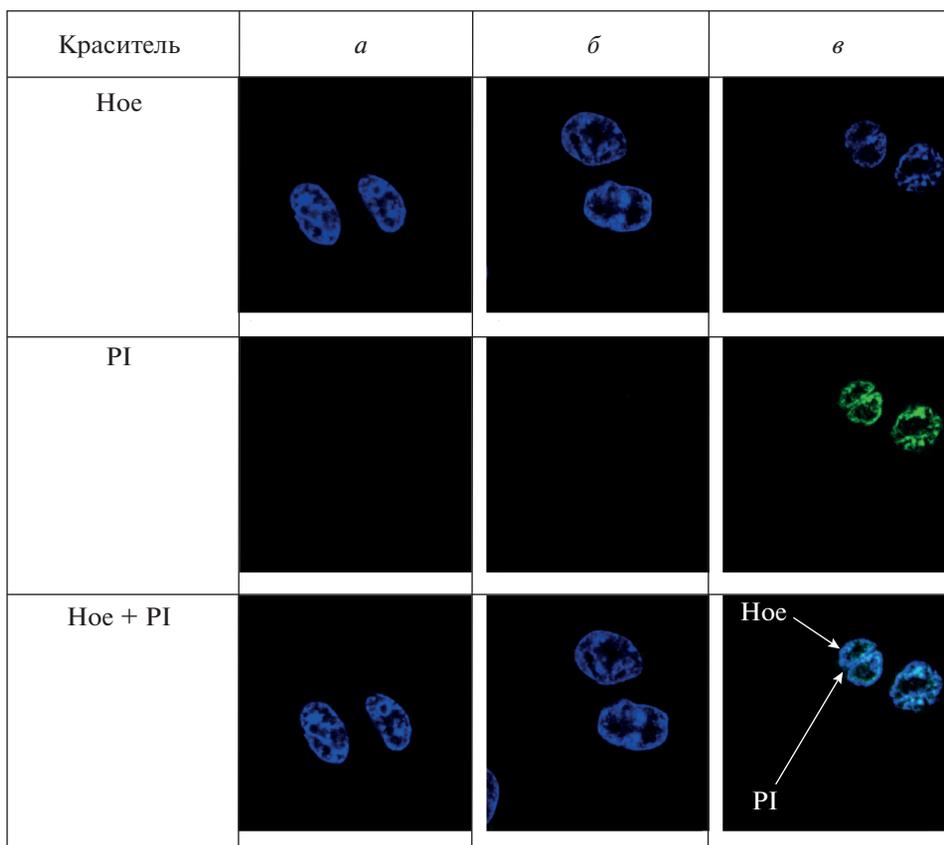
Краситель	<i>a</i>	<i>б</i>	<i>в</i>
DHR 123			
ER-Tracker			
LT			

Рис. 12. Визуализация клеточных органелл красителями DHR 123 (митохондрии), ER-Tracker (эндоплазматический ретикулум) и LT (лизосомы) в контроле (*a*), после инкубации с “чистыми” липосомами (*б*) и с липосомами, содержащими PPP-*a* (*в*).

цитотоксичности. Увеличение доз облучения с 30 до 60 Дж/см<sup>2</sup> не приводило к ускорению фотоиндуцированной гибели клеток карциномы НСТ 116. Липосомы без фотосенсибилизатора при этом вызывали незначительный рост числа опухолевых клеток.

В работе [18] показано эффективное накопление PPP-*a* после двадцатичасовой инкубации клеток НСТ 116 с липосомальной формой PPP-*a* в концентрации 2 мкМ. В наших экспериментах мы также не видим существенного повышения клеточной гибели с ростом концентрации PPP-*a* выше 1.9 мкМ.

Таким образом, липосомальная форма PPP-*a* обладала концентрационными ограничениями при ее использовании ФДТ, а низкая темновая цитотоксичность липосомальной формы PPP-*a* дает возможность многократного повторения процедур ФДТ. Необходимо отметить тот факт, что ФС, включенные в липидный бислой липосом, при действии света запускают процессы, ведущие к нарушению целостности липосом. В работе [30] рассматриваются молекулярные основы использования этого эффекта для оптимального выделения под действием света заключенных в липосомах лекарственных препаратов, что должно значительно по-



**Рис. 13.** Визуализация (Ное) клеточных ядер, накопление пропидия йодида (PI) в клеточном ядре и наложение обеих картинок (Ное + PI) в контроле (*a*), после инкубации с “чистыми” липосомами (*б*) и с липосомами, содержащими PPP-*a* (*в*).

высвить эффективность ФДТ. Применение PPP-*a* в этом качестве имеет, на наш взгляд, хорошие перспективы.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показали, что фотоиндуцированное образование альдегидных групп в липидной фазе липосом, содержащих PPP-*a*, оказалось слабовыраженным, что свидетельствует о малом вкладе фотохимических реакций I типа в окислительное повреждение липидов. В механизме

фотосенсибилизации преобладающими были фотохимические реакции II типа, связанные с переносом энергии и генерацией синглетного кислорода. Квантовый выход последнего достигал максимального значения при концентрации PPP-*a* 31.6 мкмоль/г липидов. Результаты, полученные в экспериментах на клетках карциномы НСТ 116, показали, что липосомальная форма PPP-*a* нетоксична в рассматриваемых условиях и при этом обладает выраженной фототоксичностью. Максимальная фотохимическая эффективность липосомальной формы PPP-*a* проявляется при его концентрации в липидной фазе 31–33 мкмоль/г липидов.

Спектроскопические измерения проведены на базе ЦКП “Новые материалы и технологии” ИБХФ РАН.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российским научным фондом по проекту № 18-13-00463 “Механизмы фотохимических процессов в комплексах полиметиновых красителей с двумя сопряженными хромофорами и белков”.

**Таблица 2.** Процент (%) выживших клеток линии НСТ116 по результатам МТТ-теста

[PPP- <i>a</i> ], мкмоль/г липидов	Доза облучения, Дж/см <sup>2</sup>		
	0	30	60
1.9	100.0	32.1	29.8
3.5	100.1	23.5	29.8
6.3	103.3	21.7	29.8
10.5	102.3	32.2	23.3

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yano S., Hirohara S., Obata M. et al.* // J. Photochem. Photobiol. C. 2011. V. 12. № 1. P. 46.
2. *Pandey R.K., Bellnier D.A., Smith K.M. et al.* // Photochem. Photobiol. 1991. V. 53. P. 65.
3. *Matroule J.Y., Bonizzi G., Morliere P. et al.* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 2988.
4. *Sun X., Leung W.N.* // Photochem. Photobiol. 2002. V. 75. P. 644.
5. *Roder B., Hackbarth St., Korth O. et al.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. V. 348. P. 413.
6. *Xu C.S., Leung A.W.* // Med. Sci. Monit. 2006. V. 12. P. 257.
7. *Wang K.-K., Li J., Kim B.-J. et al.* // Intern. J. Photoenergy. 2014. P. 793.
8. *Krasnovsky A.A., Jr., Neverov K.V., Egorov S.Y., Reder B.* // Opt. Spectrosc. 1988. V. 64. № 4. P. 790.
9. *Roeder B., Hackbarth St., Korth O. et al.* // Photochemotherapy: Photodynamic Therapy and Other Modalities. 1996. V. 179. P. 2625.
10. *Ponomarev G.V., Solovieva M.N., Dugin N.O. et al.* // Bioorg. Med. Chem. 2013. V. 21. P. 5420.
11. *Buchholz J., Kaser-Hotz B., Khan T. et al.* // Clin. Cancer Res. 2005. V. 11. № 20. P. 7538.
12. *Yoon Il, Jia Zhu Li, Young Key Shim* // Clin. Endosc. 2013. V. 46. P. 7.
13. *Барышников А.Ю.* // Вестн. ПАМН. 2012. № 3. С. 23.
14. *Röder B., Hanke T., Oelckers S. et al.* // J. Porphyrins Phthalocyanines. 2000. V. 4. № 1. P. 37.
15. *Tran M.A., Watts R.J., Robertson G.P.* // Pigm. Cell Melanoma Res. 2009. V. 22. № 4. P. 388.
16. *Ikeda A., Doi Y., Nishiguchi K. et al.* // Org. Biomol. Chem. 2007. V. 5. № 8. P. 1158.
17. *Düzgünes N., Piskorz J., Skupin-Mrugalska P. et al.* // Ther. Deliv. 2018. V. 9. № 11. P. 823.
18. *Guelluy P.-H., Fontaine-Aupart M.-P., Grammenos A. et al.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2010. V. 1258. № 9. P. 1252.
19. *Кузьмин В.А., Волнухин В.А., Егоров А.Е. и др.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 3.
20. *Сажина Н.Н., Антипова А.С., Семенова М.Г. и др.* // Биоорг. химия. 2019. Т. 45. № 2. С. 34.
21. *Голощанов А.Н., Бурлакова Е.Б., Шаталова О.В. и др.* // Хим. физика. 2013. Т. 32. № 5. С. 91.
22. *Русина И.Ф., Карпунин О.Н., Касаикина О.Т.* // Хим. физика. 2013. Т. 32. № 8. С. 49.
23. *Герасимов Н.Ю., Голощанов А.Н., Бурлакова Е.Б.* // Хим. физика. 2009. Т. 28. № 7. С. 82.
24. *Вассерман А.М., Отдельнова М.В., Захарова Ю.А. и др.* // Хим. физика. 2005. Т. 24. № 3. С. 29.
25. *Bacellar I.O.L., Oliveira M.C., Dantas L.S. et al.* // J. Amer. Chem. Soc. 2018. V. 140. № 30. P. 9606.
26. *Bacellar I.O.L., Baptista M.S.* // ACS Omega. 2019. V. 4. P. 21636.
27. *Wei Y., Kong B., Song K. et al.* // Photochem. Photobiol. 2007. V. 83. P. 1319.
28. *Begum G., Dube A., Joshi P.G. et al.* // J. Photochem. Photobiol. 2009. V. 95. P. 177.
29. *Matroule J.Y., Carthy C.M., Granville D.J. et al.* // Oncogene. 2001. V. 20. P. 4070.
30. *Massiot J., Rosilio V., Makky A.* // J. Mater. Chem. 2019. V. 7. № 11. P. 1805.

## МОДЕЛЬ КОМПЛЕКСА РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ ВИРУСА SARS-CoV-2 С ФАВИПИРАВИРОМ

© 2021 г. И. В. Поляков<sup>1,2</sup>, Б. Л. Григоренко<sup>1,2</sup>, А. В. Немухин<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*E-mail: anemukhin@yahoo.com

Поступила в редакцию 02.07.2020;

после доработки 27.07.2020;

принята в печать 21.09.2020

Методами молекулярного моделирования построена модель многодоменного комплекса, объясняющая механизм ингибирующего действия фавипиравира на РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp) коронавируса SARS-CoV-2. В качестве начальных атомных координат использованы данные криоэлектронной микроскопии для апо-формы RdRp вируса SARS-CoV-2 и данные по структуре RdRp вируса гепатита С. После соответствующих замен сконструирован комплекс RdRp, содержащий цепочки РНК, и потенциальный ингибитор фермента – фавипиравир в форме рибозатрифосфата. Методами молекулярной динамики оптимизирована структура комплекса в водных оболочках, включающая более ста тысяч атомов. Анализ активного центра с включенной молекулой фавипиравира позволяет объяснить химическую реакцию фермента с ингибитором.

**Ключевые слова:** молекулярная динамика, коронавирус, РНК-полимераза, механизм реакции, ингибирование, фавипиравир.

**DOI:** 10.31857/S0207401X21020138

### ВВЕДЕНИЕ

Пандемия коронавируса COVID-19 стимулировала активное изучение молекулярных процессов, протекающих во всех компонентах вируса SARS-CoV-2, включая важнейший его участок – РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp), ответственную за репликацию и транскрипцию генетической информации [1]. Потенциальные ингибиторы RdRp рассматриваются как перспективные лекарственные препараты для лечения болезни, и одним из наиболее интересных кандидатов является фавипиравир [2]. Следует отметить, что на момент написания статьи соответствующий препарат одобрен Минздравом РФ для лечения COVID-19.

На рис. 1 схематично показан механизм химических превращений в активном центре РНК-полимеразы. При депротонировании атома  $O^{3'}$  рибозы концевой нуклеотида в цепи  $NB(i)$  (левая часть рис. 1) происходит нуклеофильная атака  $O^{3'}$  на атом  $P^A$  свободного нуклеотида  $NB(i+1)$  (центральная часть рис. 1), что приводит к разрыву связи  $P^A-O^{3A}$ , отщеплению пиррофосфата и наращиванию цепи РНК (правая часть рис. 1). В качестве обобщенного основания (В) на стадии депротонирования может выступать аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты. В активном центре присутствуют ионы металла  $M_A^{2+}$ ,  $M_B^{2+}$ , где М –

магний или марганец, координирующие отрицательно заряженные группы реагентов.

Нарушение функционирования этой молекулярной машины приводит к блокированию размножения вируса. На рис. 2 показана молекула фавипиравира (в соединении с рибозатрифосфатом – F RTP), которая может конкурировать с нативными субстратами фермента в активном центре и остановить нежелательный синтез РНК-вируса.

Данная работа направлена на исследование физико-химических аспектов биомолекулярных процессов, связанных с ингибированием важнейшего фермента RdRp вируса SARS-CoV-2. Мы используем средства молекулярного моделирования для построения и анализа активного центра РНК-полимеразы с включенной молекулой фавипиравира. Полученные в 2020 г. данные криоэлектронной микроскопии для апо-формы RdRp [3], а также известные результаты по кристаллической структуре RdRp вируса гепатита С [4] предоставляют начальную структурную информацию, на основе которой возможно довести моделирование до анализа молекулярных групп в конфигурации фермента с кофактором (фавипиравиром в форме рибозатрифосфата), имитирующей фермент-субстратный комплекс. Сведения о механизме химической реакции в РНК-полимеразе [5], а также опыт моделирования катализируемых ферментами реакций преобразования нуклеозидтрифосфатов

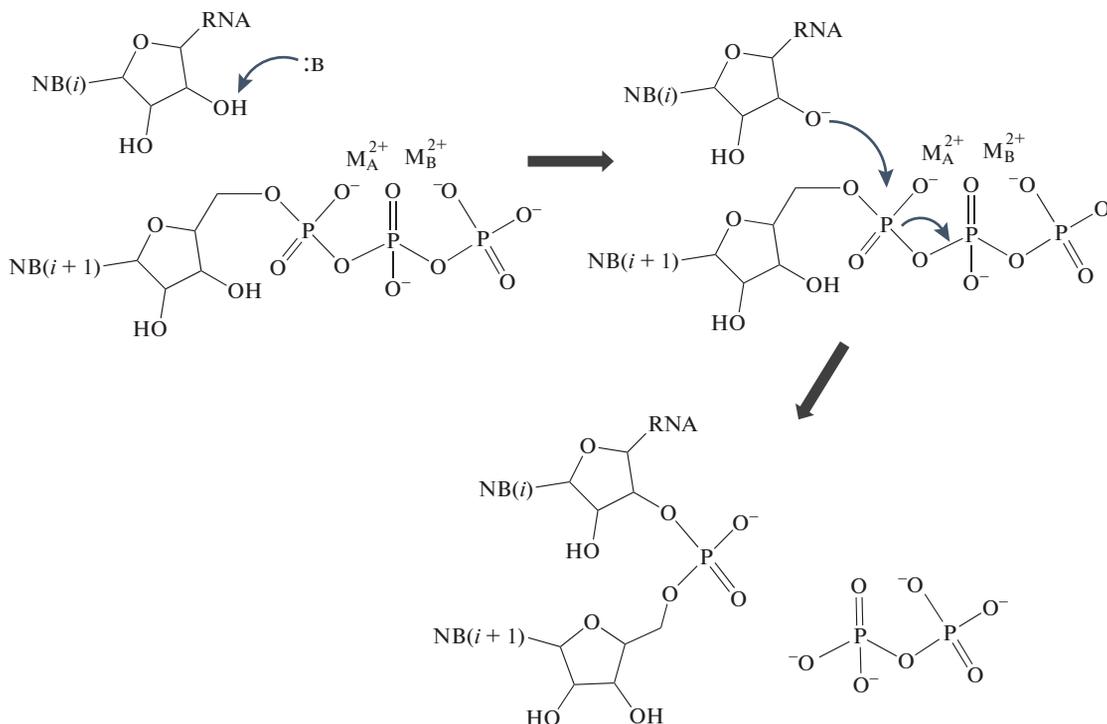


Рис. 1. Механизм химических преобразований в активном центре РНК-полимеразы.

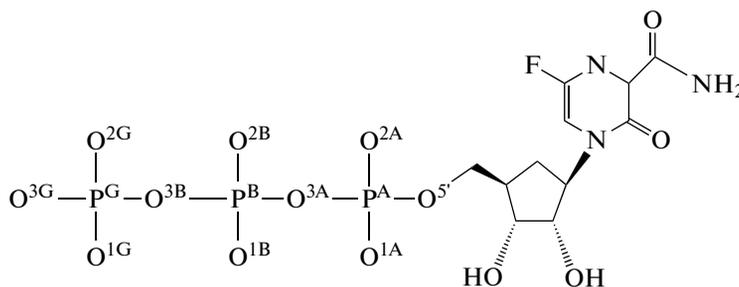


Рис. 2. Молекула фавипиравир-рибозатрифосфата (FRTP).

методами квантовой механики/молекулярной механики [6, 7] позволяют объяснить ингибирующее действие фавипиравира.

### МОДЕЛИ И МЕТОДЫ

Как и все коронавирусы, SARS-CoV-2 использует многодоменную архитектуру молекулярной машины для репликации и транскрипции своей РНК. После расщепления вирусных полипротеинов образуется набор неструктурированных белков (nsp), три из которых входят в минимальную конфигурацию, обеспечивающую функционирование комплекса, а именно, nsp12 (RdRp), nsp7 и nsp8. В работе [3] сообщается о структуре комплекса nsp12–nsp7–nsp8 без цепей РНК и кофакторов с разрешением в 2.9 Å (PDB ID: 6M71). В качестве дополнительного источника структурных данных мы использовали результаты рентгеноструктурного анализа [4] для фермента RdRp

вируса гепатита С. Соответствующая структура PDB ID: 4WTG наряду с комплексом nsp12–nsp7–nsp8 содержит цепочки РНК, кофакторы (ионы  $Mn^{2+}$ ), а также соединение софосбувир (в форме рибозадифосфата). Использование процедуры выравнивания позволило провести сравнение начальной структуры PDB ID: 6M71 и активного центра фермента в структуре PDB ID: 4WTG. Далее ионы  $Mn^{2+}$  были заменены на  $Mg^{2+}$ , а софосбувир – на FRTP (см. рис. 2); боковые цепи ряда остатков активного сайта были повернуты в соответствии с положением их аналогов в структуре PDB ID: 4WTG.

Полученная модельная система была полностью сольватирована молекулами воды; были добавлены ионы натрия и хлора для нейтрализации заряда и обеспечения физиологической концентрации NaCl: 0.15 моль/л. Молекулярно-динамические расчеты проводились с помощью программы NAMD [8], анализ траекторий – в программе

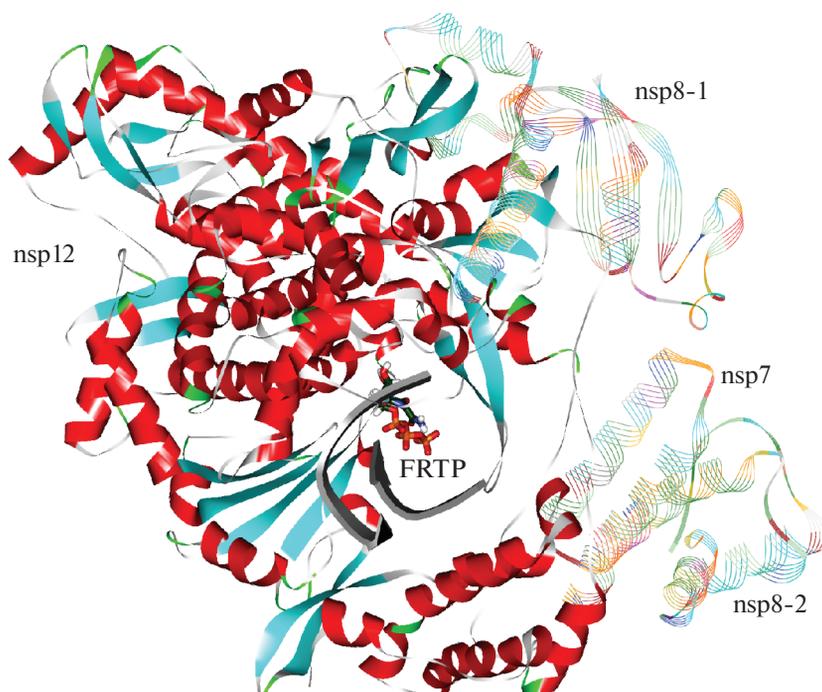


Рис. 3. Общий вид модельной системы без сольватных оболочек.

VMD [9]. Использовались условия ансамбля NTP с периодическими граничными условиями; шаг интегрирования составлял 2 фс, при этом все связи тяжелых атомов с атомами водорода были фиксированы (алгоритмы SHAKE/SETTLE). Потенциалы взаимодействия соответствовали силовому полю CHARMM36 [10]. Нестандартная топология и параметры остатка FRTP были описаны параметрами CGenFF [11]. Длина траекторий составляла не менее 40 нс, кадры траектории записывались через 200 пс.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 3 показан комплекс без сольватирующих оболочек молекул воды. Белки nsp7 и nsp8 важны для поддержания конструкции, но не участвуют в химических преобразованиях.

В центре рис. 3 видны показанные стержнями фосфатные группы молекулы FRTP. Стрелками обозначены цепочки РНК, содержащие гуаниновый (Gua), адениновый (Ade) и урациловый (Ura) нуклеотиды.

Рисунок 4 показывает, насколько стабильна модельная система вдоль молекулярно-динамической траектории. После начального участка (примерно 10 нс) вся конструкция довольно устойчива (рис. 4а). Анализ показывает, что наиболее подвижные участки в nsp12 относятся к петлям вдали от активного центра фермента.

Для уравнивания положения FRTP требуется больше времени – примерно 20 нс. Это объ-

ясняется тем, что молекула FRTP не является нативным субстратом фермента, а также особенностями начального этапа конструирования модельной системы, а именно: группы FRTP замещали другое соединение в кристаллической структуре PDB ID: 4WTG.

На рис. 5 показано, что молекула фавипиравира достаточно удачно входит в комплекс. “Голова” FRTP структурно похожа на аденин и образует пару с ближайшим основанием Gua. На рис. 6 представлена структура активного центра фермента RdRp.

Присоединение фавипиравира к концевому нуклеотиду Ura происходит по химической реакции, показанной на рис. 1. На первом этапе депротонируется группа  $O^3'H^3'$  рибозы урацила, причем очевидным обобщенным основанием является боковая цепь Asp760 – расстояние между атомом кислорода  $O^3'$  и атомом кислорода карбоксильной группы аспарагиновой кислоты составляет 2.8 Å, обеспечивая эффективный перенос протона. Расстояние от  $O^3'$  до атома фосфора  $P^A$ , равное 3.3 Å, также благоприятствует нуклеофильной атаке с образованием связи  $O^3'-P^A$  и разрывом связи  $P^A-O^{3A}$ . На рис. 6 не показаны боковые цепи аминокислотных остатков Asp761 и Asp618, входящих в координационные сферы ионов магния, а также положительно заряженные остатки Arg553, Arg555 и Lys551, которые связывают и ориентируют трифосфатный участок молекулы FRTP.

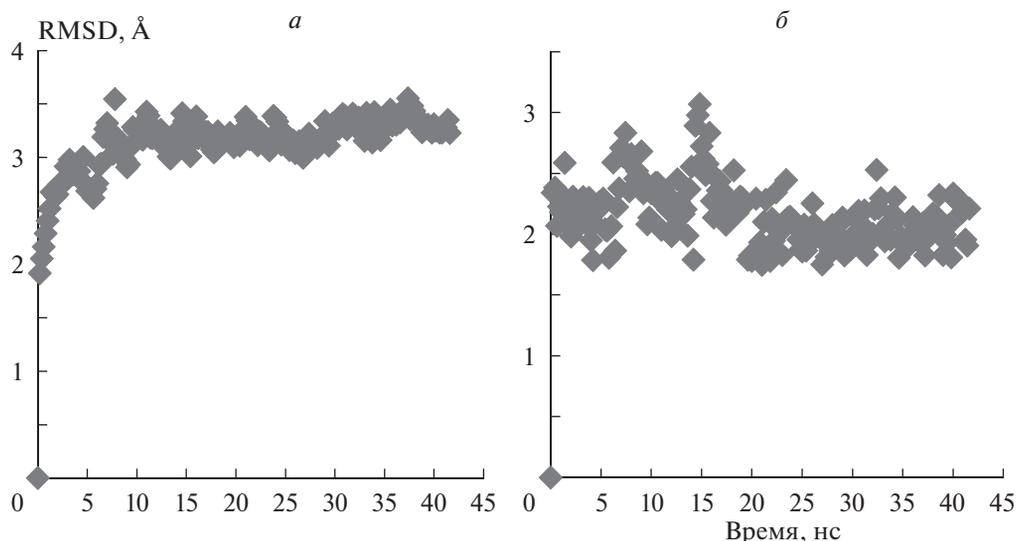


Рис. 4. Среднеквадратичные отклонения координат (RMSD) тяжелых атомов белка (а) и молекулы FRTP (б).

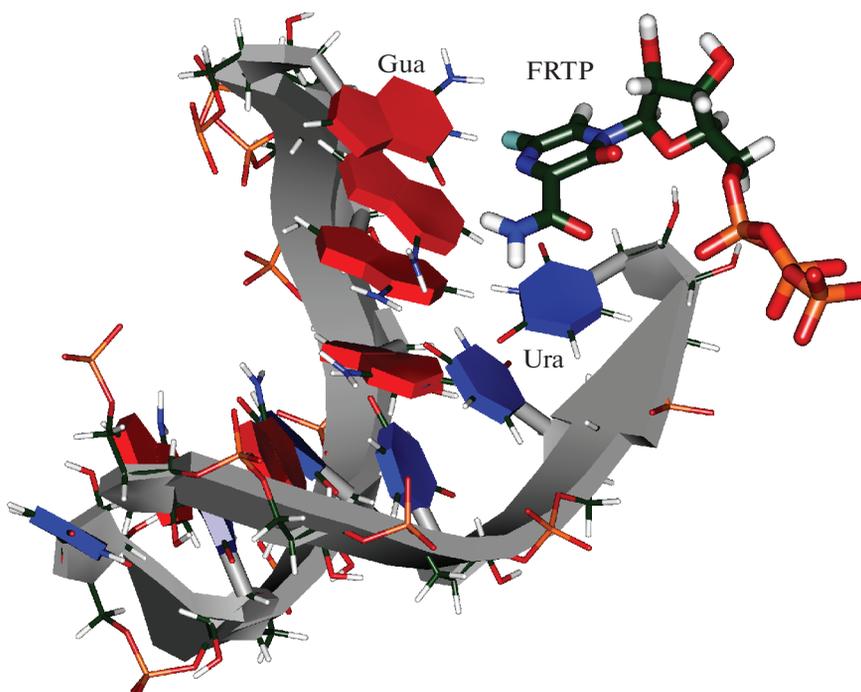


Рис. 5. Цепочки РНК и фавипиравир в комплексе.

Настоящая работа подтверждает современные достижения компьютерного моделирования биомолекулярных процессов [12, 13]. В данном случае построенный активный центр фермента полностью согласуется с представлениями о каталитических процессах с участием нуклеозидтрифосфатов. Похожий активный центр формируется в случае фермента аденилатциклазы, катализирующего реакцию преобразования аденозинтрифосфата в циклический аденозинмонофосфат. Элементарные стадии этого процесса также включают депротонирова-

ние  $O^3H^{3'}$ -группы рибозы, нуклеофильную атаку  $O^{3'}$  на атом фосфора  $P^A$   $\alpha$ -фосфатной группы нуклеозидтрифосфата и разрыв связи  $P^A-O^{3A}$ . Недавние расчеты комбинированным методом квантовой механики/молекулярной механики [6] показали, что энергетический профиль этой реакции имеет барьер для лимитирующей стадии порядка 16 ккал/моль. Мы ожидаем, что в случае реакции РНК-полимеразы SARS-CoV-2 с FRTP энергетический профиль будет аналогичным, что согласуется с эффективным встраиванием фавипиравира

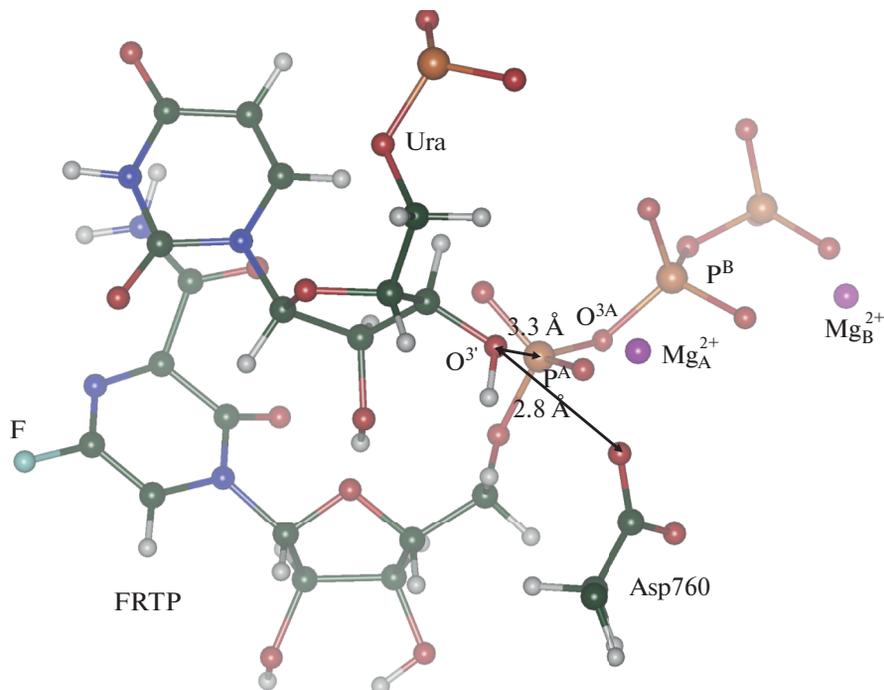


Рис. 6. Молекулярные группы в активном центре РНК-полимеразы с фавипиравиром.

