

СОДЕРЖАНИЕ

Том 41, номер 2, 2022

Строение химических соединений, квантовая химия, спектроскопия

Пронкин П.Г., Татиколов А.С.

Молекулярный докинг цианиновых и скварилиевых красителей с эндорибонуклеазой NSP15 коронавируса SARS-CoV-2

3

Кинетика и механизм химических реакций, катализ

Русина И.Ф., Вепринцев Т.Л., Васильев Р.Ф.

Антиоксидантная активность двухатомных фенолов

12

Химическая физика биологических процессов

Яковлева М.А., Радченко А.Ш., Костюков А.А., Чаговец В.В.,
Кононихин А.С., Хубецова М.Х., Борзенко С.А., Кузьмин В.А.,
Николаев Е.Н., Фельдман Т.Б., Островский М.А.

Сравнительный анализ физико-химических характеристик групп флуорофоров липофусциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека в норме и при патологии

20

Петронюк Ю.С., Трофимова Н.Н., Зак П.П., Храмова Е.А.,
Андрюхина О.М., Андрюхина А.С., Рябцева А.А.,
Гурьева Т.С., Медникова Е.И., Титов С.А., Левин В.М.

Исследование глазных патологий на биомодели японского перепела *Coturnix japonica*

27

Луцкекина С.В., Немухин А.В., Поляков И.В., Массон П.,
Варфоломеев С.Д., Григоренко Б.Л.

Моделирование механизмов спонтанной реактивации мутантов бутирилхолинэстеразы, ингибированной эхогиофатом

34

Бурцев И.Д., Егоров А.Е., Костюков А.А., Шибалева А.В., Климович М.А.,
Косов А.Д., Селиверстов М.Ю., Дубинина Т.В., Маркова А.А., Кузьмин В.А.

Фотохимические свойства октафенилзамещенного фталоцианина эрбия

41

Васильева А.Д., Юрина Л.В., Азарова Д.Ю., Иванов В.С.,
Стрельникова П.А., Бугрова А.Е., Индейкина М.И.,
Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А.

Разработка диагностического подхода, основанного на выявлении посттрансляционных модификаций фибриногена, ассоциированных с окислительным стрессом, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

51

Калинина И.Г., Иванов В.Б., Семенов С.А., Казарин В.В., Жданова О.А.

Развитие гриба *Aspergillus niger* на лакотканевой изоляции в различных температурно-влажностных условиях

57

Химическая физика полимерных материалов

**Вассерман Л.А., Папахин А.А., Кривандин А.В.,
Филатова А.Г., Бородина З.М., Плащина И.Г.**

Изменение структуры, термодинамических и функциональных свойств кукурузного крахмала при механической обработке 62

Клименко И.В.

Углеродные волокна на основе пека: состояние производства и модификация свойств 70

Похолок Т.В., Ломакин С.М., Калинина И.Г.

Взаимодействие диоксида азота с терлоном – поли-*n*-фенилентерэфталамидом 78

Тертышная Ю.В., Хватов А.В., Попов А.А.

Механические свойства композиционных материалов на основе полилактида и поли-3-гидроксibuтирата с каучуками 86

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ ЦИАНИНОВЫХ И СКВАРИЛИЕВЫХ КРАСИТЕЛЕЙ С ЭНДОРИБОНУКЛЕАЗОЙ NSP15 КОРОНАВИРУСА SARS-CoV-2

© 2022 г. П. Г. Пронкин^{1*}, А. С. Татиколов¹

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

*E-mail: pronkinp@gmail.com

Поступила в редакцию 27.07.2021;

после доработки 16.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

Продолжающееся распространение коронавирусной инфекции COVID-19 ставит целью найти новые инструменты и методы обнаружения, изучения инфекции и предотвращения заболеваемости (в частности, новые аналитические процедуры и тесты). С целью разработки зондов для обнаружения коронавируса SARS-CoV-2 методом моделирования *in silico* (молекулярный докинг) изучено нековалентное связывание цианиновых и скварилиевых красителей, имеющих различные заряды молекул и разные типы гетероциклических остатков и заместителей (всего 42 соединения), с разными вариантами эндорибонуклеазы NSP15 коронавируса SARS-CoV-2 (COVID-19): исходного (“дикого”) типа и мутантными типами. Определены энергии взаимодействия и пространственные конфигурации молекул красителей в комплексах с NSP15. Некоторые красители, имеющие отрицательные значения общей энергии комплекса E_{tot} , перспективны для дальнейшего практического изучения в качестве зондов на коронавирус.

Ключевые слова: коронавирус SARS-CoV-2 (COVID-19), эндорибонуклеаза NSP15, цианиновые красители, скварилиевые красители, нековалентное взаимодействие, молекулярный докинг.

DOI: 10.31857/S0207401X22020091

ВВЕДЕНИЕ

Угроза продолжающегося распространения коронавируса SARS-CoV-2 (COVID-19), которое сопровождается его мутациями, определяет необходимость разработки новых процедур и тестов для обнаружения, изучения и предотвращения распространения вируса. Один из наиболее эффективных подходов, используемых в настоящее время в вирусных исследованиях, включает использование флуоресцентных зондов и меток, таких как цианиновые красители [1–4] (в частности, оксамонометинцианины [5]). Основными преимуществами цианиновых красителей являются высокие коэффициенты экстинкции, поглощение и испускание в спектральном диапазоне от УФ- до ИК-области, перекрывающим оптическое окно прозрачности биологических образцов, а также их уникальные фотофизические и фотохимические свойства, зависящие от молекулярного окружения [6]. Нековалентное взаимодействие цианиновых красителей с биомолекулами (нуклеиновые кислоты, белками) приводит к изменению фотофизических и фотохимических свойств красителей и зачастую протекает с многократным усилением флуоресценции, что создает предпосылки

для использования цианинов в качестве зондов в природных и искусственных системах, содержащих биомакромолекулы [7–12]. Разнообразие структур и свойств цианиновых красителей разных типов (которые содержат полиметиновые цепи разной длины, разные концевые гетероциклы и заместители) требует молекулярного моделирования *in silico* для предварительного скрининга соединений [13–15]. Ранее нами было изучено *in silico* (методом молекулярного докинга) взаимодействие между различными полиметиновыми (цианиновыми) красителями (всего 45 соединений) и спайк-протеином (S) SARS-CoV-2 [16]. В данной работе методом моделирования *in silico* (молекулярный докинг) продолжено изучение взаимодействия цианиновых красителей с молекулярными компонентами коронавируса SARS-CoV-2 — смоделировано взаимодействие различных видов красителей (42 соединения) с разными типами белка-фермента вируса SARS-CoV-2 — эндорибонуклеазы NSP15: как исходного (“дикого”) типа, так и мутантными типами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярный докинг проводили с помощью сайта DockThor [17–19]. В эксперименте использовали целевые структуры белков, предложенные на сайте DockThor; в качестве референса изучали “дикий” тип белка-фермента NSP15 (PDB-код: 6wxc), соответствующий эталонной последовательности генома вируса (выделен в г. Ухань, провинция Хубэй, Китай, декабрь 2019 г.) [20]. Выполнен также докинг с четырьмя мутантными разновидностями белка NSP15: S294A, S294T, Y343C, Y343H. Структура NSP15 S294A соответствует мутации ключевого аминокислотного участка с нейтральным функциональным эффектом, связанной с заменой остатка Ser294 на Ala294 (замена гидрофильного остатка на гидрофобный в сайте связывания лиганда) [21]. Разновидность S294T имеет аминокислотную замену Ser293 на Thr293 (без изменения функционального эффекта); Y343C получена заменой аминокислотного остатка Tyr343 на Cys 343, что относится непосредственно к сайту связывания лигандов; структура Y343H соответствует мутации в сайте связывания белка с заменой Tyr343 на His343 [20].

Небелковые компоненты (молекулы воды, ионы, кофакторы и лиганды) были удалены (DockThor), добавлены атомы водорода и оптимизирована сеть водородных связей с учетом $\text{pH} = 6.2$ [22]. Для мутантных форм NSP15 “дикий” тип (с PDB-кодом: 6wxc) использован в качестве шаблона. В работе использовались предложенные структуры; дополнительную корректировку протонирования аминокислотных остатков не проводили.

Эксперименты проводили в режиме “слепого” докинга (blind docking); размер аппроксимирующей решетки – 22 \AA , центр при $X = 63.94$, $Y = -72.47$, $Z = 26.37$, шаг дискретизации – 0.25 \AA [17–20]. При анализе результатов учитывали до пяти лучших конфигураций.

Исследованы симметричные скварилиевые красители: моно-, три-, пента- и гептаметинцианины, как катионные, так и анионные (имеющие отрицательно заряженные сульфогруппы), с различными гетероциклами (бензимидазол, бензотиазол, бензоксазол) и заместителями в гетероциклах. Триметинцианины (карбоцианины) также имели различные заместители в гетероатомах и мезо-положении полиметиновой цепи. Для создания PDB-структур красителей-лигандов и оптимизации их геометрии (силового поля MMFF94) использовали молекулярный редактор Avogadro [23]. Для трехмерной визуализации и анализа результатов стыковки использовали программу UCSF Chimera [24]. Исходная изомерная форма мезо-замещенных карбоцианинов соответствовала *цис*-конфигурации как наиболее

стабильной для красителей этого типа в полярных растворителях [25].

О стабильности возможных комплексов краситель–белок судили по знаку и величине полной энергии системы E_{tot} , полученной в результате докинга [17, 20]: предполагалось, что образование стабильных комплексов более вероятно при достаточно низких (т.е. больших по абсолютной величине) отрицательных энергиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярный докинг катионных карбоцианиновых и нейтральных скварилиевых красителей с NSP15

Изучено взаимодействие катионных мезо-замещенных карбоцианиновых (K1–K7) и нейтральных скварилиевых красителей (СК1–СК5) с различными вариантами NSP15. Структурные формулы красителей представлены на рис. 1. Карбоцианиновые красители отличаются друг от друга как заместителями в мезо-положении полиметиновой цепи, так и концевыми гидроциклами. Скварилиевые красители отличаются друг от друга заместителями R1, R2.

Исследованные катионные и нейтральные красители характеризуются положительными значениями полной энергии E_{tot} при взаимодействии со всеми типами NSP15. В частности, при докинге K1 и K7 с NSP15 “дикого” типа получено: $E_{tot} = 16.7 \pm 0.7$ и 55.4 ± 0.33 ккал · моль⁻¹ соответственно, что практически совпадает с результатом, полученным для мутантного варианта NSP15 Y343H. Наименьшие значения E_{tot} при докинге с “диким” типом NSP15 получены для оксакарбоцианина K5 ($E_{tot} = 6.95 \pm 0.17$ ккал · моль⁻¹) и для тиакарбоцианина K3 ($E_{tot} = 10.6 \pm 0.93$ ккал · моль⁻¹). Отметим, что для катионных карбоцианиновых красителей значения энергии Ван-дер-Ваальса (E_{vdw}) оказались отрицательными: для красителей с различными гетероциклами они близки и лежат в пределах от -19.6 ± 3.32 ккал · моль⁻¹ (краситель K4) до -27.8 ± 0.67 ккал · моль⁻¹ (краситель K3). Аналогичные результаты ($E_{tot} > 0$) были получены ранее для катионных красителей при докинге со спайк-протеином SARS-CoV-2 [16].

Положительные значения E_{tot} были получены и при докинге незаряженных скварилиевых красителей с NSP15. В частности, для красителей СК2 и СК3 с заместителями R₁ = OH значения $E_{tot} = 59.4 \pm 1.15$ и 15.2 ± 0.79 ккал · моль⁻¹ (с “диким” типом NSP15) соответственно. Докинг с NSP15 незамещенного СК1 дает значительно более благоприятное (но тоже положительное) значение энергии ($E_{tot} = 7.7 \pm 0.56$ ккал · моль⁻¹). Аналогичные данные получены при докинге нейтральных скварилиевых красителей со спайк-протеином

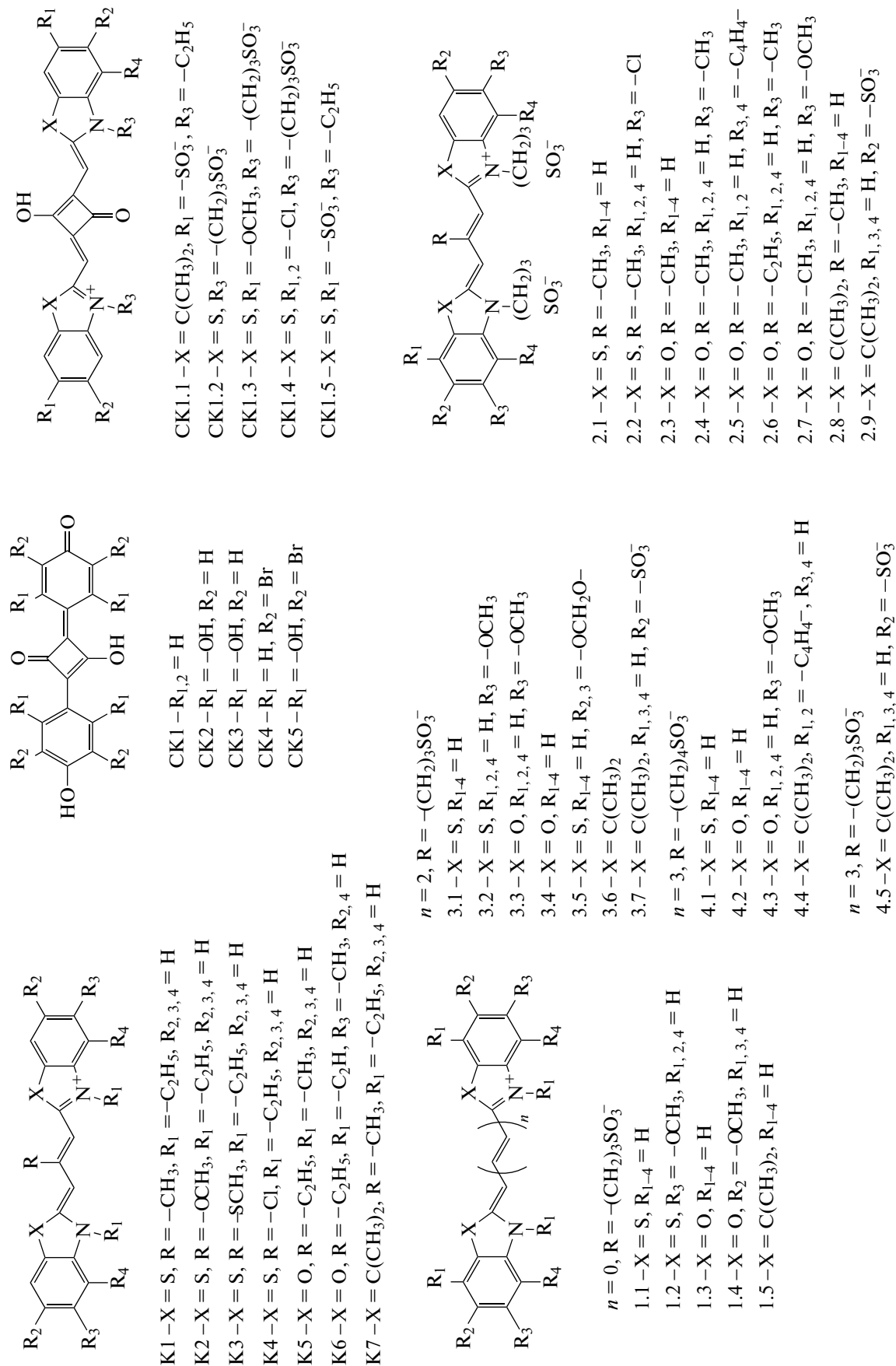


Рис. 1. Структурные формулы цианиновых красителей, а также нейтральных и анионных скварилиевых красителей.

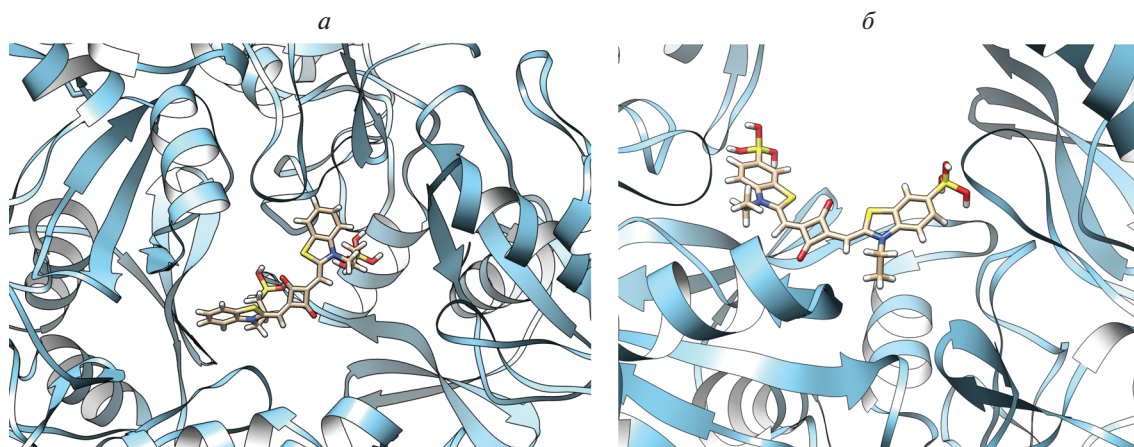


Рис. 2. Результаты докинга с NSP15 красителей: *a* – СК1.1 (“дикий” тип NSP15 и *б* – СК1.5 (Y343H). Исходные конфигурации красителей соответствовали *цис*-изомерам.

[16]. Положительные значения E_{tot} могут указывать на недостаточную стабильность комплексов катионных полиметиновых красителей и нейтральных скварилиевых красителей с NSP15.

Независимо от использования мутантных подтипов NSP15, энергии электростатического взаимодействия, E_{el} , и Ван-дер-Ваальса, E_{vdW} , оказались отрицательными; для основной части красителей их средние значения составляют -13.7 ± 1.01 и -13.4 ± 3.7 ккал · моль⁻¹ соответственно. Бромзамещенные красители СК4 и СК5 при докинге с NSP15 (“дикий” тип) имеют $E_{vdW} = -29.1 \pm 0.62$ и -25.6 ± 0.26 ккал · моль⁻¹ и $E_{el} = -0.31 \pm 0.51$ и -1.28 ± 0.39 ккал · моль⁻¹ соответственно.

Молекулярный докинг анионных красителей с NSP15

Анионные скварилиевые красители. Наряду с незаряженными (нейтральными) скварилиевыми красителями (СК1–СК5) был проведен молекулярный докинг анионных скварилиевых красителей СК1.1–СК1.5 с NSP15 (структуры красителей приведены на рис. 1). В результате докинга для большинства исследованных анионных скварилиевых красителей получены отрицательные значения полной энергии ($E_{tot} < 0$). В частности, при взаимодействии СК1.4 с “диким” и мутантным (Y343H) типами NSP15 получены $E_{tot} = -8.78 \pm 0.55$ и -9.46 ± 1.14 ккал · моль⁻¹. В то же время в случае СК1.1 получены положительные значения $E_{tot} = 20.5 \pm 0.42$ и 20.6 ± 0.89 ккал · моль⁻¹ соответственно. Возможно, это обусловлено стерическими препятствиями для образования комплекса, создаваемыми группами $C(CH_3)_3$ [16].

Сильно отрицательные значения E_{tot} были получены при докинге скварилиевых красителей СК1.2 и СК1.5; при этом наиболее отрицательные

значения E_{tot} – при докинге с S294T для имеющего бензтиазольные гетероциклы красителя СК1.2 ($E_{tot} = -72.1 \pm 1.32$ ккал · моль⁻¹). Энергии электростатического взаимодействия и Ван-дер-Ваальса для анионных скварилиевых красителей СК1.1–СК1.5 оказались отрицательными. Для красителей СК1.2 и СК1.4, имеющих сульфогруппы в заместителях при атомах N, получены наименьшие значения E_{el} (-57.2 ± 5.1 и -65.1 ± 3.4 ккал · моль⁻¹ соответственно). В среднем для изученных анионных скварилиевых красителей $E_{vdW} = -6.2 \pm 3.0$ ккал · моль⁻¹, тогда как $E_{el} = -55.7 \pm 8.5$ ккал · моль⁻¹, т.е. E_{el} выше по абсолютной величине, чем E_{vdW} , в 4.2–20 раз, что свидетельствует о значительном вкладе сил электростатического взаимодействия в стабилизацию комплексов краситель–белок.

Скварилиевые красители в комплексах с NSP15 зачастую принимают скрученную (близкую к перпланарной) конфигурацию, например, СК1.1 с “диким” типом NSP15 (рис. 2*a*). Однако для красителя СК1.7 со всеми разновидностями NSP15 характерны практически плоские структуры, близкие к *транс*-изомерам, в которых концевые гетероциклы красителя лишь незначительно (на $\sim 20^\circ$) выводятся из плоскости.

Докинг располагает молекулы лигандов в центральной полости тримера вблизи одной из субъединиц белка. Используя программу UCSF Chimera [22], мы провели анализ поверхностного связывания и поиск водородных связей между атомами лиганда и белка, а также поиск межатомных конфликтов и контактов (на основе ван-дер-ваальсовых радиусов молекул). Анализ связывания показал, что в комплексе с NSP15 молекулы скварилиевого красителя СК1.1 расположены на расстоянии ~ 4 Å от GLY165, и TYR89 субъединицы С, сульфогруппа красителя находится на

расстоянии 4 Å от ARG91. В случаях СК1.5 и мутантных форм S294A и Y343H докинг дал практически одинаковые положения лигандов (взаимодействие с субъединицей А). В случае СК1.5 и Y343H (структура красителя в комплексе приведена на рис. 2б) краситель образует водородные связи (2 Å) с GLN203 (с участием концевой сульфогруппы) и с ASP269 (за счет атома О скварилиевого кольца). Поиск межатомных контактов указывает на близкий (3 Å) контакт ARG92 с сульфогруппой красителя; также отмечен контакт (4 Å) GLU268 со скварилиевым кольцом.

Анионные цианиновые красители. Молекулярный докинг также проведен с серией из 26 анионных цианинов с различной длиной полиметиновой цепи: пяти анионных монометинцианиновых красителей (см. рис. 1, структуры 1.1–1.5), девяти мезо-замещенных триметинцианиновых красителей (карбоцианинов, структуры 2.1–2.9), семи пентаметинцианиновых красителей (структуры 3.1–3.7) и пяти гептаметинцианиновых красителей (структуры 4.1–4.5). Мезо-замещенные карбоцианины соответствовали *цис*-конфигурации.

Докинг показал, что большинство (~90%) выбранных соединений характеризуются отрицательными значениями полной энергии ($E_{tot} < -19$ ккал · моль⁻¹, см. табл. 1). Значительные отрицательные значения E_{tot} получены для анионных монометинцианиновых красителей: так, при докинге красителя 1.3, представляющего собой бензоксазолильное производное, с эндорибонуклеазой “дикого” типа $E_{tot} = -83.8 \pm 1.8$ ккал · моль⁻¹. Отметим, что для его аналогов 1.1 и 1.5 получены меньшие по абсолютной величине на ~30–44 ккал · моль⁻¹ значения E_{tot} . Возможно, здесь так же как и в случае скварилиевых красителей, играет роль стерический фактор, понижающий E_{tot} (по абсолютной величине) для более объемистых красителей 1.1 и 1.5 по сравнению с 1.3.

Докинг карбоцианинов (рис. 1, структуры 2.1–2.9) с NSP15 (“дикий” тип) также показал, что эти красители могут образовывать энергетически стабильные комплексы. В частности, при докинге оксакарбоцианинов 2.3, 2.4 и 2.6 получены значения E_{tot} в диапазоне $-31.7...-63.9$ ккал · моль⁻¹.

Тиакробоцианины 2.1 и 2.2 показывают сравнимые значения E_{tot} (см. табл. 1). Положительные значения E_{tot} получены для красителей 2.5 и 2.7 (табл. 1), которые имеют объемистые заместители в гетероядрах.

Отрицательные значения E_{tot} получены для большинства пентаметинцианиновых (дикарбоцианиновых) красителей (в частности, для тиадикарбоцианина 3.2 и его окса-аналога 3.4) с NSP15, что может свидетельствовать о стабильности межмолекулярных комплексов этих красителей. Для красителей 3.1 и 3.3 получены положительные зна-

чения E_{tot} (2.7 ± 1.57 и 4.1 ± 2.01 ккал · моль⁻¹ соответственно). Значения энергий электростатического взаимодействия и Ван-дер-Ваальса для большинства пентаметинцианиновых красителей (за исключением 3.7) оказались отрицательными; для красителей 3.2 и 3.3, имеющих заместители $-OCH_3$, получены наименьшие значения E_{el} (табл. 1).

Изучение взаимодействия с NSP15 анионных гептаметинцианиновых красителей (соединения 4.1–4.5) показало, что для части этих красителей энергетически возможно нековалентное взаимодействие, приводящее к образованию стабильных комплексов ($E_{tot} < 0$). Для красителей 4.2 (оксацанин) и 4.4 (индо-производное) получены положительные E_{tot} (18.3 ± 1.01 и 8.9 ± 2.8 ккал · моль⁻¹ соответственно).

Значения E_{el} и E_{vdW} для большинства гептаметинцианиновых красителей оказались отрицательными, исключение – краситель 4.5 (для него получено $E_{vdW} = 5.1 \pm 3.31$ ккал · моль⁻¹). Для пентаметинцианиновых (дикарбоцианиновых) красителей 3.1–3.6 значение E_{el} оказалось в 3.4–24 раз выше по абсолютной величине, чем E_{vdW} ; для гептаметинцианиновых красителей 4.1–4.4 E_{el} выше по абсолютной величине, чем E_{vdW} в 5.2–9.4 раз. Это свидетельствует о значительном вкладе сил электростатического взаимодействия в стабилизацию комплексов краситель–белок. Действительно, молекулярный докинг индокарбоцианинов с четырьмя сульфогруппами (соединения 2.9, 3.7, 4.5) дает значительно более отрицательные значения полной энергии ($E_{tot} \sim -77.8...-96.0$ ккал · моль⁻¹) из-за большого вклада электростатического взаимодействия в стабилизацию комплексов ($E_{el} \sim -87.6...-90.5$ ккал · моль⁻¹). Наиболее отрицательные значения E_{tot} получены для индокарбоцианина 2.9 при докинге с NSP15. Красители с большей длиной полиметиновой цепи показывают более умеренные значения E_{tot} (см. табл. 1).

Докинг анионных цианиновых красителей с мутантными формами целевого белка (S294A, S294T, Y343C и Y343H) показал практически одинаковые энергетические параметры связывания по сравнению с “диким” типом. Для монометинцианина 1.1 величины полной энергии, полученные для четырех мутантных форм, практически совпадают с E_{tot} , полученной для исходного белка: -53.62 ± 0.49 и -53.2 ± 0.86 ккал · моль⁻¹ соответственно. Аналогичная ситуация прослеживается и в случае других анионных красителей. Так, для пентаметинцианинового окса-красителя 3.4 величины E_{tot} , полученные при докинге с S294A, S294T, Y343C и Y343H, составляют -74.3 ± 1.56 ккал · моль⁻¹; для гептаметинового окса-красителя 4.2 докинг с мутантными формами дает $E_{tot} = -58.9 \pm 1.09$ ккал · моль⁻¹, что с учетом доверительного интервала

Таблица 1. Результаты молекулярного докинга анионных цианиновых красителей с NSP15 (“дикий” тип): общая энергия взаимодействия, энергии Ван-дер-Ваальса и электростатического взаимодействия (ккал · моль⁻¹)

Краситель	X	E_{tot}	E_{vdW}	E_{el}
1.1	S	-53.2 ± 0.86	-14.2 ± 3.34	-43 ± 4.12
1.2		-61.4 ± 0.66	-5.1 ± 7.7	-73.3 ± 7.05
1.3	O	-83.8 ± 1.81	0.25 ± 3.15	-73.8 ± 3.75
1.4		-76.2 ± 2.91	-0.96 ± 2.87	-74.6 ± 5.36
1.5	C(CH ₃) ₂	-39.8 ± 1.42	-5.9 ± 2.7	-50.3 ± 4.98
2.1	S	-49.6 ± 0.77	-4.4 ± 5.55	-83.3 ± 5.05
2.2		-51.7 ± 2.36	-1.5 ± 3.03	-83.7 ± 3.57
2.3	O	-57.9 ± 0.48	-4.2 ± 5.19	-67.3 ± 6.66
2.4		-55.1 ± 0.34	-11.1 ± 8.19	-62.7 ± 8.15
2.5		26 ± 1.07	-6.5 ± 4.71	-68.6 ± 3.97
2.6		-59.3 ± 0.42	-14.0 ± 1.06	-58.0 ± 3.15
2.7		36.9 ± 3.71	-3 ± 7.98	-71.7 ± 5.78
2.8		C(CH ₃) ₂	-36.4 ± 1.45	-7.6 ± 4.58
2.9	C(CH ₃) ₂	-96 ± 3.39	4.6 ± 4.93	-90.5 ± 6.97
3.1	S	2.7 ± 1.57	-8.1 ± 3.12	-58.3 ± 4.27
3.2		-55 ± 0.55	-3.9 ± 6.07	-67.7 ± 5.24
3.3	O	4.1 ± 2.01	-3.5 ± 6.51	-86.6 ± 7.85
3.4		-74.7 ± 2.32	-6.3 ± 10.93	-65.6 ± 11.8
3.5	S	-23.5 ± 1.04	-9.7 ± 6.02	-49.9 ± 5.39
3.6	C(CH ₃) ₂	-19.7 ± 0.69	-14.4 ± 6.82	-48.8 ± 2.6
3.7	C(CH ₃) ₂	-86.7 ± 0.28	4.3 ± 5.69	-87.6 ± 8.05
4.1	S	-43.4 ± 2.39	-9.8 ± 4.09	-61.9 ± 4.41
4.2	O	18.3 ± 1.01	-6.7 ± 6.22	-63.3 ± 6.03
4.3		-58.4 ± 0.88	-9.8 ± 4.56	-62 ± 4.51
4.4	C(CH ₃) ₂	8.9 ± 2.8	-11.2 ± 3.44	-58.1 ± 3.42
4.5	C(CH ₃) ₂	-77.8 ± 2.44	5.1 ± 3.31	-88.6 ± 5.54

соответствует данным табл. 1. Исключение составляет лишь оксакарбоцианиновый краситель 2.3, при докинге с мутантными формами белка для которого обнаружено уменьшение E_{tot} на 7% ($E_{tot} = -62.0 \pm 1.29$ ккал · моль⁻¹).