в цепочку РНК. Блокада синтеза РНК после захвата этого соединения, по всей видимости, связана с нарушением структуры формирующейся цепочки.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Построенная методами молекулярного моделирования модель многодоменного комплекса РНК-полимеразы коронавируса SARS-CoV-2 объясняет механизм воздействия фавипиравира на процесс репликации. Анализ полученной структуры и активного центра фермента показывает, что фавипиравир в форме рибозатрифосфата может встраиваться в комплекс nsp12–nsp7–nsp8 с цепочками РНК и конкурировать с природными нуклеотидами в реакции наращивания цепи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 19-03-00076) с использованием оборудования Межведомственного суперкомпьютерного центра РАН и Центра коллективного пользования сверхвысокопроизводительными вычислительными ресурсами МГУ им. М.В. Ломоносова.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Venkataraman S., Prasad B.V.L.S., Selvarajan R. // *Viruses*. 2018. V. 10. P. 76; <https://doi.org/10.3390/v10020076>
2. Furuta Y., Gowen B. B., Takanashi K. et al. // *Antiviral Res.* 2013. V. 100. P. 446; <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.015>
3. Gao Y., Yan L., Huang Y. et al. // *Science*. 2020. V. 368. P. 779; <https://doi.org/10.1126/science.abb7498>
4. Appleby T.C., Perry J.K., Murakami E. et al. // *Ibid.* 2013. V. 347. P. 771; <https://doi.org/10.1126/science.1259210>
5. Wang B., Feig M., Cukier R.I. et al. // *Chem. Rev.* 2013. V. 113. P. 8546; <https://doi.org/10.1021/cr400046x>
6. Grigorenko B., Polyakov I., Nemukhin A. // *J. Phys. Chem. B*. 2019. V. 124. P. 451; <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b07349>
7. Grigorenko B.L., Kots E.D., Nemukhin A.V. // *Org. Biol. Chem.* 2019. V. 17. P. 4879; <https://doi.org/10.1039/c9ob00463g>
8. Phillips J.C., Braun R., Wang W. et al. // *J. Comp. Chem.* 2005. V. 26. P. 1781; <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>
9. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // *J. Molec. Graphics*. 1996. V. 14. P. 33; [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
10. Best R.B., Zhu X., Shim J. et al. // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. V. 8. P. 3257; <https://doi.org/10.1021/ct300400x>
11. Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C. et al. // *J. Comput. Chem.* 2010. V. 31. P. 671; <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>
12. Григоренко Б.Л., Хренова М.Г., Кулакова А.М. и др. // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 6. С. 13; <https://doi.org/10.31857/S0207401X20060023>
13. Метелешко Ю.И., Немухин А.В., Хренова М.Г. // *Хим. физика*. 2019. Т. 38. № 6. С. 3; <https://doi.org/10.1134/S0207401X19060074>

**ТРАНСФОРМАЦИЯ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ СМОЛЫ  
ТАБАЧНОГО ДЫМА В МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ.  
МОДЕЛЬНОЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ**

© 2021 г. В. А. Меньшов<sup>1</sup>, В. Д. Кънчева<sup>2</sup>, О. И. Яблонская<sup>1</sup>, А. В. Трофимов<sup>1, 3\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт органической химии с центром фитохимии Болгарской академии наук, София, Болгария

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская обл., Россия

\*E-mail: avt\_2003@mail.ru

Поступила в редакцию 02.07.2020;

после доработки 28.07.2020;

принята в печать 21.09.2020

Хемилюминесцентные процессы окисления люминола с участием пероксида водорода в присутствии пероксидазы хрена, глицина, добавок смолы табачного дыма и пирокатехина использованы для моделирования *in vitro* метаболической трансформации антиоксидантов дыма при их попадании в живой организм. Продемонстрирована важность учета трансформации свойств экзогенных антиоксидантов в организме для оценки суммарного биоантиоксидантного эффекта.

**Ключевые слова:** хемилюминесценция, люминол, пероксидаза хрена, глицин, антиоксиданты, табачный дым.

**DOI:** 10.31857/S0207401X21020114

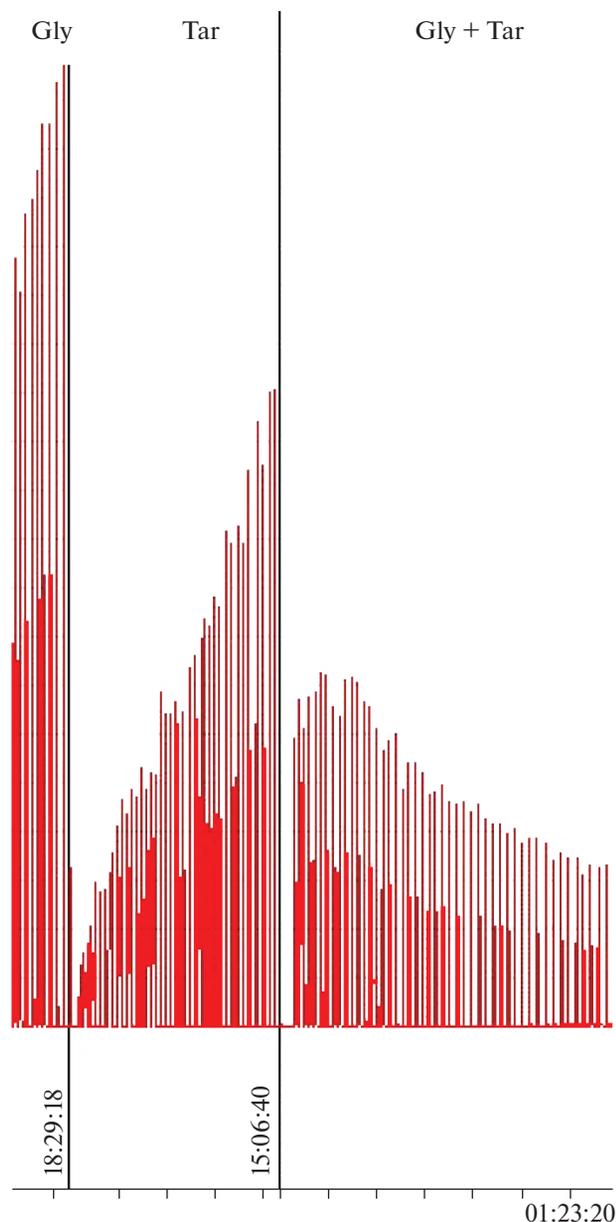
## ВВЕДЕНИЕ

Табачный дым — аэрозоль, состоящий из газовой и твердой фаз, представляет собой сложнейшую композицию из нескольких тысяч химических соединений [1] и оказывает на организм как курящего человека, так и окружающих многогранное воздействие, являющееся фактором риска развития целого ряда заболеваний [2]. Среди разнообразных путей влияния дыма на человеческий организм следует обратить внимание на развитие в организме окислительного стресса под воздействием этого физиологически активного аэрозоля, поскольку окислительный стресс является универсальным генератором патологий [3]. В самом деле, в дыме образуются и содержатся большие количества активных форм кислорода и азота, прежде всего в свободнорадикальной форме [1]. Но кроме этих высокоактивных оксидантов дым содержит также и вещества, обладающие антиоксидантными свойствами, как показали исследования с нашим участием [4, 5]. Таким образом, суммарное воздействие дыма на окислительные процессы *in vivo* зависит одновременно от его оксидантных и антиоксидантных свойств. Необходимо отметить, однако, что в то время как оксидантам, образующимся в дыме, посвящено небольшое количество исследований, антиоксидант-

ным свойствам дыма до упомянутых работ [4, 5] совершенно не уделялось внимания. При исследовании антиоксидантных свойств табачного дыма необходимо иметь в виду, во-первых, то, что антиоксидантную активность проявляют как газовая фаза дыма [4], так и твердая фаза, называемая также смолой или ТРМ (“total particulate matter”) [4, 5]. А во-вторых, очень важным аспектом является возможная трансформация свойств экзогенных антиоксидантов, попавших в человеческий организм (прежде всего, со смолой), в метаболических процессах *in vivo*. Настоящая работа посвящена моделированию такой ситуации в условиях *in vitro*. Основу экспериментального подхода к исследованию антиоксидантной активности составили измерения хемилюминесценции в модельной системе, куда вводились пробы, проявляющие антиоксидантные свойства. Хемилюминесцентные подходы в анализе антиоксидантов наиболее удобны именно тогда, когда речь идет об исследовании активности таких реагентов [5–16].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Ввиду участия пероксидаз (ферментов, неизбежно присутствующих в слизистых оболочках в местах попадания в организм человека компонентов



**Рис. 1.** Сигналы хемилюминесценции люминола ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) в присутствии пероксидазы хрена (10 ед./мл) в фосфатно-карбонатном буфере (рН 7.8) при добавлении глицина (Gly, 20 мг/мл) — слева, экстракта смолы (Tar, 20 мг/мл) — в центре и смолы с глицином в одной пробе в тех же концентрациях — справа. Перекись водорода вводилась в концентрациях  $5.9 \cdot 10^{-7}$  М с интервалами 1.5–2.0 мин.

табачного дыма) в метаболических процессах трансформации составляющих смолы в качестве хемилюминофора использовался люминол — 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион марки “Special Grade” производства компании Sigma-Aldrich (USA). Его хемилюминесценцию измеряли с помощью хемилюминометра Lum-5773 (МГУ) в присутствии

перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и пероксидазы хрена производства компании AppliChem (Germany) [16] при добавлении в хемилюминесцирующий раствор глицина марки “Pharma Grade” (Sigma-Aldrich, USA) в качестве модельной аминокислоты, экстрактов смолы табачного дыма и проб типичного фенольного антиоксиданта — пирокатехина (катехола, 1,2-дигидроксibenзола) марки “BioReagent Grade” (Sigma-Aldrich, USA), входящего в состав смолы табачного дыма [1].

Для автоматического прокуривания экспериментальных сигарет использовали курительную машину марки A14 производства фирмы Borgwaldt KC GmbH (Германия). Сбор смолы сигаретного дыма от четырех полностью выкуренных сигарет осуществлялся с помощью кембриджских фильтров [1, 4, 5] с ее последующим экстрагированием бензолом в течение 12 ч при  $8^\circ\text{C}$ .

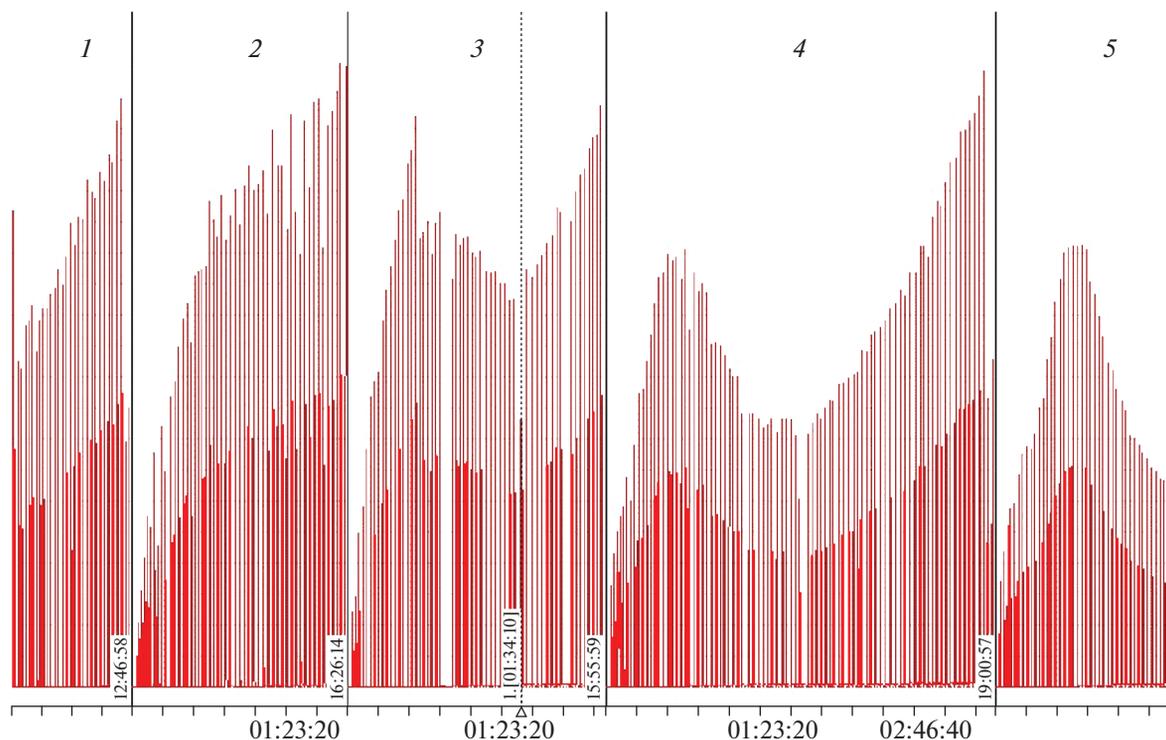
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показаны сигналы хемилюминесценции люминола в присутствии пероксидазы хрена и перекиси водорода (которую вводили маленькими порциями через каждые 1.5–2.0 мин) при добавлении глицина (слева), экстракта смолы (в центре) и смолы с глицином в одной пробе в тех же самых концентрациях (справа). Как видно из этого рисунка, ввод глицина вместе со смолой табачного дыма приводит к сильнейшему ингибированию окисления люминола, отражающемуся в тушении его хемилюминесценции.

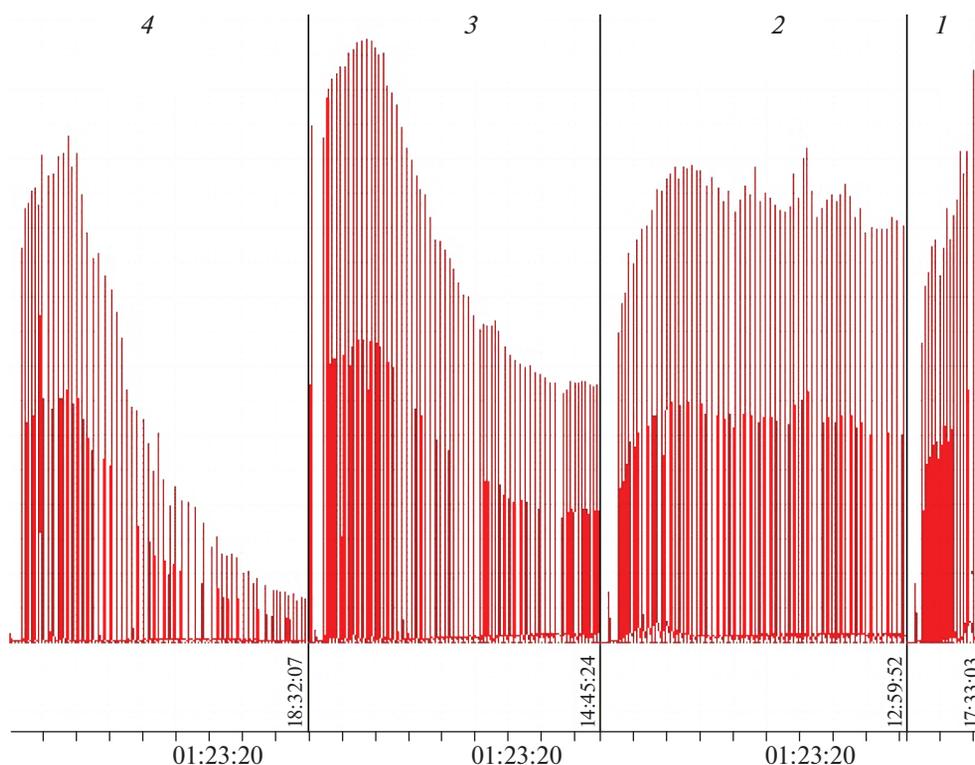
Замена смолы на пирокатехин приводит качественно к тем же результатам. Как видно из рис. 2, пирокатехин тушит хемилюминесценцию окисляющегося люминола, и степень ингибирования этого хемилюминесцентного процесса растет с увеличением концентрации пирокатехина. Но наиболее интересной оказалась зависимость интенсивности хемилюминесценции люминола от отношения концентраций глицина (Gly) и пирокатехина (Cat) (рис. 3). Как видно из этих данных, чем больше отношение  $[Gly]/[Cat]$ , тем больше глубина тушения хемилюминесценции.

Как было показано относительно недавно [17], пирокатехин в присутствии глицина способен образовывать в ферментативном окислительном процессе пирокатехин-глициновые аддукты (рис. 4) [17], которые, возможно, проявляют большую антирадикальную активность, чем сам пирокатехин. По всей видимости, именно это и происходит при введении пирокатехина в хемилюминесцентную систему, использованную в настоящей работе, и объясняет зависимость глубины тушения свечения от соотношения концентраций  $[Gly]/[Cat]$ .

В этой связи следует упомянуть интересный случай взаимодействия глицина с катехольными (пирокатехиновыми) фрагментами в присутствии



**Рис. 2.** Сигналы хемилюминесценции люминола ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) в присутствии пероксидазы хрена (10 ед./мл) в фосфатно-карбонатном буфере (рН 7.8) в зависимости от добавок приокатехина в следующих концентрациях: 0 (1),  $4.54 \cdot 10^{-6}$  (2),  $9.10 \cdot 10^{-6}$  (3),  $1.36 \cdot 10^{-5}$  (4) и  $1.82 \cdot 10^{-5}$  М (5). Перекись водорода вводилась в концентрациях  $5.9 \cdot 10^{-7}$  М с интервалами 1.5–2.0 мин.



**Рис. 3.** Сигналы хемилюминесценции люминола ( $5 \cdot 10^{-5}$  М) в присутствии пероксидазы хрена (10 ед./мл) в фосфатно-карбонатном буфере (рН 7.8) в зависимости от отношения концентраций глицина и пирокатехина,  $\lg([\text{Gly}]/[\text{Cat}])$ : 2.4 (1), 3.00 (2), 3.48 (3), 4.07 (4). Перекись водорода вводилась в концентрациях  $5.9 \cdot 10^{-7}$  М с интервалами 1.5–2.0 мин.

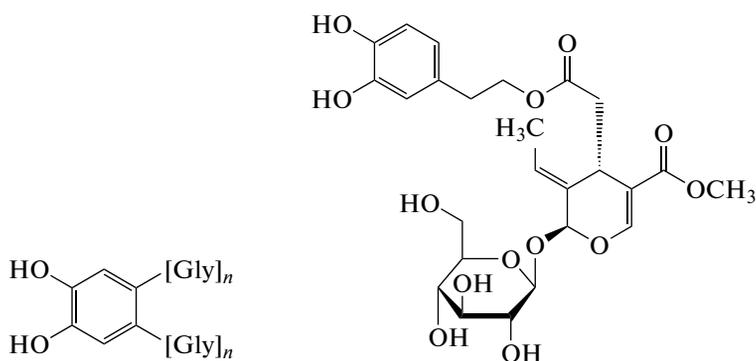


Рис. 4. Строение пирокатехин-глициновых аддуктов (слева) и олеуропеина (справа).

пероксидазы *in vivo*. Такие процессы используются личинками бабочек *Brahmaea Wallichii* с целью преодолеть денатурирующее действие олеуропеина (используемого растениями для своей защиты от поедания) в своем пищеварительном тракте [18], имеющего в своей структуре катехольный фрагмент (рис. 4). Для нейтрализации воздействия олеуропеина личинки *Brahmaea Wallichii* синтезируют в своем пищеварительном тракте до 50 мМ глицина [18]. Этот пример показывает, что метаболические ферментативные процессы с участием глицина и полифенольных соединений действительно играют важную роль живой природе. Поэтому использованный в настоящей работе ферментативный хемилюминесцентный процесс является адекватной моделью таких взаимодействий *in vitro*.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показана важность учета трансформации свойств экзогенных антиоксидантов в метаболических процессах при их попадании в живой организм для оценки и прогнозирования суммарного биоантиоксидантного эффекта. Полифенольные соединения могут вступать в окислительные ферментативные процессы с участием аминокислот с образованием продуктов, обладающих большей антиоксидантной активностью, чем исходные вещества.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-53-18019 Болг\_а) и Национальным научным фондом Болгарии (грант № КП-06-Русия-28).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davis D.L., Nielsen M.T. Tobacco: Production, Chemistry and Technology. Oxford: Blackwell Science, 1999.
2. Saha S.P., Bhalla D.K., Whayne T.F., Jr. et al. // Intern. J. Angiol. 2007. V. 16. № 3. P. 77.
3. Fedorova G.F., Kancheva V.D., Menshov V.A. et al. // Stud. Nat. Prod. Chem. 2016. V. 47. P. 357.
4. Palmira N.P., Maltseva E.L., Chasovskaya T.E. et al. // Aust. J. Chem. 2014. V. 67. № 6. P. 858.
5. Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V. et al. // Photochem. Photobiol. 2017. V. 93. № 2. P. 579.
6. Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V. et al. // Analyst. 2009. V. 134. № 10. P. 2128.
7. Русина И.Ф., Карпунин О.Н., Касакина О.Т. // Хим. физика. 2013. Т. 32. № 8. С. 49.
8. Беляков В.А., Васильев Р.Ф., Трофимов А.В. // Хим. физика. 1994. Т. 13. № 11. С. 74.
9. Жигачева И.В., Русина И.Ф., Генерозова и др. // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 11. С. 68.
10. Васильев Р.Ф., Вепринцев Т.Л., Долматова Л.С. и др. // Кинетика и катализ. 2014. Т. 55. № 2. С. 157.
11. Slavova-Kazakova A.K., Angelova S.E., Denev P. et al. // Beilstein J. Org. Chem. 2015. V. 11. P. 1398.
12. Fedorova G.F., Menshov V.A., Naumov V.V. et al. // Photochem. Photobiol. 2019. V. 95. № 3. P. 780.
13. Fedorova G.F., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F. et al. // ARKIVOC. 2007. № 8. P. 163.
14. Цаплев Ю.Б., Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д. и др. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 7.
15. Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д., Наумов В.В. и др. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 36.
16. Whitehead T.P., Thorpe G.H.G., Maxwell S.R.J. // Anal. Chim. Acta. 1992. V. 266. № 2. P. 265.
17. Ali M.A.S.H.M., El-Gizawy A.M., El-Bassiouny R.E.I. // Food Chem. 2016. V. 192. P. 879.
18. Konno K., Yasui H., Hirayama C., Shinbo H. // J. Chem. Ecol. 1998. V. 24. P. 735.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ МИКРОВЯЗКОСТИ МЕМБРАН  
ЭРИТРОЦИТОВ И ГЛУТАТИОНА В ПЛАЗМЕ КРОВИ ЖИВОТНЫХ  
ПРИ РАЗВИТИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ,  
МОДЕЛИРУЮЩЕЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИЮ  
АЛЬЦГЕЙМЕРОВСКОГО ТИПА

© 2021 г. Н. Ю. Герасимов<sup>1\*</sup>, Г. Ф. Иваненко<sup>1\*\*</sup>, Н. В. Бобкова<sup>2</sup>,  
О. В. Неврова<sup>1</sup>, А. Н. Голощапов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Институт биофизики клетки Российской академии наук, Пущино, Россия

\*E-mail: n.yu.gerasimov@gmail.com

\*\*E-mail: galiv03@rambler.ru

Поступила в редакцию 02.07.2020;

после доработки 02.07.2020;

принята в печать 21.09.2020

На мышах линии NMR1 при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа в разные сроки после операции: от двух недель до 12 месяцев, наблюдали изменение вязкости липидной и белковой областей мембран, параметров перекисного окисления липидов эритроцитов по уровню малонового диальдегида (МДА) в эритроцитах и окислительно-восстановительного состояния системы глутатиона в плазме крови. Обнаружено, что индукция значительных уровней перекисного окисления липидов, измеренных как увеличение содержания МДА, происходила только после значительного истощения уровня восстановленного глутатиона (GSH), увеличения окисленного глутатиона (GSSG) и снижения тиодисульфидного отношения ( $[GSH]/[GSSG]$ ) в плазме крови мышей с увеличением возраста животных при проявлении признаков, сходных с признаками болезни Альцгеймера.

**Ключевые слова:** текучесть и структура мембраны, эритроциты, восстановленный и окисленный глутатион, плазма крови, экспериментальная патология, болезнь Альцгеймера.

DOI: 10.31857/S0207401X21020059

## ВВЕДЕНИЕ

Одной из важных проблем в настоящее время являются деменции альцгеймеровского типа. Несмотря на то, что прикладываются значительные усилия для исследования данной патологии и уже известны многие детали при ее развитии, механизм развития болезни Альцгеймера (БА) до сих пор неизвестен. При разработке подходов к созданию модели спорадической формы болезни Альцгеймера на животных проводили двустороннее удаление обонятельных луковиц (бульбэктомия) для инициации распространяющегося процесса дегенерации в специфических структурах мозга. У бульбэктомированных (БЭ) животных в мозге возрастает содержание  $\beta$ -амилоидных пептидов ( $\beta$ A) в период наиболее выраженного нарушения пространственной памяти. Отмечается гибель нейронов в структурах мозга, связанных с памятью. Такие нарушения в модельных экспериментах на животных являются характерными признаками развития

нейродегенеративного процесса по типу болезни Альцгеймера у человека [1, 2].

Как известно, болезнь Альцгеймера характеризуется на гистологическом уровне так называемыми нейродегенеративными бляшками и нейрофибрилярными клубками, которые формируются в нейронах и состоят из гиперфосфорилированной формы внутриклеточного тау-белка. Внеклеточное отложение  $\beta$ A вызывает местные воспалительные процессы [3].

В отличие от амилоидных бляшек  $\beta$ A-воспаление коррелирует с потерей нейронов и снижением когнитивных функций при БА. Это позволяет предположить, что оно играет важную роль в прогрессировании заболевания. Накопление активных форм кислорода при БА может быть вызвано митохондриальной дисфункцией, приводящей к дефекту дыхательной цепи и, как следствие, к образованию избытка свободных радикалов кислорода и накоплению внеклеточного  $\beta$ -амилоида.

Отложение  $\beta$ A вызывает местные воспалительные процессы и активирует микроглию, которая является еще одним потенциальным источником реакционных радикалов кислорода [4, 5].

Массивный синтез свободных радикалов увеличивается в процессе клеточного старения, когда происходят нарушения функции и целостности митохондриальной мембраны. При этом структура мембраны, а также ее липидные свойства очень восприимчивы к перекисному окислению липидов [6].

Важную роль в передаче, переработке и хранении информации в клетке играет липидная компонента мембран. Состояние липидной компоненты биологических мембран определяется рядом параметров: микровязкостью липидов, фосфолипидным и жирнокислотным составом, процессами перекисного окисления липидов (ПОЛ). Возможно, ПОЛ является определяющим фактором в состоянии липидного бислоя, так как оно связано с другими характеристиками мембранных липидов [7].

При изучении структурного состояния мембран эритроцитов у людей с болезнью Альцгеймера, где в качестве структурных характеристик использовали гемолиз эритроцитов и содержание мономерного диальдегида (МДА) как показатель ПОЛ, а также микровязкость липидного бислоя, обнаружено, что у всех пациентов с БА повышена текучесть обеих областей (липидной и прибельковой) мембраны эритроцитов [8]. На начальной стадии развития экспериментальной патологии, моделирующей БА у мышей, обнаружено снижение микровязкости мембран, выделенных из мозга [9].

Накапливающиеся доказательства подтверждают гипотезу о том, что окислительный стресс и ПОЛ играют важную роль в большинстве нейродегенеративных заболеваний, связанных с возрастом. Окислительный стресс при болезни Альцгеймера является ранним событием и возникает до проявления цитопатологических признаков. Поэтому считается, что окислительный стресс может играть ключевую патогенную роль при болезни.

Действительно, гибель клеток и другие нарушения при БА связаны с окислительным стрессом и оксидативными повреждениями. Мозг особенно уязвим к окислительному стрессу из-за высокого потребления кислорода, недостатка антиоксидантов по сравнению с другими органами и большого содержания липидов [10].

В клетке существует несколько сбалансированных систем, определяющих антиоксидантный статус организма, которые можно рассматривать как регуляторные. Значительное место среди них занимают как ферменты, так и природные антиоксиданты — ингибиторы процессов свободно-радикального окисления. Другие антиоксидан-

ные механизмы зависят в значительной степени от серосодержащих аминокислот (цистеина и метионина) в белках и небелковых кофакторах, особенно от цистеинсодержащего трипептида — восстановленного глутатиона (GSH), который находится в изобилии внутри клеток [11].

Обсуждается значение редокс-дисбаланса тиолов как фактора, способствующего нейродегенеративным заболеваниям. Биологическая активность атома серы в цистеине, находящемся в виде свободной или включенной в белки и пептиды аминокислоты, является важным фактором при окислительном повреждении, эксцитотоксичности и нейродегенерации. Восстановление окислительно-восстановительного баланса важно для минимизации потери нейронов во время нейродегенерации [12].

Глутатион является одним из основных компонентов системы антиоксидантной защиты клеток млекопитающих. Он обладает множественными антиоксидантными свойствами, которые включают в себя прямое конъюгирование со свободными радикалами, ферментативную нейтрализацию свободных радикалов и регенерацию других жирорастворимых антиоксидантов, таких как витамины С и Е [13]. Глутатион снижает процессы перекисного окисления липидов, напрямую блокируя деятельность реакционных форм кислорода [14, 15]. Чрезмерная генерация последних приводит к окислительному стрессу, вызывающему нарушение гомеостаза GSH и снижение активности глутатионзависимых ферментов. [12, 16].

Несмотря на исключительность синтеза глутатиона в цитозоле, он обнаруживается во внутриклеточных пулах: в цитоплазме, ядре, митохондриях, и равномерно распределяется во внутриклеточных органеллах, чтобы контролировать по необходимости специфические отделы и функции. Внутриклеточный глутатион преимущественно находится в восстановленной форме, за исключением эндоплазматического ретикулума, где он существует в основном в окисленной форме (GSSG). Окисленный глутатион — главный источник окислительного эквивалента для обеспечения соответствующего окружения, необходимого для образования дисульфидных связей в белках. Истощение уровня митохондриального уровня GSH повышает чувствительность клеток к окислительному стрессу, такому как фактор некроза опухоли, гипоксии,  $\beta$ -амилоиду, что способствует патогенетическим заболеваниям [17, 18].

Принимая во внимание существенные доказательства, подтверждающие наличие повышенного окислительного стресса при развитии нейродегенеративных заболеваний, можно утверждать, что создание биомаркеров для выявления деменции в доклинический период позволит понять суть заболеваний не только на ранних стадиях, но

и при максимальных проявлениях БА. В основу экспериментальной модели спорадической формы болезни Альцгеймера была положена гипотеза о роли нарушений обонятельной системы при развитии данной патологии [1].

Целями наших исследований были изучение структурных характеристик мембран эритроцитов и анализ системы глутатиона в плазме крови мышей при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа на основе бульбэктомии, в сравнении с ложной операцией в сроки от двух недель до 12 месяцев после операции и контрольной группой мышей до операции.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на мышах-самках линии NMRI [19] до операции (количество животных  $n = 19$ ) и после двустороннего удаления обонятельных луковиц ( $n = 10$ ) путем аспирации через трепанационное отверстие (бульбэктомия). Ложнооперированные (ЛО) животные ( $n = 9$ ) подвергались аналогичной манипуляции, но без удаления обонятельных структур.

Кровь (0.2 мл), взятую из глазной вены индивидуально от каждого животного, помещали в цитратный раствор (0.4 мл) до и через 2 недели, 1, 2, 3, 6, 8 и 12 месяцев после ложной операции и бульбэктомии. Цитратный раствор крови центрифугировали в течение 10 мин при скорости вращения барабана 3000 об/мин для осаждения эритроцитов. В плазме крови определяли содержание глутатиона методом, описанным в нашей работе [20]. Осажденные эритроциты отмывали охлажденным физиологическим раствором 2–3 раза. В качестве исследуемых образцов использовали 5%-ную взвесь эритроцитов в *трис*-HCl-буфере. Текучесть липидного бислоя мембран определяли методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) спиновых зондов. В качестве зондов использовали стабильные нитроксильные радикалы [21] 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоилоксилпиперидин-1-оксил (зонд I) и 5,6-бензо-2,2,6,6-тетраметил-1,2,3,4-тетрагидро- $\gamma$ -карболин-3-оксил (зонд II), синтезированные в Институте химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН.

В работе было показано, что зонд I преимущественно локализуется в поверхностном слое (глубина – 2–4 Å) липидных компонент мембраны, а зонд II – в липидах, прилегающих к белкам (глубина – 2–4 Å), что позволяет по поведению зондов I и II в мембране судить о липидно-белковых отношениях в них. Для удобства изложения мы в последующем будем называть зонд I “липидным”, а зонд II – “белковым”. Зонды вводили в пробы в концентрации  $10^{-4}$  М и инкубировали в течение 30–40 мин [22]. Каждое измерение

повторялось 3–5 раз. Из полученных спектров ЭПР рассчитывали время корреляции вращательной подвижности ( $\tau_c$ ), характеризующее микровязкость компонентов мембраны, по формуле,  $\tau_c = 6.65 \cdot 10^{-10} \Delta H_+ [(I_+/I_-)^{0.5} - 1]$ , приведенной в работе [23]. Регистрацию спектров ЭПР проводили на радиоспектрометре ER200D-SRC компании Bruker (Germany).

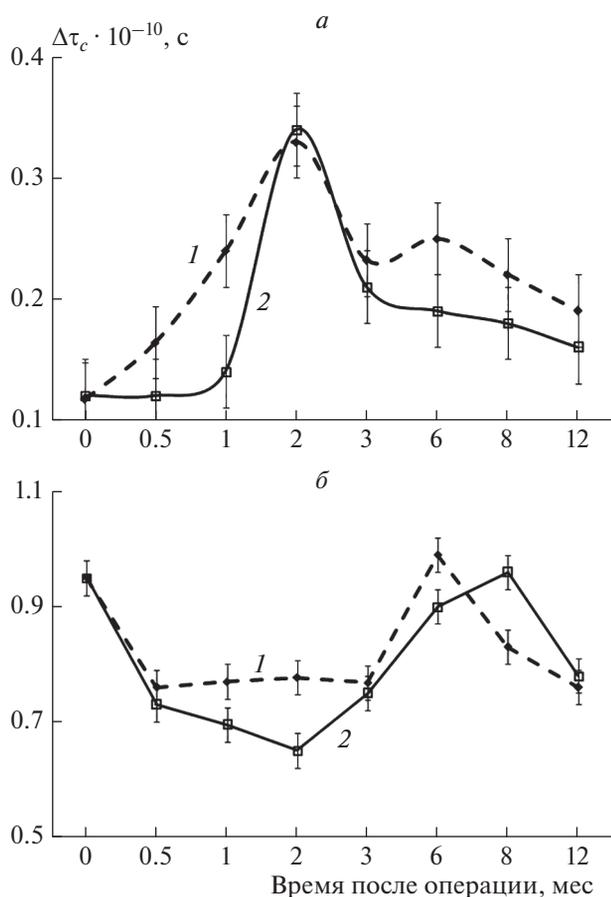
Статистическая обработка данных осуществлялась методами параметрической статистики с использованием пакетов компьютерных программ Microsoft Office Excel, Origin 6.1 и SigmaPlot 10 при статистической надежности 95% ( $P < 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Наиболее удобным материалом для длительной во времени диагностики при заболевании является кровь. Поэтому, с одной стороны, были изучены изменения структурных характеристик мембран эритроцитов, а с другой – изменение содержания сульфгидрильных и дисульфидных групп в плазме крови БЭ-мышей при развитии патологического процесса, имитирующего деменцию Альцгеймеровского типа, в сравнении с ложнооперированными и контрольными (до операции) животными на разных стадиях заболевания: от двух недель до 1, 3, 6, 8 и 12 месяцев после операции.

На рис. 1 представлены изменения микровязкости липидной фазы и прибрежковых областей мембран эритроцитов у ложнооперированных и бульбэктомированных животных в разные сроки после операции. Наблюдается плавный рост микровязкости липидных областей мембран у ЛО-животных в первые 2 мес после операции. Время корреляции вращательной подвижности,  $\tau_c$ , характеризующее микровязкость компонентов мембраны, увеличивается в период от 1 до 2 мес практически в 3 раза. Через 2 мес микровязкость липидных областей мембран у ЛО-животных начинает снижаться. Однако к сроку 12 мес после операции микровязкость липидной фазы у ЛО-мышей в 1.7 раза выше, чем у животных до операции – контроль (рис. 1а).

В то же время у БЭ-животных текучесть липидной фазы мембран в ранний период после операции (до 1 мес) не изменяется. Индукционный период сохраняется на уровне показателей контрольных животных. После индукционного периода текучесть липидной фазы мембран у БЭ-животных максимально (резко) возрастает к двум месяцам. Но уже через 2 мес после операции микровязкость липидных областей мембран у БЭ-животных резко снижается. Время вращательной корреляции у БЭ- и ЛО-мышей от 3 до 12 мес после операции соответственно в 1.5 и 1.7 раз выше, чем у контрольных животных (рис. 1а).



**Рис. 1.** Изменение микровязкости липидной фазы (а) и приберловых областей (б) мембран эритроцитов у мышей линии NMR1 до (0 дней) и после операции (1 – ЛО-животные, 2 – БЭ-животные) в зависимости от времени.

В приберловых областях через две недели после операции микровязкость мембран у ЛО-животных снижается от  $1.0$  до  $0.8 \cdot 10^{-10}$  с и сохраняется на этом уровне в течение 3 мес после операции. Несмотря на незначительное увеличение микровязкости в приберловых областях в период от 6 до 8 мес, через 12 мес микровязкость у ЛО-животных снижается до показателей, обнаруженных у мышей через 3 мес после операции. Изменение микровязкости приберловых областей мембран эритроцитов БЭ-животных носит похожий характер. Однако у БЭ-мышей в период от 1 до 2 мес после операции значения микровязкости мембран в приберловых областях достоверно ниже, чем у ложнопериоперированных в этот же период. К срокам 6 и 8 мес после операции микровязкость в приберловых областях соответственно у ЛО- и БЭ-животных возвращается к первоначальному значению (до нормы), а затем к сроку 12 мес после операции она снова снижается до значений приблизительно в 2 раза ниже, чем у контрольных животных

(рис. 1б). Таким образом, текучесть как приберловых, так и липидных областей мембран эритроцитов у БЭ-животных выше, чем у ЛО-животных практически во все сроки после операции.

Экспериментальные данные по изменению статуса глутатиона в плазме крови мышей до и после операции в сроки от двух недель до 12 месяцев представлены на рис. 2. Обнаружено, что в разные периоды развития заболевания изменение содержания восстановленного и окисленного глутатиона в плазме крови мышей контрольной группы, ложнопериоперированных и опытной группы после бульбэктомии выражены в разной степени. У БЭ-мышей в ранние сроки после операции (0.5 и 1 мес) уровень GSH в плазме крови превышает контрольные значения в 1.5 и 1.4 раза соответственно. Однако с постепенным прогрессированием заболевания (от 2 до 8 мес) содержание глутатиона снижается. Несмотря на достоверное повышение содержания восстановленного глутатиона в ранние сроки (до 1 мес), между уровнем GSH в плазме крови и инициацией нейродегенеративного процесса у БЭ-мышей в период от 0.5 до 12 мес наблюдается отрицательная корреляционная зависимость ( $r = -0.55$ ,  $n = 8$ ,  $P < 0.05$ ). С развитием патологического процесса, моделирующего нейродегенерацию с применением удаления обонятельных луковиц у животных, наблюдается достоверное снижение содержания GSH в плазме крови (рис. 2а).

У ЛО-животных через 0.5 и 1 мес после операции уровень GSH в плазме снижается, однако к двум месяцам наблюдается незначительное повышение относительно контрольных значений. В сроки от 3 до 12 мес после ложной операции уровень GSH в плазме крови сохраняется и соответствует контрольному. Несмотря на окислительный стресс, вызванный ложной операцией, достоверные изменения уровня GSH в плазме крови мышей в зависимости от сроков операции отсутствуют (рис. 2а).

Практически в одни и те же сроки после операции у ЛО- и БЭ-животных наблюдается одностороннее изменение содержания окисленного глутатиона в плазме крови. В период от двух недель до трех месяцев у животных уровень GSSG в плазме повышается. Наиболее выраженное его увеличение в плазме наблюдается у ЛО-животных к третьему месяцу по сравнению с БЭ-животными.

Через 6 мес после операции содержание глутатиона в плазме крови снижается, и этот уровень сохраняется до 12 мес. Несмотря на снижение уровня GSSG в плазме крови у животных в период от 6 до 12 мес после операции, его содержание в эти сроки остается достоверно выше, чем до операции. Необходимо отметить, что уровень изменений содержания GSSG в плазме у БЭ-животных в ранние и поздние сроки развития нейроде-

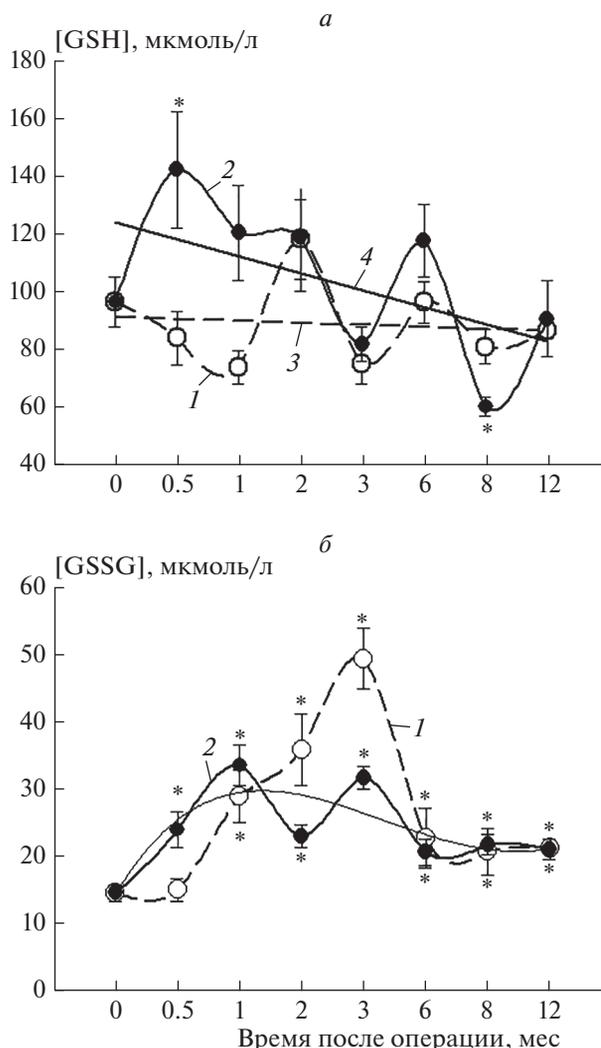
генеративного процесса в 2 раза меньше, чем у ложнооперированных (рис. 2б).

### ОБСУЖДЕНИЕ

В Институте биофизики клетки РАН (Пушино) Н.В. Бобковой с сотр. разработана наиболее адекватная из существующих в настоящее время модель спорадической формы БА. Для инициации нейродегенеративного процесса используется удаление обонятельных луковиц. Авторы отмечают, что срок в 2 недели – начальная стадия болезни, срок в 1 мес соответствует максимальному проявлению патологического процесса по соответствующим физиологическим и морфологическим показателям. Срок в 5 мес после бульбэктомии соответствует стадии компенсации, когда эти показатели возвращаются к нормальному уровню. В дальнейшем с увеличением возраста животных снова проявляются признаки, сходные с признаками БА [1, 2].

Изменения при болезни Альцгеймера объясняют массивным и прогрессивным разрушением нервных клеток, вызванным различными неврологическими процессами. Теория окислительного стресса объясняет гибель нейронов, вызванную свободными радикалами, которые изменяют состав липидов жирных кислот, мембранную текучесть и проницаемость, нарушая транспортные функции. Одним из побочных продуктов перекисного окисления липидов является малоновый диальдегид. В структурном плане МДА – высокотоксичное органическое соединение, участвующее в широко разнообразии биохимических реакций окисления. Гидроперекиси липидов являются промежуточными продуктами перекисного окисления липидов и могут вступать в реакцию с ненасыщенными жирными кислотами мембран, нарушая их структуру [7, 24–26].

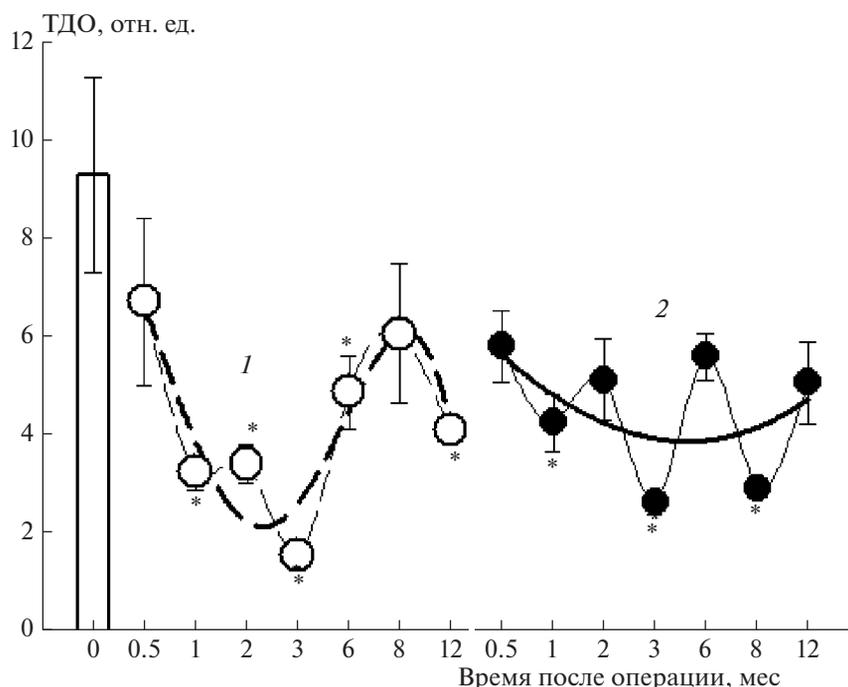
На начальной стадии болезни у БЭ-животных в первую очередь происходит изменение структурного состояния прибрежковых областей мембраны, которое связано с функционированием мембранных белков. В прибрежковых областях сразу после операции микровязкость мембран у БЭ-животных снижается (увеличивается текучесть) практически в 2 раза в сроки максимального проявления болезни (1–2–3 месяца). Вслед за изменениями в прибрежковых областях у БЭ-животных наблюдаются увеличение микровязкости и уменьшение текучести липидного бислоя мембраны через 2 мес после операции (рис. 1). Практически в эти же сроки после операции (1–2–3 мес) происходит увеличение содержания окисленного глутатиона в плазме крови у БЭ-животных. Однако содержание восстановленного глутатиона повышается на более ранних сроках, а именно через 2 недели после операции – начальная стадия болезни (рис. 2а, б).



**Рис. 2.** Изменение содержания GSH (а) и GSSG (б) в плазме крови мышей линии NMMR1 до (0 дней) и после операции (1 – ЛО-животные; 2 – БЭ-животные; 3 – ЛО-животные, коэффициент корреляции  $r = 0.03$ ; 4 – БЭ-животные, коэффициент корреляции  $r = -0.55$ ,  $n = 8$ ,  $P < 0.05$ ) в зависимости от времени. Тонкая сплошная линия на рис. 2б – аппроксимация зависимости для БЭ-животных. Различия между группами считали статистически значимыми (\*) в сравнении с контрольной группой при  $P \leq 0.05$ .

Изменение тиолдисульфидного статуса в плазме крови происходит параллельно с изменениями микровязкости в прибрежковых областях мембран эритроцитов у БЭ-животных. В период от 0.5 до 3 мес после бульбэктомии снижаются микровязкость мембран эритроцитов (рис. 1б) и величина тиолдисульфидного отношения (ТДО) в плазме крови животных (рис. 3).

Изучение статуса ТДО в плазме крови мышей при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа (бульбэктомия), показало, что вариабельность ТДО у БЭ-мышей значительно ниже,



**Рис. 3.** Изменение ТДО в плазме крови мышей линии NMMR1 до (0 дней) и после операции (1 – ЛО-животные, 2 – БЭ-животные) в зависимости от времени. Различия между группами считали статистически значимыми (\*) в сравнении с контрольной группой при  $P \leq 0.05$ .

чем у ложнопериоперированных. Кроме того, у БЭ-животных происходит снижение ТДО в период от 2 недель до 12 мес после операции, а у ЛО-мышей этот показатель снижается в период от 2 до 3 недель, а на стадии компенсации (3–6 мес) он повышается, но не достигает контрольных значений.

На модели трансгенных мышей с двойной мутацией альцгеймеровского и дикого типов исследовали количественно и сравнивали уровни GSH и GSSG, а также смешанных дисульфидов с белком (Pr-SSG) как в тканях мозга, так и образцах крови на разных стадиях заболевания (1, 5 и 11 мес). У трансгенных мышей обнаружено значительное снижение уровней GSH в тканях головного мозга и связанное с этим снижение ТДО во всех областях головного мозга через 5 мес после операции (непосредственно перед отложением  $\beta$ A) и до 11 мес. В крови уровень GSH увеличивался в период от 1 до 5 мес. Увеличение уровня Pr-SSG в крови через 5 мес в сочетании с падением GSSG и Pr-SSG в мозге авторы объясняют ростом экспорта GSSG из мозга в кровь в период повышения содержания  $\beta$ -амилоида. Сверхпродукцию S-глутатионилированных белков (Pr-SSG) в крови связывают с последующим увеличением системного окислительного стресса, в последствии приводящего к клеточной гибели [16].

Данные, полученные нами на мышах при развитии экспериментальной патологии, моделирующей нейродегенерацию альцгеймеровского типа, под-

твердились на модели трансгенных мышей при определении окислительно-восстановительного статуса глутатиона в крови.

При анализе уровней МДА в эритроцитах у БЭ-животных видно существенное их увеличение уже через 2 недели (начальная стадия заболевания) после операции по сравнению с контролем. Интересно, что на стадии компенсации (3–6 мес) содержание продуктов ПОЛ снижается, но в сроки максимального проявления болезни – 8–12 мес после операции – значения МДА в 2 раза превышают норму.

У ЛО-животных наблюдается постепенное нарастание уровня МДА, и лишь после срока в 12 мес содержание малонового диальдегида возрастает в 1.6 раз относительно контрольных значений. Уровень МДА в эритроцитах – маркера окислительного стресса у БЭ-мышей возрастает с увеличением послеоперационного срока. По уровню МДА у БЭ-животных наблюдается похожая картина, но при более высоких значениях, что говорит о более высоком уровне ПОЛ в мембранах эритроцитов, чем у ЛО-животных (табл. 1).

Уровень окислительно-восстановительного состояния глутатиона в крови служит показателем окислительного стресса. Данные, полученные нами на животных при двустороннем удалении обонятельных луковиц (бульбэктомия), показали, что в сроки максимального проявления болезни (8–12 мес после операции) с повышением

Таблица 1. Содержание МДА (мкмоль/10<sup>6</sup> клеток) в эритроцитах мышей линии NMMR1 до и в разные сроки (0,5, 1, 2, 3, 6, 8 и 12 мес) после операции

Объект	Условия	Контроль	Содержание МДА						
			0.5	1	2	3	6	8	12
ЛО	до инкубации	2.1	2.8	3.7	3.5	4.5	3.7	2.5	3.6
	после инкубации	2.8	2.8	4.7	3	5.3	3.3	3.3	4.4
БЭ	до инкубации	1.9	3.8	4.5	4.5	4.8	5.5	2.2	4.2
	после инкубации	2.6	4	9(?)	3.8	3.8	3.3	4.7	4.4

содержания МДА в эритроцитах наблюдается снижение уровня GSH, повышение GSSG в плазме крови и связанное с этими изменениями снижение тиолдисульфидного отношения (рис. 2, рис. 3, табл. 1).

Предполагают, что снижение уровней GSH при БА может быть связано с понижающей регуляцией гомеостаза GSH, а не с ограничением субстрата. Клеточный гомеостаз GSH регулируется неаллостерическим ингибированием обратной связи: GSH влияет на глутамат-цистеинлигазу (GCL), которая отвечает за синтез предшественника GSH –  $\gamma$ -глутамилцистеина (GGC). В условиях, включающих гомеостаз GSH с пониженной регуляцией, GGC служит в качестве субстрата, ограничивающего критические уровни для GSH-синтазы – основного фермента, ответственного за конденсацию глицина с GGC для образования конечно тиолового трипептида – GSH [27].

Клинические испытания показали повышенный уровень показателей окислительного стресса у пациентов с легкими когнитивными нарушениями, сходными с таковыми у пациентов с деменцией. К этим показателям относятся увеличение уровня МДА и снижение содержания антиоксидантных ферментов, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы (GPX). При инактивации последней возможно окислительное повреждение клеточной мембраны. Молекулы мишени, которые могут присутствовать в различных клеточных структурах, такие как клеточные и внутриклеточные мембраны, подвергаются значительным структурным и функциональным изменениям в этой “окислительной атаке”, а следовательно, ставят под угрозу клеточную функцию и жизнеспособность [28].

В ходе реакции, катализируемой GSH-пероксидазой, увеличение продукции GSSG может привести к образованию смешанных дисульфидов “белок–глутатион” (глутатионирование белка), что является важным этапом механизма редокс-регуляции в физиологических условиях [29]. Окислительно-восстановительный статус серы играет очень важную роль в регуляции клеточных функций, включая передачу сигналов, рост, выживание и гибель клеток. Обратимая или необратимая модификация остатков цистеина и метионина изменяют функцию белка или стабильность

и нарушают внутриклеточный сульфгидрильный гомеостаз. Следовательно, нарушение функции антиоксидантных систем и окислительно-восстановительного статуса серы связано с нарушением функции клетки, старением и многими заболеваниями, в том числе и с болезнью Альцгеймера [30].

Исследования показывают, что нарушение регуляции окислительно-восстановительной сигнализации и сульфгидрильного гомеостаза, вероятно, способствует возникновению/прогрессированию нейродегенерации. Окислительный стресс изменяет тиол-дисульфидный статус ключевых белков, которые регулируют баланс между выживанием и гибелью клеток. При развитии нейродегенеративных заболеваний по типу БА поддерживается теория ранних сбоев в гомеостазе GSH с последующим снижением его уровня с увеличением возраста животных. Полагают, что недостаточная способность синтезировать GSH является уязвимым фактором для БА [31].

Наиболее вероятным объяснением ранних событий, происходящих у животных при развитии экспериментальной патологии, является непродолжительное парадоксальное увеличение уровня глутатиона. Когда редокс-система становится нерегулируемой, появляется дисбаланс, при котором антиоксидантная защита превосходит образование окислителей. Это связывают с редуктивным стрессом, характеризующимся аномально высоким уровнем восстановительных компонентов внутри биологических систем [32].

Редуктивный стресс обнаружили и у животных с экспериментальной патологией, моделирующей болезнь Альцгеймера, когда их редокс-статус определяли в молодом возрасте, т.е. до начала процесса заболевания. Редуктивный стресс связывают с нарушением гомеостаза глутатиона (увеличение уровня GSH и ТДО) и увеличением агрегации белков в экспериментах на мышах [33].

У индивидов со слабовыраженными когнитивными нарушениями до заболевания, но с высоким риском развития болезни Альцгеймера (носители аллеля ApoE4), длительное время подвергавшихся редуктивному стрессу, повышена экспрессия фермента глутатионпероксидазы, катализирующего восстановление GSSG [34, 35]. Продолжающийся в течение длительного времени

редуктивный стресс может привести к изменению другого, самого отдаленного редокс-баланса, т.е. к окислительному стрессу, индуцируя сигнальные нарушения в клетках. В то время как окислительный стресс характерен для поздней стадии болезни Альцгеймера, редуктивный стресс происходит на ранних этапах заболевания. В период до проявления болезни редуктивный стресс увеличивает риск дальнейшего развития деменции альцгеймеровского типа [16].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При развитии патологии, моделирующей нейродегенерацию при удалении обонятельных луковиц, у мышей линии NMRI вследствие окислительного стресса обнаружено увеличение уровня МДА – побочного продукта перекисного окисления липидов, повреждающего клеточные структуры и макромолекулы. Вероятно, из-за этих изменений основные нарушения текучести имели место в прибрежных областях мембран у бульбэктомированных животных. Снижение микровязкости мембран эритроцитов наблюдается в периоды от начальной стадии заболевания и до максимального проявления болезни. В эти же периоды проявления болезни наблюдаются увеличение содержания окисленного глутатиона в плазме крови животных и снижение тиолдисульфидного отношения. Нарушения окислительно-восстановительного состояния тиолдисульфидной системы в плазме крови у БЭ-животных сохраняются с развитием болезни. Фактически концентрации GSH и его окисленной формы – глутатион дисульфида в основном определяют окислительно-восстановительное состояние клетки. Текучесть мембран прибрежных и липидных областей мембран эритроцитов у бульбэктомированных животных выше, чем у ложнопериорированных практически во все сроки после операции. Следовательно, изменения структурного состояния мембраны и нарушение регуляции окислительно-восстановительного гомеостаза глутатиона у животных можно рассматривать как следствия не только окислительного стресса, характерного для поздней стадии болезни Альцгеймера, но и редуктивного (упрощенного) стресса в период до проявления болезни, который увеличивает риск дальнейшего развития деменции альцгеймеровского типа.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бобкова Н.В., Нестерова И.В., Нестеров В.В. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2001. Т. 131. № 5. С. 507.
2. Бобкова Н.В., Нестерова И.В., Александрова И.Ю. // Психиатрия. 2008. № 4–6. С. 34.
3. Porquet D., Andr ez-Benito P., Gri an-Ferr  C. et al. // Age. 2015. V. 37. P. 9747.
4. Lin M.T., Beal M.F. // Nature. 2006. V. 443. P. 787.
5. Wilkins H.M., Carl S.M., Weber S.G. et al. // J. Alzheimers Dis. 2015. V. 45. P. 305.
6. Riechter C., Gogvadze V., Laffranchi R. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1271. P. 67.
7. Владимиров Ю.Ф., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972.
8. Герасимов Н.Ю., Голощанов А.Н., Бурлакова Е.Б. // Хим. физика. 2009. Т. 28. № 7. С. 82.
9. Molochkina E.M., Gerasimov N.Yu., Goncharova I.N. et al. // Chem. Phys. Lipids. 2008. V. 143. P. 94.
10. Floyd R.A. // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1999. V. 222. P. 236.
11. Ziegler D.M. // Annu. Rev. Biochem. 1985. V. 54. P. 305.
12. McBean G.J., Aslan M., Driffiths R.G., Torr  R.C. // Redox Biology. 2015. V. 5. P. 186.
13. Sing R.P., Shashvat S., Kapur S. // J. Indian Acad. Clinical Med. 2004. V. 5. P. 218.
14. Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F. // Clin. Chim. Acta. 2003. V. 333. № 1. P. 19.
15. Valko M., Leibfritz D., Moncol J. // Intern. J. Biochem. Cell Biol. 2007. V. 39. P. 44.
16. Zhang C., Rodriguez C., Spaulding J. // J. Alzheimers Dis. 2012. V. 28. № 3. P. 655.
17. Mar  M., Collet A., Morales A., Montfort C. // Antioxid. Redox Signal. 2010. V. 12 P. 1294.
18. Mar  M., Morales A., Collet A. // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1830. № 5. P. 3317.
19. Bomhard E., Mohr U. // Exp. Pathol. 1989. V. 36. № 3. P. 129.
20. Иваненко Г.Ф., Бурлакова Е.Б. // Изв. АН. Сер. биол. 2005. № 1. С. 9.
21. Карпова С.Г., Милюшкина Э.Г., Люсова Л.П. и др. // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 3. С. 40.
22. Бинюков В.И., Борунова С.Ф., Гольдфельд М.Г. и др. // Биохимия. 1971. Т. 36. № 6. С. 1149.
23. Вассерман А.М., Бучаченко А.Л., Коварский А.Л., Нейман И.Б. // Высокомолекуляр. соединения. А. 1968. Т. 10. С. 1930.
24. Pradhan D., Weiser M., Lumley-Sapanski K. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1023. P. 398.
25. Negre-Salauze A., Auge N., Auala V. et al. // Free Radical. Res. 2010. V. 44. P. 1125.
26. Zarkovic N., Cipak A., Jaganjac M. // J. Proteomics. 2013. V. 92. P. 239.
27. Braidy N., Zarka M., Welch J., Bridge W. // Curr. Alzheimer Res. 2015. V. 12. № 4. P. 298
28. Padurariu M., Ciobica A., Hriten L. et al. // Neurosci. Lett. 2010. V. 469. P. 6.
29. Ghezzi P. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1830. № 5. P. 3265.
30. Liedhegner E.A.S., Gao Xing-Huang, Mieryl J.J. // Redox. Signal. 2012. V. 16. № 6. P. 543.
31. Ballatori N., Krance S.M., Notenboom S. et al. // Biol. Chem. 2009. V. 390. P. 191.
32. Kemp M., Go Y.M., Jones D.P. // Free Radical Biol. Med. 2008. V. 44. P. 921.
33. Zhang X., Min X., Li C., Benjamin L.J. et al. // Hypertension. 2010. V. 55. № 6. P. 1412.
34. Bad  M.-C., Giraldo E., Das  F. et al. // Free Radical Biol. Med. 2013. V. 63. P. 274.
35. Lloret A., Fuchsberger T., Giraldo E., Vina J. // Curr. Alzheimer Res. 2016. V. 13. P. 1.

## ИЗМЕНЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ ОКСИДА АЗОТА В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ ИШЕМИИ

© 2021 г. Т. С. Константинова<sup>1</sup>, Т. Ф. Шевченко<sup>1\*</sup>, И. В. Барсков<sup>2</sup>, В. Г. Тактаров<sup>2</sup>,  
К. В. Кузнецова<sup>2</sup>, П. В. Аболтин<sup>1</sup>, Г. Р. Каламкарров<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

<sup>2</sup>Московский медицинский университет “РЕАВИЗ”, Москва, Россия

\*E-mail: tatianashevchenko@rambler.ru

Поступила в редакцию 02.07.2020;  
после доработки 10.09.2020;  
принята в печать 21.09.2020

В работе методом ЭПР исследовалось изменение относительного содержания оксида азота в коре головного мозга крысы в условиях острой ишемии. В качестве модели ишемии в работе использован индуцированный лазером тромбоз сосудов. Предварительно в кровоток вводился краситель бенгальский розовый, который в ответ на лазерное воздействие генерирует активные формы кислорода, что приводит к коагуляции белков, повреждению стенки сосуда и, как следствие, к образованию тромба. Гистологически показано, что острый ишемический процесс заканчивается через сутки после лазерной операции, а через трое суток начинается процесс активной ремиссии с соответствующими морфологическими изменениями очага поражения. Относительное содержание оксида азота определялось через 1 и 3 сут после фототромбоза сосудов головного мозга с использованием парамагнитного комплекса NO–Fe–ДЭТК в качестве спиновой ловушки. Содержание оксида азота оценивалось по крайней низкополевой компоненте спектра ЭПР этого комплекса. Показано, что значительное увеличение относительного содержания оксида азота происходит на третьи сутки после лазерной операции и совпадает с началом ремиссии после острой ишемии. В работе обсуждается возможная роль оксида азота в процессе ремиссии.

*Ключевые слова:* оксид азота, метод ЭПР, парамагнитный комплекс NO–Fe–ДЭТК, ишемия мозга, фотоиндуцированный тромбоз сосудов.

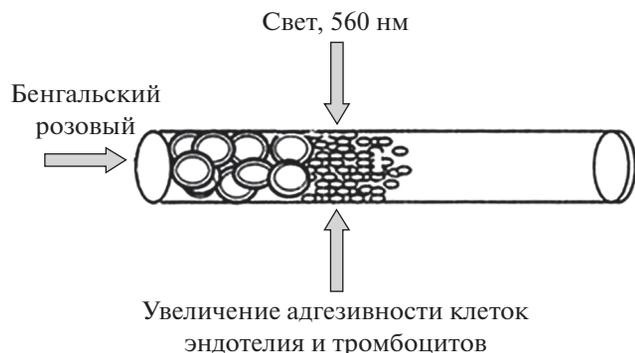
DOI: 10.31857/S0207401X21020096

### ВВЕДЕНИЕ

Оксид азота (NO) – универсальная молекула-регулятор многочисленных функций в организме и физиологический мессенджер в центральной нервной системе [1], участвующий в важных процессах, таких как регуляция кровообращения головного мозга [2]. Оксид азота синтезируется NO-синтазой (NOS) путем превращения L-аргинина в L-цитруллин в реакции, идущей с участием кислорода с образованием промежуточного продукта N-ω-гидрокси-L-аргинина.

Существуют три изоформы NOS: нейрональная (nNOS), эндотелиальная (eNOS) и индуцибельная (iNOS). Первые две изоформы являются Ca<sup>2+</sup>-зависимыми и локализованы в нервных тканях и в эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, соответственно [3, 4], а третья – Ca<sup>2+</sup>-независима и локализуется в глиальных клетках мозга.

Значительное количество исследований подтвердили участие NO в патогенезе ишемического повреждения мозга [5, 6]. В моделях центральной и тотальной ишемии мозга все три изоформы NOS индуцируются в постишемический период, приводя к непрерывному производству NO. Активности ферментов nNOS и eNOS возрастают вскоре после начала ишемии, по-видимому, из-за повышения внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup> [7–9], в то время как индукция iNOS задерживается на несколько часов. Предположительно, активация nNOS и iNOS приводит к гибели нервных клеток, а активация eNOS, напротив, защищает нейроны [10, 11]. Нейропротекция может происходить вследствие того, что NO, образующийся в эндотелиальных клетках, вызывает расслабление гладкой мускулатуры, что приводит к вазодилатации и увеличению мозгового кровотока в ишемизированной области мозга [5].



**Рис. 1.** Схема формирования тромба в просвете сосуда под воздействием пучка света с длиной волны 560 нм на введенный в кровоток фотосенсибилизируемый краситель бенгальский розовый.

Ишемия – распространенное патологическое состояние, возникающее вследствие уменьшения кровоснабжения тканей. При снижении подачи крови к ткани снижается ее обеспечение кислородом и метаболическими субстратами, нарушается удаление продуктов обмена. Именно в тех случаях, когда циркуляция крови не может удовлетворить метаболические потребности тканей, происходят патологические изменения. Продолжительное нарушение кровоснабжения может привести к необратимым повреждениям ткани и ее гибели.

Существуют различные экспериментальные модели ишемии. При исследовании ишемических процессов в разных органах в качестве модели используется метод тромбирования сосудов с помощью лазерного воздействия. Для создания тромба в кровоток вводят фоточувствительный краситель (бенгальский розовый или эритрозин Б). После освещения краситель активируется и вырабатывает синглетный кислород, который повреждает мембрану эндотелиальных клеток с последующей агрегацией тромбоцитов и образованием тромбов, что в конечном итоге приводит к локальному прерыванию кровотока. В настоящей работе мы применили этот метод для исследования ишемии мозга. Его важным преимуществом является способность осуществлять целенаправленное дозированное неинвазивное повреждение с достижением избирательной окклюзии сосудов за счет фотохимического воздействия на клетки сосудистого эндотелия. Это приводит к прекращению кровотока и агрегации клеток крови с последующим тромбообразованием и окклюзией сосуда с сохранением гомеостаза тканей мозга [12].

Целью настоящей работы было определение изменений относительного содержания оксида азота *in vivo* в условиях острой ишемии и последующего частичного восстановления тканей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали крыс-самцов линии Wistar весом 150 г, содержащихся в виварии при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище по пять особей в клетке. Основные правила содержания и ухода за экспериментальными животными соответствовали нормативам, данным в Приказе Минздрава России № 708н от 23.08.10 “Об утверждении Правил лабораторной практики”, и были согласованы с этическим комитетом Минздравсоцразвития России.

Фототромбоз сосудов проводили по методике, разработанной Уатсоном [13] (рис. 1) и основанной на том, что при действии света с длиной волны 560 нм на введенный в кровоток фоточувствительный краситель бенгальский розовый (Bengal Rose) в области его взаимодействия с фокусированным светом выделяется синглетный молекулярный кислород [14]. Это приводит к повреждению эндотелия сосудов, агрегации, адгезии форменных элементов крови и в конечном итоге – к тромбоцитарной окклюзии поврежденных кровеносных сосудов с последующей ишемизацией снабжаемых ими тканей [15, 16].

Для индукции фототромбоза животным, наркотизированным хлоралгидратом (250 мг/кг, внутривенно), в яремную вену (*v. jugularis*) вводили 3%-ный раствор фотосенсибилизируемого красителя бенгальского розового в дозе 40 мг/кг. Для воспроизведения коркового инфаркта голову животного фиксировали в стереотаксисе и после продольного разреза кожи устанавливали лазер (длина волны – 560 нм). Облучение коры височно-теменных долей проводили в течение 15 мин, после чего операционную рану ушивали. Постишемические периоды составляли 24 ч и 3 сут, после чего животным, отобранным для гистологического исследования, под глубоким хлоралгидратным наркозом проводили суправитальную транскардиальную перфузию фиксирующим раствором: 40%-ный формалин, 96%-ный спирт, ледяная уксусная кислота в соотношении 2 : 7 : 1. После перфузии мозг животных извлекали и помещали в 70%-ный спирт для последующей гистологической обработки. Гистологический материал – ткань коры головного мозга из очага поражения обрабатывали по методикам, общепринятым при приготовлении парафиновых срезов [17].

Для исследования радикальных процессов, в том числе и в биологических системах, широко используется метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [18–20]. В нашей работе относительное содержание оксида азота в коре головного мозга крыс определяли стандартным методом спиновой ловушки и ЭПР [21, 22]. В качестве ловушки использовали диэтилдитиокарбамат натрия (ДЭТК), который вводили крысе внутривенно из расчета 500 мг/кг веса. Сразу

после введения ДЭТК животному внутримышечно вводили водный раствор смеси 29 мМ FeSO<sub>4</sub> и 116 мМ цитрата натрия (2.0 мл/кг веса). Образующиеся *in vivo* комплексы ДЭТК и Fe равномерно распределялись в органах и тканях и связывали оксид азота, образуя парамагнитные комплексы, которые находятся в равновесии с концентрацией NO в ткани. Через 30 мин животных декапитировали, образцы коры головного мозга замораживали в жидком азоте и регистрировали сигнал ЭПР комплекса NO–Fe–ДЭТК при температуре жидкого азота на ЭПР-спектрометре фирмы “Bruker EMX-8”. Репрезентативные сигналы ЭПР спиновой ловушки в мозге крысы представлены на рис. 2. Сигнал ЭПР представляет собой суперпозицию сигнала комплекса NO–Fe–ДЭТК, а также других парамагнитных центров, которые обнаруживаются в тканях. Однако крайняя низкополевая компонента не перекрывается другими сигналами. Это позволяет оценивать относительную концентрацию оксида азота по этой компоненте триплетной сверхтонкой структуры этого комплекса [21].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В течение 24 ч после фототромбоза в коре происходило формирование фокального ишемического очага. На гистологических срезах головного мозга, взятых у экспериментальной группы животных, при сравнении с контролем (рис. 3а), которым служил интактный мозг, в ишемическом очаге выявлялась зона формирования тотального некроза, содержащая нейроны с признаками повреждения, характерными для данной стадии постишемического периода (рис. 3б): перичеселлюлярный отек, сморщивание тел нейронов, гомогенизация цитоплазмы, исчезновение глыбок хроматина, изменение конфигурации ядра. Окончательное формирование зоны некроза, содержащей погибшие нейроны и глию, заканчивалось на третьи сутки постишемического периода (рис. 3в), после чего начинается процесс заживления. Таким образом, для определения вероятности участия оксида азота в процессах развития ишемии и постишемического восстановления мозга регистрировалось относительное содержание оксида азота в контроле через сутки (острый период) и через трое суток (начало ремиссии). На рис. 2 представлены спектры ЭПР комплексов NO–Fe–ДЭТК коры головного мозга крысы. Стрелкой отмечена компонента, по величине которой оценивалось относительное содержание оксида азота.

Изменение относительного содержания оксида азота представлено в табл. 1. Через сутки после тромбирования сосуда содержание оксида азота в коре головного мозга изменяется незначительно. Существенные изменения наблюдаются через трое суток после проведения операции. По времени это увеличение совпадает с началом процес-

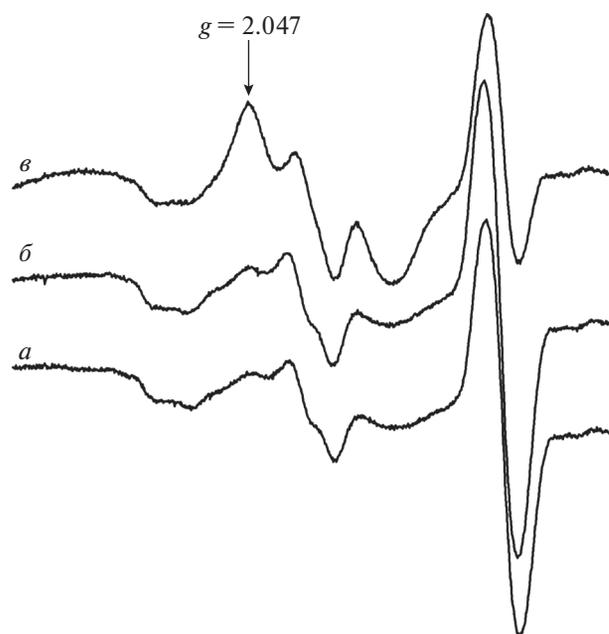
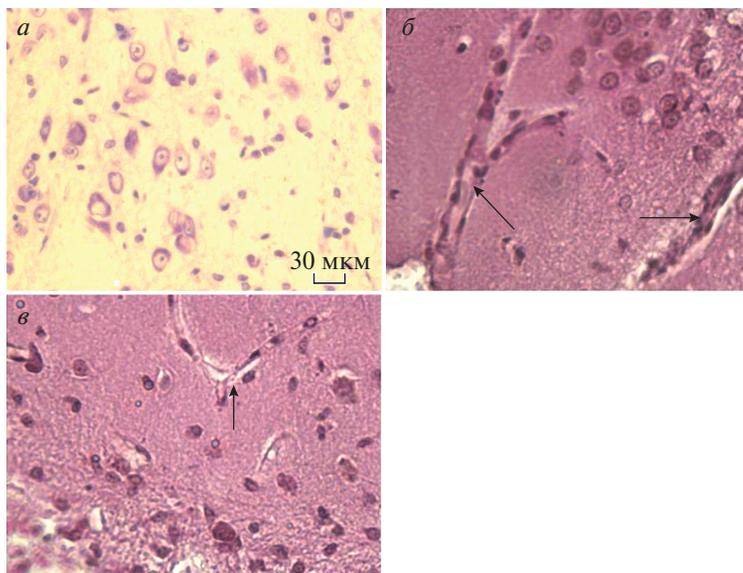


Рис. 2. Спектры ЭПР: а – кора головного мозга интактной крысы; б – кора головного мозга крысы через 24 ч после фототромбоза сосудов; в – кора головного мозга на третьи сутки после фототромбоза сосудов.

са заживления после окончания острого периода (см. рис. 3в). Можно предположить, что оно обусловлено двумя факторами. С одной стороны, активируется эндотелиальная NO-синтаза, что приводит к расширению сосуда и частичной компенсации снижения кровотока вследствие тромбирования [11]. С другой стороны, начинается процесс как некротической, так и апоптотической гибели поврежденных нервных тканей. Как известно, при этом активируются нейрональная и индуцибельная NO-синтазы [23] и увеличивается содержание оксида азота в тканях мозга. Оксид азота реагирует с активными формами кислорода, при этом наиболее важным аспектом является его взаимодействие с супероксидным анион-радикалом с образованием пероксинитрита – сильного проапоптотического фактора [24–26].

Изменение содержания оксида азота в условиях острой ишемии изучалось ранее [23–25]. При обсуждении результатов необходимо отметить два принципиальных момента.

1. Примененная в работе [25] методика инициации острой ишемии принципиально отличается от нашего метода. В этой и более ранних работах других авторов [23, 24] ишемия инициировалась путем кратковременного пережатия сонной артерии, что вызывало тотальное повреждение мозга. Процесс же восстановления (реперфузии) вызывали путем прекращения пережатия артерии и восстановления кровотока. При использовании



**Рис. 3.** Гистологические срезы коры головного мозга крысы: *а* – контроль, кора интактного мозга; *б* – состояние сосудистого русла, постишемический период – 24 ч (слева – интактный сосуд, справа – измененный сосуд в зоне ишемизации с последующим формированием зоны некроза (стрелки)); *в* – состояние сосудистого русла, постишемический период – 3 сут, сосуд после реперфузии в зоне ишемизации (стрелка) и сформировавшаяся зона некроза (внизу). Окрашивание: гематоксилин-ванадиево-кислый фуксин. Увеличение  $\times 40$ .

лазерной окклюзии тромбируется относительно небольшая сеть сосудов. Восстановление носит естественный характер за счет компенсаторного эффекта: поврежденный участок дополнительно снабжается кислородом при помощи неповрежденных сосудов. Такой подход значительно ближе к реально наблюдаемому ишемическому инсульту.

2. В работе [25] наблюдалось увеличение содержания оксида азота в первые 30 мин после инициации ишемии. Авторы справедливо связывают это с активацией эндотелиальной NO-синтазы и релаксацией сосудов. В нашей работе мы наблюдаем существенные изменения содержания NO на третьи сутки после тромбирования, т.е. в условиях, когда начинается развитие апоптоза, обусловленного активацией индуцибельной NO-синтазы и образованием пероксинитрита. Полученные результаты еще раз свидетельствуют о том, что на разных этапах развития

физико-химических процессов, вызванных гипоксией, оксид азота может играть как нейропротекторную, так и нейротоксическую роль.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе показано, что на третьи сутки в условиях ишемии, инициированной гипоксией, в очаге ишемического повреждения происходит увеличение содержания оксида азота – универсальной молекулы, запускающей многочисленные химические и биохимические процессы в клетках. В гистологических экспериментах установлено, что острый ишемический процесс заканчивается через сутки после лазерной операции, а через трое суток начинается процесс активной ремиссии с соответствующими морфологическими изменениями очага поражения. Важно отметить, что увеличение относительного содержания оксида азота происходит не в острой фазе ишемического процесса, а по времени совпадает с началом ремиссии. Можно предположить, что оксид азота играет важную роль в процессе восстановления тканей после ишемического поражения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vincent S.R. // Progr. Neurobiol. 1994. V. 42. P. 129.
2. Bredt D.S., Snyder S.H. // Annu. Rev. Biochem. 1994. V. 63. P. 175.

**Таблица 1.** Изменение относительного содержания NO в коре головного мозга крыс при острой ишемии

Контроль ( $n = 9$ )	Через 1 сут после лазерного тромбоза ( $n = 8$ )	Через 3 сут после лазерного тромбоза ( $n = 9$ )
$0.40 \pm 0.07$	$0.55 \pm 0.11$ $p > 0.05^*$	$0.91 \pm 0.01$ $p < 0.05^*$

Примечание:  $n$  – количество опытов.

\* Указана достоверность различий по сравнению с контролем.

3. *Shin D.H., Lee H.Y., Kim et al.* // *Neurosci. Lett.* 1999. V. 270. P. 53.
4. *Cheon E.W., Park C.H., Kang S.S. et al.* // *Neuroreport.* 2003. V. 14. P. 329.
5. *Mares J., Nohejlova K., Stopka P. et al.* // *Physiol. Res.* 2016. V. 65. № 5. P. 853.
6. *Психа Б.Л., Нешев Н.И., Соколова Е.М. и др.* // *Хим. физика.* 2020. Т. 39. № 7. С. 9.
7. *Shin D.H., Lee H.Y., Lee K.H. et al.* // *Neurosci. Lett.* 2000. V. 278. P. 73.
8. *Cheon E.W., Park C.H., Kang S.S. et al.* // *Neuroreport.* 2003. V. 14. P. 329.
9. *Lopez-Costa J.J., Goldstein J., Saavedra J.P.* // *Neurosci. Lett.* 1997. V. 232. P. 155.
10. *Iadecola C.* // *Trends Neurosci.* 1997. V. 20. P. 132.
11. *Zheng L., Ding J., Wang J.* // *The anatomical record.* 2016. V. 299. P. 246.
12. *Labat-gest V., Tomasi S.* // *J. Vis. Exp.* 2013. V. 9. № 76. P. 50370.
13. *Watson B.D., Dietrich W.D., Busto R. et al.* // *Ann. Neurol.* 1985. V. 17. № 5. P. 497.
14. *Шахов А.М., Астафьев А.А., Осыченко А.А. и др.* // *Хим. физика.* 2016. Т. 35. № 10. С. 49.
15. *Gajkowska B., Frontczak-Baniewicz M., Gadamski R. et al.* // *Acta Neurobiol. Exp.* 1997. V. 57. № 3. P. 203.
16. *Saniabadi A.R., Umemura K., Matsumoto N. et al.* // *Thromb. Haemost.* 1995. V. 73. № 5. P. 868.
17. *Ромейс Б.* Микроскопическая техника. М.: Изд-во иностр. лит., 1954. С. 648.
18. *Константинова Т.С., Бугрова А.Е., Шевченко Т.Ф. и др.* // *Биофизика.* 2012. Т. 57. № 2. С. 325.
19. *Коварский А.Л., Каспаров В.В., Кривандин А.В. и др.* // *Хим. физика.* 2017. Т. 36. № 4. С. 3.
20. *Воротников А.П.* // *Хим. физика.* 2015. Т. 34. № 11. С. 16.
21. *Vanin A.F., Huisman A., van Faassen E.E.* // *Methods Enzimol.* 2002. V. 359. P. 27.
22. *Obolenskaya M.Yu., Vanin A.F., Mordvintcev P.I., Molsch A., Decker K.* // *Biophys. Biochem. Res. Com.* 1994. V. 202. № 1. P. 571.
23. *Bolanos J.P., Almeida A.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1411. P. 415.
24. *Shinya Sato, Teiji Tominaga, Tomoko Ohnishi et al.* // *Ibid.* 1993. V. 1181. № 2. P. 195.
25. *Tominaga T., Ohnishi S.T., Ohnishi T. et al.* // *Brain Res.* 1993. V. 614. № 1–2. P. 342.
26. *Лобанов А.В., Кобзев Г.И., Давыдов К.С. и др.* // *Хим. физика.* 2014. Т. 33. № 6. С. 3.

## ИНДУЦИРОВАННЫЕ ГИПОХЛОРИТОМ НАРУШЕНИЯ ВТОРИЧНОЙ СТРУКТУРЫ КОАГУЛЯЦИОННОГО ФАКТОРА XIII

© 2021 г. А. Н. Щеголихин<sup>1\*</sup>, А. Д. Васильева<sup>1\*\*</sup>, Л. В. Юрина<sup>1</sup>, М. А. Розенфельд<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

\*E-mail: shchegol@deom.chph.ras.ru

\*\*E-mail: ms.kadaver@mail.ru

Поступила в редакцию 02.07.2020;

после доработки 02.07.2020;

принята в печать 21.09.2020

Коагуляционный фактор XIII (FXIII), превращающийся в активную форму FXIIIa при совместном действии тромбина и ионов кальция, играет важную роль в процессах коагуляции и фибринолиза. Было показано, что FXIII, обработанный 150 мкМ гипохлорита, практически полностью сохранял свою транслгутаминазную активность, тогда как в случае FXIIIa, обработанного 50 мкМ гипохлорита, последняя резко снижалась. Согласно данным ИК-спектроскопии действие 150 мкМ гипохлорита на FXIII, на FXIII, частично активированный  $\text{Ca}^{2+}$ , и на FXIIIa приводило к слабому снижению содержания  $\alpha$ -спиралей при увеличении содержания  $\beta$ -структур. Наиболее заметное снижение содержания  $\alpha$ -спиралей было обнаружено при окислении FXIIIa. С учетом особенностей строения каталитической, FXIII-A, и регуляторной, FXIII-B, субъединиц кажется разумным предположить, что снижение количества  $\alpha$ -спиралей под действием окислителя должно быть обусловлено структурными перестройками в домене каталитического ядра. Результаты исследования свидетельствуют, что структура FXIII является высокорезистентной к атаке окислителя.

*Ключевые слова:* коагуляционный фактор FXIII, ИК-спектроскопия, вторичная структура, индуцированное гипохлоритом окисление,  $\gamma$ - $\gamma$ -димеры,  $\alpha$ -полимеры.

DOI: 10.31857/S0207401X21020151

### ВВЕДЕНИЕ

Инфракрасная спектроскопия (ИК) широко используется для изучения биологических объектов, особенно для конформационного анализа белков [1, 2]. Важным достоинством ИК-спектроскопии при анализе структурных характеристик белков является независимость этого метода от размера молекулы белка или физического состояния образца, т.е. его универсальность применения для анализа как гидратированных пленок, так и лиофилизированных образцов [3].

В настоящее время общепризнано, что различные комбинации валентных, деформационных и смешанных мод колебаний так называемой пептидной группировки белка ( $-\text{CO}-\text{NH}-$ ) могут проявляться в среднем ИК-диапазоне в виде девяти характерных полос поглощения:  $\sim 3300 \text{ см}^{-1}$  — амид А,  $\sim 3100 \text{ см}^{-1}$  — амид В,  $\sim 1650 \text{ см}^{-1}$  — амид I,  $\sim 1550 \text{ см}^{-1}$  — амид II,  $\sim 1300 \text{ см}^{-1}$  — амид III,  $\sim 735 \text{ см}^{-1}$  — амид IV,  $\sim 635 \text{ см}^{-1}$  — амид V,  $\sim 600 \text{ см}^{-1}$  — амид VI и  $\sim 200 \text{ см}^{-1}$  — амид VII [4, 5]. Таким образом огибающая ИК-спектра содержит важную информацию о вторичной структуре белка, по-

скольку известные элементы последней находят свое отражение в конкретном наборе специфических полос поглощения, принадлежащих различным колебаниям известных фрагментов пептидной связи. С привлечением других методов анализа, таких как рентгеновская дифракция монокристаллов пептидов и спектроскопия кругового дихроизма, за последние годы установлено множество надежных корреляций между ИК-спектрами и специфическими белковыми структурами [6, 7].

Полоса поглощения амида I ( $1600-1700 \text{ см}^{-1}$ ), обусловленная валентными колебаниями группировок  $\text{C}=\text{O}$  (70–85%) и  $\text{C}-\text{N}$  (10–20%), является наиболее информативной частью ИК-спектров белков при исследовании их вторичной структуры [8]. Частота колебаний  $\text{C}=\text{O}$  в этой полосе поглощения зависит от системы водородных связей, выстраиваемых вдоль цепи протеина в процессе формирования вторичной структуры. Более подробная информация о вторичной структуре протеина может быть получена посредством разложения композитной полосы амида I на ее составляющие с помощью соответствующих процедур [9].

По их расположению в ИК-спектре эти элементы вторичной структуры обычно классифицируют следующим образом: неупорядоченные структуры,  $1642\text{--}1657\text{ см}^{-1}$ ;  $\alpha$ -спираль,  $1648\text{--}1657\text{ см}^{-1}$ ;  $3_{10}$ -спираль,  $1660\text{--}1666\text{ см}^{-1}$ ;  $\beta$ -поворот,  $1662\text{--}1686\text{ см}^{-1}$ ; параллельный  $\beta$ -лист,  $1615\text{--}1640\text{ см}^{-1}$ ; и антипараллельный  $\beta$ -лист,  $1674\text{--}1698\text{ см}^{-1}$  [10–13]. Интересно, что для всех исследованных белков лиофилизация приводит к увеличению процентного содержания  $\beta$ -листов с одновременным снижением процентного содержания  $\alpha$ -спиралей и неупорядоченных структур [3]. Однако следует заметить, что при сравнительном анализе образцов нативного и модифицированного белка подобные изменения в надмолекулярной структуре не имеют принципиального значения для идентификации или локализации отдельных “химически поврежденных” сайтов или участков структуры белковой молекулы. Таким образом, ИК-спектроскопия является полезным инструментом для определения вторичной структуры белка, а полоса амида I широко используется для количественного определения вторичной структуры и конформационных изменений белков и полипептидов [14].