Анионные цианиновые красители могут связываться с NSP15 SARS-CoV-2 в различных конформациях. Монометинцианины характеризуются скрученной (неплоской) конфигурацией их молекул в связанных состояниях; однако для окса-красителей 1.3, 1.4 возможны почти плоские (энергетически оптимальные) конфигурации. Для монометинцианиновых красителей анализ поверхностного связывания не выявил наличия водородных связей и межатомных конфликтов.

Ближкие к плоским конфигурации характерны для карбоцианинов 2.1, 2.2, 2.3. В частности, для 2.2 докинг с NSP15 (“дикий” тип) дает близкую к *транс*-изомерам конфигурацию красителя (рис. 3а); при этом метильная группа почти перпендикулярна плоскости одного из гетероциклов, а другой гетероцикл повернут на угол ~15°. Для взаимодействия оксакарбоцианина 2.3 и индокарбоцианина 2.8 также характерны почти плоские *транс*-конфигурации, при этом *мезо*-заместители выводятся за пределы плоскостей. Для красителей 2.4 и 2.6 расчеты дают “закрученные” на ~45° перпланарные формы. Докинг красителя 2.9, имеющего дополнительную пару сульфогрупп, с NSP15

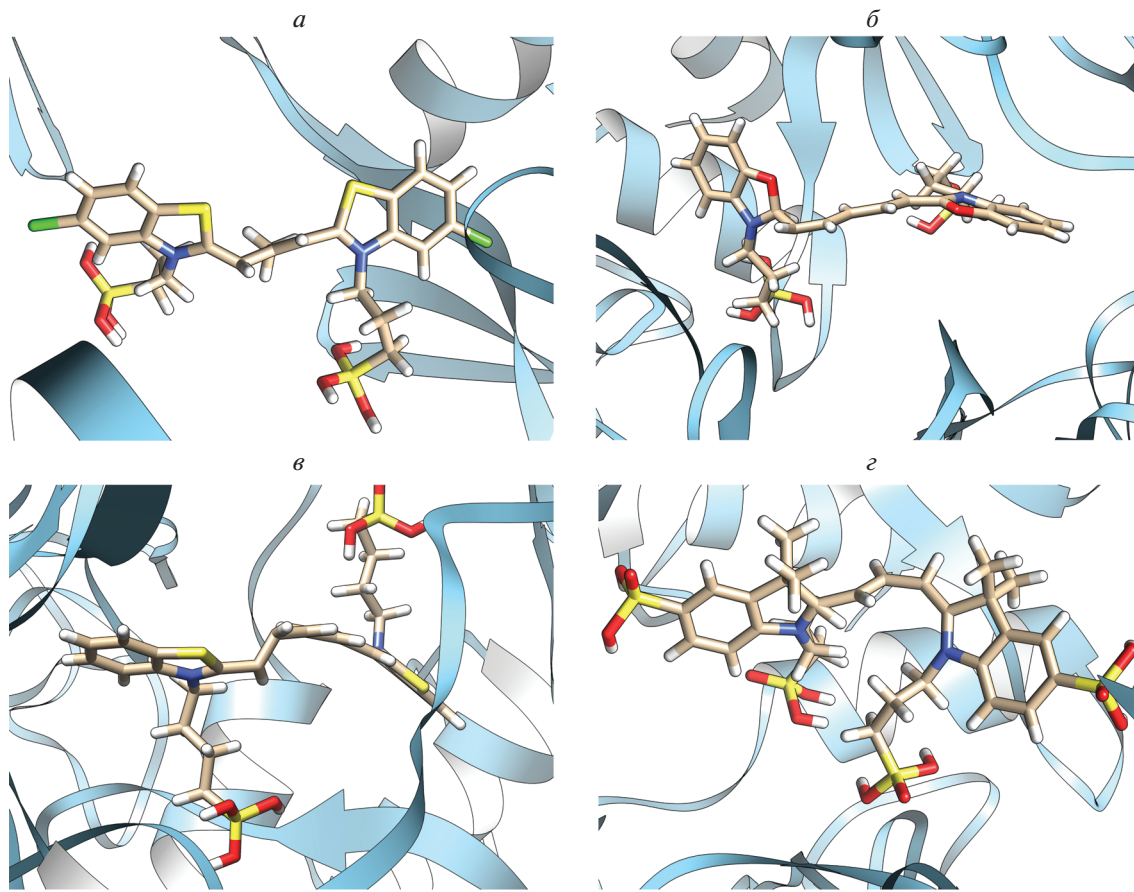


Рис. 3. Результаты докинга анионных красителей с NSP15: 2.2 (а), 3.4 (б), 4.1 (в) и 2.9 (г).

(“дикий” тип) предполагает искаженную конфигурацию, близкую к *транс*-изомеру (рис. 3г).

Докинг пентаметинцианинов 3.1, 3.2 с NSP15 дает сильно изогнутые из-за искаженных валентных углов полиметиновой цепи структуры, в которых концевые гетероциклы располагаются практически параллельно друг к другу. Красители 3.4 (рис. 3б) и 3.7 (имеет 4 сульфогруппы) приобретают при взаимодействии с NSP15 скрученные (близкие к перпланарной) структуры; красители не образуют водородных связей и межатомных контактов с белком.

Для докинга гептаметинцианиновых красителей получены различные варианты структур молекул, в основном для них характерны изогнутые структуры. При докинге красителя 4.1 искажения “скручивают” концевые гетероциклические остатки, и заместители в положениях 3 и 3' могут выводиться из плоскости молекулы (рис. 3в). Для красителя 4.2 получена структура с практически перпланарным положением концевых гетероциклов, краситель не образует водородных связей и межатомных контактов с NSP15. Красители 4.3 и 4.5 (4 сульфогруппы) имеют серповидно изогнутые структуры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты молекулярного докинга показали, что на нековалентное комплексообразование цианиновых и скварилиевых красителей с NSP15 SARS-CoV-2 существенное влияние оказывают кулоновские взаимодействия в структуре краситель–белок. Положительные значения полной энергии комплекса ($E_{tot} > 0$) для катионных цианиновых (К1–К7) или нейтральных скварилиевых (СК1–СК5) красителей могут указывать на нестабильность комплексов этих красителей с NSP15. Для многих анионных красителей получены отрицательные значения E_{tot} , что может характеризовать более высокую стабильность соответствующих комплексов. Для индокарбоцианинов с четырьмя сульфогруппами, увеличивающими отрицательный заряд молекулы красителя (2.9, 3.7 и 4.5), получены еще более благоприятные результаты. Кроме того, для большинства анионных красителей значение E_{el} значительно превышает по абсолютной величине E_{vdW} , что также указывает на ведущую роль кулоновских сил в образовании комплексов. Аналогичное влияние кулоновского взаимодействия на устойчивость

комплекса краситель–белок было обнаружено при докинге цианиновых красителей со спайк-протеином SARS-CoV-2 [16].

Структурные различия в молекулах красителя существенно влияют на стабильность комплексов. Для окса-красителей в целом были получены более отрицательные значения E_{tot} , чем для их аналогов с тиазольными и индольными концевыми гетероциклами. Возможно, это связано с более компактной структурой окса-красителей, чем тиа- и индо-аналогов.

По критерию величины E_{tot} , характеризующей устойчивость комплексов с NSP15, можно выделить анионные скварилиевые красители СК1.2, СК1.5, монометинцианиновые анионные красители 1.1–1.5, тиа- и оксацианины 2.1–2.4, 2.6, 3.2, 3.4, 3.5, 4.1, 4.3, индоцианины 2.8, 3.6, а также цианины с четырьмя сульфогруппами 2.9, 3.7 и 4.5.

При использовании красителей для спектральной детекции белков, наряду с устойчивостью комплексов краситель–белок, важную роль играет изменение спектрально-флуоресцентных свойств красителей при комплексообразовании. Для мезо-замещенных карбоцианинов (триметинцианинов) характерен более резкий рост интенсивности флуоресценции и более существенные изменения в спектрах из-за сдвига динамического *цис-транс*-равновесия, что позволяет обнаруживать очень низкие концентрации биомолекул при использовании красителей в качестве флуоресцентных зондов [7, 8, 10, 12, 26]. Учитывая вышеизложенное, перспективными в качестве таких зондов являются карбоцианины 2.1–2.4 и 2.6.

В комплексах карбоцианинов с биомолекулами наблюдается усиление процесса интеркомбинационной конверсии в триплетное состояние, что приводит к заселению триплетных энергетических уровней [27–29]. Это определяет возможность фотохимических реакций с участием возбужденных триплетных состояний красителей в этих системах и потенциально может привести к образованию активных форм кислорода (фотодинамический эффект). Таким образом, цианины могут быть перспективны для индуцированного светом повреждения компонентов вируса (белков, с которыми связывается краситель) и, таким образом, инактивации самого вируса. Отметим, что УФ-фотоинактивация коронавирусов MERS-CoV и SARS-CoV-2 в сыворотке крови рибофлавином в настоящее время изучается [30, 31]. С рассматриваемой точки зрения мезо-замещенные тиакарбоцианины 2.1 и 2.2 можно выделить для дальнейших практических исследований в этой области.

Следует отметить, что при докинге цианиновых красителей с мутантными формами NSP15 – S294A, S294T, Y343C и Y343H – величина E_{tot} практически совпадала с таковой для “дикого” типа NSP15 (лишь для красителя 2.3 при докинге

с мутантными формами обнаружено небольшое уменьшение E_{tot}). Это может свидетельствовать о действенности цианиновых красителей-зондов не только для исходной формы вируса SARS-CoV-2, но и для его мутантных форм, что особенно актуально в настоящее время, когда мутантные формы SARS-CoV-2 получают все большее распространение в мире.

Молекулярная графика и анализы, выполненные с помощью программы UCSF Chimera, разработаны Ресурсом для биокомпьютеров, визуализации и информатики Калифорнийского университета в Сан-Франциско при поддержке NIH P41-GM103311.

Работа выполнена в рамках госзадания № 001201253314 ИБХФ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saarnio V.K., Salorinne K., Ruokolainen V.P. et al. // *Dyes Pigm.* 2020. V. 77. P. 108282; <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108282>
2. Eriksson M., Hardelin M., Larsson A., Bergholtz J., Akerman B. // *J. Phys. Chem. B.* 2007. V. 111. P. 1139; <https://doi.org/10.1021/jp064322m>
3. Soto C.M., Blum A.S., Vora G.J. et al. // *J. Amer. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 5184; <https://doi.org/10.1021/ja058574x>
4. Robertson K.L., Soto C.M., Archer M.J., Odoemene O., Liu J.L. // *Bioconjugate Chem.* 2011. V. 22. P. 595; <https://doi.org/10.1021/bc100365j>
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. Gopika G.S., Prasad P.M.H., Lekshmi A.G. et al. // *Mater. Today: Proceedings.* 2021. V. 46. P. 3102; <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.02.622>
7. Татиолов А.С., Пронкин П.Г., Шведова Л.А., Панова И.Г. // *Хим. физика.* 2019. Т. 38. № 12. С. 11; <https://doi.org/10.1134/S1990793119060290>
8. Бычкова А.В., Пронкин П.Г., Сорокина О.Н., Татиолов А.С., Розенфельд М.А. // *Коллоид. журн.* 2014. Т. 76. № 4. С. 420; <https://doi.org/10.7868/S002329121404003X>
9. Пронкин П.Г., Татиолов А.С. // *Химия высоких энергий.* 2009. Т. 43. № 6. С. 527; <https://doi.org/10.1134/S0018143909060101>
10. Пронкин П.Г., Татиолов А.С. // *Журн. прикл. спектроскопии.* 2015. Т. 82. № 3. С. 429; <https://doi.org/10.1007/s10812-015-0126-8>
11. Аниковский М.Ю., Татиолов А.С., Пронкин П.Г. и др. // *Химия высоких энергий.* 2003. Т. 37. № 6. С. 445; <https://doi.org/10.1023/B:НЕС.0000003399.44000.ec>
12. 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>
13. Beg M.A., Athar F. // *Pharm. Pharmacol. Intern. J.* 2020. V. 8. P. 163; <https://doi.org/10.15406/ppij.2020.08.00292>

14. *Tazikeh-Lemeski E., Moradi S., Raoufi R. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2021. V. 39. № 13. P. 4633; <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1779133>
15. *Al-Masoudi N.A., Elias R.S., Saeed B.* // Biointerface Res. Appl. Chem. 2020. V. 10. P. 6444; <https://doi.org/10.33263/BRIAC105.64446459>
16. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 3; <https://doi.org/10.31857/S0207401X2102014X>
17. *Guedes I.A., Barreto A.M.S., Marinho D. et al.* // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 3198; <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82410-1>
18. *dos Santos K.B., Guedes I.A., Karl A.L.M., Dardenne L.* // J. Chem. Inf. Model. 2020. V. 60. P. 667; <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00905>
19. *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>
20. *Guedes I.A., Costa L.S.C., dos Santos K.B. et al.* // Sci. Rep. 2021. V. 11. P. 5543; <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84700-0>
21. *Kim Y., Jedrzejczak R., Maltseva N.I. et al.* // Protein Sci. 2020. V. 29. P. 1596; <https://doi.org/10.1002/pro.3873>
22. *Olsson M.H.M., Søndergaard C.R., Rostkowski M., Jensen J.H.* // J. Chem. Theory Comp. 2011. V. 7. P. 525; <https://doi.org/10.1021/ct100578z>
23. *Hanwell M.D., Curtis D.E., Lonie D.C. et al.* // J. Cheminformatics. 2012. V. 4. P. 1; <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>
24. *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>
25. *Khimenko V., Chibisov A.K., Görner H.* // J. Phys. Chem. A. 1997. V. 101. P. 7304; <https://doi.org/10.1021/jp971472b>
26. *Pronkin P.G., Shvedova L.A., Tatikolov A.S.* // J. Chem. Sci. 2020. V. 132. P. 152; <https://doi.org/10.1007/s12039-020-01858-2>
27. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С., Скляренко В.И., Кузьмин В.А.* // Химия высоких энергий. 2006. Т. 40. № 4. С. 295; <https://doi.org/10.1134/S0018143906040096>
28. *Пронкин П.Г., Татиколов А.С., Скляренко В.И., Кузьмин В.А.* // Там же. № 6. С. 451; <https://doi.org/10.1134/S0018143906060087>
29. *Татиколов А.С.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 11; <https://doi.org/10.31857/S0207401X21020163>
30. *Keil S.D., Bowen R., Marschner S.* // Transfusion. 2016. V. 56. P. 2948; <https://doi.org/10.1111/trf.13860>
31. *Keil S.D., Ragan I., Yonemura S. et al.* // Vox Sang. 2020. V. 115. P. 495; <https://doi.org/10.1111/vox.12937>

КИНЕТИКА И МЕХАНИЗМ
ХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ, КАТАЛИЗ

УДК 535-379; 541.14; 542.924; 547.535-39

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ДВУХАТОМНЫХ ФЕНОЛОВ

© 2022 г. И. Ф. Русина^{1*}, Т. Л. Вепринцев², Р. Ф. Васильев²

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова
Российской академии наук, Москва, Россия

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

*E-mail: rusina939@mail.ru

Поступила в редакцию 27.07.2021;

после доработки 16.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

Исследованы на антиоксидантную активность девять соединений, в том числе из класса катехоламинов, содержащих в качестве общего структурного фрагмента 3,4-гидроксифенил (катехол), который придает соединениям в реакциях окисления углеводородного субстрата антиоксидантные свойства. Антирадикальная активность определена хемилюминесцентным методом по перехвату пероксильных радикалов в модельной реакции инициированного окисления этилбензола (RH). Механизм ингибирования процессов цепного окисления соединениями двухатомных фенолов обеспечивается наличием двух активных гидроксигрупп с возможной внутримолекулярной водородной связью, приводящей к ослаблению связи O–H и высокой константе скорости отрыва атома водорода в реакции с пероксильными радикалами (k_{inh}). Эта реакция является доминирующей и определяет ингибирующую активность антиоксидантов в процессах окисления. Максимальную ингибирующую активность показали: 3,5- и 3,6-ди-*трет*-бутилпирокатехины, дофамин и эпикатехин.

Ключевые слова: хемилюминесценция, катехоламины, антиоксиданты.

DOI: 10.31857/S0207401X22020108

ВВЕДЕНИЕ

Двухатомные фенолы, содержащие группы OH в *орто*-положении, широко распространены в живой природе. Фрагменты пирокатехина присутствуют во многих флавоноидах. Подобные соединения играют важную роль при ингибировании нежелательных окислительных процессов в живых системах, защищая их от последствий окислительного стресса. Большой интерес к изучению полифенолов вызван способностью этих соединений снижать риск развития атеросклероза, онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний. В литературе до 90-х годов практически отсутствовали сведения об антиокислительных и биологических свойствах стерически затрудненных двухатомных фенолов группы катехоламинов. В последнее время к определению антиоксидантной активности (АОА) этих соединений приковано большое внимание. В исследованиях используются разнообразные подходы к оценке АОА. Однако результаты многих работ представляются неоднозначными. Изучение АОА природных соединений и их аналогов чаще всего проводят в гетерогенных системах, имитирующих по строению клетку живого организма — мицеллах и липосомах. Однако определенная в этих условиях АОА зависит от различных факторов. Для того чтобы исключить

влияние этих факторов, необходимо проводить исследования при окислении модельных систем в гомогенной системе. Актуальным представляется изучение АОА полифенолов при ингибировании окисления в растворе.

Поиск лекарственных средств среди соединений двухатомных фенолов и их производных представляется одним из наиболее перспективных путей создания новых препаратов для лечения таких заболеваний, как полинейропатии различной этиологии, болезни Паркинсона, Альцгеймера и осложнений после заболевания, вызванного коронавирусной инфекцией COVID-19.

Катехоламины — группа биогенных аминов, содержащих в качестве общего структурного фрагмента 3,4-дигидроксифенол (катехол), который придает этим соединениям статус антиоксидантов в реакциях окисления органических соединений. Катехоламины — водорастворимые соединения, выполняющие в живых организмах функции природных нейромедиаторов (адреналин, норадреналин, дофамин) [1–6]. Это обстоятельство поставило задачу определения ключевых кинетических характеристик антиокислительного действия и разработки удобных и надежных инструментальных методов их определения.

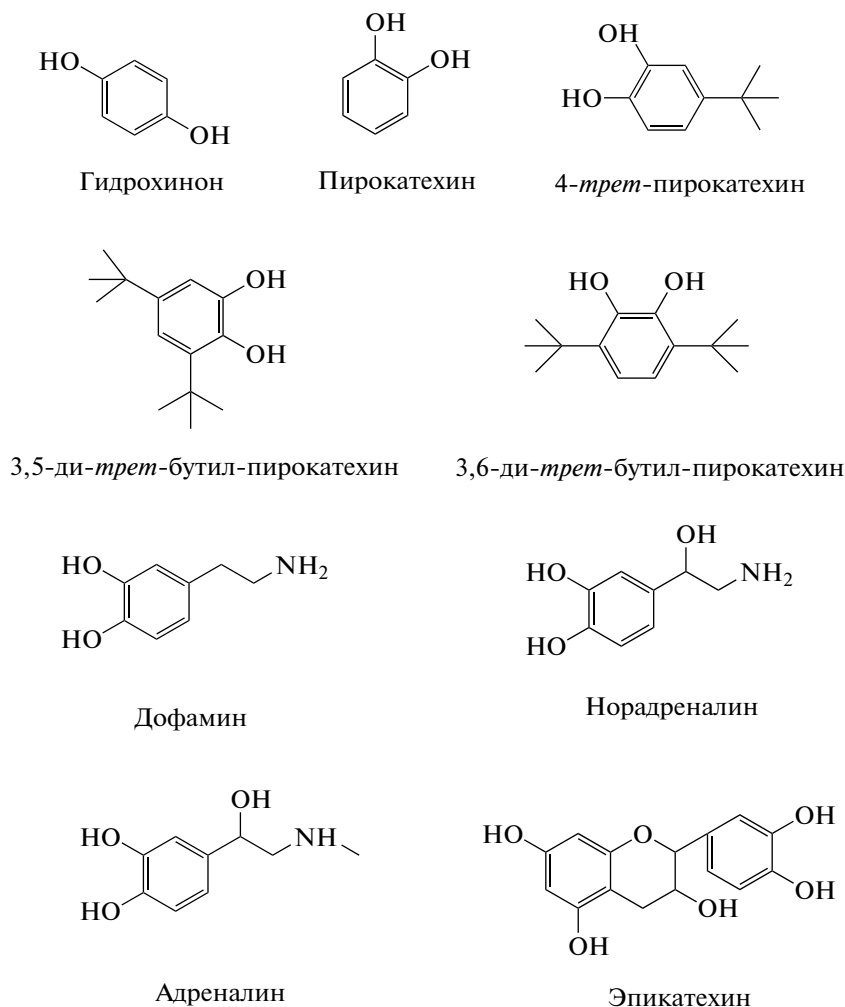


Рис. 1. Структурные формулы исследуемых двухатомных фенолов.

Для исследования кинетики окислительных процессов, в том числе с участием антиоксидантов, удобнее всего использовать хемилюминесцентные методы [7–15]. В настоящей работе рассмотрены возможности применения хемилюминесцентного метода, основанного на измерении интенсивности хемилюминесценции (ХЛ), сопровождающей инициированное окисление углеводородов, для получения количественных характеристик антирадикальной активности двухатомных фенолов: констант скорости реакции перекисного радикала с молекулой ингибитора (k_{inh}) и стехиометрического коэффициента ингибирования (f). Структурные формулы изученных в настоящей работе соединений представлены на рис. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе исследованы пять соединений двухатомных фенолов, гомологов пирокатехина, син-

тезированных и предоставленных лабораторией синтеза пространственно-затрудненных фенолов (ИБХФ РАН), и четыре соединения ряда природных катехоламинов (Fluka) на антирадикальную активность по отношению к пероксильным радикалам, ведущим цепь окисления. Антирадикальные свойства двухатомных фенолов исследовали по эффекту торможения жидкофазного окисления этилбензола (РН), инициированного термическим распадом инициатора 2,2'-азобисизобутиронитрила (АИБН). Инициатор перекристаллизовывали дважды из этанола с последующей сушкой в вакууме до постоянного веса. Растворитель хлорбензол (Merck) и модельный углеводород этилбензол (Aldrich, 99.8%) использовали без предварительной очистки. Окисляющуюся реакционную смесь (5 мл) помещали в термостатированную при 50°C кювету хемилюминометра и насыщали кислородом путем барботирования воздуха нагнетающим компрессором. Слабое первичное свечение (триplet-синглетное испускание света воз-

бужденным продуктом – ацетофеноном) усиливали за счет переноса энергии на эффективный люминофор – 9,10-дибромантрацен (ДБА) и регистрировали на хемилюминометре с фотосенсорным модулем Н7467 (Hamamatsu, Япония) с интерфейсом RS-232С.

Скорость инициированного окисления, W_i , рассчитывали с помощью соотношения

$$W_i = 2f_{\text{кл}}k_0[\text{АИБН}] = 1.2 \times 1.58 \times 10^{15} \exp(-30800/RT)[\text{АИБН}], \quad (1)$$

где $f_{\text{кл}}$ – выход радикалов из клетки ($f_{\text{кл}} = 0.6$), а k_0 – константа скорости распада инициатора, практически не зависящая от природы растворителя [16–21].

Скорость инициирования, W_i , дополнительно контролировали и измеряли непосредственно в реакционной смеси до и после опыта по кинетике ХЛ после введения известного количества стандартного ингибитора хромана (CrC_1) – 6-гидрокси-2,2,5,7,8-пентаметилхромана, что позволяло также фиксировать влияние продуктов окисления на скорость окисления (W_{O_2}).

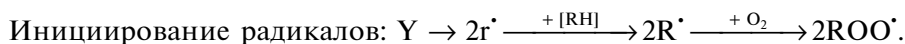
Основная проблема, возникающая при изучении АОА полифенолов в неполярной среде, связана с их крайне низкой растворимостью в этих условиях. Для приготовления рабочих растворов полифенолов приходится использовать добавки полярных растворителей. Однако полярность среды может оказывать существенное влияние на активность ингибиторов. Причиной такого влияния является образование водородной связи между группой ОН фенола и растворителем.

Это ведет к усложнению механизма действия антиоксидантов и дополнительной погрешности в измерении элементарных констант ингибирования. Поэтому была предпринята попытка подобрать такой растворитель, чтобы в нем сочетались хорошая растворимость исследуемых соединений и минимальное влияние на параметры измерений. Подходящим растворителем оказался диметилсульфоксид (ДМСО) в сочетании с ацетонитрилом (АЦН). Сначала растворяли соединение в ДМСО до концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ М, затем десятикратным разбавлением в ацетонитриле приготавливали разбавленный базовый раствор ($1 \cdot 10^{-4}$ М). Диметилсульфоксид и АЦН в контрольных измерениях не оказывали влияния на скорость инициирования в реакции окисления углеводов, поэтому в дальнейшем растворы исследуемых ингибиторов готовили с использованием ДМСО и АЦН.

Эффективную антирадикальную активность измеряли хемилюминесцентным методом, суть которого состоит в регистрации интенсивности ХЛ, сопровождающей инициированное окисление углеводорода (RH) при известной скорости инициирования (W_i). При введении ингибитора скорость окисления уменьшается, и пропорционально ей меняется интенсивность ХЛ, которая затем анализируется [17].

Окисление углеводов и липидов (RH) развивается по цепному свободно-радикальному механизму, ключевыми стадиями которого являются инициирование, продолжение и обрыв цепи [18–21]:

Схема 1



Здесь R^* и RO_2^* – свободные радикалы, Y – инициатор, ROOH – гидропероксид, первичный продукт окисления. При умеренных температурах (40–60°C), небольших степенях превращения и неизменной скорости окисления образующиеся гидропероксиды не влияют на инициирование цепей и являются нейтральными продуктами окисления, а сама реакция проходит в режиме окисления с вырожденным разветвлением [21–23].

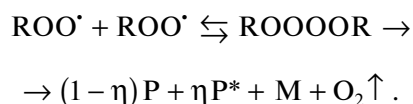
Стационарная концентрация RO_2^* в цепном процессе равна

$$[\text{RO}_2^*] = (W_i/2k_t)^{1/2}, \quad (2)$$

а скорость окисления описывается уравнением

$$W_{\text{O}_2} = \frac{k_p}{2k_t} [\text{RH}](W_i)^{1/2}. \quad (3)$$

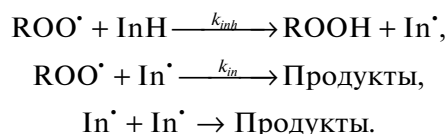
Установлено, что в процессах окисления углеводов источником ХЛ является экзотермическая реакция рекомбинации пероксильных радикалов (RO_2^*), проходящая через образование промежуточного тетроксидов с последующим распадом на продукты [19, 22]:



В этой реакции обычно выделяется энергия в 100–120 ккал/моль, и в каждом таком элементарном акте возбуждается одна молекула продукта – карбонильного соединения P* (в случае окисления этилбензола – ацетофенона), которая испускает квант света ХЛ. Скорость этой реакции $W_i = 2k_t[RO_2^*]^2$. Следовательно, измерение интенсивности ХЛ можно использовать как удобный кинетический метод, поскольку она пропорциональна $k_t[RO_2^*]^2$.

Мерой антиокислительной активности ингибиторов может служить степень тушения ими хемилюминесценции (ХЛ). В присутствии ингибиторов (InH) скорость обрыва цепей увеличивается вследствие участия ингибитора (InH) в реакциях с пероксильными радикалами:

Схема 2



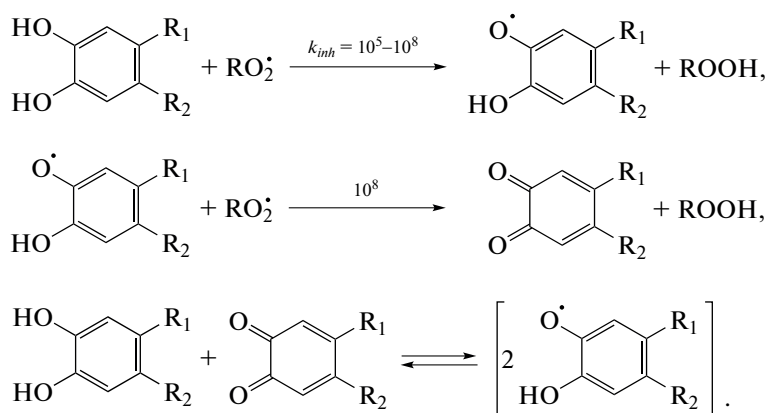
Реакции линейного обрыва цепей на ингибиторе приводят к снижению концентрации RO_2^{\cdot} и скорости ингибированного окисления, которая в простейшем случае, не осложненном побочными реакциями с участием ингибитора, определяется соотношением

$$W_{O_2} = \frac{k_p[RH]W_i}{k_{inh}f[InH]}, \quad (4)$$

где f – стехиометрический коэффициент ингибирования, показывающий, сколько обрывов цепей приходится на одну молекулу [InH] (обычно $1 < f < 2$).

Для производных пирокатехина механизм взаимодействия с пероксильными радикалами представлен следующим образом [23, 24]:

Схема 3



Конечный продукт реакции – хинон, который не взаимодействует с пероксильными радикалами (реагирует только с алкильными радикалами), но может восстанавливаться до ингибиторного радикала при взаимодействии с исходным соединением пирокатехина. Стехиометрический коэффициент ингибирования при этом $f = 2$.

При изучении кинетики окисления удобно использовать не абсолютные (I), а относительные (i) значения интенсивности ХЛ, определяемые соотношением

$$i = I/I_0 = [RO_2^{\cdot}]^2 / [RO_2^{\cdot}]_0^2 = k_t[RO_2^{\cdot}]^2 / W_i, \quad (5)$$

где I – текущее значение абсолютной интенсивности, а I_0 – значение интенсивности в отсутствие ингибитора.