Будучи высокочувствительными мишенями для активных форм кислорода (АФК), окисленные белки претерпевают существенные нарушения, касающиеся как их структуры, так и механизма функционирования. Коагуляционный фактор XIII играет ключевую роль в поддержании коагуляции и фибринолиза благодаря ковалентному сшиванию предварительно сформированных полимеров фибрина, делая их устойчивыми к лизису плазмином и сшивая фибрин с белками фибринолитической системы. Он представляет собой гетеротетрамерный профермент  $\text{FXIII-A}_2\text{B}_2$ , который состоит из двух одноцепочечных каталитических субъединиц А ( $\text{FXIII-A}_2$ ), каждая из которых имеет молекулярную массу  $\sim 83$  кДа, и двух идентичных одноцепочечных регуляторных субъединиц В ( $\text{FXIII-B}_2$ ) с молекулярной массой  $\sim 80$  кДа каждая. Субъединицы скреплены нековалентными связями [15].

Превращение  $\text{FXIII-A}_2\text{B}_2$  в активную форму фермента (номер классификации – ЕС 2.3.2.13) – многостадийный процесс, который физиологически индуцируется в конечной фазе каскада свертывания путем совместного действия тромбина и  $\text{Ca}^{2+}$ . Первая стадия – катализируемое тромбином протеолитическое расщепление связи  $\text{Arg37-Gly38}$  на  $\text{NH}_2$ -концевом участке субъединицы  $\text{FXIII-A}$ , приводящее к высвобождению активационного пептида. Это расщепление приводит к превращению гетеротетрамера  $\text{FXIII-A}_2\text{B}_2$  в гетеротетрамер  $\text{FXIII-A}'_2\text{B}_2$ , который также не обладает ферментативной активностью. Вторая стадия активации сопровождается связыванием

ионов кальция с  $\text{FXIII-A}'$ , что приводит к конформационным изменениям, запускающим диссоциацию гетеротетрамера  $\text{FXIII-A}'_2\text{B}_2$  в димерные субъединицы  $\text{FXIII-A}'_2$  и  $\text{FXIII-B}_2$ . На последнем этапе в присутствии ионов кальция  $\text{FXIII-A}'_2$  претерпевает также крупномасштабные конформационные перестройки, вследствие которых  $\text{FXIII-A}'_2$  превращается в активную форму фермента  $\text{FXIII-A}^*$ , тем самым облегчая доступ субстрата к каталитическому сайту [15].

Совсем недавно были получены новые результаты, доказывающие, что димерная молекула  $\text{FXIII-A}^*$  имеет тенденцию к диссоциации на два мономера  $\text{FXIII-A}^*$ , каждый из которых сохраняет трансклутаминазную активность [16, 17]. Как показано в работе [18], стадия перехода гетеротетрамера  $\text{FXIII-A}_2\text{B}_2$  в мономеры  $\text{FXIII-A}^*$  включает в себя образование промежуточного гетеродимера  $\text{FXIII-AB}$ , в котором субъединицы  $\text{FXIII-A}$  не полностью насыщены кальцием и все еще слабо связаны с одним из регуляторных мономеров  $\text{FXIII-B}$ .

В процессе циркуляции в кровотоке  $\text{FXIII}$ , как и другие белки плазмы, может постоянно подвергаться воздействию различных АФК. В настоящее время исследования по окислительному повреждению  $\text{FXIII}$  крайне немногочисленны [19–21]. Ранее было показано, что вызванное озоном окисление  $\text{FXIII}$  влияет на трансклутаминазную активность  $\text{FXIIIa}$ , которая в значительной степени зависит от стадии превращения  $\text{FXIII}$  в  $\text{FXIIIa}$ , на которой проводилось окисление белка [19, 22].

С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения было показано, что набор многочисленных сайтов окисления на каталитической субъединице, обнаруженный при окислении озоном исходного  $\text{FXIII}$ , а также  $\text{FXIII}$ , активированного только  $\text{Ca}^{2+}$ , и полностью активированного  $\text{FXIII}$  путем добавления тромбина и  $\text{Ca}^{2+}$ , значительно различался [20, 21]. В отличие от озона, гипохлорит, который был выбран для настоящего исследования, является физиологическим окислителем. Образованный *in vivo* в результате реакции перекиси водорода и  $\text{Cl}^-$  с помощью фермента миелопероксидазы, высвобождаемой из нейтрофилов при их активации, гипохлорит рассматривается как важный патофизиологический фактор при окислительном стрессе [23].

Впервые с помощью метода ИК-спектроскопии было изучено влияние гипохлорита ( $\text{HOCl/OCl}^-$ ) на вторичную структуру  $\text{FXIII}$  на различных стадиях его активации.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### *Выделение человеческого FXIII и фибриногена*

Коагуляционный фактор XIII выделяли из пула плазмы крови человека методом фракционного осаждения с сульфатом аммония и последующей ионообменной хроматографией с использованием сорбента DEAE-ToyoPearl M650 [24]. Фибриноген был очищен из плазмы путем осаждения глицином [25]. Концентрацию белка измеряли по Брэдфорду с использованием концентрата реагента для анализа белка производства компании Bio-Rad (USA). Гомогенность FXIII и фибриногена, выделенных из плазмы, оценивали методом электрофореза в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия [26].

### *Приготовление образцов FXIII*

Превращение FXIII в FXIIIa в присутствии ионов кальция и тромбина было выполнено, как описано ранее [19]. Чтобы инактивировать ферментативную активность тромбина, гирудин добавляли к активированному тромбином FXIII перед инкубацией с окислителем или к контрольному образцу [27]. Полная инактивация тромбина была протестирована с помощью хромогенного субстрата S-2238 [28]. Тромбин, ранее инактивированный гирудином, добавляли к образцам окисленного и исходного профермента и FXIII, обработанного 5 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ .

### *Определение транслугтаминазной активности FXIIIa*

Для определения удельной транслугтаминазной активности активированного FXIII, выделенного из плазмы крови человека, был использован колориметрический метод (коммерческий набор производства компании BioVision, Milpitas, CA, USA). Активированный FXIII имел удельную активность  $1836 \pm 79$  ед. Лоуэу/мг (для всех образцов FXIIIa измерения транслугтаминазной активности проводили с тремя биологическими повторностями): 1 ед. Лоуэу/мл представляет собой самое высокое разведение фермента, способного образовывать нерастворимый сгусток в условиях, описанных Loewy et al. [29].

### *Экспозиция FXIII к гипохлориту на различных стадиях его активации*

Коагуляционный фактор XIII (1 мг/мл) был окислен гипохлоритом в условиях, аналогичных таковым для индуцированного гипохлоритом окисления фибриногена [30]. Каждую серию образцов FXIII разделяли на три части, которые независимо окисляли с 50 или 150 мкМ  $\text{HOCl}/\text{-OCl}$  в течение 1 ч при 37°C. Реакцию окисления останавливали 10-молярным избытком L-метионина

к окислителю. Концентрации  $\text{HOCl}/\text{-OCl}$  были стандартизированы при pH 11 и 292 нм с использованием коэффициента экстинкции, равного  $350 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [31].

В контрольные образцы добавляли предварительно обработанный избытком метионина  $\text{HOCl}/\text{-OCl}$ . Удаление метионина из растворов и замену буфера на 150 мМ NaCl осуществляли центрифугированием на фильтрах Amicon Ultra с размером пор 10 кДа (Merck, Millipore, Germany).

### *ИК-измерения образцов FXIII*

ИК-спектры образцов исходного и окисленного FXIII регистрировали на ИК-фурье-спектрометре “Spectrum Two” (Perkin-Elmer, США), усредняя их по 16–25 аккумулярованным сканам с оптическим разрешением  $4 \text{ cm}^{-1}$  (цифровое разрешение —  $1 \text{ cm}^{-1}$ ) с использованием ПО “Spectrum v.10.3” [20]. Образцы для измерений готовили, нанося 5–10 мкл водного раствора образца в 150 мМ NaCl на поверхность пластин ZnSe диаметром 12.7 мм и толщиной 2 мм. После высушивания при комнатной температуре до постоянного веса получали в центральной части поверхности ZnSe-диска пятно сухого материала пробы диаметром 4–6 мм и толщиной в несколько микрон. Для записи ИК-спектров в режиме “на пропускание” использовали двухлинзовую ( $\text{MgF}_2$ ) фокусирующую приставку “Microfocus” (Perkin-Elmer, Англия), установленную в стандартном слайдовом держателе образцов в измерительном отсеке прибора. Диск ZnSe с нанесенной на него пробой помещали вертикально в специальный пост приставки “Microfocus” между двумя  $\text{MgF}_2$ -линзами на пути горизонтального зондирующего ИК-луча спектрометра. Фоновый спектр прибора обновляли в тех же условиях непосредственно перед записью спектра пробы, используя для этого идентичную чистую пластину ZnSe. Обработку полученных ИК-спектров (коррекция базовых линий, вычитание спектров и т.п.) осуществляли в рамках специализированного пакета ПО OPUS v.6.5 (Bruker GmbH, ФРГ) [32], а для более углубленной обработки данных (деконволюции сложных пиков на составляющие с описанием формы сигналов стандартными функциями) использовали программу “PeakFit v.4.11” (Systat, США). В частности, для разделения полос амида I FXIII на составляющие, отвечающие различным компонентам вторичной структуры FXIII, использовали комплексную спектральную стандартную функцию “гауссиан + лоренциан”, описываемую формулой

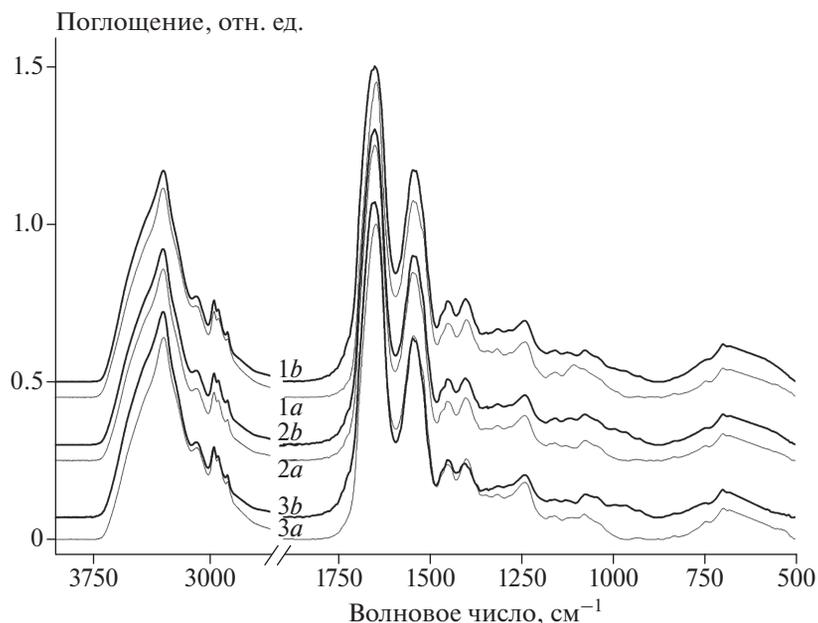


Рис. 1. Обзорные ИК-спектры различных образцов FXIII: 1 – FXIII, 2 – FXIII + Ca<sup>2+</sup>, 3 – FXIII + Ca<sup>2+</sup>/Тромбин; а – до окисления (тонкая линия); б – после окисления (жирная линия). Все кривые смещены по ординате для наглядности.

$$y = a_0 \left\{ \frac{a_3 \sqrt{\ln 2}}{a_2 \sqrt{\pi}} \exp \left( -4 \ln 2 \left( \frac{x - a_1}{a_2} \right)^2 \right) + \frac{1 - a_3}{\pi a_2 \left[ 1 + 4 \left( (x - a_1)/a_2 \right)^2 \right]} \right\} \left\{ \frac{a_3 \sqrt{\ln 2}}{a_2 \sqrt{\pi}} + \frac{1 - a_3}{\pi a_2} \right\}^{-1},$$

где  $a_0$  – амплитуда сигнала,  $a_1$  – пиковая частота полосы,  $a_2$  – ширина полосы,  $a_3$  – фактор формы полосы. На стадии предварительной деконволюции огибающей полосы амида I использовали вторую производную сигнала, которая указывала на наличие 13 индивидуальных компонент. Затем итерационный процесс описания исходной огибающей набором стандартных полос продолжали до достижения критерия среднеквадратичных отклонений  $R^2 \sim 0.99$ .

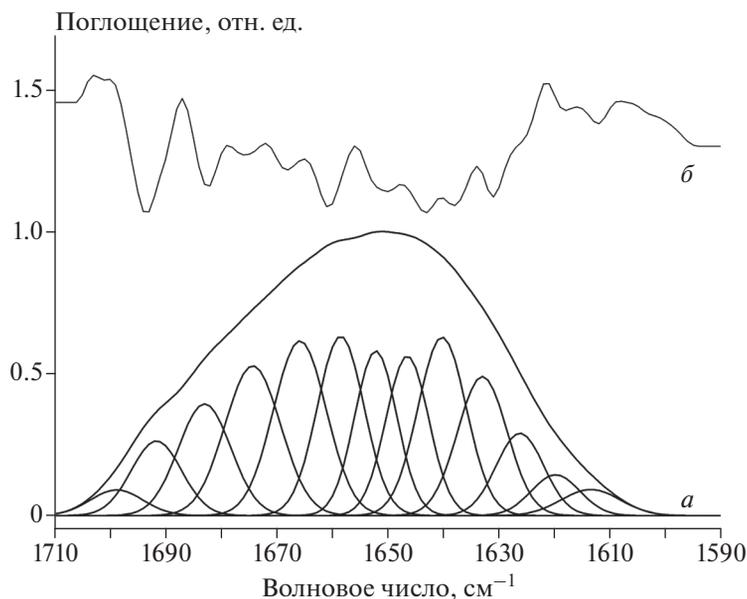
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Анализ вторичной структуры FXIII и его гомологов методом ИК-спектроскопии*

Авторы данной работы впервые изучили вызванную гипохлоритом трансформацию молекулярной структуры профермента FXIII, его частично активированной формы, а также полностью активированного FXIIIa методом ИК-спектроскопии. Соответственно, ряд колебательных спектров (рис. 1) был записан для серии образцов FXIII как до, так и после их окисления гипохлоритом. Сосредоточившись на анализе полосы амида I, мы стремились выявить изменения во вторичной структуре окисленного FXIII на разных этапах его активации. Несмотря на усредненные инфракрасные спектры

белков, которые имеют несколько амидных полос, полоса амида I при 1700–1600 см<sup>-1</sup>, как упоминалось ранее, в основном используется для извлечения информации о вторичной структуре. Поскольку каждый из различных элементов вторичной структуры вносит свой вклад в форму полосы амида I в ИК-спектре, наблюдаемые различия заключаются в наличии нескольких перекрывающихся полос компонент, представляющих структуры  $\alpha$ -спирали,  $\beta$ -листа,  $\beta$ -поворота и неструктурированных участков.

Наблюдаемое в эксперименте множество индивидуальных полос с пиками при разных частотах можно выделять с помощью процедуры деконволюции (разложения) огибающей кривой на составляющие (рис. 2, 3). Значение интегральной площади каждой выделенной полосы поглощения является мерой обилия соответствующего вторичного элемента структуры. Эти значения вместе с позициями и структурными соотношениями полос приведены в табл. 1–3. Анализ состава вторичной структуры показывает, что различные образцы FXIII представлены в основном как материал  $\beta$ -листа (табл. 1–3). Примечательно, что содержание структур  $\beta$ -листа в образцах растет в результате окисления и происходит главным образом за счет уменьшения количества  $\alpha$ -спиралей.



**Рис. 2.** ИК-спектр неокисленного FXIII + Ca<sup>2+</sup>/Тромбин: *a* – огибающая полосы амида I и ее составляющие, выделенные методом деконволюции с использованием 2-й производной; *б* – соответствующая вторая производная полосы амида I.

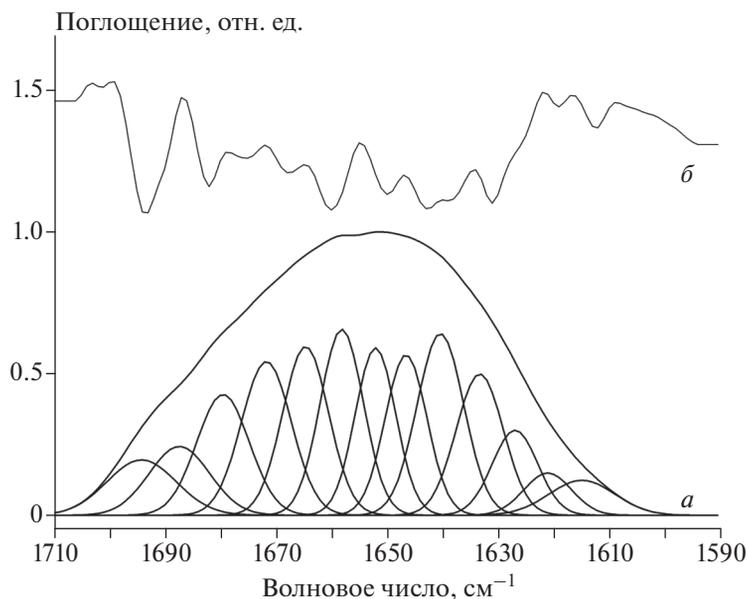
### **Влияние окисления на ферментативную активность FXIII**

При обработке FXIII 50 и 150 мкМ гипохлорита значения транслугаминазной активности FXIIIa практически не изменились по отношению к неокисленному FXIII и составили  $1830 \pm 49$ ,  $1790 \pm 51$  и  $1836 \pm 55$  ед/мг соответственно (рис. 4). Результаты показали, что значение транслугаминазной активности FXIIIa в образце FXIII + Ca<sup>2+</sup> составляло  $1841 \pm 62$  ед/мг, а затем

снижалось до  $1804 \pm 57$  и  $1710 \pm 41$  ед/мг при инкубации образца с 50 или 150 мкМ гипохлорита соответственно. При окислении полностью активированного FXIIIa белок сильно страдал как при умеренном, так и при сильном окислении. В результате значения транслугаминазной активности снизились с  $886 \pm 43$  до  $532 \pm 31$  ед/мг, тогда как для контрольного образца оно было равно  $1812 \pm 61$  ед/мг. Таким образом, можно сделать вывод, что каталитические XIII-субъединицы A\*

**Таблица 1.** Состав компонентов полосы амида I для FXIII до и после обработки гипохлоритом (150 мкМ)

Нативный FXIII		Окисленный FXIII		Структурные компоненты
пик, см <sup>-1</sup>	площадь, %	пик, см <sup>-1</sup>	площадь, %	
1613.5	2.74	1615.7	4.60	параллельные β-листы ( $1615 \pm 2.0$ см <sup>-1</sup> )
1620.1	2.92	1622.8	4.14	параллельные β-листы ( $1624 \pm 2.0$ см <sup>-1</sup> )
1625.7	4.64			параллельные β-листы ( $1627 \pm 2.0$ см <sup>-1</sup> )
1632.0	7.85	1629.5	7.94	параллельные β-листы ( $1633 \pm 2.0$ см <sup>-1</sup> )
1638.8	11.79	1636.6	10.00	параллельные β-листы ( $1638 \pm 2.0$ см <sup>-1</sup> )
1645.2	10.56	1643.6	10.42	неупорядоченные структуры ( $1642-1657$ см <sup>-1</sup> )
1650.9	9.03	1650.5	10.88	α-спирали ( $1648 \pm 2.0$ см <sup>-1</sup> , $1648-1657$ см <sup>-1</sup> )
1656.9	10.89	1657.6	10.78	α-спирали ( $1656 \pm 2.0$ см <sup>-1</sup> )
1663.9	11.65	1664.3	9.63	3 <sub>10</sub> -спирали ( $1663 \pm 3.0$ см <sup>-1</sup> )
1671.9	10.75	1671.3	10.26	β-поворот ( $1667 \pm 1.0$ см <sup>-1</sup> , $1662-1686$ см <sup>-1</sup> )
1680.8	9.21	1680.2	12.07	β-поворот ( $1680 \pm 2.0$ см <sup>-1</sup> )
1690.5	6.45	1691.4	8.19	антипараллельные β-листы ( $1691 \pm 2.0$ см <sup>-1</sup> )
1698.8	1.52			антипараллельные β-листы ( $1674-1699$ см <sup>-1</sup> )



**Рис. 3.** ИК-спектр FXIII + Ca<sup>2+</sup>/Тромбин, обработанного 150 мкМ гипохлорита: *a* – огибающая полосы амида I и ее составляющие, выделенные методом деконволюции с использованием 2-й производной; *б* – соответствующая вторая производная полосы амида I.

в полностью активированном FXIII являются наиболее уязвимой мишенью для окислителя.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Активированные нейтрофилы могут генерировать около 10 мМ HOCl<sup>-</sup>/OCl<sup>-</sup> *in vitro*, в то время как локализованная концентрация гипохлорита вблизи активированных нейтрофилов *in vivo* может быть намного выше [33, 34]. Таким образом,

сильное окисление циркулирующих в плазме крови белков высокими концентрациями гипохлорита может потенциально способствовать нарушению их структуры и функции. Как было показано в ряде работ, индуцированное гипохлоритом окисление *in vitro* повреждает ряд белков плазмы, таких как ингибитор альфа-1-протеазы [35], α1-антитрипсин [36], ингибитор протеиназы плазминогена [37] человека альфа-2-макроглобулин [38], челове-

**Таблица 2.** Состав компонентов полосы амида I для FXIII + Ca<sup>2+</sup> до и после обработки гипохлоритом (150 мкМ)

Нативный FXIII + Ca <sup>2+</sup>		Окисленный FXIII + Ca <sup>2+</sup>		Структурные компоненты
пик, см <sup>-1</sup>	площадь, %	пик, см <sup>-1</sup>	площадь, %	
1613.5	2.09	1614.9	3.08	параллельные β-листы (1615 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1619.8	2.69	1621.0	2.69	параллельные β-листы (1624 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1626.3	5.32	1626.9	5.17	параллельные β-листы (1627 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1633.0	9.36	1633.3	8.94	параллельные β-листы (1633 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1640.2	11.72	1640.3	11.41	параллельные β-листы (1638 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1646.5	9.28	1646.5	8.98	неупорядоченные структуры (1642–1657 см <sup>-1</sup> )
1652.2	9.40	1652.0	9.07	α-спирали (1648 ± 2.0 см <sup>-1</sup> , 1648–1657 см <sup>-1</sup> )
1658.5	11.42	1658.1	10.78	α-спирали (1656 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1665.8	12.55	1664.6	10.41	3 <sub>10</sub> -спирали (1663 ± 3.0 см <sup>-1</sup> )
				β-поворот (1667 ± 1.0 см <sup>-1</sup> , 1662–1686 см <sup>-1</sup> )
1674.3	11.31	1671.7	10.27	β-поворот (1680 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1683.0	7.96	1679.5	8.51	антипараллельные β-листы (1691 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1691.6	5.09	1687.3	5.59	антипараллельные β-листы (1674–1699 см <sup>-1</sup> )

Таблица 3. Состав компонентов полосы амида I для FXIII + Ca<sup>2+</sup>/Тромбин до и после обработки гипохлоритом (150 мкМ)

Нативный FXIII + Ca <sup>2+</sup> /Тромбин		Окисленный FXIII + Ca <sup>2+</sup> /Тромбин		Структурные компоненты
пик, см <sup>-1</sup>	площадь, %	пик, см <sup>-1</sup>	площадь, %	
1614.8	3.68	1616.0	3.73	параллельные β-листы (1615 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1620.9	3.34	1621.9	2.72	параллельные β-листы (1624 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1627.0	5.23	1627.8	5.60	параллельные β-листы (1627 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1633.2	8.90	1634.1	9.76	параллельные β-листы (1633 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1640.2	11.74	1641.4	11.92	параллельные β-листы (1638 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1646.6	9.66	1648.0	9.74	неупорядоченные структуры (1642–1657 см <sup>-1</sup> )
1652.3	9.07	1653.4	8.07	α-спирали (1648 ± 2.0 см <sup>-1</sup> , 1648–1657 см <sup>-1</sup> )
1658.3	10.18	1659.0	10.18	α-спирали (1656 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1664.8	10.05	1665.7	11.49	3 <sub>10</sub> -спирали (1663 ± 3.0 см <sup>-1</sup> )
1672.0	9.60	1673.6	10.88	β-поворот (1667 ± 1.0 см <sup>-1</sup> , 1662–1686 см <sup>-1</sup> )
1679.7	8.10	1682.1	8.69	β-поворот (1680 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1687.4	5.92	1691.5	5.87	антипараллельные β-листы (1691 ± 2.0 см <sup>-1</sup> )
1694.9	4.53	1700.1	1.36	антипараллельные β-листы (1674–1699 см <sup>-1</sup> )

ский сывороточный альбумин и церулоплазмин [39], фибриноген [40] и др.

В настоящей работе впервые исследовано обусловленное действием гипохлорита повреждение в структуре неактивированного FXIII, а также в структурах FXIII, активированного Ca<sup>2+</sup>, и полностью активированного FXIII, обработанного тромбином и Ca<sup>2+</sup>. Согласно данным инфракрасной спектроскопии окисление FXIII привело к некоторому снижению содержания α-спиралей наряду с увеличением вклада от структур β-листа (табл. 1–3).

Известно, что гидрофобные аминокислотные остатки белка в его нативной конформации находятся в ядре, а не на поверхности. Окисление ароматических и серосодержащих остатков, по-видимому, нарушает эту пространственную структуру из-за введения дополнительных функциональных групп в окисленные белки. Следовательно, увеличение количества гидрофобных аминокислот, доступных водному окружению, происходит во время разворачивания структуры молекулы, поскольку гидрофобные аминокислоты, которые обычно находятся внутри всех растворимых белков, подвергаются воздействию водной среды [41, 42]. Кроме того, окисление боковых цепей аминокислот в белках и конформационные перестройки во вторичной или третичной структурах влияют на стабильность и активность белка [43].

Нами было показано, что окисленный максимально выбранным количеством гипохлорита профермент FXIII при его последующей активации не терял своей транслугаминазной активности, в то время как она существенно уменьшалась

для FXIIIa, обработанного минимальным количеством окислителя (рис. 4). Большая уязвимость активной формы FXIII выявлена также и методом ИК-спектроскопии (рис. 2, 3, табл. 3.). В этой связи интересным представляется понимание того, какая область белка может быть наиболее ответственной за этот эффект.

Полипептидная цепь каталитической субъединицы FXIII-A свернута в пять различных структурных доменов: N-концевую область, β-сэндвич, каталитический домен, β-баррель 1 и β-баррель 2 [15]. Домены β-сэндвич, β-баррель 1 и β-баррель 2 почти исключительно состоят из β-листов, тогда как домен каталитического ядра содержит как β-листы,

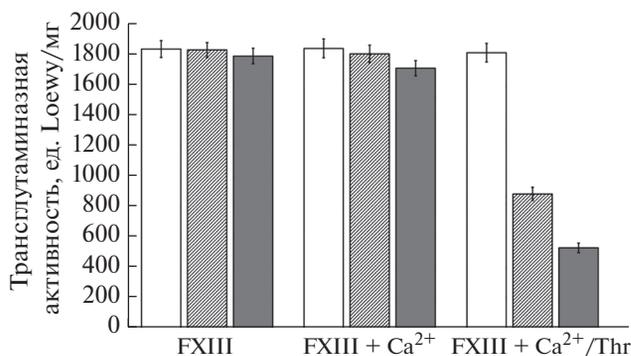


Рис. 4. Значения транслугаминазной активности (ед. Лоуэу/мг) для различных образцов FXIII, подвергнутых воздействию 50 мкМ (заштрихованные колонки), 150 мкМ (серые колонки) гипохлорита, и для неокисленного FXIII (белые колонки). Активность транслугаминазы выражена как среднее значение ± стандартное отклонение.

так и  $\alpha$ -спирали [15]. Регуляторные субъединицы FXIII-B составлены только из суши-доменов, которые практически полностью состоят из неупорядоченных структур и  $\beta$ -нитей [44]. Следовательно, с высокой долей вероятности можно сделать вывод, что наблюдаемое умеренное снижение содержания  $\alpha$ -спирали обусловлено структурным повреждением домена каталитического ядра под действием окислителя. Этот вывод согласуется с данными масс-спектрометрии, свидетельствующими о значительном окислительном повреждении первичной структуры каталитического ядра FXIIIa при его окислении гипохлоритом [20].

### ВЫВОДЫ

1. Фактор XIII, обработанный 150 мкМ гипохлорита, практически полностью сохранял свою транслугтаминазную активность, свойственную немодифицированному белку.
2. Транслугтаминазная активность FXIIIa, обработанного 50 мкМ гипохлорита, резко снижалась.
3. Действие 150 мкМ гипохлорита на FXIII, на FXIII, частично активированный  $\text{Ca}^{2+}$ , и на FXIIIa вызывало слабовыраженные нарушения вторичной структуры белка, сопровождаемые некоторым снижением содержания  $\alpha$ -спиралей наряду с увеличением  $\beta$ -структур.
4. Наиболее заметное снижение содержания  $\alpha$ -спиралей было обнаружено при окислении FXIIIa.
5. Результаты исследования свидетельствуют, что структура FXIII является высокорезистентной к атаке окислителя.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Tatlian S.* // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 203. P. 281.
2. *Baronio C., Baldassarre M., Barth A.* // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019. V. 21. P. 8587.
3. *Griebenow K., Klibanov A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 10969.
4. *Krimm S., Bandekar J.* // *Adv. Protein Chem.* 1986. V. 38. P. 181.
5. *Bandekar J.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 1120. P. 123.
6. *Byler D., Susi H.* // *Biopolymers.* 1986. V. 25. P. 469.
7. *Sarver R.W., Krueger W.C.* // *Anal. Biochem.* 1991. V. 194. P. 89.
8. *Susi H., Byler M.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988. V. 115. P. 391.
9. *Kong J., Yu S.* // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2007. V. 39. P. 549.
10. *Yang H., Yang S., Kong J. et al.* // *Nature Protocols.* 2015. V. 10. P. 382.
11. *Dong A., Huang P., Caughey W.S.* // *Biochemistry.* 1990. V. 29. P. 3303.
12. *Kalnin N.N., Baikalov I.A., Venyaminov S.* // *Biopolymers.* 1990. V. 30. P. 1273.
13. *Venyaminov S., Kalnin N.N.* // *Biopolymers.* 1990. V. 30. P. 1259.
14. *Jiang Y.J., Li C., Nguyen X. et al.* // *J. Pharm. Sci.* 2011. V. 100. P. 4631.
15. *Muszbec L., Bereczky Z., Bagoly Z. et al.* // *Physiol. Rev.* 2011. V. 91. P. 931.
16. *Anokhin B.A., Stribinskis V., Dean W.L. et al.* // *FEBS J.* 2017. V. 284. P. 3849.
17. *Protopopova A.D., Ramirez A., Klinov D.V. et al.* // *J. Thromb. Haemost.* 2019. V. 17. P. 737.
18. *Singh S., Nazabal A., Kaniyappan S. et al.* // *Biomolecules.* 2019. V. 9. P. 765.
19. *Rosenfeld M.A., Bychkova A.V., Shchegolikhin A.N. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1834. P. 2470.
20. *Васильева А.Д., Юрина Л.В., Леонова В.Б. и др.* // *Хим. физика.* 2020. Т. 39. № 6. С. 24.
21. *Vasilyeva A., Yurina L., Indeykina M. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2018. V. 1866. P. 875.
22. *Розенфельд М.А., Бычкова А.В., Щеголихин А.Н. и др.* // *Хим. физика.* 2014. Т. 33. № 1. С. 47.
23. *Loria V., Dato I., Graziani F. et al.* // *Mediat. Inflamm.* 2008. V. 2008. P. 135625.
24. *Lorand L., Credo R.B., Janus T.J.* // *Methods Enzymol.* 1981. V. 80. P. 333.
25. *Blombäck B.B., Blombäck M.* // *Arkiv. Kemi.* 1956. V. 10. P. 415.
26. *Laemmli U.K.* // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680.
27. *Rosenfeld M.A., Vasileva M.V.* // *Biomed. Sci.* 1997. V. 2. P. 155.
28. *Svendsen L., Blombäck B., Blombäck M. et al.* // *Thrombosis Res.* 1972. V. 1. P. 267.
29. *Loewy A.G., Dunathan K., Kriel R. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1961. V. 236. P. 2625.
30. *Colombo G., Cleric M., Giustariniet D. et al.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2015. V. 1850. P. 1.
31. *Morris J.C.* // *J. Phys. Chem.* 1966. V. 70. P. 3198.
32. *Литвин Я.А., Щеголихин А.Н., Скоблин А.А. и др.* // *Хим. физика.* 2016. Т. 35. № 9. С. 3.
33. *Klebanoff S.J., Leukoc J.* // *J. Biol.* 2005. V. 77. P. 598.
34. *Stief T.W., Kurz J., Doss M.O. et al.* // *Thromb. Res.* 2000. V. 97. P. 473.
35. *Clark R.A., Stone P.J., El Hag A. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. P. 3348.
36. *Summers F.A., Morgan P.E., Davies M.J. et al.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2008. V. 21. P. 1832.
37. *Gugliucci A.* // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2008. V. 46. P. 1403.
38. *Siddiqui T., Zia M.K., Ali S. et al.* // *Intern. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 117. P. 401.
39. *Власова И.И., Соколов А.В., Костевич В.А. и др.* // *Биохимия.* 2019. Т. 84. С. 652.
40. *Weigandt K.M., White N., Chung D. et al.* // *Biophys. J.* 2012. V. 103. P. 2399.
41. *Davies K.J., Delsignore M.E.* // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 9908.
42. *Schmid F.X.* // *Prot. Struc.: A Pract. App.* 1997. V. 28. P. 291.
43. *Hawkins C.L., Davies M.J.* // *Chem. Res. Toxicol.* 2005. V. 18. C. 1600.
44. *Singh S., Akhter M.S., Dodt J. et al.* // *Intern. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 1956.

## НЕКОТОРЫЕ СТРУКТУРНЫЕ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КУКУРУЗНЫХ КРАХМАЛОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПА РАСТЕНИЙ

© 2021 г. Л. А. Вассерман<sup>1, 2\*</sup>, А. Г. Филатова<sup>2</sup>, Э. Б. Хатефов<sup>3</sup>,  
В. Г. Гольдштейн<sup>4</sup>, И. Г. Пластина<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

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

<sup>3</sup>Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений  
им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов – филиал ФГБНУ  
“Федеральный научный центр им. В.М. Горбатова” Российской академии наук,  
Московская обл., пос. Красково, Россия

\*E-mail: lwasserma@mail.ru

Поступила в редакцию 02.07.2020;  
после доработки 02.07.2020;  
принята в печать 21.09.2020

Приведены результаты исследований, посвященных анализу морфологии, термодинамическим и физико-химическим свойствам крахмалов кукурузы, экстрагированных из разных ее подвидов, относящихся к различным генотипам. Среди исследованных крахмалов кукурузы выделено четыре группы крахмалов, относящихся к генотипам *wx*, *ae*, *su* и смешанного типа. Установлено, что во всех исследованных крахмалах присутствуют гранулы нерегулярной и овальной формы, доля которых в разных генотипах различна. Крахмалы *su*-генотипа обладают самыми мелкими гранулами по сравнению с крахмалами *wx*- и *ae*-генотипов. Установлено, что увеличение содержания амилозы в кукурузных крахмалах *wx*- и *ae*-генотипов сопровождается накоплением дефектных структур в исследуемых крахмалах, что отражается в понижении термодинамических параметров их плавления. Термодинамические параметры диссоциации (температура и энтальпия) амилозо-липидных комплексов для генотипов *ae* и *wx* кукурузных крахмалов ниже, чем в случае генотипа *su*. Толщины кристаллических ламелл для всех исследуемых генотипов крахмалов имеют близкие значения и практически не зависят от содержания в них амилозы. Динамическая вязкость гелей изученных крахмалов уменьшается при увеличении содержания в них амилозы и не зависит от генотипа растений, из которого экстрагирован крахмал.

**Ключевые слова:** кукурузный крахмал, генотипы *wx*, *ae* и *su*, морфология, термодинамические параметры, реологические свойства.

DOI: 10.31857/S0207401X21020175

### ВВЕДЕНИЕ

Крахмал – основной углеводный компонент многих растений, который необходимо детально исследовать для понимания его биохимических и функциональных свойств. Основными источниками крахмалов являются зерновые, клубневые (например, картофель или тапиока) и бобовые культуры, а также некоторые незрелые фрукты, такие как бананы или манго [1]. Крахмалы разного ботанического происхождения, а также их модификаты широко применяются в различных областях промышленности как загустители, стабилизирующие и гелеобразующие агенты для производства

продуктов пищевого, технического и фармацевтического назначений, а также в качестве компонентов новых композиционных и биоразлагаемых материалов [2–6]. Известно, что крахмалы состоят из двух полисахаридов – линейной амилозы и разветвленного амилопектина. Оба полисахарида являются гомополимерами  $\alpha$ -D-глюкопиранозы (глюкозы), но при этом различаются по молекулярной массе и физико-химическим свойствам. Линейная макромолекула амилозы состоит из остатков глюкозы, соединенных гликозидными связями  $\alpha$ -(1→4). Макромолекула амилопектина образуется из разветвленных цепочек остатков глюкозы, соединенных гликозидными связями

Таблица 1. Генетические характеристики зерна кукурузы, содержание крахмала в зерне и амилозы в исследуемых кукурузных крахмалах

Сорт кукурузы	Плоидность ( <i>n</i> )	Генотип	Содержание крахмала в зерне, %	Содержание амилозы в крахмале, %
<i>К-5461</i>	2	<i>wx</i>	70.5 ± 0.1	0.0 ± 0.5
<i>Тетрасил</i>	4	<i>wx</i>	73.7 ± 0.3	15.0 ± 0.7
<i>Луч</i>	2	–	75.3 ± 0.4	17.5 ± 1.0
<i>КБЗ</i>	2	–	73.0 ± 0.1	21.0 ± 0.9
<i>Баксанская сахарная</i>	4	<i>su</i>	59.3 ± 0.2	25.5 ± 1.1
<i>К-9301</i>	2	<i>ae</i>	71.3 ± 0.3	32.0 ± 0.9
<i>К-4520</i>	2	<i>ae</i>	69.3 ± 0.3	38.0 ± 0.1

$\alpha$ -(1→4), а в точках разветвления цепи –  $\alpha$ -(1→6). Структура амилопектина трехмерна, его ветви расположены во всех направлениях и придают молекуле сферическую форму [7, 8]. Особенности строения и соотношение двух основных полисахаридов в крахмалах определяют их функциональные и физико-химические свойства.

Показано, что на физико-химические и термодинамические свойства крахмалов влияют как условия культивирования растений, из которых экстрагируется крахмал, так и присутствие тех или иных генов, участвующих в биосинтезе полисахаридов крахмала [9, 10]. Изменения активности ферментов, участвующих в процессе биосинтеза полисахаридов крахмала, определяют в конечном счете соотношение основных полисахаридов крахмала и их физико-химические свойства. Существует несколько синтаз, ответственных за биосинтез крахмала и гликогена: крахмалсинтаза (SS), гликогенсинтаза (GS) и крахмалфосфорилаза (SP), принадлежащие к суперсемейству GT-B (CL0113) [11]. У растений обнаружено пять независимо консервативных крахмалсинтаз: GBSSI, SSI, SSII, SSIII и SSIV [11, 12]. Синтаза GBSS является ключевой для синтеза амилозы [13], тогда как мутации в SSIIb и SSIII изменяют уровни содержания амилопектина [14]. В эндосперме зерновых экспрессируется три формы ферментов, способствующих ветвлению молекулы крахмала: фермент I (SBEI), фермент IIa (SBEIIa) и фермент IIb (SBEIIb) [15]. К таким генам относится ген *waxy* (*wx*), который характеризуется отсутствием GBSS, что проявляется в полном отсутствии амилозы и в накоплении только амилопектина, ген *amylose extender* (*ae*) – генотип с повреждениями гена SBEIIb, которые способствуют накоплению слаборазветвленных полисахаридов, увеличивающих содержание амилозы в крахмале [16, 17].

Кукуруза с содержанием очень высокого уровня амилозы (>90%) была получена при значительном снижении активности фермента SBEI наравне с почти полным подавлением активности фермента SBEII [18]. Такие мутанты по ферменту SBEIIb ха-

рактеризуются аномальной морфологией крахмальных гранул эндосперма с повышенным содержанием амилозы, что сопровождается повышением температуры плавления гранул крахмала. Кроме того, в этом генотипе обнаруживается значительная часть вещества промежуточного типа между амилозой и амилопектином [19]. Генотип *sugary* (*su*) с сахарными синтазами SS (sucrose synthase), образующими фитогликоген как предшественник амилопектина, характеризуется дефицитом таких ферментов, как изоамилаза и пуллуланаза, нарушающих ветвление крахмалов. Активность такого фермента высока в сахарном сорго и сахарной кукурузе, о чем свидетельствует высокое содержание в них сахаров и пониженное – крахмала. Зерна этих растений, как правило, сморщенные [20, 21].

Образцы сортов кукурузы, находящиеся в коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова, относятся к различным генотипам и поэтому могут иметь широкое практическое применение в различных областях промышленности. В связи с этим целью данного исследования состояла в оценке влияния генов *wx*, *ae*, *su* на структурные и термодинамические свойства крахмалов, экстрагированных из кукурузного зерна растений, относящихся к различным подвидам.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### МАТЕРИАЛЫ

Размножение семенного материала кукурузы для исследований проводили в Кабардино-Балкарском НИИСХ в предгорной зоне в 2017 г. Сорта и гибриды размножали под бумажными изоляторами методом перекрестного опыления в пределах популяции на делянке. Уборка проводилась вручную после полного созревания початков. Семенной материал кукурузы был представлен восьмью образцами нетрансгенных подвигов кремнистой, зубовидной и сахарной кукурузы из мировой коллекции ВИР, выделенных по значению высокого содержания крахмала в зерне (табл. 1).

## МЕТОДЫ

### Цитологический анализ

Препараты корешков проростков кукурузы для хромосомного анализа фиксировали в ацеталкоголе (фиксатор Карнуа) в фазе трехдневных проростков в утренние часы. Окрашивание хромосом проводили по Фельгену реактивом Шиффа после горячего гидролиза в 1н растворе HCl, который проводили при температуре 60 °С в течение 10 мин, с последующей трехкратной промывкой в сернистой воде [22]. Для облегчения раздавливания зерен препаратов применяли мацерацию целлюлазой из *Aspergillus niger* производства компании Sigma-Aldrich (USA).

### Определение хромосомного числа

Хромосомные числа образцов кукурузы определяли с помощью световой микроскопии в проходящем свете. В каждом образце подсчитывали число хромосом в соматической клетке корешков в 15 метафазных пластинках давленных препаратов под микроскопом Olympus CX43 фирмы "OLYMPUS OPTICAL CO., LTD" (Japan) при 1600-кратном увеличении с использованием иммерсии.

### Определение содержания крахмала в зерне, выделение крахмала и определение содержания амилозы в крахмале

Определение содержания крахмала в зерне определяли в соответствии со стандартными европейскими методиками (ISO 10520 : 1997. Native starch – Determination of starch content – Ewers polarimetric method). Крахмалы из зерна кукурузы выделяли по модифицированной методике, предложенной в работе [23]. Содержание амилозы в крахмале определяли колориметрически в соответствии с методикой, описанной в работе [24].

### Световая микроскопия и сканирующая электронная микроскопия

Морфологию исследованных гранул кукурузных крахмалов определяли с помощью световой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

**Световая микроскопия:** крахмал помещали на предметное стекло и окрашивали одной каплей раствора Люголя (раствор йода в водном растворе йодида калия) [25]. Затем препарат накрывали покровным стеклом и слегка прижимали его для равномерного распределения крахмальных гранул. Избыток красителя удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Анализ гранул крахмала проводили при 400-кратном увеличении с применением синего фильтра под оптическим микроскопом

Микромед 3 ЛЮМ в проходящем свете с фотонасадкой Oplenic psc600-15c (B51) производства компании Oplenic Corp. (USA).

**Сканирующая электронная микроскопия.** Микрофотографии гранул крахмалов получены с помощью сканирующего электронного микроскопа Miра 3 LMU производства компании Tescan (Чехия) при комнатной температуре в условиях высокого вакуума с ускоряющим напряжением 500 В.

### Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия

Термодинамические параметры плавления 0.3%-ных (по весу) водных дисперсий исследуемых кукурузных крахмалов определяли с помощью метода высокочувствительной дифференциальной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) на микрокалориметре ДАСМ-4 (Пушино, Россия). Измерения проводили в диапазоне температур 20–120 °С при скорости нагревания 2 °С/мин и постоянном давлении 2.5 МПа. Объем исследуемого образца в закрытой ячейке соответствовал 0.5 см<sup>3</sup>. Калибровку шкалы избыточной теплоемкости проводили с использованием эффекта Джоуля–Ленца. Ранее показано, что в данных условиях нет необходимости в учете термического запаздывания и продолжительности обработки образца в калориметрической ячейке [26]. В качестве раствора сравнения при измерении использовали деионизованную воду, полученную с помощью системы фильтрации и очистки воды марки Millipore Direct-Q3 (Merck, Germany), с удельным сопротивлением 18.2 МОм · см при температуре 25 °С.

Средние значения термодинамических параметров плавления кристаллических ламелей крахмалов определяли из не менее трех параллельных измерений. Значение температуры плавления соответствовало максимуму пика теплоемкости на термограмме, а значение экспериментальной энтальпии плавления – площади под пиком кривой зависимости избыточной теплоемкости от температуры. Расчет молярной энтальпии плавления ( $\Delta H_m$ ) проводили с учетом концентрации ангидроглюкозного остатка (162 г/моль). Процесс плавления крахмалов в первом приближении можно считать квазиравновесным [10, 27], что дает возможность применять одностадийную модель плавления, в которой процесс плавления крахмалов описывается как равновесная реакция между нативным и расплавленным состояниями.

Значения энтальпии плавления Вант-Гоффа ( $\Delta H^{vH}$ ) рассчитывали, как было описано ранее [28], используя следующее уравнение:

$$\Delta H^{vH} = 2R^{1/2}T_m(C_p - 0.5\Delta C_{p\text{exp}})^{1/2}, \quad (1)$$

где  $R$  – универсальная газовая постоянная,  $T_m$  – температура плавления кристаллической ламели

крахмала,  $C_p$  – максимум ординаты пика теплоемкости на термограмме,  $\Delta C_{p\text{exp}}$  – разность значений теплоемкостей между расплавленным и нативным состоянием крахмальных дисперсий. Кооперативную единицу плавления ( $v$ ) и толщину кристаллической ламеллы ( $L_{cr,l}$ ) рассчитывали, как описано в работе [29]:

$$v = \Delta H^{vH} / \Delta H_m, \quad (2)$$

$$L_{cr,l} = 0.35v; \quad (3)$$

при этом 0.35 нм – значение проекции ангидроглюкозного остатка на ось двойной спирали амилопектина [30].

Для деконволюции термограмм применяли программу Peak Fit (AISN Software Incorporated, Ver. 4).

#### Определение динамической вязкости

Динамическую вязкость 3%-ных водных гелей крахмалов определяли на ротационном вискозиметре Геплера с падающим шариком диаметром 10 мм [31, 32]. Методика приготовления 3%-ных водных гелей крахмала состояла в следующем: рассчитанное количество крахмала суспендировали в требуемом объеме воды и перемешивали в течение 7–10 мин. Для получения геля крахмала полученную дисперсию нагревали до 95°C и выдерживали при этой температуре и постоянном перемешивании в течение 10 мин. Далее полученную систему охлаждали до  $(20 \pm 0.5)^\circ\text{C}$  и выдерживали в течение 3 ч. После этого определяли вязкость приготовленных гелей крахмала. Измерения вязкости проводили на трех параллельных образцах, полученные результаты усредняли.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ результатов исследования ранжирования образцов по генотипу крахмалов в зерне позволил выделить образцы, относящиеся к типу *wx* (сорта кукурузы *K-5461*, *Тетрасил*), типу *ae* (сорта кукурузы *K-4520*, *K-9301*) и типу *su* (сорт *Баксанская сахарная*), см. табл. 1. Остальные образцы (сорта кукурузы *Луч*, *КБЗ*) были отнесены к промежуточным генотипам. С помощью цитологического анализа было установлено, что образцы кукурузы *Тетрасил*, *Баксанская сахарная* характеризуются тетраплоидным ( $4n$ ) числом хромосом, тогда как все остальные образцы имеют диплоидное ( $2n$ ) число в геноме (табл. 1). Тетраплоидные образцы отличаются от диплоидных тем, что диплоидные генотипы имеют двойной набор всех генов в геноме, а тетраплоидные – четырехкратный. Выявленные тетраплоидные образцы различаются между собой наличием гена *sugary2* в гомозиготном рецессивном, *su2su2su2su2* (сорт *Баксанская сахарная*), и доминантном, *Su2Su2Su2Su2*

(сорт *Тетрасил*), состояниях. Ген *su2* способствует формированию зерен со сморщенным эндоспермом за счет накопления сахаров, тогда как гены *wx* и *ae* не вызывают каких-либо существенных видимых изменений в эндосперме кукурузы.

В табл. 1 приведены генетические характеристики исследуемых зерен кукурузы, а также содержание крахмала в них и содержание амилозы в крахмале. Из приведенных данных видно, что образцы кукурузы с амилопектиновым (*wx*) и амилозным (*ae*) генотипами характеризуются близкими значениями содержания крахмала в зерне: от 69.3 до 73.7%. При этом крахмалы, экстрагированные из генотипа *ae*, содержат 32.0–38.8% амилозы, а крахмалы из генотипа *wx* – 0–15% амилозы. Сахарный генотип (*su*), представленный единственным тетраплоидным образцом, показал минимальную массовую долю крахмала в зерне: 59.3%, а содержание амилозы в крахмале составило 25.5%. Эти данные подтверждают предположение о том, что количество основных полисахаридов крахмала (амилозы и амилопектина), как и их соотношение, определяется генотипом образца.

Образцы кукурузы, относящиеся к генотипам *wx* и *ae*, характеризуются достаточно высоким содержанием в них крахмала. Следует отметить, что содержание крахмала в зерне генотипа *su* кукурузы сорта *Баксанская сахарная* достаточно высокое для сахарной кукурузы и составляет 59.3%, при этом этот сорт кукурузы характеризуется низким коэффициентом извлечения крахмала из зерна. Вероятно, при выделении крахмала из кукурузы сорта *Баксанская сахарная* его потери существенно увеличиваются из-за того, что в данном крахмале преобладают гранулы мелких размеров.

Результаты световой микроскопии исследования гранул кукурузного крахмала в присутствии раствора Люголя приведены на рис. 1. Известно, что молекулы амилопектина и амилозы окрашиваются раствором Люголя по-разному. Макромолекулы амилопектина окрашиваются в коричневый цвет, а макромолекулы амилозы – в синий [25]. Из приведенных микрофотографий видно, что молекулы амилопектина, окрашенные в коричневый цвет, присутствуют в случае *wx* генотипа крахмала, а в случае *ae*- и *su*-генотипов крахмалов в них имеются как макромолекулы амилозы, окрашенные в синий цвет, так и молекулы амилопектина. Также из данных микрофотографий видно, что крахмалы отличающихся генотипов различаются по размерам гранул. Следует отметить, что фракция крахмала *su*-генотипа, экстрагированного из кукурузы сорта *Баксанская сахарная*, характеризуется мелкими и очень мелкими гранулами, которые легко проходили через капроновое сито с размерами отверстий 93 мкм (рис. 1) в отличие от гранул крахмалов генотипов *wx* и *ae*, обладающих большими по размерам гранулами крахмала.

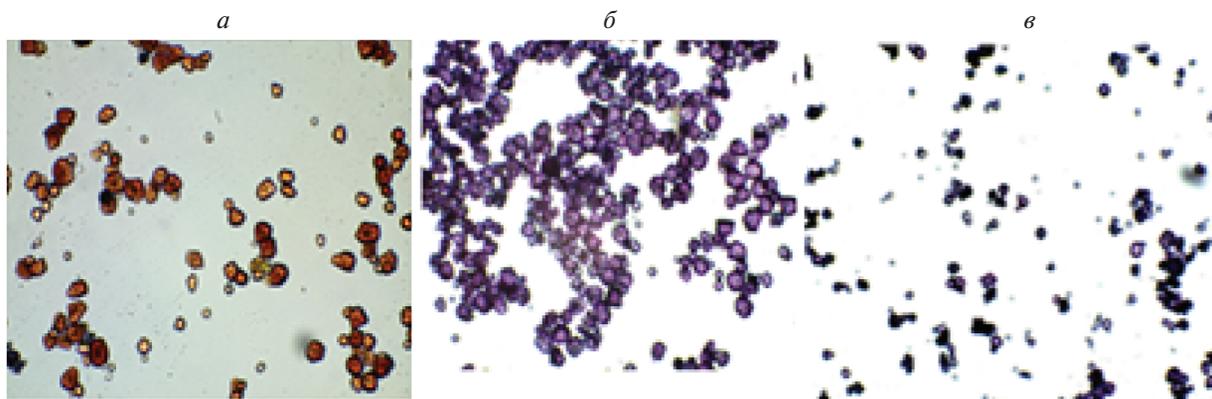


Рис. 1. Микрофотографии гранул крахмала с разным генотипом (*a* – *ix*, *б* – *ae*, *в* – *su*), окрашенных раствором Люголя, полученные с помощью световой микроскопии с увеличением  $\times 400$  с синим светофильтром.

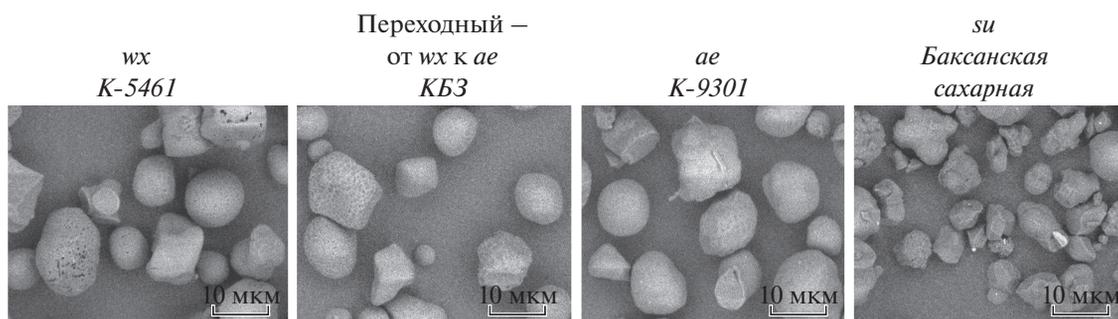


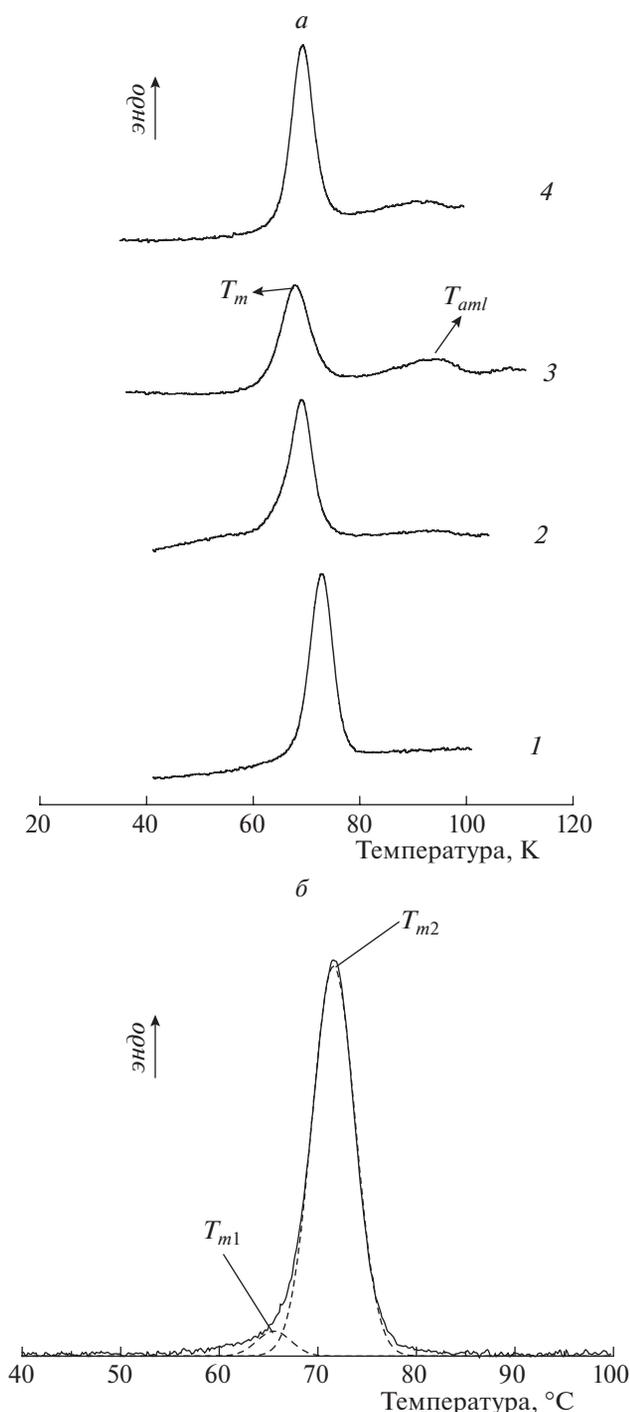
Рис. 2. Микрофотографии кукурузных крахмалов различных генотипов и сортов (указаны вверху), полученные с помощью СЭМ.

На рис. 2 приведены микрофотографии исследованных кукурузных крахмалов, полученные методом сканирующей электронной микроскопии. Из приведенной микрофотографий видно, что во всех исследованных кукурузных крахмалах присутствуют гранулы как нерегулярной или кубической, так и овальной формы с ровными краями. В крахмале генотипа *ix* преобладают гранулы нерегулярной или кубической формы. В случае переходного генотипа увеличивается доля гранул овальной формы наряду с присутствием гранул кубической формы. В крахмале генотипа *ae* количество гранул овальной формы больше, чем гранул кубической формы. В крахмале генотипа *su* присутствуют гранулы как овальной, так и нерегулярной или кубической формы, причем доля гранул нерегулярной формы выше по сравнению с долей гранул овальной формы. Следует отметить, что все исследованные кукурузные крахмалы характеризуются наличием гранул разного размера — как крупных, так и мелких. Причем крахмал *su*-генотипа обладает меньшими по размерам гранулами по сравнению с крахмалами *ix*- и *ae*-генотипов, что коррелирует с данными, полученными с помощью световой микроскопии. Таким образом, размеры и

форма гранул кукурузных крахмалов, как и их соотношение, зависят от генотипа растения, из которого экстрагировали крахмал.

На рис. 3а для примера приведены ДСК-термограммы плавления водных дисперсий кукурузного крахмала с разными генотипами. Полученные ДСК-термограммы являются типичными для плавления кукурузных крахмалов [26, 29]. Из приведенных термограмм видно, что при плавлении кукурузных крахмалов, за исключением амилопектинового, наблюдается два пика. Как известно, первый пик соответствует плавлению кристаллических ламелл амилопектина или разрушению (раскручиванию) двойных спиралей, образованных Н-связями внутри боковых цепей амилопектина, а второй — диссоциации амилозо-липидных комплексов [26, 29]. Естественно, при плавлении амилопектинового кукурузного крахмала (*ix*-генотип) с содержанием амилозы 0%, экстрагированного из сорта *K-5461*, наблюдается только один пик плавления, так как данный крахмал не содержит амилозы.