Площадь светосуммы ХЛ над кинетической кривой тушения ХЛ ингибитором показывает, сколько пероксильных радикалов погибло на ингибиторе с момента введения до полного его расходования, и является количественной характеристикой стехиометрического коэффициента ингибирования f , не зависящей от k_{inh} .

Роль продуктов окисления минимизировали использованием низкой скорости инициирования $W_i \sim 10^{-9} \text{ M} \cdot \text{c}^{-1}$, которую дополнительно контролировали, измеряя непосредственно в реакци-

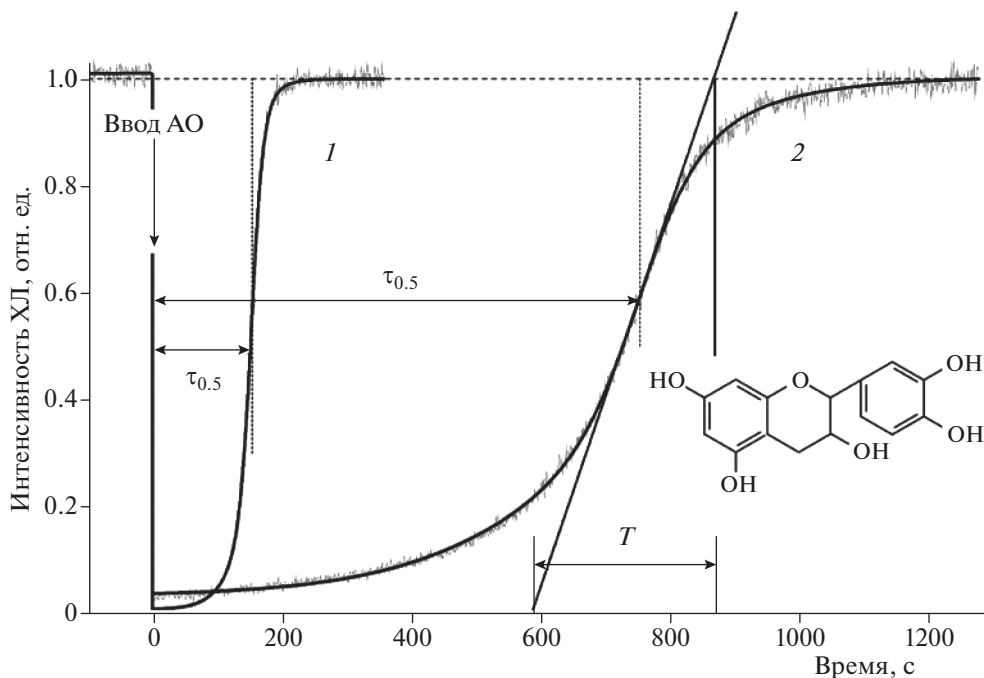


Рис. 2. Кинетические кривые тушения ХЛ при окислении этилбензола (20%-ный раствор в хлорбензоле, $W_i = 4.8 \cdot 10^{-9} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$, $[\text{ДБА}] = 2.0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, 50°C) после введения антиоксидантов: 1 – хромана ($[\text{CrC}_1] = 3.8 \cdot 10^{-7} \text{ М}$), 2 – эпикатехина ($[\text{ЭПК}] = 4 \cdot 10^{-6} \text{ М}$). На кинетических кривых стрелками обозначены периоды торможения $\tau_{0.5}$ и обратная крутизна кинетической кривой восстановления интенсивности ХЛ ($T = 1/\text{tg}\varphi$, где φ – угол наклона кривой в точке перегиба).

онной смеси до и после опыта по кинетике тушения ХЛ стандартным ингибитором, синтетическим аналогом α -токоферола – хроманом (CrC_1) в соответствии с соотношением

$$W_i = f[\text{InH}]_0/\tau_{0.5}, \quad (6)$$

в котором для хромана $f = 2$, $[\text{InH}]_0$ – концентрация ингибитора, $\tau_{0.5}$ – период торможения в секундах от момента введения хромана до выхода интенсивности свечения на уровень $0.5I_0$ по мере расходования антиоксиданта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 2 представлены кинетические кривые тушения ХЛ в процессе окисления этилбензола добавками хромана (CrC_1) и образца катехоламина (эпикатехин). По мере расходования антиоксиданта интенсивность ХЛ восстанавливается по S-образной симметричной кривой, определяемой константой скорости (k_{inh}) реакции антиоксиданта с перекисным радикалом, т.е. индивидуальной кинетической характеристикой антиоксиданта. Максимальный наклон кривой зависимости восстановления свечения ХЛ $i(t)$ в точке перегиба определяется как

$$(di/dt)_{max} = 1/T = 0.273W_i^{1/2} k_{inh}/(2k_t)^{1/2}. \quad (7)$$

Из выражения (7) следует расчетное соотношение для k_{inh}

$$(k_{inh})|_{\text{tg}\varphi} = \frac{(2k_t)^{1/2} \text{tg}\varphi}{0.273W_i^{1/2}}. \quad (8)$$

На рис. 3 приведены четыре характерные кинетические кривые тушения ХЛ после введения в модельную реакцию окисления этилбензола исследуемых антиоксидантов. Результаты измерений параметров ингибирования сведены в табл. 1 вместе с условиями эксперимента.

Как видно из табл. 1, скорости иницирования для всех АО близки, что позволило совместить их на одном графике (рис. 3).

В табл. 2 представлены результаты определения параметров антиокислительной активности двухатомных фенолов – констант скорости взаимодействия с перекисными радикалами k_{inh} и стехиометрических коэффициентов ингибирования f при использовании соотношений (8) и (6) соответственно. Для данных, представленных в табл. 1 и 2, ошибка измерения составила $\leq 15\%$.

Наличие двух фенольных ОН-групп в соседних положениях в структуре фрагмента пирокатехина приводит к образованию внутримолекулярной водородной связи, за счет которой происходит ослабление одной из связей гидроксигруппы.

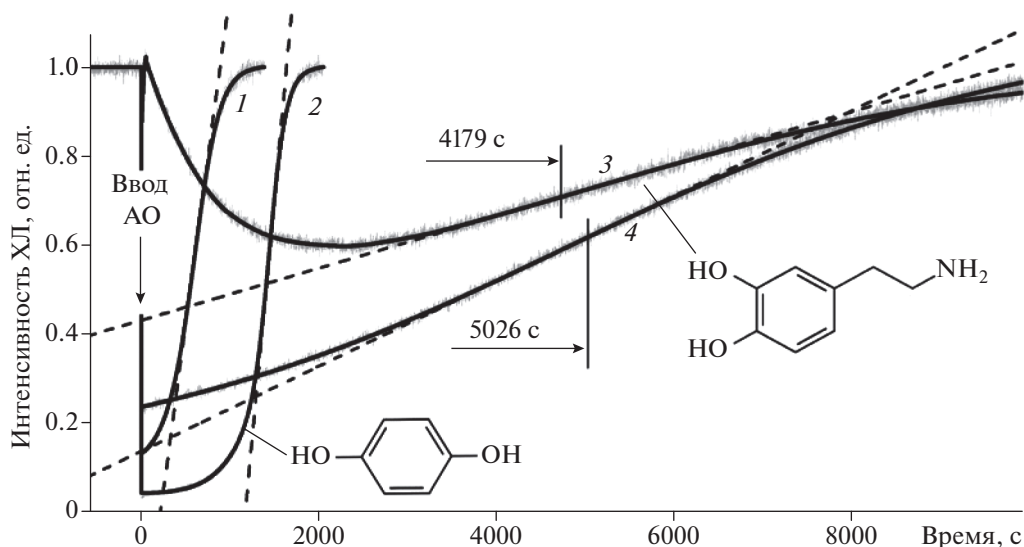


Рис. 3. Кинетические кривые тушения ХЛ при окислении этилбензола (20%-ный раствор в хлорбензоле, $W_i = 4.8 \cdot 10^{-9} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$, $[\text{ДБА}] = 2.0 \cdot 10^{-4} \text{ М}$, 50°C) после введения исследуемых антиоксидантов (1–4, см. табл. 1).

Это приводит к резкому увеличению константы скорости взаимодействия с пероксильными радикалами в сравнении с фенолом и другими двухатомными фенолами. Было показано, что упомянутое свойство сохраняется для ди-*трет*-бутилзамещенных пирокатехинов. Так 3,5- и 3,6-ди-*трет*-бутилпирокатехины по константе скорости взаимодействия с пероксильными радикалами значительно превосходят ди-*трет*-замещенные фенолы и приближаются по эффективности к α -токоферолу [23–27]. При этом стехиометрический коэффициент ингибирования $f = 2$.

Особенностью пирокатехинов является низкая устойчивость образующихся в процессе ингибирования продуктов *орто*-хинонов, что обуславливает их высокую активность по отношению к алкильным радикалам при измерениях

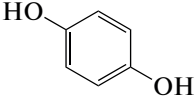
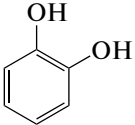
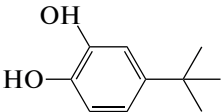
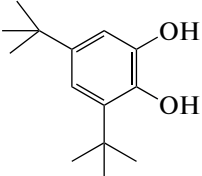
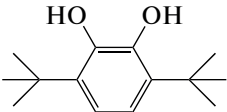
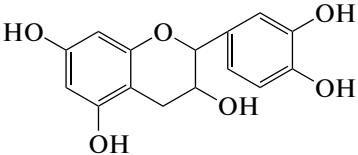
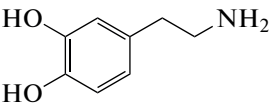
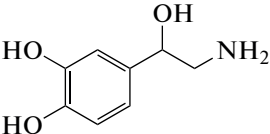
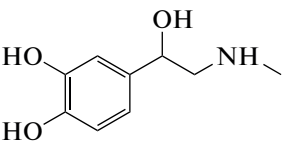
АОА катехоламинов в водно-мицеллярных субстратах [27–31, 33].

Так, согласно [32], растворимость кислорода воздуха в хлорбензоле при 50°C в 47 раз превышает его концентрацию в водно-мицеллярном субстрате, что исключает наличие достаточной концентрации алкильных радикалов для активации их реакции с *орто*-хиноном. Поэтому в использованной нами модельной реакции инициированного окисления этилбензола взаимодействие катехоламинов с алкильными радикалами не проявляется. Возможно, высокая активность адреналина в водно-мицеллярных средах может проявляться вследствие более сложного механизма торможения процесса окисления и увеличения стехиометрического коэффициента в связи с дополнительным ингибированием продуктами окисления в отличие от

Таблица 1. Параметры ингибирования хемиллюминесцентного процесса окисления этилбензола антиоксидантами, полученные при обработке данных рис. 3

№ кривой на рис. 3	Антиоксидант	$[\text{АО}], \text{ М}$	f	$k_{inh}, \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$	$W_i (\text{ М} \cdot \text{с}^{-1})$ по $\tau_{0.5}$
1	α -нафтол	$1.96 \cdot 10^{-6}$	2.0	$3.6 \cdot 10^5$	$6.54 \cdot 10^{-9}$
2	гидрохинон	$9.77 \cdot 10^{-6}$	2.0	$5.5 \cdot 10^5$	$6.78 \cdot 10^{-9}$
3	дофамин	$1.44 \cdot 10^{-5}$	1.9	$1.5 \cdot 10^5$	$5.88 \cdot 10^{-9}$
4	ионол	$1.48 \cdot 10^{-5}$	2.0	$2.4 \cdot 10^4$	$5.88 \cdot 10^{-9}$

Таблица 2. Параметры ингибирования хемилюминесцентного процесса окисления этилбензола двухатомными фенолами

Структурная формула	Название	$k_{inh}, M^{-1} \cdot c^{-1}$	f
	<i>p</i> -дигидроксибензол (гидрохинон)	$5.5 \cdot 10^5$	2.0
	<i>o</i> -диоксибензол (пирокатехин)	$2.8 \cdot 10^6$	2.0
	4- <i>tert</i> -бутил-пирокатехин	$4.0 \cdot 10^6$	2.1
	3,5-ди- <i>tert</i> -бутил-пирокатехин	$7.7 \cdot 10^6$	2.1
	3,6-ди- <i>tert</i> -бутил-пирокатехин	$6.8 \cdot 10^6$	1.8
	эпикатехин	$7.0 \cdot 10^5$	2.0
	дофамин	$1.5 \cdot 10^5$	1.9
	норадреналин	$2.4 \cdot 10^3$	0.5
	адреналин	$4.9 \cdot 10^3$	1.6

модельной реакции окисления углеводов [34–36].

ВЫВОДЫ

Предложена методика определения истинной реакционной способности двухатомных фенолов по отношению к пероксильным радикалам с использованием в качестве субстрата окисления модельного углеводорода — этилбензола, на основе которой определены параметры антиоксидантной активности (k_{inh} и f) для девяти соединений катехоламинов при окислении этилбензола. Значение стехиометрического коэффициента $f = 2$, независимо от числа гидроксильных групп.

Установлено, что двухатомные фенолы являются сильными антиоксидантами, сравнимыми по эффективности торможения процессов окисления с α -токоферолом. Максимальную ингибирующую активность показали: 3,5-ди-*трет*-бутил-пирокатехин, 3,6-ди-*трет*-бутил-пирокатехин, эпикатехин и дофамин.

Работа выполнена в рамках тем государственного задания №№ 0082-2018-0006 (регистрационный номер АААА-А18-118020890097-1), 0084-2014-0004 (регистрационный номер 001201253314).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Laguerre M., Bayrasy C., Panya A. et al.* // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2014. V. 55. № 2. P. 183.
2. *Maldonado O.S., Lucas R., Comelles F. et al.* // Tetrahedron. 2011. V. 67. P. 7268.
3. *Ruiz-Ruiz J.C., Ortiz-Vazquez E.L., Segura-Campos M.R.* // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2017. V. 57. P. 1423.
4. *Song C., Shieh C., Wu Y. et al.* // Prog. Lipid Res. 2016. V. 62. P. 41.
5. *Кольман Я., Рём К.* // Наглядная биохимия. Пер. с нем. М.: Мир, 2004.
6. *Михасько Т.А., Дубовик Б.В., Шадыро О.И., Полозов Г.И.* // Медицинские новости (Минск, РБ). 2002. Т. 82. № 4. С. 81.
7. *Fedorova G.F., Lapina V.A., Menshov V.A. et al.* // Photochem. Photobiol. 2019. V. 95. № 3. P. 780.
8. *Васильев Р.Ф., Трофимов А.В., Цаплев Ю.Б.* // Успехи химии. 2010. Т. 79. № 2. С. 91.
9. *Цаплев Ю.Б., Трофимов А.В.* // ЖФХ. 2020. Т. 94. № 11. С. 1716.
10. *Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V.* // Photochem. Photobiol. 2017. V. 93. № 2. P. 579.
11. *Цаплев Ю.Б., Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д. и др.* // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 7.
12. *Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д., Наумов В.В. и др.* // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 36.
13. *Наумов В.В., Федорова Г.Ф., Васильев Р.Ф. и др.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 24.
14. *Меньшов В.А., Кънчева В.Д., Яблонская О.И. и др.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 49.
15. *Kancheva V.D., Dettori M.A., Fabbri D. et al.* // Antioxidants. 2021. V. 10. № 4. P. 624.
16. *Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К.* Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. М.: Наука, 1965.
17. *Шляпникох В.Я., Карпунин О.Н., Постников Л.М., Захаров И.В., Вичутинский А.А., Цепалов В.Ф.* Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. М.: Наука, 1966.
18. *Frankel E.N.* Lipid oxidation. Second Ed. Chap. 1. Philadelphia: Woodhead Publishing, 2012.
19. *Васильев Р.Ф., Русина И.Ф.* // ДАН СССР. 1964. Т. 156. № 6. С. 1402.
20. *Русина И.Ф., Карпунин О.Н., Касаикина О.Т.* // Хим. физика. 2013. Т. 32. № 8. С. 49.
21. *Эмануэль Н.М., Гал Д.* Окисление этилбензола. Модельная реакция. М.: Наука, 1984.
22. *Fedorova G.F., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F., Veprintsev T.L.* // ARKIVOC. 2007. № VIII. P. 163.
23. *Азатян Н.А., Карпунина Г.В., Белостоцкая И.С., Комиссарова Н.Л.* // Нефтехимия. 1973. № 3. С. 435.
24. *Ершов В.В., Никифоров Г.А., Володькин А.А.* Пространственно-затрудненные фенолы. М.: Химия, 1972.
25. *Тихонов И.В., Рогинский В.А., Плисс Е.М., Русаков А.И.* // Башкирский хим. журн. 2006. Т. 13. № 4. С. 112.
26. *Yen G.-C., Hsieh C.L.* // Biosci. Biotechnol. Biochem. 1997. V. 61. № 10. P. 1646.
27. *Ягунов С.Е., Хольшин С.В., Кандалинцева Н.В.* // Вестн. Новосибирского гос. пед. ун-та. 2013. Т. 5. № 15. С. 5.
28. *Едимечева И.П., Островская Н.И., Полозов Г.И., Шадыро О.И.* // ЖОХ. 2005. Т. 75. № 4. С. 632.
29. *Бельков М.Б., Ксендзова Г.А., Кузовков П.В. и др.* // Журн. прикл. спектроскопии (Минск, РБ). 2007. Т. 74. № 5. С. 577.
30. *Рогинский В.А.* Фенольные антиоксиданты. Реакционная способность и эффективность. М.: Наука, 1988.
31. *Менгеле Е.А., Плащина И.Г., Касаикина О.Т.* // Коллоид. журн. 2011. Т. 73. № 6. С. 815.
32. *Battino R., Rettich T.R., Tominaga T.* // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1983. V. 12. № 2. P. 163.
33. *Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V. et al.* // Analyst. 2009. V. 134. № 10. P. 2128.
34. *Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д., Федорова Г.Ф. и др.* // Кинетика и катализ. 2010. Т. 51. № 4. С. 533.
35. *Васильев Р.Ф., Вепринцев Т.Л., Долматова Л.С. и др.* // Кинетика и катализ. 2014. Т. 55. № 2. С. 157.
36. *Shimizu T., Nakanishi Y., Nakahara M. et al.* // J. Clin. Biochem. Nutr. 2010. V. 47. № 3. P. 181.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ГРУПП ФЛУОРОФОРОВ ЛИПОФУСЦИНОВЫХ ГРАНУЛ ИЗ КЛЕТОК РЕТИНАЛЬНОГО ПИГМЕНТНОГО ЭПИТЕЛИЯ КАДАВЕРНЫХ ГЛАЗ ЧЕЛОВЕКА В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

© 2022 г. М. А. Яковлева^{1*}, А. Ш. Радченко¹, А. А. Костюков¹, В. В. Чаговец²,
А. С. Кононихин^{1,3}, М. Х. Хубецова⁴, С. А. Борзенко⁴, В. А. Кузьмин¹,
Е. Н. Николаев³, Т. Б. Фельдман^{1,5}, М. А. Островский^{1,5}

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

²Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

⁴Межотраслевой научно-технический комплекс “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Фёдорова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁵Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 27.07.2021;

после доработки 13.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

Проведено сравнительное исследование отдельных групп бисретиноидов и продуктов их окисления и деградации в хлороформных экстрактах из клеток ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека без признаков патологии (“норма”) и в случае визуализированной возрастной макулярной дегенерации. Флуоресцентный анализ, высокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия показали, что при возрастной макулярной дегенерации наблюдается повышенное содержание продуктов окисления и деградации бисретиноидов по сравнению с “нормой”. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что перечисленные методы могут быть использованы в доклинической диагностике дегенеративных заболеваний сетчатки и ретинального пигментного эпителия глаза человека.

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

DOI: 10.31857/S0207401X22020169

ВВЕДЕНИЕ

Дегенеративные заболевания сетчатки и рети-нального пигментного эпителия (РПЭ) глаза чело-века являются одной из основных причин полной или частичной потери зрения. Наиболее распро-страненным и социально-значимым заболеванием является возрастная макулярная дегенерация (ВМД) [1, 2]. В механизмах старения и дегенерации сетчатки и РПЭ важнейшая роль принадлежит так называемому “пигменту старости” – липофусци-новым гранулам (ЛГ) [3], образующимся в клетках РПЭ в результате неполной лизосомальной де-градации обломков фоторецепторов [4]. Предпо-лагается, что развитие ВМД может быть связано с прогрессирующим накоплением ЛГ. Повышен-ное содержание ЛГ в клетках РПЭ может считаться одним из маркеров риска развития ВМД.

Липофусциновые гранулы содержат более двух десятков флуорофоров, которые являются, в основном, производными полностью-*транс*-ре-тиналя (бисретиноиды и продукты их окисления) [5]. Наиболее изученным из них является бисре-тинилиденэтаноламин (А2Е) [6]. При поглоще-нии видимого света они способны генерировать активные формы кислорода (АФК), что опреде-ляет их фототоксичность [7]. Также при действии света и в присутствии кислорода в ЛГ может про-исходить фотоокисление бисретиноидных флуо-рофоров с образованием цитотоксичных альдеги-дов и кетонов [5].

Одним из перспективных методов диагности-ки дегенеративных заболеваний сетчатки и РПЭ, в том числе и патологии, является неинвазивный метод аутофлуоресценции (АФ) глазного дна.

Следует однако отметить, что метод АФ позволяет диагностировать патологию с уже проявившимися клиническими признаками. Поэтому в настоящее время для проведения доклинической диагностики стараются усовершенствовать метод АФ для извлечения дополнительной информации из суммарной аутофлуоресценции. Перспективным подходом для этого является измерение времен жизни флуоресценции (ВЖФ) при регистрации ее на определенных длинах волн – метод FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) [8, 9]. Одной из главных задач при внедрении в офтальмологическую практику метода FLIM является определение состава и флуоресцентных характеристик флуорофоров ЛГ при ВМД (далее – “патологии”) по сравнению с “нормой”.

Ранее нами было показано [10, 11], что при ВМД наблюдается повышенное содержание продуктов фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов по сравнению с “нормой”. Кроме того, получены данные анализа ВЖФ [12–14], которые показали, что численные значения ВЖФ в обоих случаях заметно не отличались, однако при “патологии” увеличивался вклад более долгоживущих окисленных бисретиноидов по сравнению с “нормой”.

Таким образом, учитывая то, что флуоресцентные характеристики окисленных и неокисленных форм флуорофоров ЛГ имеют существенные различия, а их относительное содержание заметно меняется при “патологии” по сравнению с “нормой” [10, 11], дальнейшее детальное изучение этого феномена может позволить использовать эти данные для создания доклинической диагностики ВМД и других дегенеративных заболеваний глаза.

В данной работе был проведен сравнительный анализ состава неокисленных и окисленных бисретиноидов в отдельных фракциях хлороформного экстракта, полученного из клеток РПЭ кадаверных глаз человека без признаков патологии и с визуализируемой ВМД. Для определения состава флуорофоров применен тандем методов масс-спектрометрии и ВЭЖХ-анализа [15–17]. Для анализа спектральных характеристик были использованы методы флуоресцентного анализа и регистрации кинетики затухания флуоресценции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

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

Материал. Кадаверные глаза человека получены из Глазного тканевого банка МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Фёдорова на основании договора о научном сотрудничестве между ИБХФ РАН и МНТК “Микрохирургия глаза” им. акад. С.Н. Фёдорова [10]: два глаза от донора

74 лет без клинических признаков патологии РПЭ (“норма”) и два глаза от донора 75 лет с визуализированной патологией ВМД (“патология”).

Получение из клеток РПЭ хлороформных экстрактов, содержащих бисретиноиды и их производные. РПЭ извлекали из кадаверных глаз согласно методике, описанной в работе [10]. Ретиноидные флуорофоры ЛГ экстрагировали из клеток РПЭ по методу Фолча смесью хлороформ–метанол (2 : 1) [18].

ВЭЖХ-анализ. Хроматографическое разделение бисретиноидов и продуктов их фотоокисления и фотодеградации в хлороформных экстрактах РПЭ проводили на хроматографе фирмы “Knauer” (Германия) с колонкой “Диасфер 110-С18” (4 × 250 мм, размер сорбента – 5 мкм) АО “Био-ХимМак СТ” (Россия), как описано ранее в работе [13]. В качестве стандарта использовали бисретиноид А2Е, синтезированный согласно методу, описанному в работе [19].

В результате ВЭЖХ-анализа хлороформных экстрактов были получены фракции, содержащие отдельные группы ретиноидов. Фракция 1 получена на временах удерживания 2–5 мин, фракция 2 – 7–16 мин, фракция 3 – 18–25 мин (см. ниже рис. 1).

Измерение спектров флуоресценции. Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре RF-5301PC (“Shimadzu”, Япония).

Регистрация кинетики затухания флуоресценции. Измерения времени жизни флуоресценции (ВЖФ) хлороформного экстракта РПЭ выполняли методом подсчета коррелированных по времени фотонов с использованием спектрофлуориметра FluTime 300 (“PicoQuant”, Германия) в Центре коллективного пользования “Новые материалы и технологии” ИБХФ РАН. Возбуждение флуоресценции образца проводили с использованием диодного лазера фирмы “PicoQuant” (Германия) LDH-P-C-485 (485 нм, длительность импульса – 107 пс). Сигнал флуоресценции регистрировали при длине волны 556 нм. Кинетические кривые затухания флуоресценции обрабатывали в рамках трехэкспоненциальной модели. ВЖФ и вклад отдельных групп флуорофоров в детектируемые кривые затухания флуоресценции рассчитывали по следующей формуле с учетом собственной функции прибора (instrument response function, IRF):

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

где i – номер компоненты, A – амплитуда, τ – время жизни флуоресценции. Следует отметить, что в данной работе мы использовали параметр амплитуды (A), а не интенсивности, так как целью этого анализа было показать относительное

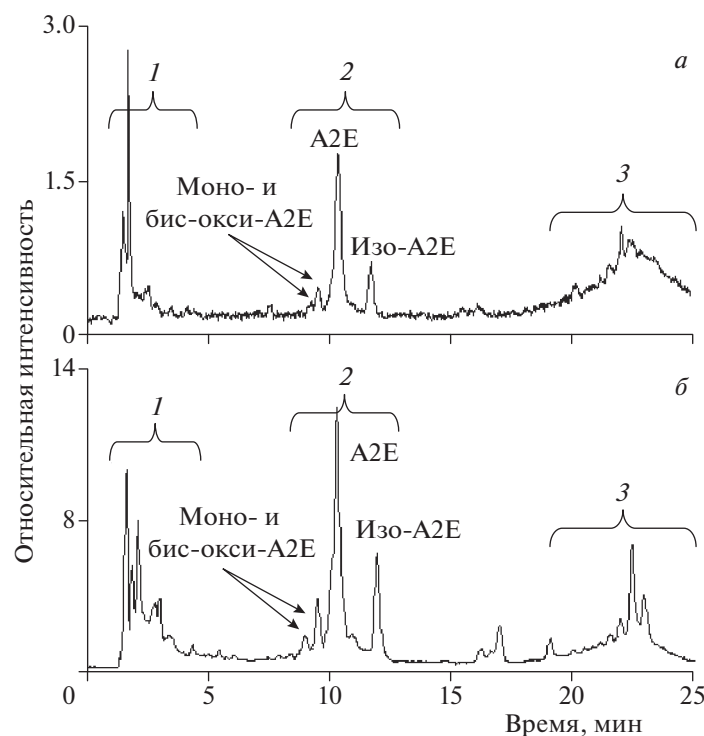


Рис. 1. ВЭЖХ-анализ хлороформных экстрактов из РПЭ двух глаз донора в возрасте 74 лет без признаков патологии (а) и двух глаз донора в возрасте 75 лет с визуализируемой ВМД (б). Группы пиков: 1 – продукты фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов [10], 2 – А2Е, изо-А2Е, моно- и бис-окси-А2Е [20], 3 – продукты модификации полностью-*транс*-ретинала и их слабоокисленные продукты [5, 21, 22]. Детектирование – по поглощению на длине волны 430 нм.

содержание исследуемых веществ, которое отображается амплитудой.

Для проведения эксперимента образцы предварительно упаривали с использованием химической вакуумной системы MZ 2C NT+AK+M+D (“Vacuubrand”, Германия), а потом растворяли в 1 мл хлороформа ($D_{485} = 0.08-0.2$). Анализ данных проведен при помощи программного обеспечения FluoFit (“PicoQuant”, Германия).

ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией. Анализ хлороформных экстрактов из РПЭ был выполнен методом ВЭЖХ с масс-спектрометрической детекцией (ВЭЖХ-МС) на хроматографе Dionex UltiMate 3000 (“Thermo Fisher Scientific”, Германия) и масс-спектрометре MaXis impact (“Bruker”, Германия). Разделение проводили методом хроматографии гидрофильного взаимодействия (HILIC, hydrophilic interaction chromatography) на колонке фирмы “Waters” (США) SpherisorbSilica (1 × 250 мм, размер сорбента – 5 мкм) со следующим градиентом: 0–0.5 мин – 94% А, 6% В; 0.5–60.5 мин – 77% А, 23% В; 61–64 мин – 94% А, 6% В, где А – ацетонитрил, В – ацетат аммония, 5 ммоль/л. Скорость потока составляла 50 мкл/мин. Масс-спектрометрический анализ выполняли с ионизацией электрораспылением, масс-спектры регистрировали в режиме положи-

тельных ионов в диапазоне m/z от 400 до 1000. Параметры источника ионов: напряжение на игле составляло 4200 В, распыляющий газ подавали под давлением 0.7 бар, поток осушающего газа – 6 л/мин при температуре 200 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный ВЭЖХ-анализ ретиноидов из клеток РПЭ глаз доноров без признаков патологии и с визуализируемой ВМД

На рис. 1 представлены результаты ВЭЖХ-анализа хлороформных экстрактов из РПЭ двух донорских глаз без признаков патологии (а) и двух донорских глаз с визуализируемой ВМД (б). Группа пиков 1 на хроматограммах соответствует продуктам фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов [10]. Группа пиков 2 соответствует А2Е, изо-А2Е, а также продуктам их моно- и бис-окисления [20]. Группа пиков 3 (согласно литературным данным) может соответствовать таким бисретиноидам как: А2-DHP-PE, А2-DHP-E [5], RAL-dimer, RAL-dimer-E, А2-GPE и продуктам их слабого окисления [21], а также высокомолекулярным продуктам полимеризации бисретиноидов [22]. Сравнительный анализ показывает, что в случае ВМД в группе 1 наблюдаются пики, соот-

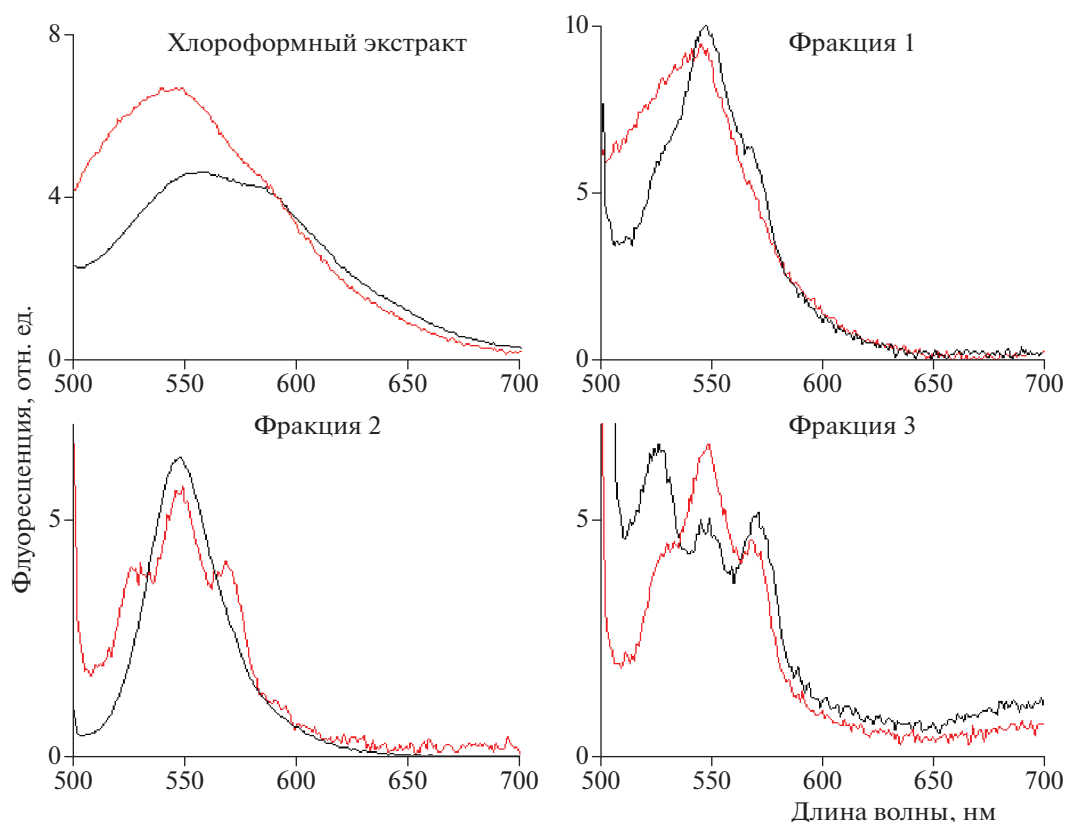


Рис. 2. Спектры флуоресценции хлороформных экстрактов из РПЭ донорских глаз и отдельных фракций этих хлороформных экстрактов (фракции 1–3), полученных в результате ВЭЖХ-анализа (рис. 1). Флуоресценцию возбуждали светом с длиной волны 488 нм. “Норма” – черная линия спектра; “патология” – красная линия спектра. Фракция 1 – продукты фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов [10]; фракция 2 – А2Е, изо-А2Е, моно- и бис-окси-А2Е [20]; фракция 3 – продукты модификации полностью-*транс*-ретинала и их слабоокисленные продукты [5, 21, 22]. Спектры хлороформных экстрактов нормированы по длине волны 592 нм.

ветствующие разнообразным продуктам фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов. Эти результаты хорошо согласуются с полученными ранее [10, 11].

Сравнительный флуоресцентный анализ хлороформных экстрактов из клеток РПЭ глаз доноров без признаков патологии и с визуализируемой ВМД

На рис. 2 представлены спектры флуоресценции исследуемых образцов и отдельных фракций этих хлороформных экстрактов. Отдельные фракции были получены в результате ВЭЖХ-анализа и соответствуют номерам обозначенных групп пиков на рис. 1.

Из рис. 2 видно, что в случае хлороформного экстракта из РПЭ донорских глаз с признаками “патологии” интенсивность флуоресценции в коротковолновой части спектра (500–550 нм) заметно больше по сравнению с “нормой”. В ранее опубликованных работах [10, 11, 13] мы предположили, что такое увеличение интенсивности

флуоресценции в коротковолновой части спектра происходит за счет повышенного содержания продуктов фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов. В настоящей работе для проверки этого предположения были получены отдельные фракции хлороформных экстрактов и зарегистрированы их спектры флуоресценции (рис. 2, фракции 1–3). Из полученных данных видно, что основной вклад в увеличение интенсивности флуоресценции в коротковолновой части спектра образца из РПЭ донорских глаз с признаками ВМД происходит за счет повышенного содержания продуктов фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов, присутствующих во фракции 1 (рис. 1, группа пиков 1).

Сравнительный анализ кривых затухания флуоресценции отдельных фракций хлороформных экстрактов из клеток РПЭ глаз доноров без признаков патологии и с визуализируемой ВМД

Для каждой полученной из хлороформного экстракта фракции (рис. 1 и 2) была зарегистри-

Таблица 1. Показатели времени жизни флуоресценции отдельных фракций хлороформных экстрактов из РПЭ глаз доноров без признаков патологии (“норма”) и с визуализируемой ВМД (“патология”); возбуждение светом с длиной волны 488 нм, детектирование — при длине волны 556 нм

Номер фракции*		τ_1 , нс	A_1 , %	τ_2 , нс	A_2 , %	τ_3 , нс	A_3 , %
Фракция 1	норма	—	—	3.2	67	7.1	33
	патология	—	—	3.4	53	7.6	47
Фракция 2	норма	0.11	33	3.7	62	6.9	5
	патология	0.1	20	3.0	55	6.0	25
Фракция 3	норма	0.3	45	2.7	45	6.4	10
	патология	0.2	35	2.9	49	6.8	16

*Номера фракций соответствуют номерам групп пиков на хроматограммах, представленных на рис. 1.

рована кинетика затухания флуоресценции на длине волны 556 нм. В рамках трехэкспоненциальной модели рассчитаны времена жизни флуоресценции и вклад отдельных групп флуорофоров (фракции 1–3) в детектируемые кривые (табл. 1).

Как показано выше, флуоресценция хлороформного экстракта из РПЭ обусловлена в основном флуорофорами ЛГ. В настоящее время определено более 20 видов флуорофоров, которые являются производными полностью-*транс*-ретиноля. Поэтому использование трехэкспоненциальной модели дает усредненные значения при расчетах характерных времен жизни флуоресценции. В связи с этим, согласно полученным результатам (табл. 1), можно считать, что значения τ_1 , τ_2 и τ_3 для разных образцов приблизительно одинаковы и в среднем равны 0.18, 3.2 и 6.8 соответственно. Полученные величины времен хорошо согласуются с нашими предыдущими исследованиями [12, 13], а также литературными данными [23].

Можно предположить, что самые короткие времена жизни флуоресценции (τ_1) соответствуют неокисленным ретиноидам из фракций 2 и 3. Во фракции 1, скорее всего, они отсутствуют, на что указывает отсутствие данной временной компоненты при детектировании флуоресценции на длине волны 556 нм. Другими словами, фракция 1 содержит практически только продукты фотоокисления и фотодеградации ретиноидов [10].

Природу соединений, характеризующихся временем τ_2 , в данном эксперименте было невозможно определить. Казалось бы, из данных хроматографического анализа основными продуктами должны быть А2Е и его изомерные формы. Однако, согласно нашим исследованиям [10], вклад этого бисретиноида в суммарную флуоресценцию при ее возбуждении светом с длиной волны 488 нм минимален. В то же время по данным флуоресцентного анализа вклад второй компоненты (τ_2) является существенным. Можно предположить, что этими соединениями могут быть моно- и/или бис-окси-А2Е (рис. 1).

Самая долгоживущая компонента (τ_3), скорее всего, соответствует продуктам фотоокисления и фотодеградации различных ретиноидов (фракция 1). Наличие этой компоненты во фракциях 2 и 3 может быть объяснено вкладом окисленных форм А2Е, а также слабоокисленных продуктов модификации полностью-*транс*-ретиноля [21, 22, 14].

Ранее нами [11, 14] было предложено определять методом FLIM [8, 9] наличие “патологии” (ВМД) не по абсолютным значениям характерных времен жизни флуоресценции, а по вкладу отдельных компонент, а именно долгоживущей компоненты τ_3 , в кинетику затухания флуоресценции.

Результаты данного исследования подтвердили наше предположение, что при “патологии” содержание продуктов фотоокисления и фотодеградации ретиноидов выше по сравнению с “нормой”. Анализ кривых затухания флуоресценции показал, что вклад (A_3), самой долгоживущей компоненты (τ_3), которая соответствует этим продуктам (фракция 1), в случае “патологии” (ВМД) увеличивается на 14% по сравнению с “нормой”. Следует отметить, что аналогичная тенденция наблюдается и для фракций 2 и 3. Таким образом, показано, что продукты фотоокисления и фотодеградации бисретиноидов имеют наибольшие времена жизни флуоресценции.

Сравнительный масс-спектрометрический анализ отдельных фракций хлороформного экстракта из клеток РПЭ глаз доноров без признаков патологии и с визуализируемой ВМД

На рис. 3 представлены масс-спектры положительных ионов, суммированные по всем временам удерживания, для каждой отдельной фракции (рис. 1 и 2). Как видно из рис. 3, наиболее заметная разница между масс-спектрами образцов “нормы” и “патологии” наблюдается в случае фракции 1. В случае “патологии” характерен больший набор интенсивных пиков (10–100% от

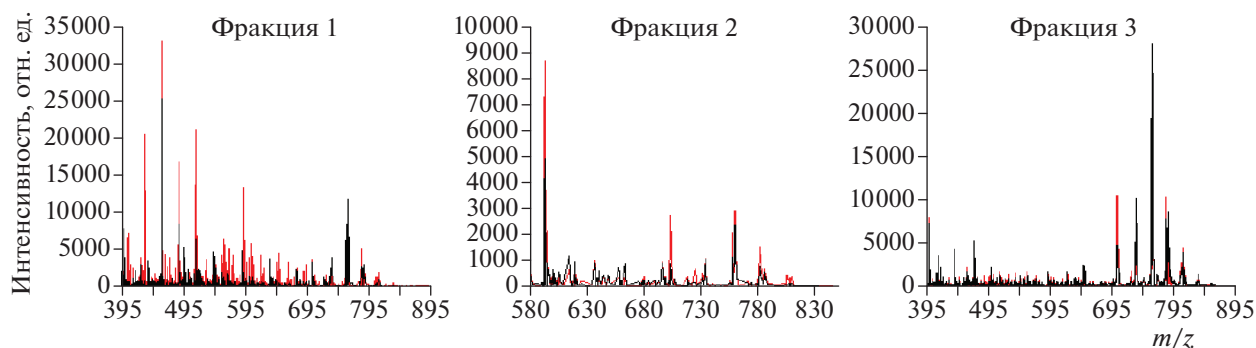


Рис. 3. Суммарные масс-спектры положительных ионов, полученные в результате анализа хлороформных экстрактов фракций 1–3. Черные линии масс-спектров – “норма”; красные линии масс-спектров – “патология”.

максимального значения интенсивности) по сравнению с “нормой”. Следует отметить, что результаты масс-спектрального анализа хорошо согласуются с хроматографическими данными и флуоресцентной детекцией (рис. 1 и 2). Все три вида анализа отчетливо указывают на увеличение количественного и изменение качественного содержания продуктов окисления и деградации бисретиноидов в случае “патологии”.

Значения m/z наиболее интенсивных пиков при масс-спектральном анализе фракций хлоро-

формных экстрактов представлены в табл. 2. Для фракции 1 большинство масс находится в диапазоне $m/z = 400–500$. Согласно литературным данным, детектируемые вещества можно отнести к продуктам окислительной деградации бисретиноидов [23]. В масс-спектрах фракции 2 детектируется основной бисретиноид A2E ($m/z = 592$), а также продукты его окисления ($592 + n \times 16$) с $m/z = 608, 624, 640, 656$ [10, 20]. Профили масс-спектров фракции 3 для “нормы” и “патологии” близки (рис. 3, фракция 3), что хорошо согласует-

Таблица 2. Значения m/z наиболее интенсивных пиков* при масс-спектральном анализе фракций хлороформных экстрактов РПЭ кадаверных глаз без признаков патологии (“норма”) и с визуализируемой ВМД (“патология”)

Фракция 1**		Фракция 2**		Фракция 3**	
норма	патология	норма	патология	норма	патология
400.3	400.3	592.5	592.4	—	413.2
426.4	426.4	608.4	608.3	471.1	471.1
—	428.4	624.5	624.5	—	473.1
459.5	459.5	640.6	640.6	703.6	703.6
—	460.5	656.2	656.2	706.5	704.5
487.5	487.5	703.5	703.6	732.6	—
496.3	—	760.5	760.5	734.6	734.5
—	512.4	783.5	783.5	758.6	758.6
515.5	515.5	—	—	760.5	760.6
—	561.4	—	—	762.6	762.6
—	576.4	—	—	782.6	782.6
—	605.4	—	—	—	784.5
—	693.5	—	—	786.6	786.6
704.6	703.6	—	—	788.6	788.6
758.6	—	—	—	—	806.5
760.6	760.6	—	—	—	810.6
—	782.6	—	—	—	—
786.6	786.6	—	—	—	—

*Приведены значения масс пиков с относительной интенсивностью 10–100% от максимального значения интенсивности (рис. 3).
 **Номера фракций соответствуют номерам групп пиков при ВЭЖХ-анализе хлороформных экстрактов (рис. 1).

ся с данными хроматографии и флуоресцентной детекции (рис. 1 и 2). Для фракции 3 характерны большие по значению массы ($m/z > 700$), которые могут соответствовать полимерным формам полностью-*транс*-ретинала, а также димерам и тримерам бисретиноидов [22].

Таким образом, масс-спектрометрический анализ показал, что основное отличие “нормы” от “патологии” в качественном и количественном содержании бисретиноидов и продуктов их окисления наблюдается во фракции 1. При “патологии” содержание продуктов со значениями $m/z < 600$ заметно больше по сравнению с “нормой”. С учетом полученных ранее результатов [10], можно предположить, что в основном эта фракция содержит продукты окислительной деградации А2Е и других бисретиноидов, и что она является наиболее перспективной для использования в качестве диагностического признака дегенеративного заболевания сетчатки глаза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее нами было показано, что при наличии признаков ВМД спектры флуоресценции как суспензии РПЭ, так и хлороформных экстрактов ЛГ из клеток РПЭ, характеризуются более интенсивной флуоресценцией в коротковолновой части спектра по сравнению с “нормой” [10, 11]. При этом ВЭЖХ-анализ показал, что в случае “патологии” наблюдаются большее разнообразие и увеличенное относительное содержание продуктов окисления и деградации бисретиноидов [10, 11]. Кроме этого, при сравнительном анализе ВЖФ хлороформных экстрактов установлено, что значения характеристических времен для “нормы” и “патологии” практически не отличаются, однако вклады долгоживущих компонент (τ_3) увеличиваются в случае “патологии” [11, 13]. На основании полученных данных сделано предположение, что при ВМД относительное содержание продуктов окисления и деградации бисретиноидов в ЛГ из клеток РПЭ выше по сравнению с “нормой”.

В настоящей работе было проведено сравнительное исследование отдельных групп бисретиноидов и продуктов их окисления и деградации для “нормы” и “патологии”. Флуоресцентный анализ, ВЭЖХ, методы измерения ВЖФ и масс-спектрометрии подтвердили ранее сделанные предположения о том, что при ВМД наблюдается повышенное содержание продуктов окисления и деградации бисретиноидов по сравнению с “нормой”. Полученные результаты позволяют заключить, что этот феномен и определяет различие в флуоресцентных свойствах ЛГ в “норме” и при “патологии”, и что он может лежать в основе разработки спектрального анализа картины АФ

глазного дна для доклинической диагностики дегенеративных заболеваний сетчатки и РПЭ глаза человека.

Исследование выполнено при финансовой поддержке грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2020-773). В работе использовались оборудование и ресурсы ЦКП ИБХФ РАН “Новые материалы и технологии”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sparrow J.R., Boulton M.E. // Exp. Eye Res. 2005. V. 80. P. 595.
2. Holz F.G., Gross-Jendroska M., Eckstein F. et al. // Ger. J. Ophthalmol. 1995. V. 4. № 6. P. 336.
3. Kennedy C., Rakoczy P., Constable I. // Eye. 1995. V. 9. P. 763.
4. Holz F.G., Schutt F., Kopotz J. et al. // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 1999. V. 40. P. 737.
5. Sparrow J.R., Gregory-Roberts E., Yamamoto K. et al. // Prog. Retin. Eye Res. 2012. V. 31. № 2. P. 121.
6. Eldred G.E., Lasky M.R. // Nature. 1993. V. 361. P. 724.
7. Boulton M., Dontsov A., Jarvis-Evans J. et al. // J. Photochem. Photobiol. B, Biol. 1993. V. 19. P. 201.
8. Schweitzer D., Schenke S., Hammer M. et al. // Microsc. Res. Tech. 2007. V. 70. № 5. P. 410.
9. Schweitzer D., Gaillard E.R., Dillon J. et al. // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012. V. 53. № 7. P. 3376.
10. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Arbukhanova P.M. et al. // Anal. Bioanal. Chem. 2015. V. 407. № 4. P. 1075.
11. Feldman T.B., Yakovleva M.A., Larichev A.V. et al. // Eye. 2018. V. 32. № 9. P. 1440.
12. Яковлева М.А., Фельдман Т.Б., Арбуханова П.М. и др. // ДАН. 2017. Т. 472. № 2. С. 226.
13. Yakovleva M.A., Radchenko A.Sh., Feldman T.B. et al. // Photochem. Photobiol. Sci. 2020. V. 19. P. 920.
14. Яковлева М.А., Радченко А.Ш., Костюков А.А. и др. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 18.
15. Васильева А.Д., Юрина Л.В., Леонова В.Б. и др. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 24.
16. Кононихин А.С., Захарова Н.В., Юсупов А.Э. и др. // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 59.
17. Иванов Д.Г., Пеков С.И., Бочаров К.В. и др. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 41.
18. Folch J., Lees M., Stanley G.H.S. // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. P. 497.
19. Parish C.A., Hashimoto M., Nakanishi K. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. № 25. P. 14609.
20. Яковлева М.А., Сакина Н.Л., Кононихин А.С. и др. // ДАН. 2006. Т. 409. № 3. С. 411.
21. Kim S.R., Jang Y.P., Sparrow J.R. // Vision Res. 2010. V. 50. P. 729.
22. Murdaugh L.S., Avale L.B., Mandal S. et al. // J. Mass Spectrom. 2010. V. 45. P. 1139.
23. Wu Y., Yanase E., Feng X. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 16. P. 7275.

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЛАЗНЫХ ПАТОЛОГИЙ НА БИОМОДЕЛИ ЯПОНСКОГО ПЕРЕПЕЛА *COTURNIX JAPONICA*

© 2022 г. Ю. С. Петронюк^{1*}, Н. Н. Трофимова¹, П. П. Зак¹, Е. А. Храмцова¹,
О. М. Андрюхина², А. С. Андрюхина², А. А. Рябцева², Т. С. Гурьева³,
Е. И. Медникова³, С. А. Титов⁴, В. М. Левин¹

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

²Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

³Государственный научный центр Российской Федерации – Институт медико-биологических проблем
Российской академии наук, Москва, Россия

⁴Научно-технологический центр уникального приборостроения Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: jps7@mail.ru

Поступила в редакцию 27.07.2021;

после доработки 11.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

Проблема глазных патологий, таких как возрастная макулярная дистрофия и детская миопизация, становится с каждым годом все актуальнее. Влияние спектрального состава искусственного освещения, сопровождающего человека, начиная от самого рождения и до зрелости, становится все более заметным. Для выявления этой закономерности проведены экспериментальные исследования с использованием эффективной животной модели – японского перепела *Coturnix japonica*, одомашненная популяция которого широко используется в качестве лабораторного животного в офтальмологии и биомедицинских дисциплинах. Для выявления различия в развитии тканей глаза при повседневном освещении с разными спектральными характеристиками были исследованы птенцы и взрослые птицы. Методами оптической когерентной томографии наблюдалась структура переднего отдела глаза, а также толщина и строение хориоретинального комплекса. Ультразвуковыми методами получены данные о возрастных изменениях глазного яблока, роговицы, передней камеры, хрусталика, стекловидного тела, хориоретинального комплекса, склеры. Измерено содержание мелатонина в тканях глаза.

Ключевые слова: онтогенез глаза, миопия, японский перепел, акустическая микроскопия, оптическая когерентная томография.

DOI: 10.31857/S0207401X22020078

ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов возникновения детской близорукости в настоящий момент имеет приоритетный характер и вызывает значительный интерес ученых. Прогрессирующий рост детской миопии связан прежде всего с массовым использованием дисплейных устройств, требующих напряженной зрительной работы. Глаза детей в возрасте до 7–8 лет, в отличие от взрослых, имеют укороченный размер по центральной оптической оси и являются дальнозоркими (+3D). По мере взросления глазное яблоко постепенно удлиняется, и в подростковом возрасте (10–14 лет) рост глаз останавливается по достижении нормальной сферической формы; в случае дальнейшей удлинения центральной оси глаза развивается близорукость (миопия). Форма глаза повседневно подстраивается под сохранение резкости изображе-

ния на сетчатке. По совокупности литературных данных в последние годы сформирована рабочая гипотеза, согласно которой миопический рост детского глаза по переднезадней оси стимулируется в результате возбуждения красночувствительных и зеленочувствительных колбочек сетчатки, а возбуждение синечувствительных фоторецепторов тормозит этот рост [1, 2]. Предположительными нейромодуляторами скорости роста могут быть мелатонин и допамин, секретируемые в противоположном циркадном ритме клетками сетчатки [3]. Мелатонин выполняет множество функций в организме человека: является сильным антиоксидантом, регулирует экспрессию большого числа генов, обладает противораковой активностью, повышает жизнеспособность клеток сетчатки, снижает внутриглазное давление. Известно, что миопия сопровождается высоким уровнем мелатонина в плазме крови, однако причинно-следственные свя-

зи этой корреляции до конца неясны и оказываются предметом современных исследований [4, 5].

За последние пять лет опубликовано около 50 работ по биомоделированию миопии на цыплятах кур [2]. Подобные исследования позволяют оценивать влияние повседневного освещения на развитие детского глаза и исследовать механизмы профилактического действия света. Во многих из этих работ показано, что при искусственной миопии, спровоцированной “дефокусом” изображения с помощью накладных линз, или же при “депривации” изображения матированными стеклами, красное освещение способствует миопическому росту глаза, а синий цвет тормозит миопизацию [1, 4, 6]. В некоторых из этих работ дополнительно исследовано содержание дофамина [4, 6]. Домашний японский перепел *Coturnix japonica* относится к отряду курообразных, и этот факт дает возможность проводить аналогичные исследования. В мировой литературе ссылок на работы, посвященные моделированию миопии на цыплятах перепелов, крайне мало [6]. Тем не менее важным преимуществом применения в качестве биомодели японского перепела является наличие высокой светозависимой циркадно-мелатониновой регуляции у этих птиц [6]. Эпифизарная система находится под тормозным контролем синечувствительных меланопсиновых ганглионарных клеток сетчатки, а ретинальная система сосредоточена непосредственно в самих фоторецепторных клетках. Выполнение работ в рамках данной биомодели позволяет исследовать как процессы миопизации, так и анализировать светорегуляторные функции мелатонина в этих процессах.

В данной работе исследовалось постнатальное развитие глаза японского перепела *Coturnix japonica* в норме и при моделировании миопии путем коррекции спектра повседневного освещения. Исследование выполнялось в том числе и в целях развития неинвазивных, прижизненных методик, позволяющих изучать *in vivo* динамику процессов формирования патологических отклонений офтальмологической направленности на лабораторных животных.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы и образцы

Для выполнения экспериментов цыплята японского перепела инкубационно выводились из яиц, приобретенных в ООО “Генофонд” (Сергиев Посад). С момента вылупления из яиц цыплят разделили на две группы с разными условиями повседневного освещения: преимущественно с синим (450 нм) и желтым (500–700 нм) участками спектра. Источники освещения прошли необходимый контроль и спектрометрическую калибровку для обеспечения физиологического уровня

освещенности ≈ 200 лк. Калибровку проводили с помощью спектрометра МК-350 компании Urt-ech (Taiwan). Суточный режим освещения задавали таймером на 9 ч (ночь) и 15 ч (день). Необходимый обогрев осуществляли инфракрасными обогревателями мощностью 50 Вт. Перед включением света разных длин волн всем птенцам давали провести сутки при стандартном освещении для адаптации к самостоятельному нахождению воды и пищи. Использовался стандартный корм для выращивания птиц ПК 5-41, разработанный специально для птенцов перепела. Содержание птиц и их вывод из эксперимента декапитацией выполнялся согласно “Правилам надлежащей лабораторной практики”, утвержденных Приказом Министерства Здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 года N 199н.

Эксперименты по измерению анатомо-топографических структур глазного яблока выполнялись в условиях *in vivo*, *in situ* и *in vitro*. Исследовались глаза японского перепела в возрасте 10, 20, 30 и 65 дней развития. В измерениях *in vivo* применялась мягкая фиксация тела птицы и ее головы в руках экспериментатора. Веки фиксировались вручную и с применением векорасширителя. Для уменьшения чувствительности глаза использовалась инстилляционная анестезия 2%-ным раствором лидокаина. Для обследования переднего и заднего сегментов глаза перепела применялась оптическая когерентная томография (ОКТ) [7, 8]. С помощью аппаратов Topcon DRI OCT Triton и SPECTRALIS Heidelberg Engineering были получены изображения переднего и заднего отделов глаза перепела с микронным разрешением (рис. 1). Поскольку фиксация взгляда птицы затруднительна, проводились многократные записи (более 20) вблизи центральной оптической оси.

Более полное исследование геометрических размеров структурных элементов глаза с точной юстировкой по центральной оси выполнялось с помощью ультразвуковых методов тех же глаз в условиях *in situ* и *in vitro*. Ультразвуковая микроскопия (УЗМ) традиционно используется в биологических [9], эмбриологических [10] и медицинских [11, 12] исследованиях. В данной работе для исследования структуры и геометрических размеров глаза перепела применялся импульсный акустический микроскоп, разработанный в ИБХФ РАН [13]. Микроскоп оснащен акустическим объективом с рабочей частотой 50–100 МГц, малой угловой апертурой 22° и фокусным расстоянием 13.5 мм. Перемещение акустической линзы осуществлялось прецизионными двигателями с шагом в 25 мкм. Основными традиционными режимами визуализации в медицинской практике являются режимы А, В и В/D-сканирование в виде сечений по глубине [1]. Режим динамической фокусировки – В/D-скан использовался для обеспечения высокого уровня контрастности

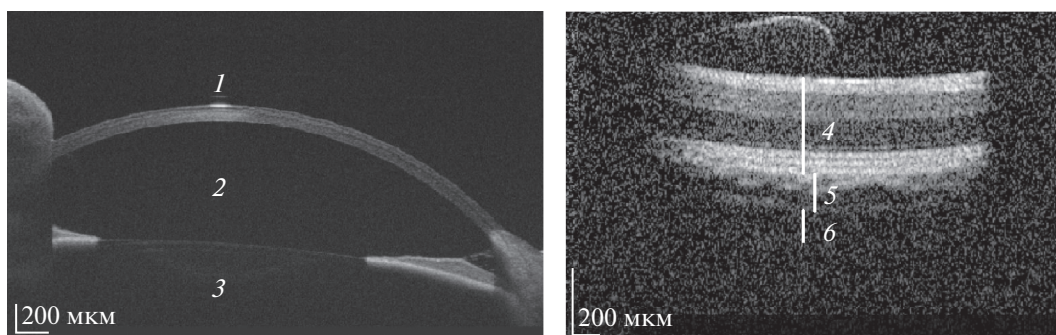


Рис. 1. Оптическая когерентная спектроскопия глаза перепела в возрасте 65 сут: *a* – изображение переднего отдела глаза (Topcon DRI OCT Triton); *b* – изображение заднего отдела (SPECTRALIS Heidelberg Engineering); 1 – роговица, 2 – передняя камера глаза, 3 – хрусталик, 4 – сетчатка с ретинальным пигментным эпителием, 5 – сосудистый слой, 6 – склера.

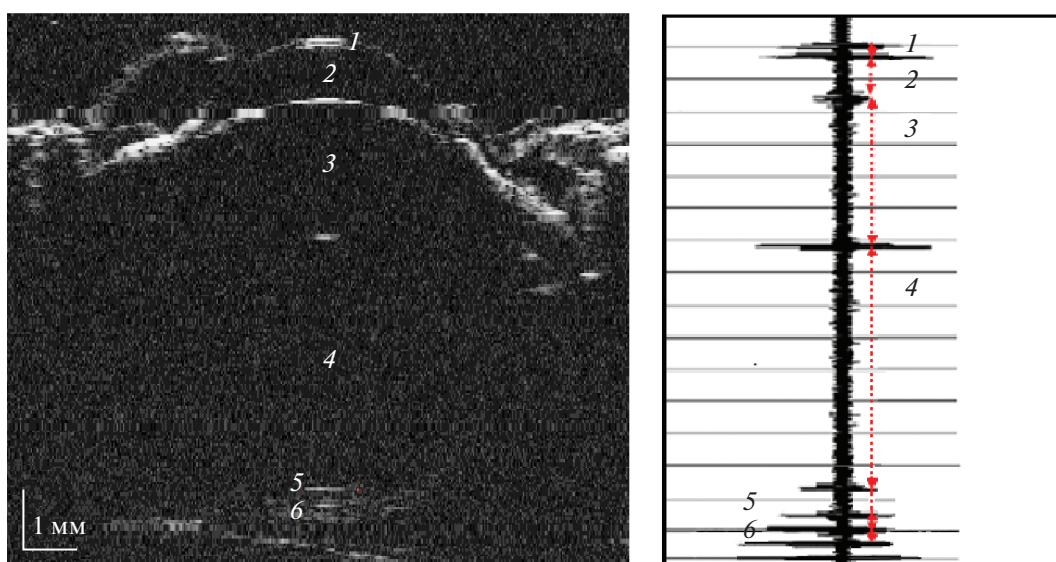


Рис. 2. Акустическая микроскопия глаза перепела в возрасте 65 сут в условиях *in situ*: *a* – В/Д-скан; *b* – эхограмма импульсов, А-скан; 1 – роговица, 2 – передняя камера глаза, 3 – хрусталик, 4 – стекловидное тело, 5 – хориоретинальный комплекс, 6 – склера.

акустических изображений по всей глубине продольного сечения. Эхо-импульсным методом измеряли продольные размеры структур глаза с погрешностью ± 15 мкм. Измерения проводили со стороны роговицы при их естественном положении в глазных орбитах. В качестве иммерсии использовали ультразвуковой гель низкой вязкости и многокомпонентный физиологический раствор (Рингер-СОЛОФАРМ). Исследования проводили при комнатной температуре (23 ± 2) °С. Время проведения одного эксперимента составляло около 20 мин. С помощью сканирующей системы микроскопа были получены эхограммы сигналов (А-скан) вдоль оптической оси глаза (рис. 2*a*). В процессе эксперимента измеряли время задержки эхо-импульсов t , отраженных от границ структурных элементов, а затем рассчитывали значе-

ния толщин (d) этих элементов: $d = 0.5vt$, где v – скорость звука в образце. Необходимо отметить, что ткани глаза являются сильно обводненными и величина скорости звука в них приближается к значению, характерному для воды – 1490 м/с. Однако значения скорости звука для роговицы, хрусталика и склеры несколько различаются, поскольку эти ткани имеют более плотную структуру [14]. В табл. 1 приведены значения скорости звука в этих тканях, использованные для определения толщины структурных элементов глаза в наших экспериментах.

Для получения большей достоверности при сравнительном анализе ультразвуковых данных птенцы перепела взвешивались и калибровались

Таблица 1. Скорость звука (м/с) в тканях глаза

Ткань глаза	Скорость звука
Роговица	1563
Хрусталик	1629
Склера	1639
Стекловидное тело	1520

по весу ± 10 г с точностью 1 г. Исследовались левый и правый глаз у трех птиц каждого возраста.

Измерения содержания мелатонина в тканях глаза выполняли на тандемном хромато-масс-спектрометре AB SCIEX QTRAP 5500 с использованием хроматографических колонок ACQUITY UPLC CSH C18 VanGuard Precolumn. Определенные органические веществ в биологических системах с использованием масс-спектрометрии высокого разрешения имеет широкое применение в научной и клинической практике [15–18]. Прибор позволяет определять содержание мелатонина в одном-двух глазах перепела. Выделение образцов тканей глаза выполняли в определенное время суток – 13 ч 30 мин. Измеряли параметры четырех видов образцов: стекловидное тело, хориоретинальный комплекс, цилиарное тело вместе с радужкой, артериальная кровь. При получении образцов энуклеированные глаза разрезали по экватору, из задней камеры пинцетом вынимали стекловидное тело и далее – хориоретинальный комплекс; из сегмента глазного яблока вынимали цилиарное тело вместе с радужкой и хрусталиком. Пробоподготовка велась без доступа посторонней жидкости на сухой пластиковой чашке Петри и с удалением избытка влаги путем протаскивания образца по сухой пластиковой поверхности. Образцы весом от 15 мг помещали в заранее взвешенные микроцентрифужные пробирки Эппендорфа, взвешивали повторно и переносили в глубокую заморозку при температуре -80°C . Время всей процедуры от момента декапитации птицы до замораживания образца составляло 5–7 мин. Непосредственно перед измерениями образцы размораживали, заливали фосфатным буфером, гомогенизировали в той же пробирке тefлоновым пестиком и центрифугировали.

Извлечение мелатонина проводили методом жидкостной экстракции. Для этого к 200 мкл супернатанта добавляли смесь из 10 мкл внутреннего стандарта, 200 мкл ацетона и 2000 мкл метилтрет-бутилового эфира. Смесь встряхивали в течение 2 мин, после чего замораживали 10 мин при -40°C . Органический слой перемещали в стеклянную центрифужную пробирку и упаривали в токе азота досуха при 40°C , а затем растворяли в

200 мкл метанол-водной смеси (1 : 1). Далее 10 мкл полученного раствора наносили на хроматографическую колонку. В эксперименте использовалась калибровочная рабочая кривая в пределах 25–5000 пг/мл. Конечные результаты выражались в пг/мг сырой массы ткани и пг/мл плазмы крови.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью оптической когерентной томографии определены значения толщины роговицы и размера передней камеры глаза перепела, характерные для особи в возрасте 65 сут развития при нормальном повседневном освещении (рис. 1). В переднем сегменте глазного яблока хорошо просматриваются размеры, форма и толщина роговицы, размеры передней камеры, радужка и передние отделы хрусталика; в заднем сегменте определяется сетчатка, сосудистая оболочка глаза и склера. Толщина роговицы составила 170 мкм, глубина передней камеры – 1250 мкм, толщина сетчатки – 300 мкм, сосудистой оболочки – 130 мкм. Данные цифры получены в условиях *in vivo*.

В табл. 2 приведены медианные экспериментальные значения для длины передне-задней оси, горизонтального диаметра глазного яблока, толщины роговицы, склеры и хрусталика, глубины передней камеры и передне-задний размер стекловидного тела для трех пар глаз перепелов различного возраста – 10, 20, 30 и 65 сут, измеренные *in situ*. Коэффициент сферичности определяли из отношения диаметра экватора глаза к осевой длине (передне-задняя ось). В табл. 2 также указаны значения (со звездочкой) для перепелов, развитие которых происходило при синем освещении. Ультразвуковые измерения показывают, что осевая длина (переднезадняя ось), размеры передней камеры, хрусталика и стекловидного тела, а также коэффициент сферичности несколько выше по сравнению со значениями для глаза при естественном освещении.

Сравнительный анализ экспериментальных значений, полученных в условиях *in situ* ультразвуковым методом (рис. 2б) и *in vivo* с помощью ОКТ (рис. 1) на одной и той же птице в возрасте 65 сут, выявил некоторые различия. Существенно различаются данные по размеру передней камеры: ОКТ – 1250 мкм, УЗМ – 900 мкм, что может быть обусловлено частичным обезвоживанием передней камеры в результате выведения перепела из эксперимента.

На рис. 3 представлено акустическое изображение (В/D-скан) глаза цыпленка перепела в возрасте 10 сут. В отличие от полученного *in situ* акустического изображения на рис. 2б, данное изображение получено *in vitro* (рис. 3а). На изображениях визуализируется роговица, передняя камера, хрусталик,

Таблица 2. Результаты ультразвуковых биометрических измерений глаза японского перепела *Coturnix japonica* в условиях *in situ*. Величина среднеквадратичного отклонения варьируется внутри погрешности измерения (± 15 мкм)

Возраст, сут	Вес, г	Осевая длина, мм	Коэффициент сферичности	Передняя камера, мм	Роговица, мм	Хрусталик, мм	Стекловидное тело, мм	Хориорегиональный комплекс, мм	Склера, мм
10	—	5.85	0.71	0.60	0.14	1.85	3.05	0.30	0.14
20	75	6.45	0.74	0.58	0.14	2.01	3.55	0.33	0.13
20*	69	7.50	0.75	0.63	0.14	2.15	4.32	0.35	0.125
30	127	7.20	0.73	0.61	0.16	2.05	3.97	0.34	0.14
65	181	8.15	0.78	0.85	0.15	2.52	4.37	0.44	0.16

* Развитие при синем освещении.

стекловидное тело, ретиальный пигментный эпителий (РПЭ), сосудистая оболочка, склера. Для более ясной интерпретации акустического изображения на рис. 3б приведено полученное нами в более ранней работе [19] гистологическое изображение строения заднего сегмента глаза.

Уровень выработки мелатонина в организме перепела в 10 раз выше, чем у человека. В практике клинических лабораторий, специализирующихся на определении содержания мелатонина в крови, существует некая норма. В нашем случае лаборатория “АРХИМЕД”, в которой были выполнены исследования на лабораторных живот-

ных, использует следующие референсные значения для человека: 15.0–30.0 пг/мл утром, менее 4.9 пг/мл днем, 8.0–40.0 пг/мл вечером (с 22 до 24), 52.3–149.4 пг/мл ночью. У детей в возрасте 1–5 лет норма в 3–4 раза выше, у лиц пожилого возраста – ниже на 20% [20]. По нашим измерениям в глазах перепела более 85% мелатонина сконцентрировано непосредственно в сетчатке, причем у цыплят оно оказывается в 20 раз выше, чем у взрослых птиц. Результаты, полученные в ходе эксперимента, представлены в табл. 3.

Ретиальный мелатонин в детском глазу отвечает за развитие миопии. Известно, что у близо-

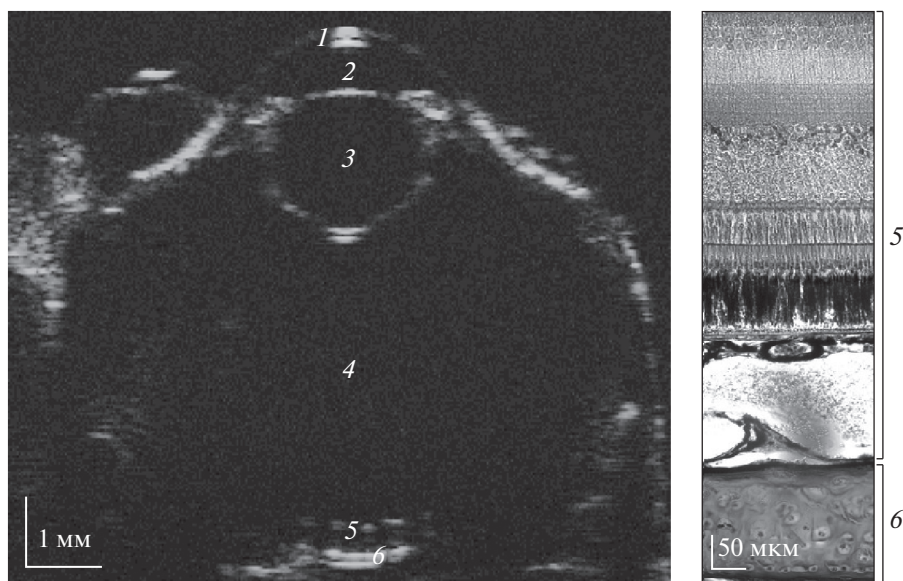


Рис. 3. Акустическая микроскопия глаза перепела в возрасте 10 сут в условиях *in vitro*: а – В/D-скан, б – гистологическое изображение; обозначения те же, что и на рис. 2.

Таблица 3. Результаты измерения содержания мелатонина в тканях глаза и сыворотке крови японского перепела *Coturnix japonica* для двух возрастов в зависимости от освещения. Относительная ошибка измерения – не более 20%

Образец	Содержание мелатонина, пг/мл	
	“желтый” свет	“синий” свет
	30 сут развития	
Сетчатка	31447	24780
	8 мес развития	
Сетчатка	1797.3 (86%)	1560.5 (88%)
РПЭ + сосудистая оболочка	214.9 (11%)	191.9 (11%)
Стекловидное тело	69.1 (3%)	19.6 (1%)
Всего в тканях глаза	2081.3 (100%)	1762 (100%)
Сыворотка крови	774.6	722.8

руких людей содержание мелатонина существенно выше, чем у людей с нормальными пропорциями глаз [3]. По результатам наших исследований условия “синего” повседневного освещения на начальном этапе развития незначительно снижают уровень мелатонина как в тканях глаза, так и в сыворотке крови на 7–15%, что, строго говоря, лежит в пределах погрешности измерений и свидетельствует лишь о тенденции.

Еще одним дополнительным звеном, определяющим светозависимое формирование оптической системы глаза, является толщина кровеносной сосудистой оболочки, подстилающей сетчатку и РПЭ и осуществляющей питание глаза. Толщина этой оболочки влияет на аккомодацию глаза и настройку резкости изображения. По нашим данным, полученным при помощи акустической микроскопии, толщина этого слоя увеличивается с возрастом в среднем со 150 (10-е сутки) до 200 мкм (65-е сутки). Кроме того, полученные данные говорят о некотором незначительном утолщении сосудистой оболочки в процессе роста птиц при “синем” освещении (7%). Это подтверждается ранее полученными нами данными гистологического исследования, где было показано, что у старых содержащихся на коротковолновом (“синем”) освещении птиц (52 недели) общая толщина сосудистой оболочки оказывается больше на 30% по сравнению с нормой [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что методы акустической микроскопии (ультразвуковой биометрии) и оптической когерентной томографии могут использоваться для исследований *in vivo*, *in situ* и *in vitro* глаза на лабораторной животной модели перепела. Измерения *in vivo* являются наиболее актуальными и позволяют выполнять многократное наблюдение в течение всего онтогенеза птицы и наблюдать из-

менения структуры глаза с возрастом и при смене спектрального состава повседневного освещения.

Экспериментальные исследования, выполненные в рамках настоящей работы, показывают, что при нормальном развитии в первой трети жизни глаза перепелов растут пропорционально (коэффициент сферичности) и линейно. Полученные нами данные о соотношении размеров основных оптических структур глаза перепела могут использоваться в качестве сравнительной шкалы при дальнейших исследованиях с помощью этой животной модели, в частности при экспериментальном воспроизведении миопических рефракционных нарушений. В дальнейшем предполагается исследовать влияние спектрального состава повседневного освещения на формирование глаза в раннем постнатальном периоде в рамках задач по моделированию детской миопии.

Коллектив выражает благодарность сотрудникам аналитической лаборатории “АРХИМЕД” (зав. лаб. А.Н. Нижник) за помощь в определении концентрации мелатонина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rucker F. // Exp. Eye Res. 2019. V. 184. P. 172.
2. Nickla D.L. // Exp. Eye Res. 2013. V. 114. P. 25.
3. Foulds W., Bharathi V., Luu D. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. V. 54. P. 8004.
4. Ostrin L.A. // Clin. Exp. Optom. 2019. V. 102. Issue 2. P. 99.
5. Kearney S., O'Donoghue L., Pourshahidi L.K. et al. // Ophthalm. Physiol. Opt. 2017. V. 37. Issue 5. P. 557.
6. Tosini G., Iuvone P. The Retina and Circadian Rhythms. Springer, 2014.
7. Авемусов С.Э., Кац М.В. // Universum: медицина и фармакология. 2017. № 4(38). С. 15.
8. Pecora R.A., Watanabe S.S., Brito G.M. et al. // Vet Ophthalmol. 2020. V. 23. № 2. P. 358.
9. Lemons R.A., Quate C.F. // Science. 1975. V. 188. P. 905.

10. *Foster F.S., Zhang M.Y., Duckett A.S. et al.* // *Investig. Ophthalm. Visual Science*. 2003. V. 44. P. 2361.
11. *Nakamura Y., Kusano K.F., Nakamura K. et al.* // *World J. Cardiovascular Diseases*. 2013. V. 3. Issue 1. P. 22.
12. *Pavlin C.J., Easterbrook M., Hurwitz J.J. et al.* // *Amer. J. Ophthalmol.* 1993. V. 116. P. 854.
13. *Закутайлов К.В., Левин В.М., Петронюк Ю.С.* // Западская лаборатория. Диагностика материалов. 2009. Т. 75. № 8. С. 28.
14. *Хилл К., Тер Хаар Г., Бэмбер Дж.* Ультразвук в медицине / Под ред. Сапожникова О.А. и др. М.: Физмалит, 2008.
15. *Яковлева М.А., Радченко А.Ш., Костюков А.А. и др.* // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 6. С. 18.
16. *Васильева А.Д., Юрина Л.В., Леонова В.Б. и др.* // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 6. С. 24.
17. *Кононихин А.С., Захарова Н.В., Юсупов А.Э. и др.* // *Хим. физика*. 2019. Т. 38. № 12. С. 59.
18. *Иванов Д.Г., Пеков С.И., Бочаров К.В. и др.* // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 6. С. 41.
19. *Сигаева А.О., Сережникова Н.Б., Погодина Л.С. и др.* // *Сенсорные системы*. 2015. Т. 29. № 4. С. 354.
20. *Анисимов В.Н.* Мелатонин как геропротектор и антиканцероген. СПб.: ЭлПринт, 2014.

МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ СПОНТАННОЙ
РЕАКТИВАЦИИ МУТАНТОВ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ,
ИНГИБИРОВАННОЙ ЭХОТИОФАТОМ

© 2022 г. С. В. Лушекина¹, А. В. Немухин^{1, 2*}, И. В. Поляков^{1, 2}, П. Массон³,
С. Д. Варфоломеев^{1, 2}, Б. Л. Григоренко^{1, 2}

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

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

³Институт фундаментальной медицины и биологии
Казанского федерального (Приволжского) университета, Казань, Россия

*E-mail: anet@icc.chem.msu.ru

Поступила в редакцию 27.07.2021;

после доработки 12.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

Методами молекулярного моделирования исследован механизм реакции реактивации двойного мутанта бутирилхолинэстеразы Asn322Glu/Glu325Glu, ингибированной фосфорорганическим соединением (ФОС) эхотиофатом. Способность данного мутанта к спонтанной реактивации была ранее показана экспериментально. Рассчитанный методом квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ) энергетический профиль пути реакции подтверждает, что подобный механизм возможен. При помощи молекулярно-динамических расчетов с потенциалами КМ/ММ исследованы пути переноса протона и определено протонированное состояние глутаминовых кислот активного сайта двойного мутанта. Методами классической молекулярной динамики исследованы возможные пути повышения его конформационной стабильности.

Ключевые слова: бутирилхолинэстераза, реактивация, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0207401X22020066

ВВЕДЕНИЕ

“Биоловушками”, “биочистильщиками” или “биоскавенджерами” называют биологические объекты (ферменты, каталитические антитела), способные связывать и/или гидролизовать фосфорорганическим соединением (ФОС). Их использование представляется наиболее эффективной альтернативой традиционным антидотам для нейтрализации или детоксикации ФОС. При этом основными требованиями являются широкий спектр действия и приемлемая стоимость производства большого количества фермента. Введение биоловухек позволяет нейтрализовать молекулы токсиканта в кровотоке прежде, чем они достигнут своих биологических мишеней, обеспечивая тем самым защиту от отравления.

Биоловушки первого поколения нейтрализуют молекулы ФОС, стехиометрически связываясь с ними. Была показана безопасность и эффективность бутирилхолинэстеразы (БХЭ) человека при использовании ее для защиты от отравлений ФОС. Однако стехиометрическая нейтрализация ФОС требует введения огромного количества до-

рогостоящих биофармацевтических препаратов. Вторым поколением являются каталитические биоловушки – искусственные ферменты или катализаторы другого рода, способные расщеплять молекулы ФОС и восстанавливаться после реакции. Эти катализаторы либо расщепляют фосфорные эфиры (фосфотриэстеразная, органофосфат-гидролазная активность), либо превращают их в менее токсичные соединения за счет окисления алкильных либо арильных цепей. Недавно было опубликовано несколько обзоров, посвященных биоловушкам второго поколения [1–6].

Анализ конфигураций интермедиатов реакций спонтанной реактивации конъюгатов с различными ФОС нативной формы, полиморфных вариантов и искусственных мутантов БХЭ показывает, что ключевую роль в ходе реакции играет ориентация каталитического гистидина [7, 8]. В случае, когда атом азота N^ε имидазольного кольца и протон, полученный им в результате фосфорилирования или активации молекулы воды, лежат в одной плоскости с атомом O^γ каталитического серина, это облегчает переход протона, необхо-

димый для реактивации фермента. Это может быть достигнуто за счет изменения положения третьего члена каталитической триады – глутаминовой кислоты. По результатам анализа кристаллографической структуры положение 322 представляется наиболее перспективным для введения мутации, облегчающей переход протона. Двойная мутация БХЭ Asn322Glu/Glu325Gly благоприятствует сохранению функциональной каталитической триады и изменению угла наклона имидазольного кольца. Мутации, затрагивающие каталитические аминокислоты, зачастую являются губительными для фермента, но в данном случае экспериментально было показано, что БХЭ с этой мутацией сохраняет эстеразную активность [9].

Экспериментально было получено свидетельство того, что этот мутант способен к спонтанной реактивации после ингибирования эхотиофатом. К сожалению, из-за сниженной конформационной стабильности этого мутанта экспериментально получить количественные характеристики реакции реактивации не представляется возможным. Экспериментальный перебор большого количества модификаций мутанта Asn322Glu/Glu325Gly для повышения его конформационной стабильности требует эффективной системы экспрессии и существенных финансовых затрат. Методы молекулярного моделирования позволяют оптимизировать этот процесс.

Таким образом, целью данной работы было изучение механизма спонтанной реактивации двойного мутанта БХЭ Asn322Glu/Glu325Gly с использованием методов суперкомпьютерного моделирования, а также исследование возможных путей повышения его конформационной стабильности.

МОДЕЛИ И МЕТОДЫ

Модели

Для построения моделей в качестве источника координат была использована кристаллографическая структура БХЭ человека из банка данных PDB 1P0I [10]. Недостающие фрагменты белковой молекулы (боковые цепи отдельных аминокислотных остатков и атомы водорода) были восстановлены, как описано в [9]; мутации были внесены, как описано в [11]. Полученные модельные системы были полностью сольватированы молекулами воды; были добавлены ионы натрия и хлора для нейтрализации заряда и для обеспечения физиологической концентрации NaCl, равной 0.15 моль/л.

Молекулярная динамика

Молекулярно-динамическое (МД) моделирование проводилось с помощью программы NAMD

[12] в силовом поле CHARMM36 [13] согласно ранее опубликованному протоколу [14]. Для каждого мутанта были получены три параллельные траектории длиной 100 нс, которые использовались для анализа.

Метод квантовой механики/молекулярной механики (КМ/ММ)

Построение энергетического профиля реакции методом КМ/ММ проводилось согласно протоколу, опубликованному ранее [9], с использованием программы NWChem [15] с функционалом электронной плотности PBE0 и базисом cc-pvdz. Молекулярно-механическая подсистема моделировалась с помощью силового поля AMBER [16].

Метод молекулярной динамики с потенциалами КМ/ММ

Молекулярно-динамические расчеты с потенциалами КМ/ММ проводились при помощи общего интерфейса программ TeraChem и NAMD [17] с использованием схемы электростатического внедрения с функционалом электронной плотности PBE0-D3 и базисом cc-pvdz и силового поля CHARMM36 для ММ-подсистемы. Параметры МД-протокола были такими же, как и для классических молекулярно-динамических расчетов. Для исследования путей переноса протона в систему был добавлен ион гидроксония между остатками Glu441 и Glu322.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спонтанная реактивация после ингибирования эхотиофатом

На рис. 1 показан профиль минимальной энергии вдоль пути реакции реактивации мутанта Asn322Glu/Glu325Gly, ингибированного эхотиофатом. На первом этапе происходит нуклеофильная атака молекулой воды, активируемой остатком каталитического гистидина His438, атома фосфора конъюгата с образованием пентакоординированного интермедиата. Энергетический барьер этой стадии составляет 8.2 ккал/моль. Далее происходит практически безбарьерная реориентация образовавшегося имидазольного катиона. Затем происходит одновременный перенос протона с имидазольного катиона на кислород каталитического серина Ser198 и перенос протона с образующегося диэтилфосфата обратно на тот же самый остаток каталитического гистидина. Известное из литературы значение $pK_a = 1.39$ [18] диэтилфосфата не противоречит этому механизму. Это приводит к высвобождению фермента с протонированным каталитическим гистидином, который может восстановить свою эффективность за счет

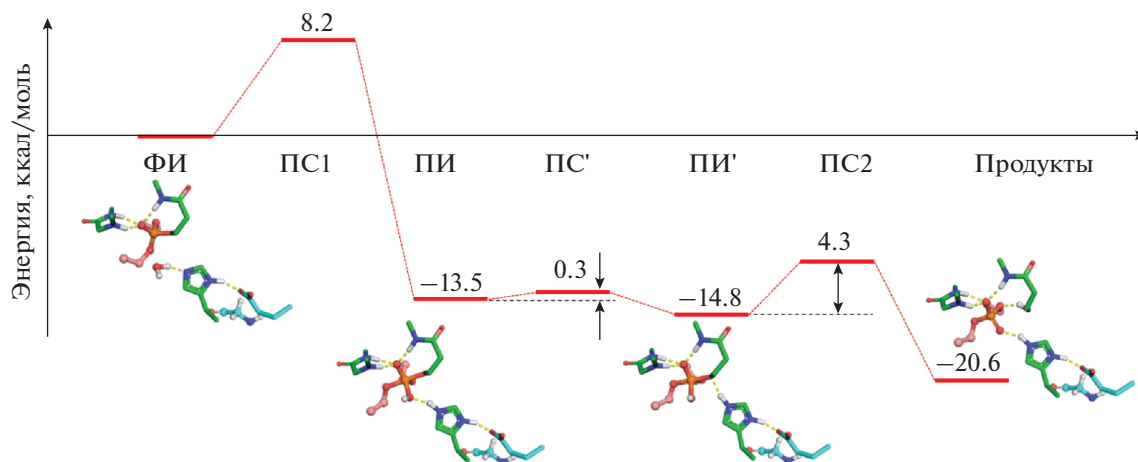


Рис. 1. Энергетический профиль реакции спонтанной реактивации мутанта Asn322Glu/Glu325Gly БХЭ, ингибированного эхотиофатом; ФИ – фермент-ингибиторный комплекс, ПС – переходное состояние, ПИ – пентакоординированный интермедиат.

переноса протона на остаток Glu197, обладающий аномально высокой основностью [8, 19, 20].

Полученные результаты свидетельствуют о протекании реакции спонтанной реактивации по механизму нуклеофильного присоединения-отщепления ($A_N + D_N$) [21]. Ориентация каталитического гистидина остатком новой каталитической глутаминовой кислоты Glu322 позволяет обеим стадиям – присоединению молекулы воды и отщеплению каталитического серина протекать с относительно низкими барьерами.

Протонированное состояние глутаминовых кислот активного сайта

Вопрос протонированного состояния двух некаталитических глутаминовых кислот активного сайта БХЭ Glu197 и Glu441, находящихся в непосредственной близости друг к другу, обсуждается в литературе на протяжении десятилетий [8]. Анализ конформационной подвижности мутанта Asn322Glu/Glu325Gly, выполненный с использованием метода цепей Маркова, показал, что протонированное состояние ионогенных групп, а именно двух некаталитических глутаминовых кислот активного сайта Glu197 и Glu441, оказывает существенное влияние на конформационные переходы в белке [9]. В рамках классической молекулярной динамики остался открытым вопрос перехода протона между молекулами воды и карбоксильными группами, окружающими активный сайт.

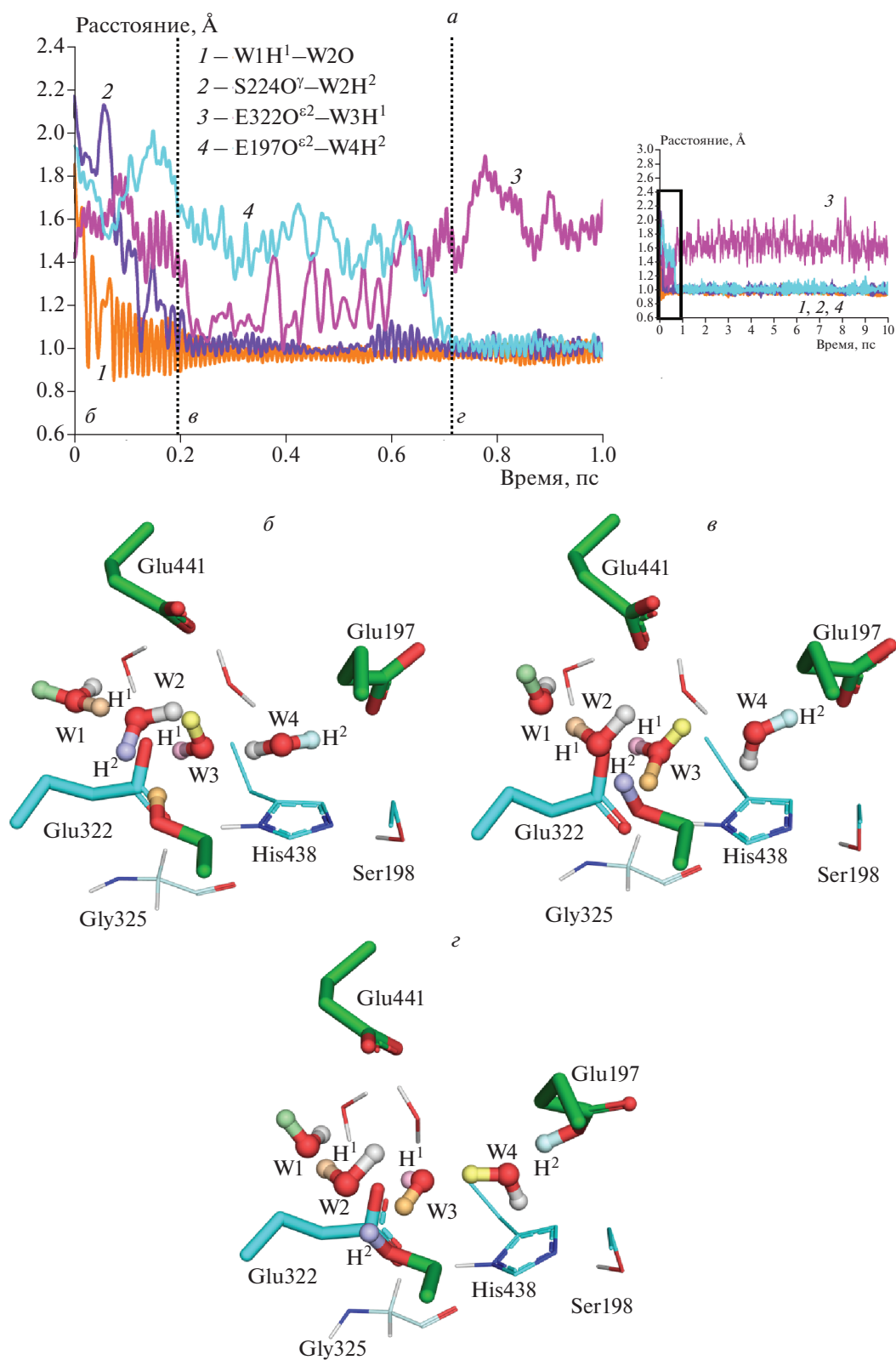
По результатам МД-расчетов с КМ/ММ-потенциалами в пределах доступных длин траекторий порядка десятков пикосекунд пути переноса протона оканчивались на Glu197. При этом пути

переноса протона включали также гидроксильную группу аминокислотного остатка Ser224, обменивающегося протоном с соседними молекулами воды, кратковременное протонирование Glu322 и лишь затем перенос протона через две молекулы воды на Glu197. После чего система с протонированным Glu197 была довольно стабильна без признаков дальнейшего переноса протона на соседние молекулы воды или аминокислотные остатки (рис. 2).