Значения термодинамических параметров плавления кристаллических ламелл амилопек-



**Рис. 3.** *a* – ДСК-термограммы плавления водных дисперсий кукурузных крахмалов ( $c = 0.3$  вес.%) различных генотипов (1 и 2 – генотип *ix* с содержанием амилозы 0 и 15% соответственно; 3 – генотип *su*, содержание амилозы – 25.5%; 4 – генотип *ae*, содержание амилозы – 32.0%). *б* – Деконволюция ДСК-термограммы плавления крахмала генотипа *ix* с содержанием амилозы 0%: экспериментальная (сплошная линия) и рассчитанная (штриховая линия) термограммы;  $T_{m1}$  и  $T_{m2}$  – температуры плавления низко- и высокотемпературных структур соответственно.

тина довольно близки для крахмалов различных генотипов (табл. 2). Значения толщины кристаллической ламеллы, рассчитанные в соответствии с методикой, предложенной в работе [29], во всех исследуемых крахмалах достаточно близки, и среднее значение составляет 5.7 нм вне зависимости от генотипа крахмала и содержания в нем амилозы.

Отметим, что в случае крахмалов генотипа *ix* наблюдается понижение значений как температуры плавления (с 72.8 до 69.9 °С), так и энтальпии плавления кристаллической ламеллы (с 3.7 до 2.4 кДж/моль) с увеличением содержания амилозы от 0 до 15%. В то же время значения энтальпии плавления крахмалов генотипа *ae* (32.0 и 38.0% амилозы) и генотипа *ix* (0% амилозы) практически совпадают. Таким образом, не наблюдается простой корреляции между содержанием амилозы и значениями термодинамических параметров плавления гранул крахмалов.

Значения температур и энтальпии плавления амилозо-липидных комплексов в изучаемых кукурузных крахмалах также практически неизменны при увеличении содержания амилозы (табл. 2). Учитывая, что термическая стабильность данного комплекса зависит как от кристаллического состояния данного комплекса, так и от природы липидов, а значение энтальпии плавления пропорционально содержанию амилозо-липидных комплексов, можно предположить, что содержание липидов и кристаллическое состояние амилозо-липидных комплексов для исследованных кукурузных крахмалов довольно близки [33].

Термодинамические параметры плавления кукурузного крахмала с генотипом *su*, экстрагированного из кукурузы сорта *Баксанская сахарная*, несколько выпадают из ряда аналогичных параметров исследуемых крахмалов (табл. 2). Температура плавления кристаллических ламелл составляет 67.8 °С, т.е. характеризуется наименьшим значением для исследуемых крахмалов, что свидетельствует о присутствии в данном крахмале менее упорядоченных структур, чем в крахмале с близким содержанием амилозы, экстрагированном из кукурузы сорта *КБЗ*. В то же время данный крахмал характеризуется большим количеством наиболее стабильного амилозо-липидного комплекса, у которого температура и энтальпия диссоциации равны 94.3 °С и 0.7 кДж/моль соответственно. Вероятно, особенности термодинамических параметров крахмала, экстрагированного из сорта кукурузы *Баксанская сахарная*, связаны с особенностями генотипа сахарного эндосперма зерна кукурузы, характерного для этого сорта растений. А именно, данный сорт зерна характеризуется генотипом *su*, в котором влияние гена *su2* на формирование крахмальных гранул проявляется в виде нарушений процесса разветвления полисахаридов крахмала, в

Таблица 2. Термодинамические параметры плавления кукурузных крахмалов различных генотипов

Сорт/генотип	Содержание амилозы, %	$T_m$ , °C	$\Delta H_m$ , кДж/моль	$\Delta H^{vH}$ , кДж/моль	$v$ , ангидрогл юкозных остатков	$L_{cr.l}$ , нм	$T_{amb}$ , °C	$\Delta H_{amb}$ , кДж/моль
<i>K-5461/wx</i>	0	72.8 ± 0.1	3.7 ± 0.2	48.6 ± 1.0	13.4 ± 0.6	4.7	—	—
<i>Тетрасил/wx</i>	15	69.9 ± 0.0	2.4 ± 0.1	38.2 ± 0.1	16.0 ± 0.5	5.6	93.5	0.2
<i>Луч/—</i>	17	70.7 ± 0.1	1.9 ± 0.1	34.9 ± 1.8	17.9 ± 0.1	6.3	92.6	0.3
<i>КБЗ/—</i>	21	70.1 ± 0.0	1.9 ± 0.1	36.2 ± 4.0	20.0 ± 0.8	7.0	94.3	0.1
<i>K-9301/ae</i>	32	70.5 ± 0.0	2.8 ± 0.3	42.5 ± 2.4	15.5 ± 0.8	5.5	93.1	0.3
<i>K-4520/ae</i>	38	69.9 ± 0.0	2.7 ± 0.1	43.2 ± 2.5	16.0 ± 0.4	5.6	93.0	0.3
<i>Баксанская сахарная/su</i>	25.5	67.8 ± 0.1	2.4 ± 0.1	35.1 ± 0.4	14.7 ± 0.8	5.2	94.3	0.7
Среднее значение						5.7 ± 0.8	93.5 ± 0.7	0.3 ± 0.2

Примечание:  $T_m$  — температура плавления кристаллических ламелл,  $\Delta H_m$  — энтальпия плавления кристаллических ламелл,  $\Delta H^{vH}$  — энтальпия Вант-Гоффа,  $v$  — значение кооперативной единицы плавления,  $L_{cr.l}$  — толщина кристаллической ламеллы,  $T_{amb}$  и  $\Delta H_{amb}$  — температура и энтальпия диссоциации амилозо-липидного комплекса.

отличие от других исследованных крахмалов, характеризующихся генотипами *wx* и *ae*. Но изучение данного факта требует дальнейших, более глубоких исследований.

Таким образом, анализ термодинамических параметров плавления кукурузных крахмалов разных генотипов и с различающимися содержаниями амилозы показал, что величина этих параметров зависит как от генотипических особенностей растения, из которого экстрагируется крахмал, так и от содержания амилозы в крахмале, выделенном из растений одинакового генотипа (табл. 2), что коррелирует с литературными данными [29, 34].

Известно, что увеличение содержания амилозы сопровождается накоплением как неупорядоченных амилозных цепей в аморфной ламелле, так и амилозных концевых цепей в кристаллических ламеллах, что в конечном итоге приводит к образованию более дефектных или менее упорядоченных кристаллических структур, которые плавятся при более низких температурах [29, 35]. Можно предположить, что этот эффект и наблюдается для исследуемых кукурузных крахмалов. С целью установления влияния накопления дефектных структур на величины термодинамических параметров плавления гранул крахмалов была предпринята деконволюция термограмм.

Термограммы плавления амилопектиновых пиков исследуемых кукурузных крахмалов характеризуются некоторой асимметрией, поэтому можно предположить, что это есть проявление наличия более одного независимого перехода

кристаллических структур с различной температурой плавления. В табл. 3 приведены результаты деконволюции кривых теплоемкости по модели двух независимых переходов “все или ничего”, а на рис. 3б представлен пример деконволюции ДСК-термограммы амилопектинового пика для образца кукурузного крахмала сорта *K-5461*.

Из приведенных в табл. 3 данных видно, что при плавлении амилопектина проявляются два независимых перехода, соответствующие плавлению структур с различающимися температурами плавления. Следует отметить, что с увеличением содержания амилозы доля структур, характеризующихся низкотемпературным переходом, в кукурузных крахмалах *wx*- и *ae*-генотипов возрастает. Причем доля таких структур в крахмалах *ae*-генотипа меньше, чем в крахмалах *wx*-генотипа. Низкотемпературный переход для исследованных кукурузных крахмалов, вероятно, связан с плавлением кристаллических ламелл с более дефектной структурой, чем в случае основного пика.

С помощью уравнения Томсона–Гиббса для температуры плавления полукристаллических синтетических полимеров

$$T_m = T_{0m} \left( 1 - 2\gamma_i / \Delta H_{0m} \rho_{cr.l} L_{cr.l} \right), \quad (4)$$

где  $T_{0m}$  и  $\Delta H_{0m}$  — соответственно температура и энтальпия плавления гипотетического кристалла неограниченного размера (идеальный кристаллит) или такого кристалла, для которого ролью свободной поверхностной энергии по сравнению с объемной можно пренебречь; с  $\gamma_i$  — свободная

Таблица 3. Результаты деконволюции термограмм плавления кукурузных крахмалов различных генотипов

Генотип	Содержание амилозы, %	$T_{m1}$ , °C	$\alpha_1$ , %	$T_{m2}$ , °C	$\alpha_2$ , %
<i>wx</i>	0	65.5	4.8	71.6	95.5
<i>wx</i>	15	63.1	15.9	67.9	84.1
—	17	64.9	26.1	64.9	73.9
—	21	68.8	90.8	74.0	9.2
<i>ae</i>	32	64.3	3.6	69.2	96.6
<i>ae</i>	38	64.5	6.4	68.7	93.5

Примечание:  $T_{m1}$  и  $T_{m2}$  – температуры плавления низко- (1) и высокотемпературных (2) переходов,  $\alpha_1$  и  $\alpha_2$  – доли молярных энтальпий плавления переходов 1 и 2 в общей экспериментальной молярной энтальпии плавления.

поверхностная энергия торцевых граней кристаллических ламелей;  $\rho_{cr.l}$  и  $L_{cr.l}$  – соответственно плотность и толщина кристаллической ламели, возможно получать полезную информацию относительно термодинамических параметров плавления кристаллических ламелл, а именно, относительно поверхностной энтропии  $q_i$  и энтальпии  $s_i$  торцевых граней кристаллических ламелей [36, 37]:

$$q_i = (\Delta H_{0m} - \Delta H_m) \rho_{cr.l} L_{cr.l} / 2.5, \quad (5)$$

$$s_i = (q_i - \gamma_i) / T_m. \quad (6)$$

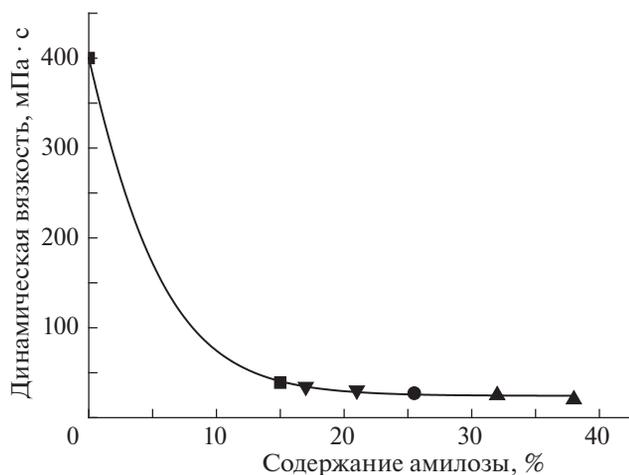
Плавление полимерного кристалла начинается с разрушения наиболее слабых мест, т.е. с дефектов в аморфной ламелли, и поэтому значение поверхностной энтропии торцевых граней кристаллической ламелли пропорционально количеству дефектов в структурной организации гранул крахмала [36, 38]. Метод ДСК позволяет качественно оценить наличие дефектов в полимерном кристалле. В крахмалах роль дефектов играют проходные цепи амилозы, представляющие собой одиночные скрученные спирали, имеющие неупорядоченную конформацию, и/или молекулярно-упорядоченные структуры, состоящие из двойных спиралей и находящиеся между кристаллитами в аморфной ламелли, а также В-цепи амилопектина, расположенные в аморфной ламелли [27, 37].

Накопление дефектов сопровождается образованием кристаллитов с более “податливой” поверхностью и уменьшением значения температуры плавления. Были оценены термодинамические параметры поверхности торцевых граней кристаллических ламелл исследуемых крахмалов (табл. 3). Для расчетов использовали значения  $T_{0m} = 366.5$  К и  $\Delta H = 35.5$  Дж/г, а также  $\rho_{cr.l} = 1.48$  г/см<sup>3</sup> для А-типа сферолитного кристаллита, к которым относятся кукурузные крахмалы

[39, 40]. Значения энтропии плавления, температуры плавления и толщины кристаллической ламелли получали из экспериментальных данных. Из приведенных в табл. 4 данных видно, что значения поверхностной энтропии плавления торцевых граней кристаллических ламелл для кукурузных крахмалов генотипов *wx*, *ae* и *su* практически одинаковы, что свидетельствует о сходстве в степени их упорядоченности. Наиболее существенные различия, а именно рост величины энтропии плавления торцевых граней наблюдаются для крахмалов переходного генотипа: от *wx* к *ae* (сорта *Луч*, *КБЗ*), вероятно, вследствие их менее упорядоченной структуры. В то же время при сравнении образцов одного генотипа с различным содержанием амилозы наблюдается рост плавления торцевых граней кристаллических ламелл при повышении содержания амилозы в крахмале (сорта *К-5461* и *Тетрасил* генотипа *wx* и сорта *Луч* и *КБЗ* переходного, от *wx* к *ae*, генотипа), что отражает роль амилозы в увеличении доли менее упорядоченных структур в составе крахмалов.

Таким образом, увеличение содержания амилозы в исследуемых кукурузных крахмалах сопровождается уменьшением значений термодинамических параметров их плавления, при этом толщина кристаллической ламели и количество амилозо-липидных комплексов остаются неизменными для крахмалов *ae*- и *wx*-генотипов. Степень упорядоченности структуры крахмалов определяется не только содержанием в них амилозы, но и генотипом растения, из которого экстрагируется крахмал.

Для оценки влияния содержания амилозы и генотипа крахмала на вязкоупругие свойства гелей кукурузных крахмалов получены предварительные данные по реологии 3%-ных гелей в воде. На рис. 4 приведено изменение динамической вязкости исследуемых гелей крахмалов с различным генотипом в зависимости от содержания в



**Рис. 4.** Зависимость динамической вязкости 3%-ных водных гелей кукурузных крахмалов различных генотипов: ■ — *wx*, ▼ — переходный — от *wx* к *ae*, ● — *su*, ▲ — *ae* от содержания в них амилозы.

них амилозы. Из представленных данных видно, что зависимость для крахмалов различных генотипов может быть представлена в обобщенной форме (рис. 4), при этом с увеличением содержания амилозы в крахмалах значение динамической вязкости понижается. Этот результат согласуется с литературными данными относительно роли амилозы в реологических свойствах гелей крахмалов [41, 42].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что выбранные для изучения образцы кукурузного крахмала относятся к различным генотипам. К генотипу *wx* отнесены крахмалы, экстрагированные из сортов кукурузы *K-5461*, *Тетрасил*, к генотипу *ae* — крахмалы, экстрагированные из сортов кукурузы *K-4520*, *K-9301*, и к генотипу *su* —

крахмал, экстрагированный из кукурузы сорта *Баксанская сахарная*. Крахмалы, экстрагированные из сортов *Луч*, *КБЗ* отнесены к промежуточным типам. Образец из сорта кукурузы *Баксанская сахарная* характеризуется меньшим размером гранул и более низкой температурой их плавления.

Установлено, что увеличение содержания амилозы в кукурузных крахмалах *wx*-генотипа сопровождается понижением значений термодинамических параметров их плавления, что отражается в накоплении дефектных структур в исследуемых крахмалах. Толщина кристаллической ламеллы и количество амилозо-липидных комплексов остаются неизменными для всех исследуемых крахмалов. Крахмал, экстрагированный из образца кукурузы *Баксанская сахарная* (*su*-генотип), по термодинамическим параметрам плавления отличается от остальных образцов, а именно характеризуется наименьшим значением температуры плавления амилопектина и амилозо-липидного комплекса. При этом энтальпия диссоциации амилозо-липидного комплекса характеризуется наибольшим значением среди исследованных кукурузных крахмалов. Таким образом, термодинамические параметры плавления исследуемых кукурузных крахмалов определяются как содержанием амилозы в них, так и особенностями генотипа растений, из которых экстрагируется крахмал.

Показано, что реологические характеристики гелей исследованных кукурузных крахмалов не зависят от генотипа крахмала, а определяются содержанием в них амилозы. Исследованные сорта кукурузы имеют практическое значение, так как могут быть ценным сырьем для различных областей промышленности и исходным материалом для селекции сортов высококрахмалистой восковидной кукурузы, традиционных сортов и гибридов кукурузы с высокой массовой долей крахмала в ее зернах.

**Таблица 4.** Значения свободной поверхностной энергии ( $\gamma_i$ ), энтальпии ( $q_i$ ) и энтропии ( $s_i$ ) торцевой грани кристаллической ламеллы кукурузных крахмалов различных генотипов

Сорт кукурузы	Генотип	Содержание амилозы, %	$\gamma_i \cdot 10^7$	$q_i \cdot 10^7$	$s_i \cdot 10^7$
			Дж/см <sup>2</sup>		
<i>K-5461</i>	<i>wx</i>	0	$6.89 \pm 0.37$	$35.93 \pm 6.17$	$0.08 \pm 0.02$
<i>Тетрасил</i>	<i>wx</i>	15.0	$9.80 \pm 0.39$	$68.74 \pm 4.19$	$0.17 \pm 0.01$
<i>Луч</i>	—	17.5	$10.27 \pm 0.02$	$87.74 \pm 2.07$	$0.23 \pm 0.01$
<i>КБЗ</i>	—	21.0	$11.74 \pm 0.50$	$100.73 \pm 11.33$	$0.29 \pm 0.01$
<i>K-9301</i>	<i>ae</i>	32.0	$8.98 \pm 0.41$	$59.05 \pm 8.67$	$0.15 \pm 0.02$
<i>K-4520</i>	<i>ae</i>	38.0	$9.39 \pm 0.25$	$62.97 \pm 4.74$	$0.16 \pm 0.01$
<i>Баксанская сахарная</i>	<i>su</i>	25.5	$9.47 \pm 0.48$	$63.34 \pm 9.90$	$0.16 \pm 0.01$

Работа выполнена в рамках государственных заданий, темы 0084-2014-0005 (№ 01201253307), 0082-2018-0006 (регистрационный номер АААА-А-18-118020890097-1), № 585-2018-0015, № 0662-2019-0006.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Santana A.L., Meireles M.A.A.* // Food Public Health. 2014. V. 4. № 5. P. 229.
2. *Zeeman S.C., Kossmann J., Smith A.M.* // Ann. Rev. Plant Biol. 2010. V. 61. P. 209.
3. *Сергеев А.И., Шилкина Н.Г., Вассерман Л.А., Шилов С.И., Staroszczyk H.* // Хим. физика. 2017. Т. 36. С. 71.
4. *Асеева Р.М., Сахаров П.А., Сахаров А.М.* // Хим. физика. 2009. Т. 28. С. 89.
5. *Роговина С.З., Алексанян К.В., Владимиров Л.В., Берлин А.А.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. С. 39.
6. *Жорина Л.А., Кузнецова О.П., Роговина С.З., Владимиров Л.В., Грачев А.В., Прут Э.В., Берлин А.А.* // Хим. физика. 2018. Т. 37. С. 74.
7. *Durrani C.M., Donald A.M.* // Polym. Gels Networks. 1995. V. 3. № 1. P. 1.
8. *BeMiller J.N., Whistler R.L.* Starch: Chemistry and Technology. Academic Press, 2009.
9. *Christiansen C., Hachem A.M., Janecek S., Vikso-Nielsen A., Blennow A., Svensson B.* // FEBS J. 2009. V. 276. P. 5006.
10. *Вассерман Л.А., Кривандин А.В., Филатова А.Г., Васильев В.Г., Колачевская О.О., Тарасов В.Ф., Плащина И.Г., Романов Г.А.* // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 63.
11. *Liu J., Mushegian A.* // Protein Sci. 2003. V. 12. P. 1418.
12. *Leterrier M., Holappa L.D., Broglie K.E., Beckles D.M.* // BMC Plant Biol. 2008. V. 8. P. 98.
13. *Shure M., Wessler S., Fedoroff N.* // Cell. 1983. V. 35. P. 225.
14. *Craig J., Lloyd J.R., Tomlinson K. et al.* // Plant Cell. 1998. V. 10. P. 13.
15. *Mizuno K., Kimura K., Arai Y. et al.* // J. Biochem. 1992. V. 112. P. 643.
16. *Schwall G.P., Safford R., Westcott R.J. et al.* // Nature Biotech. 2000. V. 18. P. 551.
17. *Nishi A., Nakamura Y., Tanaka N., Satoh H.* // Plant Physiol. 2001. V. 127. P. 459.
18. *Sidebottom C., Kirkland M., Strongitharm B., Jeffcoat R.* // J. Cereal Sci. 1998. V. 27. P. 279.
19. *Takeda C., Takeda Y., Hizukuri S.* // Carbohydr. Res. 1993. V. 246. P. 273.
20. *Myers A.M., Morell M.K., James M.G., Ball S.G.* // Plant Physiol. 2000. V. 122. P. 989.
21. *Zhang H.Y., Dong S.T., Gao R.Q., Li Y.Q.* // J. Plant Physiol. Molec. Biol. 2007. V. 33. P. 25.
22. *Romeis B.* Mikroskopische Technik. München–Wien–Baltimore, 1989.
23. *Adkins G.K., Greenwood C.T.* // Starch–Stärke. 1966. V. 7. P. 213.
24. *McGrance C.J., Cornell H.J., Rix C.J.* // Starch, 1998. V. 50. P. 158.
25. *Lille M., Autio K.* // Inn. Food Sci. Emer. Technol. 2007. V. 8. P. 117.
26. *Andreev N.R., Kalistratova E.N., Wasserman L.A., Yuryev V.P.* // Starch. 1999. V. 50. P. 422.
27. *Wasserman L.A., Papakhin A.A., Borodina Z.M. et al.* // Carbohydr. Polym. 2019. V. 212. P. 260.
28. *Privalov P.L., Potekhin S.A.* // Methods Enzymol. 1986. V. 131. P. 4.
29. *Matveev Y.I., van Soest J.J.G., Nieman C., Wasserman L.A. et al.* // Carbohydr. Polym. 2001. V. 44. P. 151.
30. *Imberty A., Chanzy H., Perez S., Buleon A., Tran V.* // J. Molec. Biol. 1988. V. 201. P. 365.
31. *Ptitchkina N.M., Brukhanova O.V., Novikova I.A., Ishin A.G., Morris E.R.* // Food Hydrocol. 1994. V. 8. P. 383.
32. *Nielsen S.* Food Analysis Laboratory Manual. Springer Intern. Publ., 2017.
33. *Biliaderis C.G.* // Food Technol. 1992. V. 46. P. 98.
34. *Singh N., Inouchi N., Nishinari K.* // Food Hydrocol. 2006. V. 20. P. 923.
35. *Jenkins P.J., Donald A.M.* // Intern. J. Biol. Macromol. 1995. V. 17. P. 315.
36. *Bershtein V.A., Egorov V.M.* Differential scanning calorimetry of polymers: physics, chemistry, analysis, technology / Ed. Kemp T.J. N.Y., London, Toronto, Sydney, Tokyo, Singapore: Ellis Horwood Ltd, 1994.
37. *Protserov V.A., Wasserman L.A., Tester R.F. et al.* // Carbohydr. Polym. 2002. V. 49. P. 271.
38. *Wunderlich B.* Macromolecular Physics. V. 2. Crystal nucleation, growth, annealing. N.Y.: Academic Press, 1977.
39. *Tester R.F.* // Intern. J. Biol. Macromol. 1997. V. 21. P. 37.
40. *Whittam M.A., Noel T.R., Ring S.G.* // Intern. J. Biol. Macromol. 1990. V. 12. P. 359.
41. *Aparicio-Saguilan A., Méndez-Montealvo G., Solorza-Feria J., Bello-Pérez L.A.* // J. Sci. Food Agrical. 2006. V. 86. P. 1078.
42. *Rosa-Millan J., Agama-Acevedo E., Jimenez-Aparicio A.R., Bello-Pérez L.A.* // Starch. 2010. V. 62. P. 549.

## МОДИФИКАЦИЯ ОЗОНОМ СТРУКТУРИРОВАННЫХ НА НАНОУРОВНЕ ПЛЕНОК ДИОКСИДА ТИТАНА ДЛЯ СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ КРАСИТЕЛЕМ СОЛНЕЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

© 2021 г. О. В. Алексеева<sup>1</sup>, С. С. Козлов<sup>1</sup>, М. Л. Константинова<sup>1</sup>, О. И. Шевалеевский<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук, Москва, Россия

\*E-mail: shevale2006@yahoo.com

Поступила в редакцию 02.07.2020;

после доработки 02.07.2020;

принята в печать 21.09.2020

Изучена кинетика реакции озона с диоксидом титана. Структура и оптические характеристики структурированных на наноуровне тонких слоев диоксида титана ( $\text{TiO}_2$ ), обработанных озонно-кислородной смесью с различной концентрацией озона, исследованы методами оптической и инфракрасной спектроскопии. Показано, что обработка озонem увеличивает адсорбцию рутениевого красителя (N719) в объеме структурированного на наноуровне слоя  $\text{TiO}_2$ . Обработанные озонem слои  $\text{TiO}_2$  были использованы в качестве фотоэлектродов для конструирования сенсibilизированных солнечных элементов (СЭ). Исследование фотовольтаических параметров сенсibilизированных СЭ при стандартном освещении (спектр АМ 1.5g, уровень освещенности –  $1000 \text{ Вт/м}^2$ ) показало, что модификация  $\text{TiO}_2$  озонem приводит к увеличению эффективности преобразования солнечной энергии в электрическую с 7.5 до 8.2%.

*Ключевые слова:* наноструктуры, тонкие пленки, диоксид титана, озон, сенсibilизированные красителем СЭ, фотовольтаика.

DOI: 10.31857/S0207401X21020023

### ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день одними из основных задач солнечной фотовольтаики являются поиск и создание новых видов солнечных элементов (СЭ), которые могли бы составить конкуренцию традиционным фотопреобразователям на основе кремния, обладая при этом сравнимой эффективностью при более дешевой технологии изготовления [1, 2]. В этом отношении особый интерес представляют сенсibilизированные красителем СЭ (dye-sensitized solar cells (DSCs)) на основе структурированных на наноуровне слоев диоксида титана ( $\text{TiO}_2$ ), которые в последние два десятилетия стали предметом многочисленных поисковых исследований [3]. Основные преимущества DSCs по сравнению с наиболее распространенными СЭ на основе кремния – относительно простая технология изготовления, низкая себестоимость, а также их способность к эффективной работе в условиях низкой и диффузной освещенности [4–7]. Рекордная эффективность DSCs в условиях стандартного освещения (спектр АМ 1.5g, уровень освещенности –  $1000 \text{ Вт/м}^2$ ) составляет ~13% [8], что уступает эффективности традиционных СЭ на основе кристаллического кремния [9, 10].

Для повышения эффективности DSCs используются различные методы модификации поверхности слоев диоксида титана. Среди наиболее распространенных методов модификации следует отметить следующие: высокоэффективная очистка поверхности и удаление органических остатков в плазме [11, 12], длительная обработка кислородом, ультрафиолетовое (УФ) облучение [13], погружение в кислоты и щелочи, обработка перикисными соединениями [14, 15]. Например, в случае обработки  $\text{TiO}_2$  пероксидом наблюдалось улучшение покрытия структурированных на наноуровне слоев диоксида титана молекулами красителя [14]. Также было показано, что одним из наиболее эффективных методов предобработки поверхности металлооксидов ( $\text{TiO}_2$ ,  $\text{SnO}_2$ ,  $\text{ZnO}$ ) является комбинированная обработка УФ-излучением и озонem (UV-ozone treatment) [16]. В настоящее время данный способ применяется в основном в качестве промежуточной стадии очистки тонких слоев  $\text{TiO}_2$  и  $\text{SnO}_2$  при создании сенсibilизированных и перовскитных СЭ [17]. Известно, что такая обработка приводит к значительному улучшению фотовольтаических характеристик СЭ [18]. Однако в условиях комбинированной обработки “УФ + озон” не представляется возмож-

ным контролировать концентрацию озона (озон генерируется из воздуха в условиях УФ-облучения, наблюдается сильное повышение температуры) [19], также не ясен вклад каждого из факторов в наблюдаемые изменения фотоэлектрических характеристик СЭ. Обработка озоном структурированных на нанорурне слоев диоксида титана в контролируемых условиях (концентрация  $O_3$ , температура) [20, 21] в отсутствие УФ-обработки является перспективным подходом для создания высокоэффективных сенсibilизированных СЭ, поскольку озон инициирует формирование специфических групп на поверхности слоя  $TiO_2$ , которые способствуют увеличению сорбции красителя и, как следствие, улучшают фотоэлектрические параметры СЭ [22].

В данной работе были исследованы основные процессы, происходящие в нанесенных на стеклянные подложки тонких слоях диоксида титана ( $TiO_2$ ) под действием озона. Исследована кинетика реакции озона с диоксидом титана. Выявлено, что она протекает в диффузионно-кинетическом режиме. Исследованы процессы адсорбции красителя в структурированных на нанорурне слоях  $TiO_2$  и установлены оптимальные параметры процесса обработки диоксида титана озоном. Определены фотоэлектрические характеристики сенсibilизированных СЭ на основе обработанных озоном слоев  $TiO_2$ . Показана возможность регулирования и оптимизации процессов озонизации тонких слоев  $TiO_2$  с целью повышения эффективности сенсibilизированных красителем СЭ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Конструирование сенсibilизированных СЭ

Для создания фотопреобразователей типа DSCs в качестве подложек были использованы стекла ТЕС-8 марки Pilkington с проводящим слоем FTO на основе допированного фтором оксида олова (сопротивление  $\sim 8 \text{ Ом/см}^2$ ). Подложки размером  $2 \times 2 \text{ см}$  были предварительно очищены в ультразвуковой ванне последовательно в растворах детергента, этанола и ацетона, после чего они прокаливались при  $500^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Далее подложки обрабатывались в  $40 \text{ мМ}$  водном растворе  $TiCl_4$  в течение 30 мин при  $70^\circ\text{C}$  для образования компактного буферного слоя  $TiO_2$ . После обработки они промывались водой и этанолом и прокаливались при  $500^\circ\text{C}$  в течение 30 мин.