Предыдущие результаты микросекундного классического МД-моделирования и анализа с использованием метода цепей Маркова свидетельствуют о том, что такому протонированному состоянию присуща большая конформационная подвижность с преобладанием конформаций с оперативной каталитической триадой [9]. В то же самое время Glu197 в непротонированном состоянии за счет образования ионной пары стабилизирует имидазольный катион, образующийся в качестве промежуточной стадии реакции реактивации. Поддержку Glu197 в протонированном состоянии можно обеспечить путем замены Glu441 на глутамин, что предотвратит перенос протона с Glu197 при протонировании His438 [8]. Такая мутация, помимо прочих, была рассмотрена как вариант дальнейшей оптимизации рассматриваемого мутанта Asn322Glu/Glu325Gly.

Повышение конформационной стабильности

Аминокислотный остаток Asn322 не входит в непосредственное окружение каталитической триады, тем не менее он играет существенную роль в цепи водородных связей, поддерживающих целостность активного сайта. Ранее нами было пока-



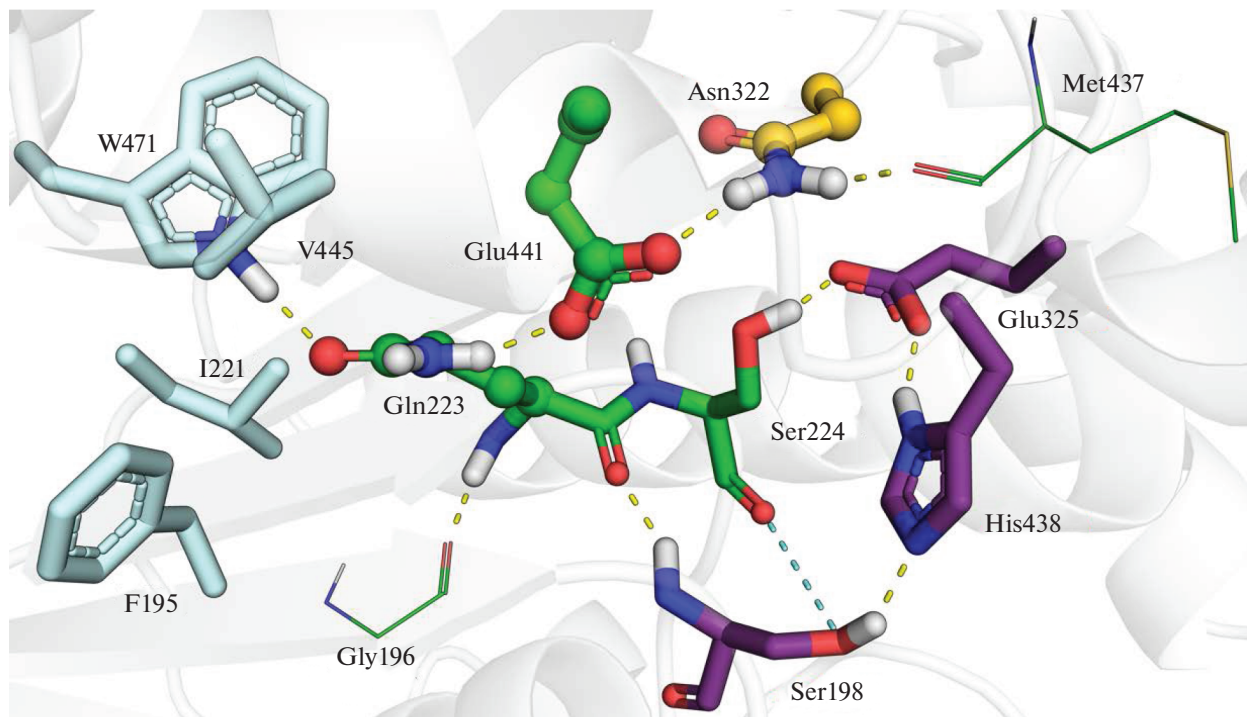


Рис. 3. Активный сайт нативной БХЭ и его окружение. Атомы углерода остатков каталитической триады (Ser198, His438, Glu325) показаны фиолетовым цветом. Желтым цветом показаны атомы углерода остатка Asn322, который превращен в каталитическую глутаминовую кислоту в двойном мутанте. Основные остатки, образующие сеть водородных связей, стабилизирующую активный сайт (Gln223, Asn322, Glu441), показаны с помощью шаростержневой модели. Атомы углерода гидрофобных остатков (Phe195, Ile221, Val445, Trp471), замена которых на гидрофильные рассматривается как способ повышения конформационной стабильности, показаны голубым цветом.

зано [22], что возмущения в этой цепи водородных связей лежат в основе утраты каталитической активности полиморфным вариантом БХЭ Val204Asp [22]. Также снижение конформационной стабильности мутанта Asn322Glu/Glu325Gly связано с увеличением подвижности аминокислотных остатков с водородными связями с Asn322 в нативном ферменте, утративших эти стабилизирующие связи при замене Asn322Glu. При этом происходит изменение его роли со стабилизирующей на каталитическую. Восстановлению конформационной стабильности может способствовать создание новой цепи водородных связей взамен нарушенных за счет мутаций прилегающих гидрофобных остатков Phe195, Ile221, Val445, Trp471 (рис. 3).

Таким образом, в качестве возможных направлений повышения конформационной стабильности мутанта Asn322Glu/Glu325Gly рассматривалось введение двух дополнительных замен: Glu441Gln и замены одного из остатков Phe195, Ile221, Val445, Trp471 на Ser, Thr, Asn, Gln (всего 16 вариантов). В свете изложенных выше результатов остаток Glu197 был протонирован.

В качестве критерия конформационной стабильности рассматриваемых мутантов было при-

нято среднее по всем молекулярно-динамическим траекториям расстояние между каталитическими остатками: расстояние между атомами Ser198 O γ и His438 N ϵ и его сумма с расстоянием между атомами His438 N δ и Glu322 O ϵ .

Приведенные на рис. 4 результаты показывают, что введение этих мутаций в целом повышает конформационную стабильность рассматриваемых четверных мутантов по сравнению с Asn322Glu/Glu325Gly. Хотя по приведенным данным трудно выделить наилучший вариант, но представляются перспективными мутанты Asn322Glu/Glu325Gly/Glu441Gln/Phe195Thr и Asn322Glu/Glu325Gly/Glu441Gln/Val445Gln.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам суперкомпьютерного молекулярного моделирования реакции спонтанной активации двойного мутанта БХЭ Asn322Glu/Glu325Gly было показано, лимитирующий энергетический барьер этой реакции не превышает 8.5 ккал/моль, что согласуется с качественными экспериментальными данными. Как и в случае фермента дикого типа, некаталитическая глута-

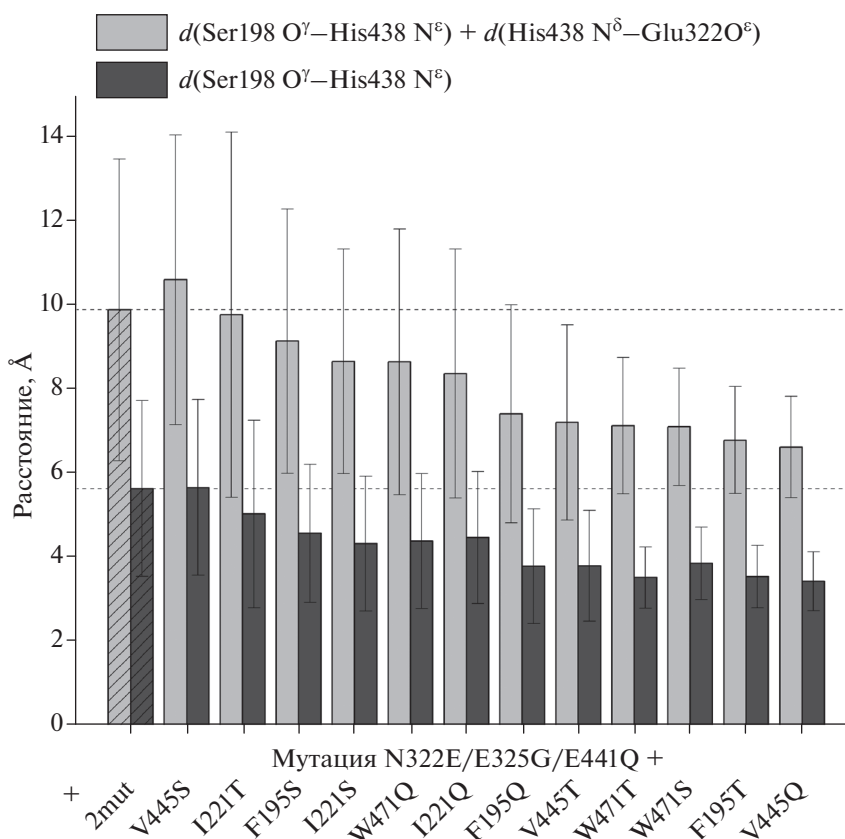


Рис. 4. Среднее расстояние d между каталитическими остатками по всем молекулярно-динамическим траекториям для мутантов БХЭ: 2mut – мутант Asn322Glu/Glu325Gly и его модификации.

миновая кислота в позиции 197 находится в протонированном состоянии. Показано, что введение дополнительных мутаций, обеспечивающих создание новой сети водородных связей, может повысить конформационную стабильность мутанта Asn322Glu/Glu325Gly.

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. Worek F, Thiermann H., Wille T. // *Toxicol. Lett.* 2016. V. 244. P. 143; <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.07.012>
2. Masson P., Lushchekina S.V. // *Chem.-Biol. Interact.* 2016. V. 259. P. 319; <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.02.010>
3. Masson P., Nachon F. // *J. Neurochem.* 2017. V. 142 Suppl 2. P. 26; <https://doi.org/10.1111/jnc.14026>
4. Goldsmith M., Ashani Y. // *Chem.-Biol. Interact.* 2018. V. 292. P. 50; <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.07.006>
5. Masson P., Lushchekina S. // *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* / Ed. Gupta R.D. London: Acad. Press, 2020. P. 1199.
6. Lyagin I., Efremenko E. // *Intern. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22; <https://doi.org/10.3390/ijms22041761>
7. Lushchekina S.V., Schopfer L.M., Grigorenko B.L. et al. // *Front. Pharmacol.* 2018. V. 9. P. 211; <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00211>
8. Lushchekina S., Masson P. // *Toxicology.* 2018. V. 409. P. 91; <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.07.020>
9. Grigorenko B.L., Novichkova D.A., Lushchekina S.V. et al. // *Chem.-Biol. Interact.* 2019. V. 306. P. 138; <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.04.019>
10. Nicolet Y., Lockridge O., Masson P. et al. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 41141; <https://doi.org/10.1074/jbc.M210241200>
11. Григоренко Б.Л., Хренова М.Г., Кулакова А.М. и др. // *Хим. физика.* 2020, Т. 39. С. 13; <https://doi.org/10.31857/s0207401x20060023>
12. Phillips J.C., Braun R., Wang W. et al. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. P. 1781; <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>

13. *Best R.B., Zhu X., Shim J. et al.* // J. Chem. Theor. Comp. 2012. V. 8. P. 3257;
<https://doi.org/10.1021/ct300400x>
14. *Поляков И.В., Григоренко Б.Л., Немухин А.В.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. С. 44;
<https://doi.org/10.31857/s0207401x21020138>
15. *Valiev M., Bylaska E.J., Govind N. et al.* // Comput. Phys. Commun. 2010. V. 181. P. 1477;
<https://doi.org/10.1016/j.cpc.2010.04.018>
16. *Case D.A., Cheatham T.E., 3rd, Darden T. et al.* // J. Comput. Chem. 2005. V. 26. P. 1668;
<https://doi.org/10.1002/jcc.20290>
17. *Khrenova M.G., Tsirelson V.G., Nemukhin A.V.* // Phys. Chem. Chem. Phys. 2020. V. 22. P. 19069;
<https://doi.org/10.1039/d0cp03560b>
18. *Kumler W.D., Eiler J.J.* // J. Am. Chem. Soc. 1943. V. 65. P. 2355;
<https://doi.org/10.1021/ja01252a028>
19. *Amitay M., Shurki A.* // Proteins. 2009. V. 77. P. 370;
<https://doi.org/10.1002/prot.22442>
20. *Eslami M., Hashemianzadeh S.M., Bagherzadeh K. et al.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2016. V. 34. P. 855;
<https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1057526>
21. *Allen K.N., Dunaway-Mariano D.* // Trends Biochem. Sci. 2004. V. 29. P. 495;
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.07.008>
22. *Delacour H., Lushchekina S., Mabboux I. et al.* // PLoS One. 2014. V. 9. P. e101552;
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101552>

ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ОКТАФЕНИЛЗАМЕЩЕННОГО ФТАЛОЦИАНИНА ЭРБИЯ

© 2022 г. И. Д. Бурцев¹, А. Е. Егоров¹, А. А. Костюков¹, А. В. Шибаева¹, М. А. Климович¹,
А. Д. Косов², М. Ю. Селиверстов², Т. В. Дубинина², А. А. Маркова^{1,3}, В. А. Кузьмин^{1*}

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

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

³Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук, Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 27.07.2021;

после доработки 10.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

Установлены спектрально-кинетические характеристики синглетного и триплетного возбужденных состояний октафенилзамещенного фталоцианина эрбия. Показано, что соединение обладает высокими значениями квантовых выходов флуоресценции (0.50) и синглетного кислорода (0.43). Определены значения времени жизни возбужденного синглетного (4.9 нс) и триплетного состояний (1.4 мс). Рассчитана величина константы связывания фталоцианина с бычьим сывороточным альбумином ($5.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$), указывающая на эффективное связывание исследуемого вещества с альбумином. На модельной клеточной линии аденокарциномы толстой кишки (линия клеток НСТ116) было установлено преимущественное накопление красителя в цитоплазме клеток. Методом конфокальной микроскопии установлена локализация фталоцианина в митохондриях и структурах эндоплазматического ретикулаума.

Ключевые слова: фталоцианины, фотохимия, триплетные состояния, флуоресценция, фотодинамическая терапия, локализация в клетках, конфокальная спектроскопия.

DOI: 10.31857/S0207401X22020029

ВВЕДЕНИЕ

Фталоцианины (Pc) лантанидов (Ln) находят широкое применение в областях, связанных с исследованием различных флуоресцентных материалов, проводников, в нелинейной оптике и фотомедицине [1–4]. Они представляют собой макроциклические соединения, которые, благодаря наличию четырех изоиндольных фрагментов, обладают симметричной π -сопряженной ароматической системой. Наличие такой системы в молекуле приводит к повышению ее химической и термической стабильности, а также к появлению ряда важных химических и фотофизических свойств. Данный класс соединений обладает интенсивным поглощением в области 600–700 нм с высокими значениями коэффициента молярной экстинкции [5, 6].

Расширенная ароматическая система молекул фталоцианинов увеличивает вариативность в синтезе соединений ввиду возможности введения широкого спектра заместителей в периферические положения [7, 8]. Введение Ln в качестве центрального иона металла позволяет в том числе координировать два и более макроциклических

фталоцианиновых остова, что дает возможность получения производных фталоцианинов вида LnPc_2 или Ln_2Pc_3 [9–11].

Многие фталоцианины, как и их ближайшие природные аналоги – порфирины, используются также в области фотомедицины в качестве агентов для фотодинамической терапии (ФДТ) рака [12–17]. Метод ФДТ основан на фотохимическом действии фотосенсибилизатора (ФС), локализованного в опухоли, способствующего генерации цитотоксически активных форм кислорода (АФК) в присутствии молекулярного кислорода при облучении светом на определенной длине волны [18]. Результатом поглощения энергии света являются фотохимические реакции с переносом энергии и электрона, в ходе которых образуются АФК: синглетный кислород $^1\text{O}_2$ и супероксидный анион-радикал, приводящие к гибели опухолевых клеток.

Соединения лантанидов с органическими лигандами и наночастицы на их основе успешно применяются в ФДТ в качестве цитотоксичных агентов и ингибиторов [19], а также обладают значительными люминесцентными свойствами и

применяются в биоимиджинге [20, 21]. Введение в структуру фталоцианина эрбия способствует батохромному сдвигу спектров поглощения и флуоресценции в область важного для ФДТ “терапевтического окна” [22, 23].

Целью настоящей работы было исследование фотохимических и фотофизических свойств нового октафенилзамещенного фталоцианина эрбия в качестве аксиальной лиганда, который может быть рассмотрен для дальнейших испытаний в качестве ФС для ФДТ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследуемое соединение 2,3,9,10,16,17,23,24-октафенилфталоцианината эрбия ацетат, $\text{P}^{\text{h}}\text{PcEr}(\text{OAc})$, было получено согласно методике, описанной в работе [24].

Спектральные измерения

Электронные спектры поглощения $\text{P}^{\text{h}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ регистрировали с использованием спектрофотометра “Shimadzu UV-3101PC” фирмы “Shimadzu” (Japan) в диапазоне длин волн 300–800 нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см при комнатной температуре.

Спектры флуоресценции $\text{P}^{\text{h}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ регистрировали на спектрофлуориметре FluoTime 300 фирмы “PicoQuant” (Germany) с использованием ксеноновой лампы в качестве источника возбуждающего света в кварцевых кюветах размером 1.0×1.0 см при комнатной температуре. Во избежание эффекта внутреннего фильтра оптическая плотность растворов стандарта и образцов в точке возбуждения подбиралась не выше 0.07.

Квантовые выходы флуоресценции $\text{P}^{\text{h}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ регистрировали в растворе диметилсульфоксида (ДМСО) с использованием раствора метиленового синего в метаноле в качестве стандарта ($\Phi_f = 0.80$ [25]) при возбуждении ксеноновой лампой на длине волны 620 нм. Квантовые выходы флуоресценции были рассчитаны согласно формуле [26]

$$\Phi_f^i = \frac{F^i f_s n_i^2}{F^s f_i n_s^2} \Phi_f^s,$$

где Φ_f^s – квантовый выход флуоресценции стандарта, F_i и F_s – площади под спектрами флуоресценции образца и стандарта, n_i^2 и n_s^2 – квадраты коэффициентов преломления в используемом растворителе для образца и стандарта соответственно; $f_i = 1 - 10^{-A_x}$, (A_x – поглощение соединения на длине волны возбуждения).

Кинетику гибели флуоресценции для $\text{P}^{\text{h}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ регистрировали на спектрофлуориметре FluoTime 300 фирмы “PicoQuant” (Germany) с использова-

нием лазера SOLEA. Сигнал собственной функции прибора (IRF) был получен с использованием рассеивающей среды Ludox производства компании DuPont (USA) в качестве стандарта. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Кинетические кривые гибели флуоресценции обрабатывали с использованием полиэкспоненциальной модели при помощи программного обеспечения FluoFit Software фирмы “PicoQuant” (Germany). Время жизни флуоресценции было рассчитано согласно уравнению

$$I(t) = \int_{-\infty}^t \text{IRF}(t') \sum_{i=1}^n I_i \exp\left(\frac{-t-t'}{\tau_i}\right) dt',$$

где I_i – амплитуда, τ_i – время жизни i -го компонента, n – номер компонента. Соответствие экспериментальных данных предложенной модели контролировалось по распределению отклонений от экспоненциальной модели (χ^2) и по функции автокорреляции.

Константу связывания фталоцианина с бычьим сывороточным альбумином (БСА) определяли методом тушения флуоресценции тирозина и триптофана в структуре белковой молекулы. Флуоресценцию регистрировали в растворе БСА в фосфатном буфере (pH = 7.4) при возбуждении на длине волны 280 нм. Спектры флуоресценции регистрировали в диапазоне 300–450 нм. Полученные данные аппроксимировали гиперболой

$$F_0 - F = F_{\text{max}} [\text{BCA}] / (K_d + [\text{BCA}]),$$

где F_0 – интенсивность флуоресценции белка в отсутствие $\text{P}^{\text{h}}\text{PcEr}(\text{OAc})$, F – интенсивность флуоресценции пробы с $\text{P}^{\text{h}}\text{PcEr}(\text{OAc})$, F_{max} – интенсивность флуоресценции пробы в отсутствие красителя, $[\text{BCA}]$ – концентрация альбумина, K_d – константа диссоциации комплекса краситель–альбумин.

Квантовые выходы синглетного кислорода определяли по соответствующей формуле [27]:

$$\Phi_{\Delta}^i = \frac{F^i A_s n_i^2}{F^s A_i n_s^2} \Phi_{\Delta}^s,$$

где Φ_{Δ}^s – квантовый выход синглетного кислорода для стандарта, F_i и F_s – площади под спектрами люминесценции синглетного кислорода для образца и стандарта, A_i и A_s – оптическая плотность образца и стандарта на длине волны возбуждения, n_i и n_s – коэффициенты преломления растворителя для растворов образца и стандарта соответственно. Оптические плотности на длине волны регистрации были равными. Спектры люминесценции растворов синглетного кислорода в ДМСО и метаноле ($\lambda_{\text{max}} \sim 1270$ нм) регистрировали при облучении ксеноновой лампой (возбуждение на $\lambda = 650$ нм растворов, насыщенных кислородом при комнатной температуре). В качестве

стандарта использован раствор метиленового синего в метаноле ($\Phi_{\Delta} = 0.49$ [28]).

Спектрально-кинетические характеристики триплетных состояний в экспериментах по импульсному фотолизу ${}^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ в растворе ДМСО измеряли в кварцевой кювете с длиной оптического пути $l = 20$ см на установке импульсного фотолиза с использованием ксеоновой лампы (фильтр КС-18, пропускание – от 690 нм) с энергией вспышки 80 Дж и временем вспышки 20 мкс [29]. Регистрацию поглощения осуществляли с помощью фотоумножителя ФЭУ-38 в диапазоне длин волн 400–800 нм. Удаление кислорода из рабочих растворов проводили с помощью вакуумирования.

Культуру клеток аденокарциномы толстой кишки (линия клеток НСТ116, полученная из Американской коллекции типовых культур) инкубировали в питательной среде DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) производства компании ПанЭко (Россия) с добавлением 5%-ной фетальной бычьей сыворотки производства компании HyClone (USA), 2 мМ L-глутамина, 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 37 °С, 5%-ной CO_2 во влажной атмосфере. В экспериментах использовали культуры в логарифмической фазе роста. Клетки в количестве $2 \cdot 10^5$ в 3 мл культуральной среды вносили в чашки Петри для микроскопии производства компании SPL Lifesciences (USA) диаметром 35 мм и инкубировали при указанных выше условиях. Через 48 ч добавляли ${}^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М и инкубировали в течение 17 ч. В часть чашек краситель не вносили, их использовали в качестве контрольной среды. После инкубации монослой клеток промывали солями Хенкса для последующего окрашивания клеточными маркерами. Для визуализации внутриклеточного распределения органелл клетки окрашивали флуоресцентными красителями: ER tracker Green (BODIPY™ FL Glibenclamide, ThermoFisher Scientific) в концентрации 1 мкМ для окрашивания эндоплазматического ретикулума при инкубации в течение 30 мин ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 500$ –580 нм); Dihydrorhodamine 123 производства компании ThermoFisher Scientific, митохондриальный трекер для детекции активных форм кислорода (10 мкМ, 30 мин, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 500$ –580 нм), лизосомный маркер LysoTracker Green DND-26 производства компании ThermoFisher Scientific (1 мкМ, 30 мин, $\lambda_{\text{ex}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 500$ –580 нм) и Hoechst 33342 для окрашивания ядер (0.01 мг, 15 мин, $\lambda_{\text{ex}} = 405$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 420$ –480 нм).

Исследование повреждения клеточных мембран для проницаемости пропидия иодидом проводили методом конфокальной микроскопии с такой же пробоподготовкой, как в эксперименте с анализом

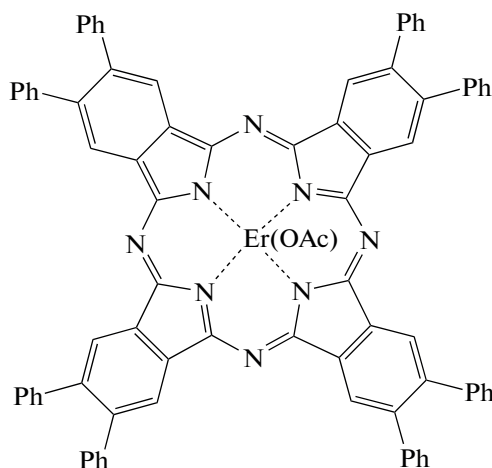


Рис. 1. Структурная формула октафенил-замещенного фталоцианината эрбия ацетата ${}^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$.

внутриклеточного распределения ${}^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$. В культуральную среду клеток добавляли ${}^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ в конечной концентрации $5 \cdot 10^{-6}$ М и инкубировали в течение 17 ч. После инкубации монослой клеток промывали солями Хенкса для последующего окрашивания клеточными маркерами. Для визуализации внутриклеточного распределения органелл клетки окрашивали красителем Hoechst 33342 для окрашивания ядер (характеристики красителя приведены выше), промывали солями Хенкса и добавляли соли Хенкса с пропидия иодидом в конечной концентрации 0.1 мкг/мл ($\lambda_{\text{ex}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 550$ –700 нм). Изображения получали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 компании Leica Microsystem GmbH (Germany), исключая фоновую флуоресценцию ${}^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ путем ограничения мощностей лазера и детекторов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектральные фотохимические характеристики фталоцианина ${}^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$

Структурная формула исследуемого фталоцианина ${}^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ представлена на рис. 1. Фталоцианин ${}^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ характеризуется наличием восьми фенильных заместителей в периферических положениях и ацетата в качестве аксиального лиганда у центрального иона эрбия, который может являться уходящей группой при синтезе последующих производных, содержащих два или более фталоцианиновых лиганда [24].

Для исследуемого фталоцианина ${}^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ были зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции его в растворе ДМСО (рис. 2). Спектр поглощения ${}^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ характеризуется наличием S-полосы в области 350–370 нм и интенсивной узкой Q-полосы с максимумом погло-

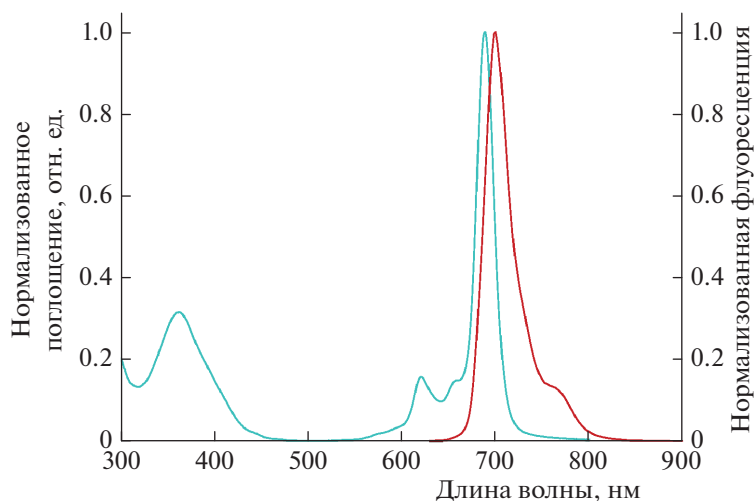


Рис. 2. Нормализованные спектры поглощения и флуоресценции $^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ в растворе ДМСО; $\lambda_{\text{ex}} = 620$ нм.

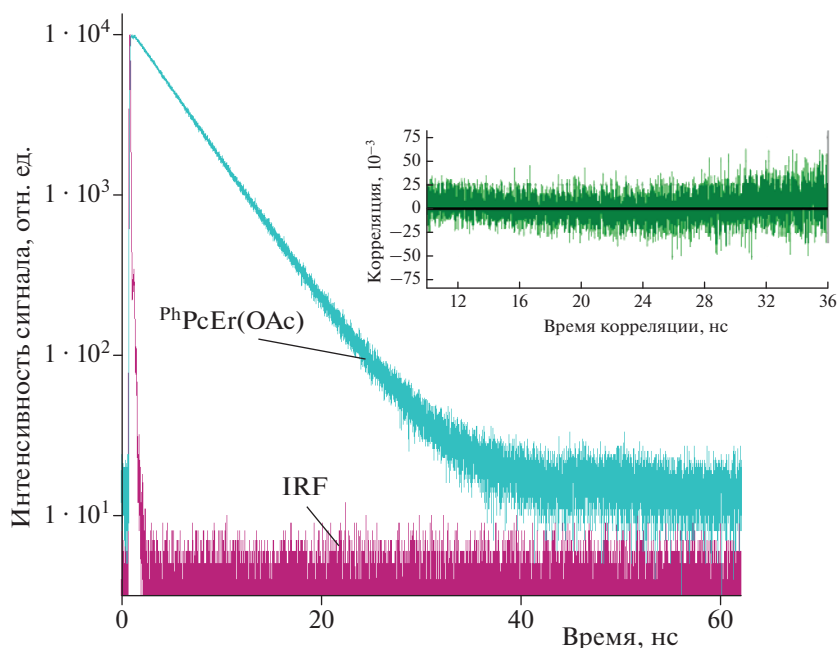


Рис. 3. Кинетика гибели флуоресценции $^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ в растворе ДМСО ($C = 5.6 \cdot 10^{-6}$ М); $\lambda_{\text{ex}} = 620$ нм, $\lambda_{\text{reg}} = 700$ нм. На вставке: функция автокорреляции для аппроксимации моноэкспоненциальной зависимости интенсивности сигнала от времени.