На следующими этапе, следуя описанной ранее методике [23], на подложки последовательно наносились структурированные на нанорурне слои  $TiO_2$  двух типов – сначала прозрачный слой толщиной  $\sim 10 \text{ нм}$  на основе наночастиц размером  $30\text{--}40 \text{ нм}$ , а потом рассеивающий слой толщиной  $\sim 5 \text{ нм}$  на основе наночастиц размером

$300\text{--}400 \text{ нм}$ . Общая толщина фотоэлектрода составляла около  $15 \text{ мкм}$ . Затем фотоэлектроды подвергались повторной обработке в  $40 \text{ мМ}$  водном растворе  $TiCl_4$  и последующему отжигу. Далее проводилась обработка полученных фотоэлектродов озоном высокой концентрации в закрытом реакторе (см. ниже).

Процесс сенсibilизации фотоэлектродов проводился в течение 24 ч в  $0.3 \text{ мМ}$  растворе красителя N719 производства компании Sigma-Aldrich (USA) в смеси ацетонитрила и трет-бутилового спирта в соотношении 1 : 1 [24]. В качестве противоэлектрода использовалась стеклянная проводящая подложка, на которую наносился раствор  $H_2PtCl_6$  (2 мг Pt в 1 мл этанола) с последующим отжигом при  $400^\circ\text{C}$  в течение 15 мин. При окончательной сборке СЭ сенсibilизированный фотоэлектрод и противоэлектрод накладывались друг на друга с последующей герметизацией по периметру с помощью пленки марки Surlin 1702. Пространство между электродами через отверстия в противоэлектроде заполнялось электролитом, представляющим собой раствор  $0.6 \text{ М}$  йодида 1-бутил-3-метилимидазола,  $0.03 \text{ М}$   $I_2$ ,  $0.1 \text{ М}$  гуанидин тиоцианата и  $0.5 \text{ М}$  4-терт-бутилпиридина в смеси валеронитрила и ацетонитрила в соотношении 85/15. В результате была приготовлена серия СЭ типа DSCs рабочей площадью  $\sim 0.25 \text{ см}^2$ .

### Озonoлиз

Все эксперименты по обработке озоном фотоэлектродов на основе диоксида титана проводились с использованием прибора MedOzone-UOTA-60. Озон получали при пропускании струи кислорода через зону электрического разряда (4 кВ) при скорости потока  $10\text{--}100 \text{ мл/мин}$  [27]. Концентрацию озона определяли спектрофотометрически при  $\lambda = 254 \text{ нм}$  [25, 26]. Озонирование проводили при комнатной температуре и влажности в трехгорлом реакторе при трех различных концентрациях озона:  $20 \text{ мг/л}$  ( $4.16 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ ),  $40 \text{ мг/л}$  ( $8.3 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ ),  $60 \text{ мг/л}$  ( $1.25 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$ ).

Скорость и глубину реакции оценивали по разнице между концентрациями озона на входе ( $[O_3]_0$ ) и выходе ( $[O_3]_r$ ) из реактора:  $\Delta[O_3] = [O_3]_0 - [O_3]_r$ , при концентрации озона  $[O_3]_0 = 3.65 \cdot 10^{-7} \text{ моль/л}$  и скорости подачи озono-кислородной смеси  $V_r = 0.1 \text{ л/мин}$  [27].

### Методы исследования

Количество красителя N719, поглощенного структурированными на нанорурне слоями  $TiO_2$ , определяли путем десорбции красителя в  $0.1 \text{ М}$  водном растворе NaOH. Концентрацию десорбированного красителя определяли с использованием спектрофотометрического метода [28].

Исследование слоев  $\text{TiO}_2$  методом ИК-фурье-спектроскопии проводили на установке FTIR Spectrum Two фирмы "PerkinElmer, Inc." (USA) с модифицированной приставкой DRIFT (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy), использование которой позволяет проводить измерения твердых образцов [29, 30]. Вместо стандартной чашки для проб DRIFT использовались небольшие столики из нержавеющей стали диаметром 13 мм. При этом плоская поверхность столиков действует как зеркало, а инфракрасный луч проникает внутрь образца. Структурированные на наноуровне слои  $\text{TiO}_2$  соскребались со стеклянной подложки непосредственно перед измерением и помещались на поверхность столика. Положение держателя образца было оптимизировано перед измерением с использованием чистого металлического валика. Инфракрасные спектры записывались в диапазоне  $4000\text{--}400\text{ см}^{-1}$  с шагом  $4\text{ см}^{-1}$  и усреднением 16 последовательных сканов.

Фотоэлектрические параметры сконструированных сенсibilизированных СЭ измерялись в стандартных условиях освещения (AM 1.5g,  $1000\text{ Вт/м}^2$ ) с использованием имитатора солнечного излучения Abet 10500 компании Abet Technologies (USA). Вольт-амперные характеристики записывались с помощью измерительной системы Keithley 4200-SCS (Keithley, USA). Спектры внешней квантовой эффективности СЭ (IPCE) в диапазоне длин волн  $300\text{--}800\text{ нм}$  были получены с использованием автоматизированной установки QEX10 производства компании PV Measurements (USA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

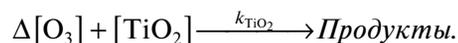
Использование озона в контролируемых условиях для создания высокоэффективных сенсibilизированных СЭ предполагает исследование кинетики реакции озона с диоксидом титана в тонких слоях. Реакции озона с образцами в тонких слоях отличаются от аналогичных реакций в растворе или на поверхности твердых образцов [31–33]. В настоящей работе диоксид титана имеет мезопористую структуру и движение газа (озона) наблюдается не только вдоль поверхности, но и внутрь образца. Варьирование толщин наносимых на стеклянную подложку слоев диоксида титана и концентраций подаваемого в реактор озона позволяет найти оптимальный режим обработки.

Подготовленные образцы в виде стеклянных подложек с нанесенными на них структурированными на наноуровне слоями  $\text{TiO}_2$  помещались в реактор, заполненный озono-кислородной смесью, с непрерывной подачей газа. Изучение кинетики реакции озона с тонкими слоями невозможно при больших концентрациях озона. При концентрации озона  $20\text{ мг/л}$  ( $4.16 \cdot 10^{-4}\text{ моль/л}$ ) реакция на по-

верхности любых образцов протекает с очень большой скоростью и анализ кинетики затруднен, поэтому опыты проводили при концентрации озона  $[\text{O}_3]_0 = 3.65 \cdot 10^{-7}\text{ моль/л}$  и  $V_r = 0.1\text{ л/мин}$ . Толщины слоев  $\text{TiO}_2$  составляли 15, 25, 30 и 35 мкм.

На рис. 1 представлены кинетические кривые изменения во времени концентрации озона на входе и выходе из пустого реактора и реактора с образцами  $\text{TiO}_2$ . Было показано, что реакция озона со структурированным на наноуровне слоем диоксида титана протекает относительно быстро. Площадь, ограниченная кривыми 1 и 6 (заштрихованная область), отражает потери озона на заполнение пустого реактора, а площадь, ограниченная кривыми 2 и 6, 3 и 6, 4 и 6, 5 и 6, — количество озона, затраченное на реакцию с образцами  $\text{TiO}_2$  различной толщины плюс потери на заполнение реактора. Разница между площадями соответствует затратам озона на химический процесс. Как видно из рис. 1, при проведении реакции озono-кислородной смеси с  $\text{TiO}_2$  в нормальных условиях увеличение толщины слоя диоксида титана приводит к пропорциональному увеличению расхода озона. Для любой произвольной точки кинетических кривых поглощения озона диоксидом титана наблюдаемое изменение  $\Delta[\text{O}_3]$  связано с изменением константы скорости и количеством окисленных групп в образце диоксида титана:

$$\Delta[\text{O}_3] = [\text{O}_3]_0 - [\text{O}_3]_r,$$

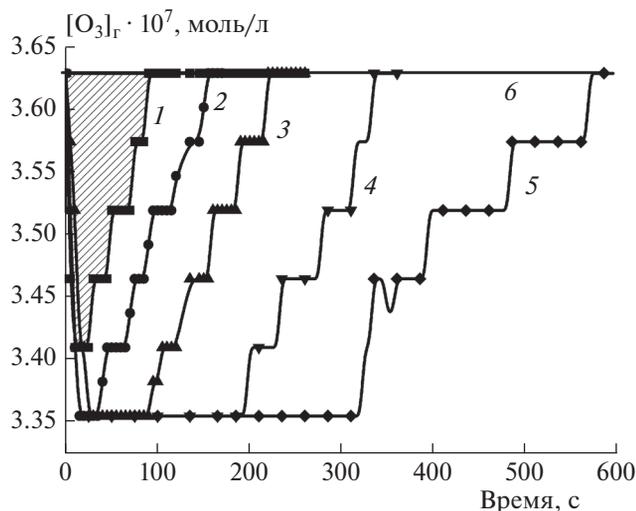


В условиях проведения опытов реализовывался стационарно-динамический режим, при котором время контакта ( $\tau$ ) озона со слоем  $\text{TiO}_2$  можно сопоставить с истинным временем реакции. Численные значения удельной скорости реакции озона с диоксидом титана ( $w_{\text{TiO}_2}$ ) для любых моментов времени протекания процесса можно найти, используя разработанную ранее кинетическую модель, которая отражает особенности топочимии исследуемых процессов [31]. Величина  $w_{\text{TiO}_2}$  определяется следующим уравнением:

$$w_{\text{TiO}_2} = -\ln(1 - \Delta[\text{O}_3]_\tau / [\text{O}_3]_0) / (\tau \alpha [\text{TiO}_2]_0 \gamma), \quad (1)$$

где  $\gamma$  — объем слоя,  $\alpha = [\text{O}_3]_0 / [\text{O}_3]_r$ ,  $[\text{TiO}_2]_0$  — исходное количество диоксида титана на поверхности подложки [31].

Результаты расчета  $w_{\text{TiO}_2}$  для образцов  $\text{TiO}_2$  различной толщины приведены на рис. 2. Было показано, что в начале процесса реакция идет с большой скоростью, но в дальнейшем последняя уменьшается (стрелка) по мере расходования озона и накопления продуктов реакции. При увеличении толщины слоя диоксида титана до 35 мкм наблюдается уменьшение удельной скорости реакции озона с  $\text{TiO}_2$ . Скорость реакции начинает

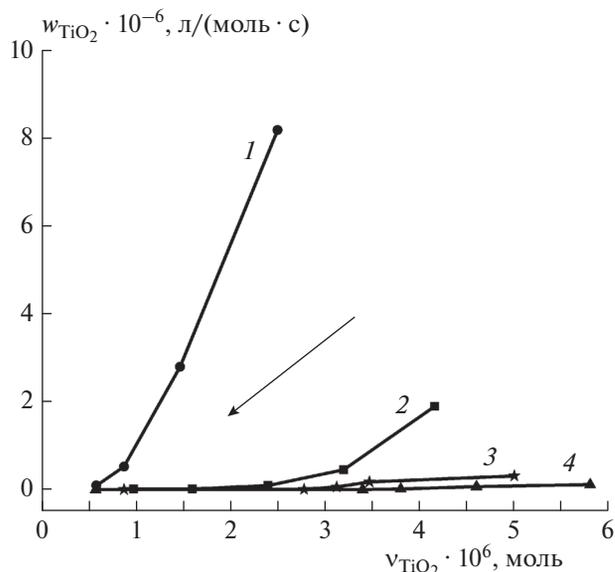


**Рис. 1.** Кинетические кривые изменения концентрации озона на выходе из пустого реактора и реактора с образцами  $\text{TiO}_2$ . Кривая 1 – пустой реактор; образцы  $\text{TiO}_2$  толщиной: 2 – 15 мкм, 3 – 25 мкм, 4 – 30 мкм, 5 – 35 мкм; 6 – концентрация озона на входе в реактор. Площадь под кривыми 1 и 6 отражает потери озона на заполнение пустого реактора.

определяться процессом диффузии озона в подповерхностные слои образца и сквозь барьерный слой продуктов реакции к нижележащим слоям диоксида титана, и процесс, протекающий вначале в кинетическом режиме, плавно переходит в диффузионно-кинетический.

Максимальная удельная скорость процесса (крайние правые точки на рис. 2) соответствует эффективной константе скорости реакции  $k_{\text{TiO}_2}$  и составляет  $8.2 \cdot 10^6$ ,  $1.9 \cdot 10^6$ ,  $3.16 \cdot 10^5$  и  $1.19 \cdot 10^5$  л/(моль · с) для слоя  $\text{TiO}_2$  толщиной 15, 25, 30 и 35 мкм соответственно. Топохимические эффекты, полученные для реакции озона со структурированным на наноуровне слоем  $\text{TiO}_2$ , сопоставимы с данными по реакциям озона на поверхности полимерных тонких пленок или с образцами, имеющими развитую поверхность [20, 31]. Таким образом, толщина слоя диоксида титана ~15 мкм является оптимальной для модификации озонем.

Исследование озонированных пленок  $\text{TiO}_2$  методом ИК-спектроскопии показало, что основные характеристические полосы для контрольного образца  $\text{TiO}_2$  наблюдались в областях  $3696$  и  $3440$   $\text{см}^{-1}$  (поверхностно-адсорбированная вода),  $1639$   $\text{см}^{-1}$  (гидроксильная группа  $\text{Ti}-\text{OH}$ ),  $1463$   $\text{см}^{-1}$  (растяжение связей  $\text{Ti}-\text{O}-\text{Ti}$ ). После обработки озонем слоя  $\text{TiO}_2$  наблюдается уменьшение полос поглощения при  $3440$  и  $3693$   $\text{см}^{-1}$ , а также полосы при  $1635$   $\text{см}^{-1}$ , что говорит о сокращении количества  $\text{OH}$ -групп на поверхности  $\text{TiO}_2$ . Появление полосы при  $1249$   $\text{см}^{-1}$  говорит об



**Рис. 2.** Зависимость удельной скорости реакции озона с образцами  $\text{TiO}_2$  различной толщины (1 – 15 мкм, 2 – 25 мкм, 3 – 30 мкм, 4 – 35 мкм) от количества прореагировавшего вещества.

образовании перекисных групп (также в виде свободной перекиси, находящейся в порах) в результате обработки озонем пленок  $\text{TiO}_2$  [32, 33].

Важным параметром, влияющим на эффективность сенсibilизированных СЭ, является количество красителя, адсорбированного на поверхности диоксида титана. На рис. 3 приведены УФ-спектры поглощения десорбированного красителя N719 для контрольного образца  $\text{TiO}_2$  и для слоев  $\text{TiO}_2$ , озонированных при трех различных концентрациях озона: 20, 40 и 60 мг/л (время обработки – 10 мин). Спектры показывают типичные полосы поглощения красителя N719 около 375 и 510 нм.

Концентрация адсорбированного красителя рассчитывалась на основе закона Ламберта–Бера:  $A = \epsilon lc$ , где  $A$  – оптическая плотность,  $\epsilon$  – молярный коэффициент экстинкции при 515 нм ( $\epsilon = 12406$  ( $\text{M} \cdot \text{см}^{-1}$ )),  $l$  – длина пути светового пучка,  $c$  – концентрация красителя. Количество адсорбированного на единицу активной площади красителя приведено в табл. 1.

Полученные результаты свидетельствуют, что обработка озонем в концентрации 20 мг/л приводит к увеличению адсорбции красителя слоем  $\text{TiO}_2$  ( $7.7 \cdot 10^{-8}$  моль/ $\text{см}^2$ ) по сравнению с контрольным образцом ( $7.2 \cdot 10^{-8}$  моль/ $\text{см}^2$ ). Дальнейшее увеличение концентрации озона приводит к снижению сорбции молекул красителя структурированным на наноуровне слоем диоксида титана. Присутствие свободной перекиси внутри слоя  $\text{TiO}_2$  также

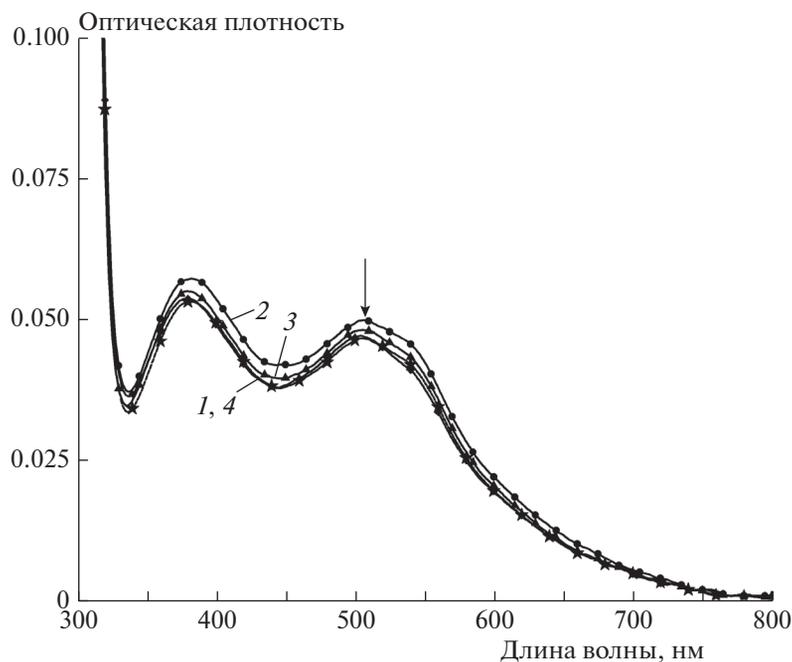
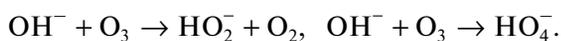


Рис. 3. УФ-спектры поглощения красителя N719, десорбированного из исходного образца (1) диоксида титана и образцов  $\text{TiO}_2$ , обработанных озоном в концентрации 20 (2), 40 (3) и 60 мг/л (4).

оказывает влияние на сорбционную способность образца за счет увеличения количества доступных  $-\text{OH}$ -групп. Краситель адсорбируется в результате взаимодействия карбоксильной группы красителя N719 с  $\text{OH}$ -группами на поверхности диоксида титана. При увеличении концентрации озона количество групп сокращается в связи с разрушением связи  $\text{Ti}-\text{O}-\text{Ti}$  и образованием на поверхности групп  $\text{Ti}-\text{O}_2\text{H}^-$ . Перекисные группы должны способствовать прониканию красителя в образец при больших концентрациях обработки. Однако подобная картина наблюдается только при обработке озоном в концентрации 20 мг/л, а в случае больших концентраций сорбция падает, но не до исходных значений. Скорее всего, это происходит из-за обезвоживания образцов озоном в концентрациях выше 20 мг/л. Большая часть реакционно-способных групп удаляется с поверхности, что может продемонстрировать следующий механизм:



Таким образом, обработка структурированных на наноуровне слоев  $\text{TiO}_2$  озоном в концентрации 20 мг/л будет оптимальной для улучшения адсорбции красителя слоем диоксида титана и дальнейшего создания сенсibilизированных СЭ на основе озонированных фотоэлектродов.

Для демонстрации влияния озонирования на фотоэлектрические характеристики сенсibilизированных СЭ была приготовлена серия образцов СЭ на основе мезоскопических слоев  $\text{TiO}_2$ , озонированных при  $[\text{O}_3] = 20$  мг/л. Были проведены сравнительные исследования фотоэлектрических параметров сенсibilизированных СЭ, изготовленных на основе необработанных и обработанных озоном фотоэлектродов. На рис. 4 и 5 приведены соответствующие спектры ИРСЕ и вольт-амперные характеристики СЭ. Видно, что для СЭ на основе озонированных фотоэлектродов наблюдается увеличение плотности тока короткого замыкания ( $J_{SC}$ ) и значений внешней квантовой эффективности. Полученные результаты хорошо объясняются увеличением сорбции красителя N719 в результа-

Таблица 1. Адсорбция красителя N719 фотоэлектродами на основе диоксида титана

Образец	Количество адсорбированного красителя N719, $10^{-8}$ моль/см <sup>2</sup>
$\text{TiO}_2$	7.2
$\text{TiO}_2 + 20$ мг/л $\text{O}_3$	7.7
$\text{TiO}_2 + 40$ мг/л $\text{O}_3$	7.4
$\text{TiO}_2 + 60$ мг/л $\text{O}_3$	7.4

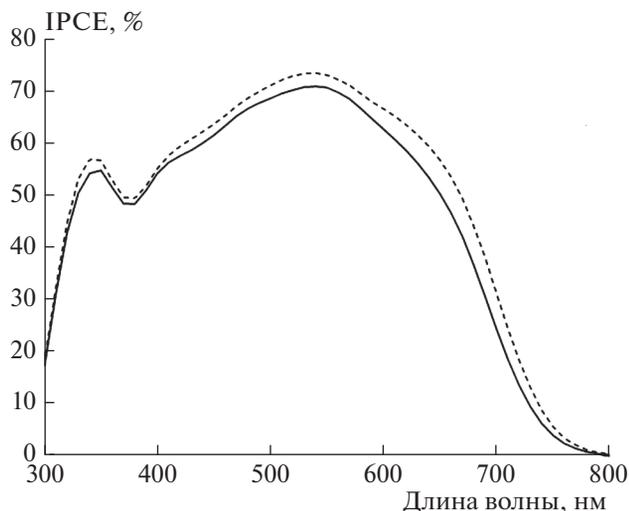


Рис. 4. Сравнительный вид спектральных характеристик внешней квантовой эффективности sensibilizированных СЭ на основе стандартного (сплошная кривая) и обработанного озонном (штриховая) фотоэлектродов.

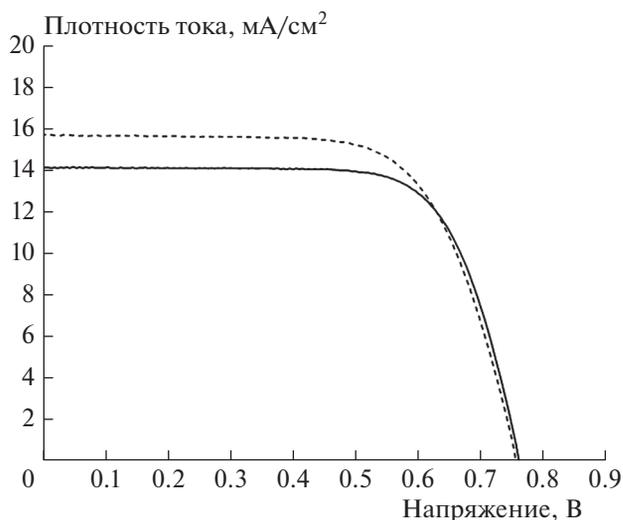


Рис. 5. Вольт-амперные характеристики для sensibilizированных СЭ на основе стандартного (сплошная кривая) и обработанного озонном (штриховая) фотоэлектродов.

те обработки мезоскопических фотоэлектродов озонном при концентрации последнего 20 мг/л.

Значения фотоэлектрических параметров исследованных sensibilizированных СЭ приведены в табл. 2. Коэффициент полезного действия фотопреобразования ( $\eta$ ) рассчитывался по известной формуле:

$$\eta = \frac{J_{SC} V_{OC} FF}{P_{in}} \cdot 100\%, \quad (3)$$

где  $J_{SC}$  – плотность тока короткого замыкания,  $V_{OC}$  – напряжение холостого хода,  $FF$  – коэффициент заполнения,  $P_{in}$  – интенсивность освещения (1000 Вт/м<sup>2</sup>).

Как видно из табл. 2, обработка озонном в концентрации 20 мг/л приводит к увеличению КПД sensibilizированных СЭ до 8.2% по сравнению с контрольным образцом (7.7%). Таким образом, показано, что обработка мезоскопических слоев  $TiO_2$  озонном высокой концентрации является эффективным способом увеличения КПД sensibilizированных красителем СЭ на основе диоксида титана.

Таблица 2. Значения фотоэлектрических параметров sensibilizированных СЭ на основе структурированных на наноразмере слоев  $TiO_2$  (контрольный образец и после обработки озонном с концентрацией 20 мг/л)

Образец	$J_{SC}$ , mA/cm <sup>2</sup>	$V_{OC}$ , В	FF	КПД, %
$TiO_2$	14.1	0.76	0.72	7.7
$TiO_2 + O_3$ (20 мг/л)	15.7	0.755	0.69	8.2

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучена кинетика реакции озона с диоксидом титана в структурированных на наноразмере слоях  $TiO_2$  различной толщины. Показано, что реакция озона с  $TiO_2$  протекает в диффузионно-кинетическом режиме. Определены численные значения эффективных констант скоростей и удельных скоростей процесса озонирования. Установлена оптимальная концентрация озона в процессе обработки (20 мг/л), необходимая для улучшения адсорбции красителя N719 структурированным на наноразмере слоем диоксида титана. Модифицированные озонном слои  $TiO_2$  были использованы в качестве фотоэлектродов для конструирования sensibilizированных красителем СЭ. Проведены сравнительные исследования фотоэлектрических параметров СЭ на основе стандартного и обработанного озонном фотоэлектродов. Показано, что обработка озонном в концентрации 20 мг/л увеличивает КПД sensibilizированных СЭ на 6%.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерством науки и высшего образования РФ в рамках темы № 01201253312 и частично поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 19-08-01042.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Green M.A., Emery K., Hishikawa Y. et al. // Prog. Photovolt.: Res. Appl. 2017. V. 25. № 7. P. 668.
2. Chu S., Majumdar A. // Nature. 2012. V. 488. № 7411. P. 294.
3. Gratzel M. // J. Photochem. Photobiol., C. Rev. 2003. V. 4. № 2. P. 145.

4. *Hardin B.E., Snaith H.J., McGehee M.D.* // Nat. Photon. 2012. V. 6. № 3. P. 162.
5. *Reddy K.G., Deepak T.G., Anjusree G.S. et al.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2014. V. 16. № 15. P. 6838.
6. *Vildanova M.F., Nikolskaia A.B., Kozlov S.S. et al.* // J. Phys.: Conf. Ser. 2015. V. 643. P. 012106.
7. *Шевалеевский О.И., Никольская А.Б., Вильданова М.Ф., Козлов С.С., Алексеева О.В., Вишнёв А.А., Ларина Л.Л.* // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 8. С. 36.
8. *Mathew S., Yella A., Gao P. et al.* // Nat. Chem. 2014. V. 6. № 3. P. 242.
9. *Yoshikawa K., Kawasaki H., Yoshida W. et al.* // Nat. Energy. 2017. V. 2. № 5. P. 17032.
10. *Battaglia C., Cuevas A., Wolf S.D.* // Energy Environ. Sci. 2016. V. 9. P. 1552.
11. *Park K.-H., Dhayal M.* // Electrochem. Commun. 2009. V. 11. № 1. P. 75.
12. *Kim Y., Yoo B.J., Vittal R. et al.* // J. Power Sources. 2008. V. 175. № 2. P. 914.
13. *Chu Y., Cai H., Huang L. et al.* // Phys. Status Solidi A. 2019. V. 216. № 6. P. 1800669.
14. *Subramanian A., Wang H.-W.* // Appl. Surf. Sci. 2012. V. 258. № 20. P. 7833.
15. *Sireesha P., Sun W.G., Su C. et al.* // J. Nanosci. Nanotechnol. 2017. V. 17. № 1. P. 354.
16. *Saekow S., Maiakgree W., Jarernboon W. et al.* // J. Non-Cryst. Solids. 2012. V. 358. P. 2496.
17. *Méndez P. F., Muhammed S.K.M., Barea E.M. et al.* // Solar RRL. 2019. V. 3. № 9. P. 1900191.
18. *Kleine A., Hilleringmann U.* // Renewable Energies & Power Quality J. 2016. № 14. P. 102.
19. *Лунин В.В., Попович М.П., Ткаченко С.Н.* Физическая химия озона. М.: Изд-во МГУ, 1998.
20. *Alekseeva O., Konstantinova M., Rasumovskii S.* // Heteroatom Chem. 2008. V.19. № 7. P. 661.
21. *Valdés H., Sánchez-Polo M., Rivera-Utrilla J. et al.* // Langmuir. 2002. V. 18. № 6. P. 2111.
22. *Jang I., Song K., Park J.-H. et al.* // Bull. Korean Chem. Soc. 2013. V. 34. № 10. P. 2883.
23. *Ito S., Shen P., Comte P. et al.* // Prog. Photovoltaics Res. Appl. 2007. V. 15. № 7. P. 603.
24. *Kozlov S., Nikolskaia A., Larina L., Vildanova M., Vishnev A., Shevaleevskiy O.* // Phys. Status Solidi A. 2016. V. 213. № 7. P. 1801.
25. *Alekseeva O.V., Konstantinova M.L., Rasumovskii S. et al.* // Oxid. Commun. 2009. V. 32. № 3. 537.
26. *Разумовский С.Д., Гриневиц Т.В., Коровина Г.В.* // Хим. физика. 2011. Т. 30. № 10. С. 54.
27. *Alekseeva O.V., Rasumovskii S.D.* // Kinet. Catal. 2006. V. 47. № 4. P. 533.
28. *Hwang K.-J., Shim W.-G., Kim Y. et al.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2015. V. 17. P. 21974.
29. *Shchegolikhin A.N., Lazareva O.L.* // Intern. J. Vib. Spect. 1997. V. 1. № 4. P. 95.
30. *Shchegolikhin A.N., Lazareva O.L.* // Ibid. 1997. V. 1. № 4. P. 26.
31. *Alekseeva O.V., Konstantinova M.L., Rasumovskii S.D.* // Polym. Sci. Ser. B. V. 46. № 9. P. 301.
32. *Кумпаненко И.В., Роцин А.В., Иванова Н.А. и др.* // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 2. С. 25.
33. *Tai J.Y., Leong K.H., Saravanan P. et al.* // J. Mater. Sci. 2017. V. 52. № 19. P. 11630.