шения при 690 нм. Q-Полоса обладает ярко выраженной сопутствующей полосой поглощения при 620 нм, что характерно для фталоцианинов редкоземельных элементов [2]. Спектр флуоресценции характеризуется наличием интенсивной полосы флуоресценции с максимумом при 704 нм (стоксов сдвиг – 14 нм). Квантовый выход флуоресценции $^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ составил $\Phi_{\text{fl}} = 0.50$.

Была исследована кинетика гибели флуоресценции для описываемого соединения (рис. 3).

Время жизни флуоресценции исследованного соединения в растворе ДМСО составляет 4.9 нс. Кинетика гибели флуоресценции $^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ является моноэкспоненциальной ($\chi^2 = 1.03$).

Константа связывания с БСА, рассчитанная по тушению флуоресценции белка (рис. 4), составила $K_b = (5.5 \pm 1.0) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Высокое значение K_b при взаимодействии БСА с $^{\text{Ph}}\text{PcEr}(\text{OAc})$ в сравнении со константой, полученной для фталоцианина цинка в работе [30], вероятно, обусловлено тем,

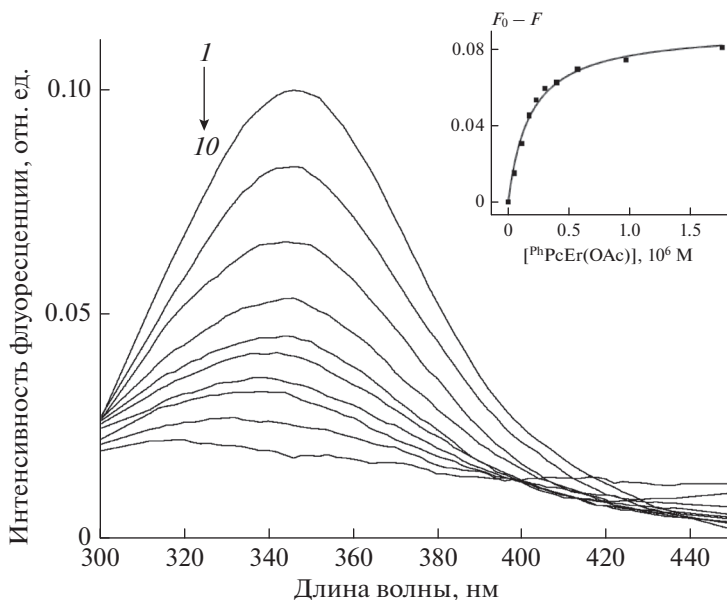


Рис. 4. Спектры флуоресценции БСА ($C = 5 \cdot 10^{-7}$ М) в присутствии $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ ($C = 0 - 1.8 \cdot 10^{-6}$ М для кривых 1–10) в фосфатном буфере; $\text{pH} = 7.3$, $\lambda_{\text{ex}} = 280$ нм. На вставке: кривая для расчета константы связывания k_b .

что эрбий находится вне плоскости молекулы фталоцианина и связан с ацетатом. Высокая эффективность кулоновского взаимодействия между положительно заряженным центральным фрагментом молекулы фталоцианина и отрицательно заряженной молекулой белка является подтверждением этого предположения [31].

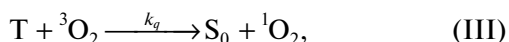
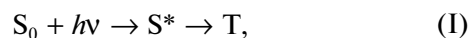
Спектрально-кинетические характеристики триплетных состояний

Методом импульсного фотолиза были получены дифференциальный триплет-триплетный спектр поглощения дегазированного раствора $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ в ДМСО (рис. 5) и кинетика гибели триплетного состояния данного соединения (см. реакцию (I) ниже).

Триплет-триплетный спектр характеризуется наличием интенсивной полосы триплетного поглощения в области 400–600 нм, а также менее интенсивным поглощением в области 740–780 нм и областью выцветания синглетного состояния при 600–720 нм, соответствующей максимуму спектра синглетного поглощения (рис. 2). Кинетика гибели триплетного состояния является моноэкспоненциальной и описывается уравнением $\Delta A = \Delta A_0 \exp(-t/\tau_T)$, где ΔA – изменение триплет-триплетного поглощения в течение заданного времени, ΔA_0 – триплет-триплетное поглощение непосредственно после вспышки, t – время. Время жизни триплетного состояния $\tau_T = 1/k_T$, где k_T – константа скорости гибели триплетного со-

стояния. Время жизни триплетного состояния составило 1.4 мс.

Синглетный кислород генерируется в результате переноса энергии от триплетного состояния молекулы ФС к молекулам кислорода в основном состоянии:



Для $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ была определена квантовая эффективность синглетного кислорода. По регистрации спектров люминесценции синглетного кислорода (рис. 6, реакция (IV)) в ближней ИК-области ($\lambda_{\text{max}} \sim 1270$ нм) было рассчитано значение его квантового выхода, которое для $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ составило $\Phi_\Delta = 0.43$. Полученное значение указывает на эффективность процесса переноса энергии (см. табл. 1).

Значения квантовых выходов флуоресценции и синглетного кислорода для $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ сравнивали с соответствующими значениями для аналогичного безметалльного фталоцианина PhPcH_2 : $\Phi_f = 0.20$ и $\Phi_\Delta = 0.55$ в табл. 1. Усиление флуоресценции $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ хорошо согласуется с ранее полученными сведениями о гомолептических бисфталоцианинах эрбия [32]. Включение металла в структуру фталоцианина приводит к исчезновению расщепления уровня энергии, соответствующего

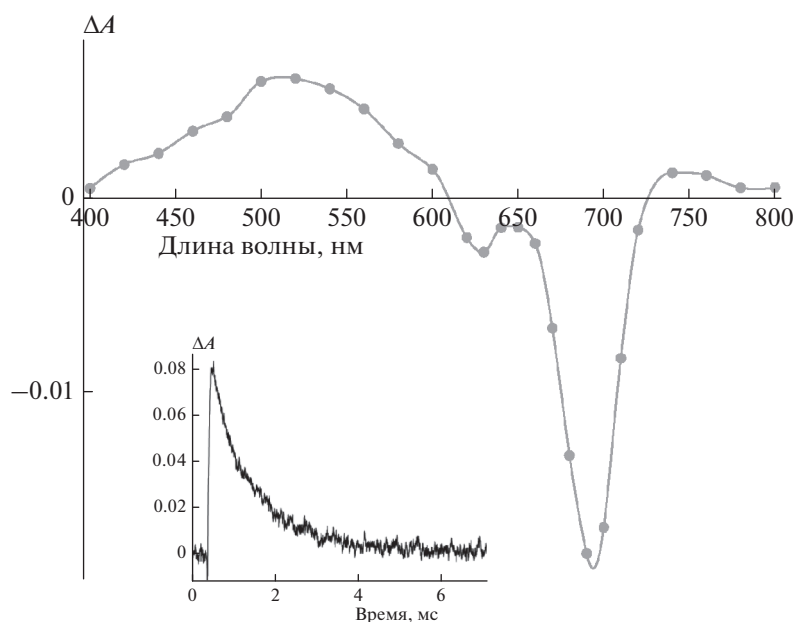


Рис. 5. Дифференциальный триплет-триплетный спектр поглощения $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ ($C = 7 \cdot 10^{-7}$ М в растворе ДМСО) по прошествии 300 мкс после вспышки. На вставке: кинетика гибели триплетного состояния при 520 нм.

шего нижней свободной молекулярной орбитали. Данный процесс выражается в уменьшении квантового выхода интеркомбинационной и внутренней конверсии, что приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции. Описанный эффект основан на взаимодействии σ -орбиталей металла с π -электронным сопряжением орбиталей атомов азота в лиганде фталоцианина, перпендикулярных плоскости кольца.

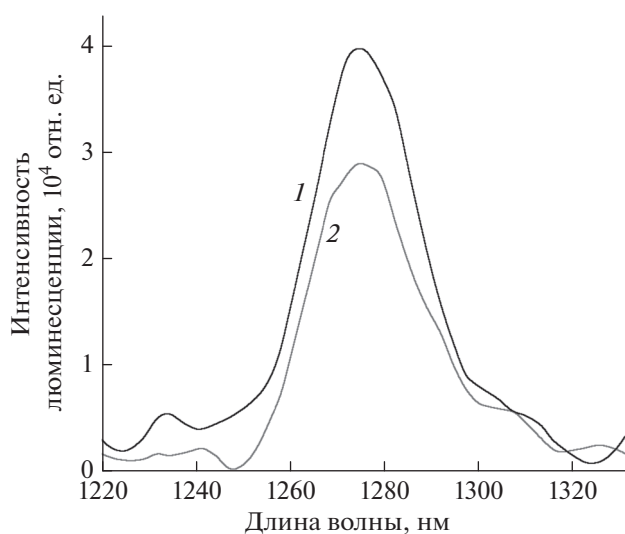


Рис. 6. Спектры люминесценции синглетного кислорода метиленового синего и $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ в ДМСО: 1 – метиленовый синий, 2 – $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$; $\lambda_{\text{ex}} = 650$ нм.

Исследования на клетках

Для визуализации клеток использовался краситель ядер Hoechst 33342. На рис. 7 показано, что $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ накапливается в клетках модельной клеточной линии аденокарциномы толстой кишки (линия клеток НСТ116). Накопление происходит преимущественно в цитоплазме. В ядре краситель накапливается в меньшей степени, но сигнал обнаруживается и в ядрах клеток. Способность $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ накапливаться в клеточных структурах может быть во многом обусловлена его способностью связываться с белковыми молекулами ($K_b = (5.5 \pm 1.0) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$).

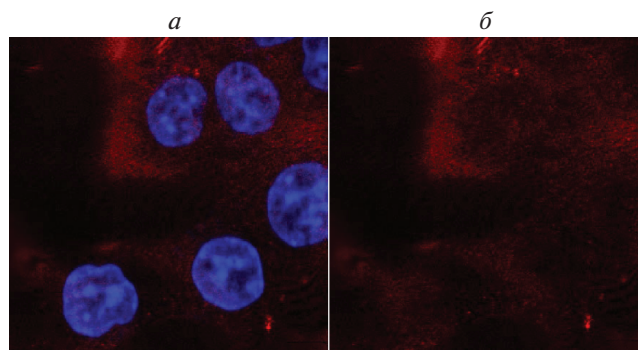


Рис. 7. Накопление $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ в клетках аденокарциномы толстой кишки (линия клеток НСТ116). *а* – наложение сигналов $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$ и Hoechst 33342, *б* – сигнал $\text{PhPcEr}(\text{OAc})$.

Таблица 1. Фотохимические характеристики ^{Ph}PcEг(OAc)

Соединение	λ_{abs} , нм	λ_{fl} , нм	$\Delta\lambda$, нм	Φ_{fl}	τ_{fl} , нс	λ_{t-t} , нм	τ_{t-t} , мс	Φ_{Δ}	k_b , M ⁻¹
^{Ph} PcEг(OAc)	690	704	14	0.50	4.87	520	1.4	0.43	$(5.5 \pm 1.0) \cdot 10^6$
^{Ph} PcH ₂	688 (Q ₁), 718 (Q ₂)	708	20	0.20	5.73	—	—	0.55	—

Примечания: λ_{abs} – максимум поглощения, λ_{fl} – максимум флуоресценции, $\Delta\lambda$ – стоксов сдвиг, Φ_{fl} – квантовый выход флуоресценции, τ_{fl} – время жизни флуоресценции, λ_{t-t} – максимум триплетного поглощения, τ_{t-t} – время жизни триплетного состояния, Φ_{Δ} – квантовый выход синглетного кислорода, k_b – константа связывания комплекса фталоцианина с БСА.

В дальнейшем были окрашены некоторые клеточные органеллы с целью соотнести сигнал от ^{Ph}PcEг(OAc) с сигналами от митохондрий, эндоплазматического ретикулума и лизосом. Кроме того, в качестве контроля были окрашены соответствующими маркерами клетки, которые не подвергались воздействию ^{Ph}PcEг(OAc).

В контрольных чашках наблюдали нормальную морфологию клеток (рис. 8). В клетках, которые инкубировались с ^{Ph}PcEг(OAc), происходила регистрация в соответствующих его спектральным характеристикам диапазонах: $\lambda_{ex} = 633$ нм, $E_m = 650–750$ нм (красный сигнал). Наложение сигналов от ^{Ph}PcEг(OAc) и от окрашиваемых клеточ-

ных органелл позволяет проанализировать преимущественное накопление исследуемого красителя. Для визуализации митохондрий использовался краситель Dihydrochlorhodamine 123. Особенность данного красителя заключается в том, что он не только накапливается в митохондриях клеток, но и является сенсором активных форм кислорода [33] (рис. 9).

Активные формы кислорода окисляют Dihydrochlorhodamine 123 и превращают его в флуоресцентный родамин 123. При наложении сигналов (рис. 9з) происходит значительное, но неполное перекрывание сигналов. Можно предположить, что в некоторой степени ^{Ph}PcEг(OAc) способен накапливаться в митохондриях клеток. Анало-

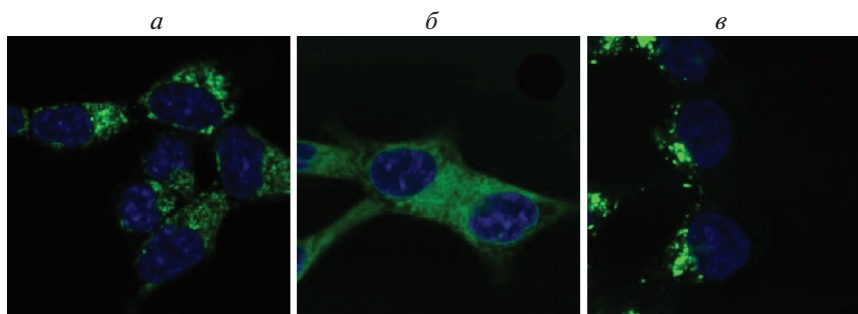


Рис. 8. Визуализация ядра (“синий” сигнал, более темные области) и клеточных органелл (“зеленый” сигнал (более светлые области) соответствует следующим органеллам: а – митохондрии, б – эндоплазматический ретикулум и в – лизосомы) в контрольных образцах.

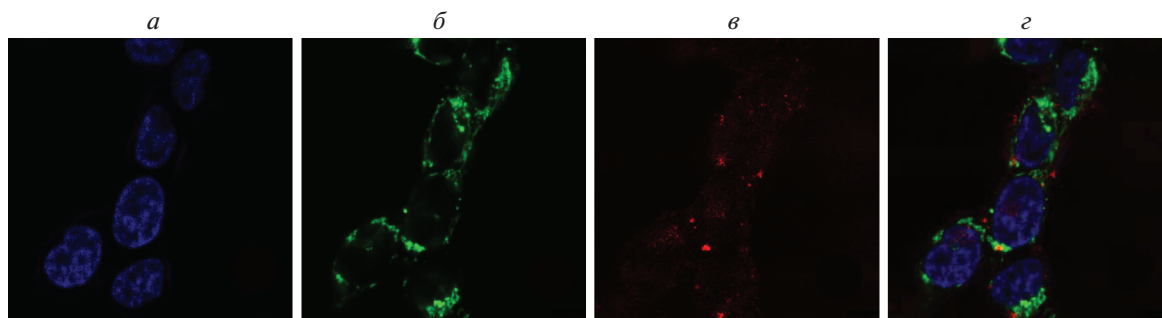


Рис. 9. Исследование солокализации ^{Ph}PcEг(OAc) с клеточными митохондриями: а – ядра клеток, окрашенные Hoechst 33342; б – сигнал от митохондрий, окрашенных Dihydrochlorhodamine 123; в – сигнал ^{Ph}PcEг(OAc); з – наложение сигналов а и б.

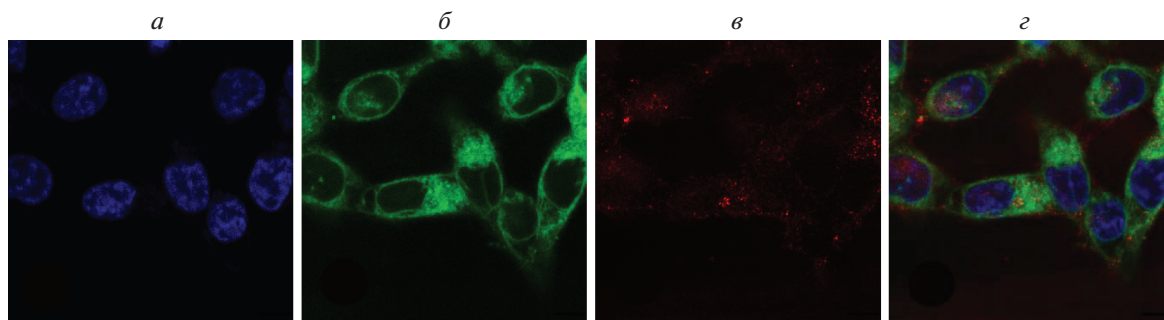


Рис. 10. Исследование солокализации $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$ с эндоплазматическим ретикуломом; *a* – ядра клеток, окрашенные Hoechst 33342; *b* – сигнал от эндоплазматического ретикула, окрашенного ER-Tracker; *c* – сигнал $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$; *d* – наложение сигналов *a* и *b*.

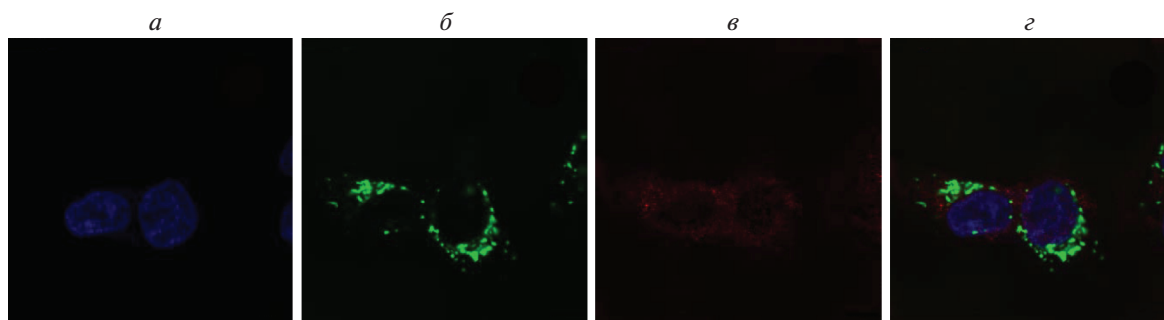


Рис. 11. Исследование солокализации $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$ с лизосомами: *a* – ядра клеток, окрашенные Hoechst 33342; *b* – сигнал от лизосом, окрашенных LysoTracker Green; *c* – сигнал $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$; *d* – наложение сигналов *a* и *b*.

гичным образом происходило сопоставление сигналов от ER-Tracker и $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$, см. рис. 10.

Заметно значительное перекрытие сигналов $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$ и ER-Tracker, что может говорить о способности $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$ накапливаться в структурах эндоплазматического ретикула. Вместе с тем полного совпадения сигналов мы не наблюдаем, что говорит о неселективном характере накопления $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$.

Исследование солокализации $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$ и лизосом (рис. 11) позволяет говорить о совсем незначительном перекрытии сигналов, накопление $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$ в лизосомах не происходит.

Конфокальная микроскопия клеток, нагруженных $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$, показала отсутствие летального фотоповреждения мембран клеток в течение 1 ч после освещения. Клетки, накопившие $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$ и окрашенные красителем ядер Hoechst 33342, облучались при $\lambda_{\text{ex}} = 633$ нм до достижения плотности дозы в 300 Дж/см² в клеточном буфере, содержащем пропидия иодид (рис. 12). Последний иодид не способен проникать через неповрежденные цитоплазматические мембраны клеток, а в случае их повреждения он проходит в цитоплазму и ядро, интеркалируя с нуклеиновыми кислотами (РНК в цитоплазме и ДНК в ядре) с

увеличением флуоресценции в своем канале. Через 1 мин после фотовозбуждения клеток, нагруженных $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$, мембраны клеток были не повреждены, а окрашивание пропидия иодидом цитоплазмы (и ядрышек) развивалось медленно – в течение 1 ч и не на всех клетках в пробе. Это свидетельствует о незначительном фотоповреждении мембран клеток при высоких дозах фотовозбуждения $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$ и, следовательно, об отсутствии быстрого фотоиндуцированного некроза клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Октафенилзамещенный фталоцианин $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$ обладает значительными флуоресцентными свойствами, что выражается в высоком квантовом выходе и продолжительном времени жизни флуоресценции. Введение эрбия приводит к батохромному сдвигу спектров поглощения и флуоресценции, что хорошо согласуется с требованиями к фотосенсибилизатору для ФДТ. Высокая флуоресценция позволяет визуализировать локализацию $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$ в компартаментах клеток.

Под воздействием “красного” света на $^{195}\text{PtPcEg}(\text{OAc})$ в результате интеркомбинационной конверсии образуется триплетное состояние фта-

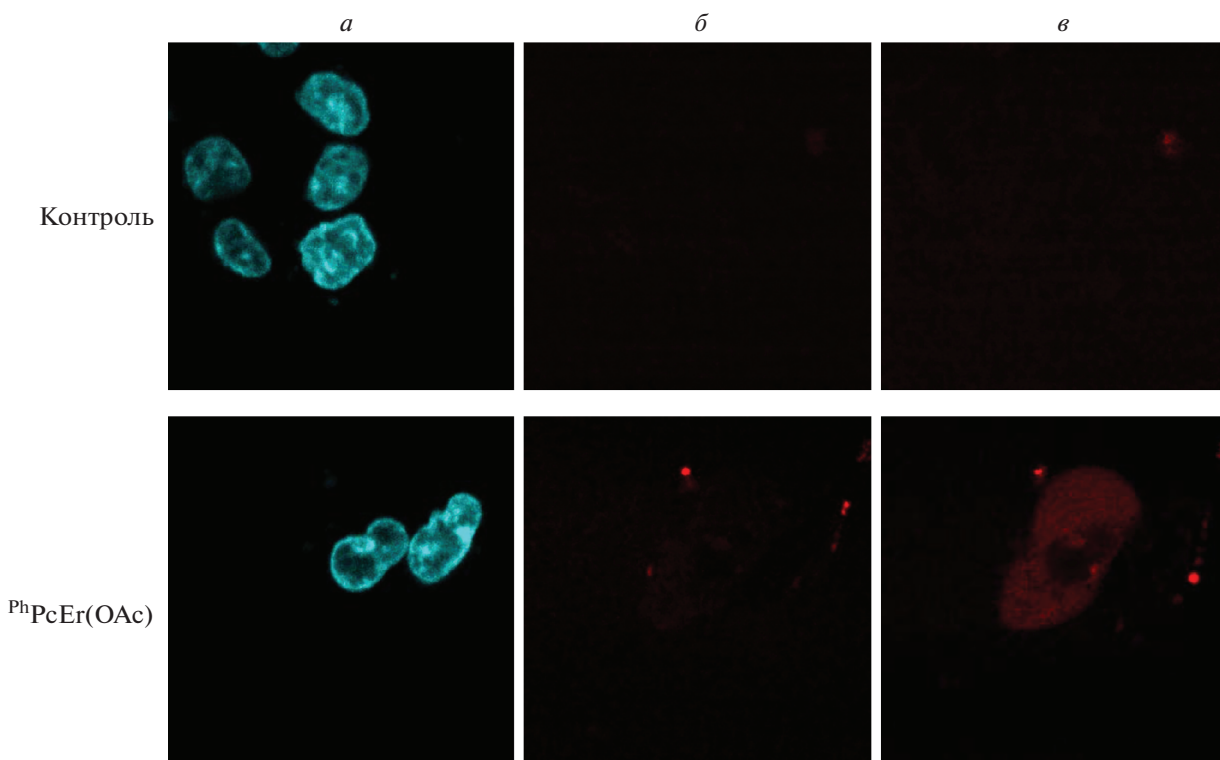


Рис. 12. Исследование фотоповреждения цитоплазматических мембран на клетках НСТ116, накопивших $^{Ph}PcEr(OAc)$. На двух снимках *а* – ядра клеток, окрашенные Hoechst 33342, на остальных снимках (красный цвет) – цитоплазма и ядрышки клеток с поврежденными мембранами, проницаемыми для пропидия иодида: *б* – время после возбуждения 1 мин, *в* – 60 мин.

лоцианина. Триpletная природа образующегося возбужденного состояния подтверждена тушением молекулярным кислородом. Высокий квантовый выход синглетного кислорода позволяет рассматривать $^{Ph}PcEr(OAc)$ в качестве эффективного фотосенсибилизатора. Также данное соединение обладает высоким значением константы связывания с молекулой БСА, что говорит о его высоком сродстве к белковым молекулам и, соответственно, о возможности его доставки и накопления в опухолевых клетках.

Исследуемое соединение обладает интенсивным сигналом флуоресценции в клетках аденокарциномы толстой кишки (линия клеток НСТ116). Оно накапливается преимущественно в цитоплазме, и в значительно меньшей степени флуоресцентный сигнал красителя обнаруживается в ядре клетки. Сопоставление флуоресцентного сигнала $^{Ph}PcEr(OAc)$ с сигналами ряда клеточных органелл позволило установить, что краситель может накапливаться в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме, при этом практически не обнаруживается в ядре и лизосомах. Исследуемый краситель $^{Ph}PcEr(OAc)$ не обладает субмикромольной темновой цитотоксичностью, его фотодинамическая активность на клетках требует высоких интенсивностей освеще-

ния, при этом фталоцианин накапливается в цитоплазме. Это открывает возможность дальнейшего исследования фталоцианина как соединения для фотовизуализации, применимого в длительных флуоресцентных методах анализа без фотодинамического повреждения клеточных структур. Полученные данные о незначительном фотоповреждении клеточных мембран свидетельствуют о перспективности применения $^{Ph}PcEr(OAc)$ для фотовизуализации без повреждения клеток в процессе флуоресцентной микроскопии.

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

Исследование цитотоксичности выполнено при финансовой поддержке Министерством науки и высшего образования Российской Федерации на оборудовании Центра изучения молекулярного состава ИНЭОС РАН.

Работа выполнена в рамках госзадания № 1201253303 по теме “Кинетика и механизмы элементарных стадий сложных фотохимических и биофотохимических процессов”.

Синтез фталоцианиновых комплексов осуществлялся при финансовой поддержке грантом Президента РФ МК-1056.2020.3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Katoh K., Yoshida Y., Yamashita M. et al.* // J. Amer. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 9967.
2. *Zugle R., Litwinski C., Nyokong T.* // Polyhedron. 2011. V. 30. P. 1612.
3. *Kuzmina E.A., Dubinina T.V., Vasilevsky P.N. et al.* // Dyes Pigment. 2021. V. 185. P. 108871.
4. *Kuzmina E.A., Dubinina T.V., Dzuban A.V. et al.* // Polyhedron. 2018. V. 156. P. 14.
5. *Wong R.C.H., Lo P.-C., Ng D.K.P.* // Coord. Chem. Rev. 2019. V. 379. P. 30.
6. *Roguin L.P., Chiarante N., Vior M.C.G. et al.* // Intern. J. Biochem. Cell Biol. 2019. V. 114. P. 105575.
7. *Dubinina T.V., Tychinsky P.I., Borisova N.E. et al.* // Dyes Pigments. 2018. V. 156. P. 386.
8. *Furuyama T., Maeda K., Maeda H. et al.* // J. Org. Chem. 2019. V. 84. № 21. P. 14306.
9. *Feng G., Xiaowan F., Liu Y. et al.* // Dalton Trans. 2016. V. 45. P. 7476.
10. *Wenbo L., Houhe P., Ziqian W. et al.* // Chem. Commun. 2017. V. 53. P. 3765.
11. *Barard S., Kreouzis T., Cammidge A.N. et al.* // Semicond. Sci. Technol. 2018. V. 33. № 9. P. 095010.
12. *Santos K.L.M., Barros R.M., Lima D.P.S. et al.* // Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2020. V. 32. P. 102032.
13. *Martin-Gomis L., Fernandez-Lazaro F., Sastre-Santos A.* // J. Mater. Chem. A. 2014. V. 2. P. 15672.
14. *Urbani M., Ragoussi M.-E., Nazeeruddin M.K. et al.* // Coord. Chem. Rev. 2019. V. 381. P. 1.
15. *Бердникова Н.Г., Донцов А.Е., Ерохина М.В. и др.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 48.
16. *Клименко И.В., Лобанов А.В., Трусова Е.А.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 74.
17. *Климович М.А., Сажина Н.Н., Радченко А.Ш. и др.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 33.
18. *Dabrowski J.M.* // Adv. Inorg. Chem. 2017. V. 70. P. 343.
19. *Teo R.D., Termini J., Gray H.B.* // J. Med. Chem. 2016. V. 59. № 13. P. 6012.
20. *Zhigao Y., Zichao L., Xian Q. et al.* // Acc. Chem. Res. 2020. V. 53. № 2. P. 2962.
21. *Herlan C., Brase S.* // Dalton Trans. 2020. V. 49. P. 2397.
22. *Yigang L., Hong Y., Zian H. et al.* // J. Mater. Res. 2005. V. 20 № P. 2940.
23. *Shuhui B., Jin H., Qi W. et al.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. V. 7. P. 474.
24. *Dubinina T.V., Paramonova K.V., Trashin S.A. et al.* // Dalton Trans. 2014. V. 43. P. 2799.
25. *Shahinyan G.A., Amirbekyan A.Y., Markarian S.A.* // Spectrochim. Acta, Part A. 2019. V. 217. P. 170.
26. *Brouwer A.M.* // Pure Appl. Chem. 2011. V. 83. № 12. P. 2213.
27. *Sainuddin T., McCain J., Pinto M. et al.* // Inorg. Chem. 2016. V. 55. № 1. P. 83.
28. *Redmond R.W., Gamlin J.N.* // Photochem. Photobiol. 1999. V. 70. P. 391.
29. *Кузьмин В.А., Волнухин В.А., Егоров А.Е. и др.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 3.
30. *Amitha G.S., Vasudevan S.* // Polyhedron. 2019. V. 175. P. 114208.
31. *Li X., Jeong K., Lee Y. et al.* // Theranostics. 2019. V. 9. № 22. P. 6412.
32. *Bo S., Tang D., Liu X., Zhen Z.* // Dyes Pigment. 2008. V. 76. № 1. P. 35.
33. *Ortega-Villasante C., Buren S., Blazquez-Castro A. et al.* // Free Radic. Biol. Med. 2018. V. 122. P. 202.

**РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА, ОСНОВАННОГО
НА ВЫЯВЛЕНИИ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ
ФИБРИНОГЕНА, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОКИСЛИТЕЛЬНЫМ
СТРЕССОМ, МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ
ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

© 2022 г. А. Д. Васильева^{1*}, Л. В. Юрина¹, Д. Ю. Азарова¹, В. С. Иванов¹,
П. А. Стрельникова¹, А. Е. Бугрова¹, М. И. Индейкина^{1,2}, А. С. Кононихин^{1,3},
Е. Н. Николаев³, М. А. Розенфельд¹

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия

³Автономная некоммерческая образовательная организация высшего профессионального образования
“Сколковский институт науки и технологий”, Москва, Россия

*E-mail: alexandra.d.vasilyeva@gmail.com

Поступила в редакцию 27.07.2021;
после доработки 14.08.2021;
принята в печать 20.08.2021

В рамках данного исследования был разработан способ упрощенной подготовки проб к анализу методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ–МС/МС) для дальнейшего клинично-диагностического использования, включающий иммунопреципитацию фибриногена на магнитных микрочастицах с последующим ферментативным гидролизом белка. Разработка эффективной методики, которая бы включала выделение целевого белка из исследуемого образца плазмы или любой другой физиологической жидкости с исключением большого количества стадий процесса (например, многочисленных стадий переосаждения, различных видов хроматографии при выделении целевых белков) и использования агрессивных условий (например, при элюировании белков с носителей), а также с уменьшением общей трудоемкости и времени подготовки проб к анализу, является необходимой для использования в протеомных исследованиях.

Ключевые слова: фибриноген, высокоэффективная жидкостная хроматография, тандемная масс-спектрометрия, иммунопреципитация, магнитные частицы, ферментативный гидролиз.

DOI: 10.31857/S0207401X22020145

ВВЕДЕНИЕ

Посттрансляционные модификации (ПТМ) относятся к ковалентной (в том числе ферментативной) модификации белков после биосинтеза. Они могут происходить вскоре после трансляции или на любой стадии жизненного цикла белка, они влияют на укладку белковой молекулы, ее стабильность, клеточную локализацию, активность, взаимодействие с другими белками и биомолекулами. В настоящее время экспериментально обнаружено более 620 типов ПТМ (<http://www.uniprot.org/docs/ptmlist.txt>). Накопленные данные показали, что аномальный статус ПТМ какого-либо белка часто указывает на его участие в различных механизмах развития заболеваний, таких как рак, диабет и нейродегенеративные заболевания [1–3] и др. По этой причине посттрансляционные мо-

дификации белков выделяются в качестве многообещающего инструмента для прогнозирования заболеваний [4–6].

Однако наблюдается дефицит исследований, которые бы давали представление о разнообразии окислительных ПТМ белков. В основном исследования направлены на ограниченное количественное определение карбониллов или модифицированных ароматических аминокислотных остатков (образование дитиозиновых сшивок, 3-хлортирозина). В настоящее время для количественной оценки ПТМ используются иммуоферментный анализ и другие иммунохимические методы, но они более применимы для узких задач в области фундаментальных исследований из-за длительных экспериментальных процедур, необходимости использования специфичных к различным

модификациям антител и отсутствием специфичности к конкретному белку, что, в свою очередь, затрудняет исследования механизмов действия окислительного стресса на организм. Масс-спектрометрия является альтернативным подходом, который может обнаруживать широкий спектр модификаций, обеспечивает высокую селективность и специфичность анализа, а также позволяет избежать большинства проблем, связанных с объединением нескольких анализов в одном измерении [7–9]. При всех преимуществах метода масс-спектрометрии и его активном развитии в последние годы, существует ряд нерешенных проблем, которые до сих пор не позволяют применять его в рутинной клинико-лабораторной практике для анализа белковых маркеров, в том числе ПТМ. К ним можно отнести высокую стоимость оборудования и его последующего обслуживания, относительно низкую (по сравнению, например, с иммунохроматографическими методами) пропускную способность, длительную и многостадийную подготовку образцов к анализу, а также сложную обработку и, порой, интерпретацию полученных результатов [10, 11].

Фибрин – это основной белковый компонент тромботического сгустка. Фибриноген – белок-предшественник фибрина, является одним из ключевых факторов свертывания крови [12]. Известно, что фибриноген является белком острой фазы и маркером целого ряда заболеваний. Генетические и фармакологические исследования выявили ключевую роль фибриногена в определении степени местного или системного воспаления [13]. Воспаление является естественным механизмом защиты от патогенов и связано со многими заболеваниями. Многие хронические заболевания, связанные с повышенной продукцией активных форм кислорода, приводят к окислительному стрессу и окислению белков [14]. Фибриноген среди всех белков плазмы проявляет самую высокую чувствительность к воздействию окислителей [15]. Окисление фибриногена ведет к изменению процесса самосборки фибрина и формированию аномальных тромботических сгустков. Они характеризуются тонкими индивидуальными фибриновыми фибриллами, малой пористостью, низкой проницаемостью и, как следствие, повышенной устойчивостью к плазминовому гидролизу [16].

Цель данного исследования – разработка метода упрощенной подготовки проб к анализу методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ–МС/МС) для дальнейшего клинико-диагностического использования, включающий иммунопреципитацию фибриногена на магнитных микрочастицах с последующим ферментативным гидролизом белка. Разработка эффективной методики, которая бы включала выделение целевого белка из исследуемого образца плазмы или любой другой фи-

зиологической жидкости с последующим гидролизом выделенного белка для дальнейшего анализа методом ВЭЖХ–МС/МС с исключением большого количества стадий процесса (например, многочисленных стадий переосаждения, различных видов хроматографии при выделении целевых белков) и использования агрессивных условий (например, при элюировании белков с носителей), а также с уменьшением общей трудоемкости и времени подготовки проб к анализу, является необходимой для использования в протеомных исследованиях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для экспериментов была использована пулированная плазма крови доноров, полученная от Московской центральной станции переливания крови. Окисление образцов плазмы проводилось раствором гипохлорита фирмы Sigma-Aldrich (USA) при температуре 37 °С в течение 1 ч при постоянном перемешивании [17–19]. Количество окислителя составляло 300 мкМ. Реакция останавливалась добавлением десятикратного молярного избытка L-метионина.

Иммунопреципитация фибриногена из образцов плазмы проводилась с использованием магнитных микрочастиц с NH₂-группой производства компании Sileks (Россия), модифицированных моноклональными (клон 1F3) антителами (MAт) против фибриногена (HyTest, Россия) в течение 1 ч при постоянном перемешивании (соотношение плазма/суспензия магнитных частиц равно 9/1). После окончания инкубации магнитные частицы отделялись от обедненной фибриногеном плазмы с использованием магнитного штатива. Затем частицы пятикратно промывались 1 мл 10 мМ натрий-фосфатного буфера (pH = 7.4) с 0.15 М NaCl также с использованием магнитного штатива. После окончания промывки суспендировали частицы в 1 мл этого же буфера.

Успешность иммунопреципитации молекул фибриногена оценивалась методом электрофореза в полиакриламидном геле (5% – концентрирующий гель, 15% – разделяющий гель) по присутствию полипептидных цепей фибриногена. Электрофорез восстановленных образцов фибриногена, предварительно элюированного с поверхности магнитных частиц 1 М раствором глицина, pH = 2, проводили в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) по методике Laemmli. Белок был окрашен красителем кумасси бриллиантовым синим R250 производства компании Pharmacia (Uppsala, Sweden).

Ферментативное расщепление образцов смесью трипсина и Arg-C в соотношении 1 : 1 осуществляли в соответствии с протоколом производителя (Trypsin Gold, mass spectrometry grade,

Таблица 1. Типы детектированных модификаций

Моноизотопная масса	Название модификации	Состав	Модифицированные аминокислотные остатки
+15.994915	окисление	O	Met, Tyr, Trp, Pro, Asn, Asp
+31.989828	диокисление	O (2)	Tyr, Trp
+13.979265	окисление триптофана до оксолактона	H(-2) O	Trp
+44.985077	нитротирозин	H(-1) N O(2)	Tyr

V5280, Arg-C, Sequencing Grade, V1881, Promega, USA). Магнитные частицы с Mat и преципитированным фибриногеном переносились в 50 мМ трис-HCl-буфер с 0.15 М NaCl (pH = 8.0). Гидролиз белков осуществлялся смесью трипсина и Arg-C в соотношении фермент/образец 1/50 в течение 1, 5 и 16 ч при 37°C. Реакцию останавливали путем добавления муравьиной кислоты до конечной концентрации в 0.1%.

Эффективность гидролиза оценивалась методом электрофореза в полиакриламидном геле (5% – концентрирующий гель, 15% – разделяющий гель). Магнитные частицы после гидролиза были проинкубированы в буфере для образцов с добавлением 5% 2-меркаптоэтанола в течение 5 мин при 90°C. Электрофорез восстановленных образцов проводили по той же методике, что и для фибриногена (см. выше). Для определения молекулярных масс полипептидных цепей использовали смесь белков-маркеров с молекулярной массой от 10 до 250 кДа: Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, компании Thermo Scientific (USA).

Эксперименты ВЭЖХ–МС/МС выполняли с помощью хроматографа Agilent 1100 производства фирмы “Agilent Technologies Inc.” (USA) с системой автоматического отбора проб и tandemного масс-спектрометра 7T LTQ-FT Ultra фирмы “Thermo Fisher Scientific” (USA). Для хроматографического разделения 1 мкл каждого образца впрыскивали в колонку C18 размером 75 мкм × 12 см производства компании Ammerbuch-Entringen (Germany). Использовали следующую подвижную фазу: растворитель А – 0.1% муравьиная кислота в H₂O; растворитель В – ацетонитрил. Хроматографию осуществляли с линейным градиентом путем увеличения относительного содержания растворителя В с 3 до 50% в течение 60 мин. Масс-спектрометрический анализ пептидных фракций проводили с использованием программного обеспечения Xcalibur (Thermo Electron, Бремен, Германия) с автоматическим измерением спектров в двухстадийном режиме [20]. На первом этапе точные массы пептидов были измерены в ячейке ICR в диапазоне $m/z = 300–1600$ с разрешением $R = 50$ при $m/z = 400$ (количество ионов в ячейке ICR было установлено равным $5 \cdot 10^6$). На втором этапе пять наиболее интенсивных пиков первой стадии подвергались столкновительной

диссоциации, спектры фрагментов регистрировались в линейной ионной ловушке (число ионов было установлено равным 3×10^4). После фрагментации соответствующие массы родительских пептидов были динамически исключены из рассмотрения в течение следующих 30 с.

Триптические пептиды образцов фибриногена были идентифицированы путем поиска в базе данных UniProtKB (UP000005640-9606 HUMAN, Homo sapiens) с использованием программного обеспечения PEAKS Studio (v.8.5, Bioinformatics Solutions Inc., Canada). Точность определения массы для иона-предшественника была установлена равной 15 ч/млн. Точность массы фрагментов МС/МС – до 0.50 Да.

Фильтрация результатов по средней доле ложных отклонений для пептидов была установлена на уровне <0.1%. Пептиды от шести аминокислотных остатков и содержали максимум три модификации рассматривались для идентификации. Список типов обнаруженных окислительных модификаций приведен в табл. 1.

Идентификация с использованием программы PEAKS достигается путем интеграции результатов поиска в выбранной базе данных и результатов анализа спектров с помощью алгоритма *de novo*. Алгоритм поиска в базе данных используется для идентификации белков. При поиске в базе данных в качестве переменных модификаций указывается только ограниченное число посттрансляционных модификаций для максимизации чувствительности (например, окисление (+15.99) или диокисление (+31.99)). Алгоритм поиска модификаций используется для выявления большего количества ПТМ. На этом этапе анализируются только спектры с высокими показателями достоверности при анализе *de novo*, но не идентифицированные при поиске в базе данных. Список переменных модификаций расширяется и включает более специфические модификации из находящихся в базе данных UNIMOD.

Точные сайты модификации определялись наличием сайт-определяющих фрагментов ионов. Определение достоверных сайтов модификаций было достигнуто с помощью параметра Ascore, включающего доверительную оценку идентификации модификации пептида в конкретной пози-

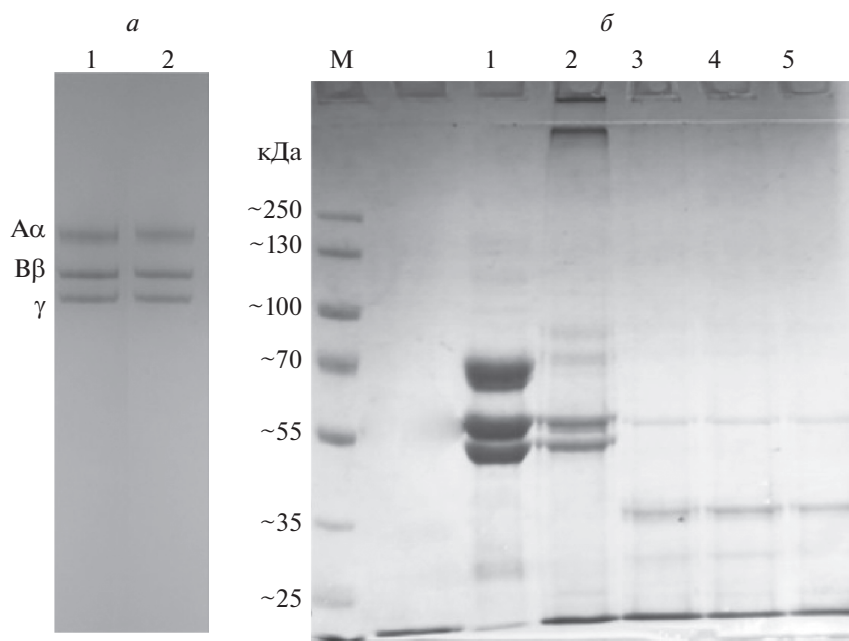


Рис. 1. *a* – электрофореграмма для фибриногена, иммунопреципитированного из нативной плазмы (1), и из плазмы, окисленной 300 мкМ $\text{HOCl}^-/\text{OCl}^-$ (2) после элюирования с магнитных частиц; *б* – электрофореграмма белкового элюата с магнитных частиц после 1 (3), 5 (4) и 16 ч (5) ферментативного гидролиза. На дорожке 1 – полипептидные цепи фибриногена, на дорожке 2 – моноклональные антитела против фибриногена; М – маркерные белки.

ции (аминокислотного остатка), рассчитанной с помощью программного обеспечения PEAKS, в качестве $-10 \log$ вероятности того, что модификация произошла в сообщенной позиции, сравнительно с другими возможными позициями. В этой работе мы использовали порог фильтрации для параметра *Ascore* >100 .

Все эксперименты повторялись трижды. Аминокислотный остаток, который оказывался модифицированным только в одном из образцов, исключался из дальнейшего анализа. Каждый из аминокислотных остатков, окисленных по меньшей мере на 0.1% (степень модификации $>0.1\%$), считался модифицированным.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Первый этап разрабатываемой методики включает взаимодействие молекул фибриногена с МАг, поэтому крайне важно определить влияние окислителя на эпитопную специфичность МАг к фибриногену. На рис. 1*a* представлен результат электрофореза смыва фибриногена, преципитированного из нативной и окисленной плазмы, с магнитных частиц, модифицированных МАг. Количество фибриногена, захваченного МАг на поверхности магнитных частиц, не зависит от обработки окислителем образцов плазмы, что свидетельствует о том, что эпитопная специфичность сохраняется.

Для верной интерпретации результатов на этапе обработки белковых молекул, иммобилизованных на поверхности магнитных частиц, смесью гидролитических ферментов необходимо понимать насколько полно прошел процесс гидролиза. На рис. 1*б* представлена электрофореграмма, демонстрирующая, что большая часть белка была успешно гидролизована с поверхности частиц уже через 1 ч обработки ферментами.

По результатам масс-спектрометрии количество детектированных участков молекулы фибриногена, так называемое покрытие, слабо зависит от времени гидролиза (различия внутри группы составляли не более 10%); см. рис. 2*a*. Изменение покрытия в окисленных образцах может быть вызвано рядом причин, в том числе повреждением участков гидролиза в результате окисления, либо, напротив, экспонированием ранее труднодоступных участков гидролиза в результате гидрофобизации поверхности молекулы белка при окислении.

Увеличение содержания (степень модификации) окисленных пептидных форм в молекуле фибриногена наблюдается в окисленном образце относительно нативного, а также степень модификации растет внутри групп образцов с увеличением времени инкубации при обработке гидролитическими ферментами (рис. 2*a*). Прирост степени модификации внутри групп образцов с увеличением времени обработки может быть объяснен автоокислением белковых молекул, что по-

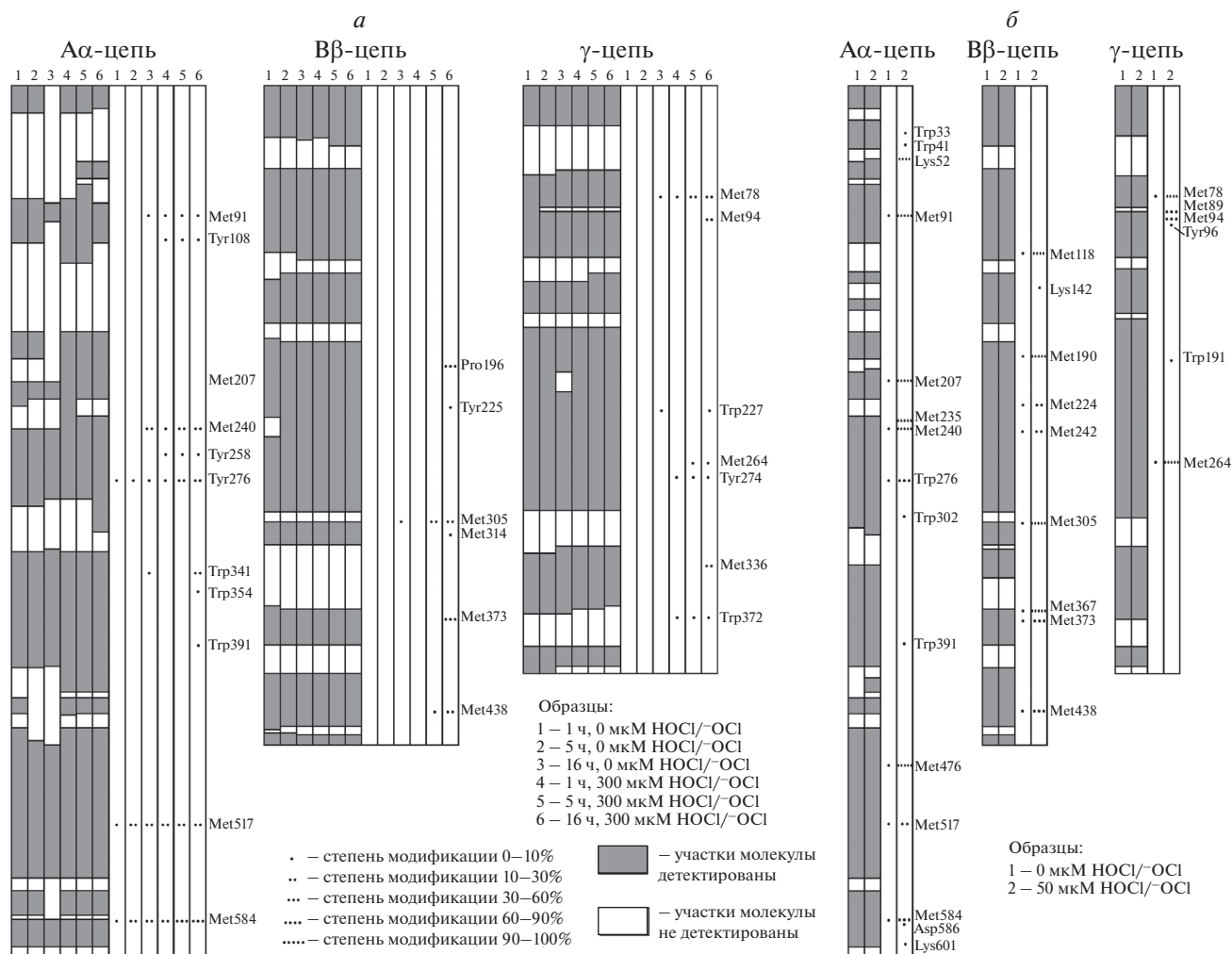


Рис. 2. Покрытие аминокислотной последовательности полипептидных цепей фибриногена и детектированные окислительные модификации.

вышает риск неверной интерпретации результатов. В результате чего, можно предположить, что 1 ч обработки образца гидролитическими ферментами является достаточным для получения достоверных отличий между окисленным и нативным образцами при отсутствии артефактных модификаций.

Методом масс-спектрометрии был детектирован ряд окислительно модифицированных аминокислотных остатков: AαMet91, AαTyr108, AαMet240, AαTyr258, AαTyr276, AαTrp341, AαTrp354, AαTrp391, AαMet517, AαMet584, BβPro196, BβTyr225, BβMet305, BβMet314, BβMet373, BβMet438, γMet78, γMet94, γTrp227, γMet264, γTyr274, γMet336, γTrp372. Ранее опубликованные результаты индуцированного гипохлоритом окисления предварительно очищенного фибриногена [21] коррелируют с данным исследованием (рис. 2б), что свидетельствует о высокой достоверности полученных результатов. Высокая степень модификации аминокислотных остатков при окислении

фибриногена в растворе по сравнению с фибриногеном, окисленным в плазме, обусловлена отсутствием буферных белков (прежде всего, альбумина), перехватывающих молекулы окислителя и, как следствие, большую концентрацию гипохлорита относительно исследуемого белка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Посттрансляционные модификации (ПТМ) участвуют во многих аспектах биологических процессов, регулируя функции белков. Считается, что aberrantные ПТМ белка часто указывают на его участие в механизмах развития заболеваний. По этой причине посттрансляционные модификации белков выделяются в качестве многообещающего инструмента молекулярной диагностики. Однако, во многом из-за методических сложностей при анализе ПТМ и невозможности проведения глобального скрининга ассоциированных с заболе-

ваниями ПТМ, об их диагностической ценности можно судить только по некоторым, весьма ограниченным и неструктурированным исследованиям. Поэтому разработка высокочувствительного и селективного экспресс-метода для определения типов и уровней ПТМ в белках имеет важное научно-техническое значение.

Разработанный метод подготовки проб для анализа методом ВЭЖХ–МС/МС позволяет сократить общее время анализа до 1 ч гидролиза (при стандартных значениях, составляющих 12–16 ч) и, как следствие, избежать образования ПТМ, характерных для продолжительной подготовки проб или использовании агрессивных условий элюции, и затрудняющих анализ результатов. В перспективе данный метод может быть адаптирован к различным диагностически значимым белковым молекулам и упростить процедуры при работе с большим количеством образцов.

В работе использовали оборудование ЦКП ИБХФ РАН.

Исследование выполнено при поддержке грантом Российского научного фонда № 21-74-00146.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jin H., Zangar R.C. // Biomarker Insights. 2009. V. 4. P. 191.
2. Morino C.K., Petersen K.F., Dufour S. et al. // J. Clin. Invest. 2005. V. 115. P. 3587.
3. Gong C.X., Liu F., Grundkeiqbal I. et al. // J. Neural. Transm. 2005. V. 112. P. 813.
4. Kumar V., Calamaras T.D., Haussler D. et al. // Antioxid. Redox. Signal. 2012. V. 17. № 11. P. 1528.
5. Chung H.S., Wang S.B., Venkatraman V. et al. // Circ. Res. 2013. V. 112. № 2. P. 382.
6. Xu H., Wang Y., Lin S. et al. // Genomics, Proteomics, Bioinformatics. 2018. V. 16. № 4. P. 244.
7. Anderson N.L., Anderson N.G., Haineset L.R. et al. // J. Proteome. Res. 2004. V. 3. P. 235.
8. Bronstrup M. // Expert Rev. Proteomics. 2004. V. 1. P. 503.
9. Kirkpatrick D.S., Gerber S.A., Gygi S.P. // Methods. 2005. V. 35. P. 265.
10. Grebe S.K., Singh R.J. // The Clinical biochemist. Reviews. 2011. V. 32. № 1. P. 5.
11. Pan S., Aebersold R., Chen R. et al. // J. Proteome Res. 2009. V. 8. P. 787.
12. Medved L., Weisel J.W. // J. Thromb. Haemost. 2009. V. 7. P. 355.
13. Davalos D., Akassoglou K. // Semin. Immunopathol. 2012. V. 34. P. 43.
14. Berlett B.S., Stadtman E.R. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 33. P. 20313.
15. Shacter E., Williams J.A., Lim M. et al. // Free Radic. Biol. Med. 1994. V. 17. P. 429.
16. Weigandt K.M., White N., Chung D. et al. // Biophys. J. 2012. V. 103. P. 2399.
17. Васильева А.Д., Юрина Л.В., Леонова В.Б. и др. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 6. С. 24.
18. Щеголихин А.Н., Васильева А.Д., Юрина Л.В. и др. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 66.
19. Вассерман Л.А., Юрина Л.В., Васильева А.Д. и др. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 11. С. 59.
20. Кононихин А.С., Захарова Н.В., Юсупов А.Э. и др. // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 12. С. 59.
21. Юрина Л.В., Васильева А.Д., Бугрова А.Е. и др. // ДАН. 2019. Т. 484. № 3. С. 367.

РАЗВИТИЕ ГРИБА *ASPERGILLUS NIGER* НА ЛАКОТКАНЕВОЙ ИЗОЛЯЦИИ В РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРНО-ВЛАЖНОСТНЫХ УСЛОВИЯХ

© 2022 г. И. Г. Калинина^{1*}, В. Б. Иванов¹, С. А. Семенов¹, В. В. Казарин¹, О. А. Жданова¹

¹Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова
Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: i_kalinina1950@mail.ru

Поступила в редакцию 11.06.2021;
после доработки 13.07.2021;
принята в печать 20.07.2021

Изучено влияние температурно-влажностных условий на продолжительность периода, предшествующего увеличению массы гриба *Aspergillus niger* при его развитии на лакотканевой изоляции (период адаптации гриба к материалу). Установлено, что определяющее воздействие на его продолжительность оказывает температура. Влияние относительной влажности воздуха незначительно. Предложена простая аналитическая зависимость, описывающая изменение периода адаптации во всем изученном диапазоне температур. Показано, что в интервале температур, наиболее благоприятном для роста микроорганизмов, величина периода связана с температурой зависимостью, аналогичной уравнению Аррениуса. Результаты исследований могут быть использованы при разработке методов оценки и прогнозирования стойкости полимерных материалов к росту на них плесневых грибов в различных климатических условиях.

Ключевые слова: полимерные материалы, микроскопические грибы.

DOI: 10.31857/S0207401X22020042

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что деградация функциональных свойств лакотканевой изоляции (далее – лакоткани) электропроводов при их эксплуатации в составе изделий техники часто связана с развитием на ней плесневых грибов [1]. Наиболее активным и часто встречающимся на лакоткани ее деструктором является грибок *Aspergillus niger* (*A. niger*) [2]. В работах [3–8] проанализированы все три основные стадии процесса повреждения материала грибом: 1) адгезия микроорганизмов, 2) их рост на материале, 3) изменение свойств последнего. Каждую стадию авторы характеризуют набором специфических параметров, которые, как подтверждено экспериментально, чувствительны к природе полимерного материала и виду гриба-деструктора. Это позволило нам предположить, что и первые две стадии, на которых изменение свойств материала еще незаметно, и третья стадия чувствительны также к условиям протекания процесса и, вероятно, могут использоваться для оценки и прогнозирования биодegradации изоляции при ее эксплуатации в различных климатических условиях. Важнейшими из этих условий, с точки зрения взаимодействия микроорганизмов с материалами, являются температура и влажность [9].

Ранее [10] это предположение было подтверждено для начального этапа процесса – адгезионного взаимодействия *A. niger* с лакотканью. Целью данной работы было изучение закономерностей влияния температурно-влажностных условий окружающей среды на параметры роста *A. niger* на лакоткани.

Рост грибов на полимерных материалах изучался, как правило, только при благоприятных для микроорганизмов температурах и влажности. В большинстве работ [2–6, 11–13] его характеризуют величиной массы микроорганизмов (биомассы) на зараженной ими площади. При этом параметрами процесса являются максимальная, достигаемая в эксперименте, величина биомассы, константа скорости ее роста и продолжительность периода, предшествующего началу увеличения массы гриба на зараженном материале, т.е. периода, характеризующего время, необходимое для адаптации гриба к материалу как к источнику питания (далее – период адаптации, *L*). Перечисленные параметры позволяют проводить оценку устойчивости материалов к росту грибов. Чем меньше *L* и выше значения максимальной биомассы и константы скорости ее роста, тем быстрее микроорганизм адаптируется к материалу, интенсивнее протекает его развитие и, следовательно, тем материал менее стоек к росту

на нем плесневого гриба. Указанные параметры взаимосвязаны между собой, поэтому для проведения оценок устойчивости материалов к поражению микроскопическими грибами они могут использоваться совместно или по отдельности. При выполнении рассматриваемых в статье исследований процесс развития *A. niger* на лакоткани характеризовали параметром L , так как экспериментальное определение его значения менее продолжительно и трудоемко, чем других параметров [12, 14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследовали лакоткань, представляющую собой хлопчатобумажную нитяную основу, пропитанную этилцеллюлозным лаком ЭЦ-959 (ТУ-6-10-691-74). Материал испытывали в составе провода БПВЛ (ТУ 16.505.911-76), представляющего собой медную токопроводящую жилу с внутренним слоем изоляции из поливинилхлоридного пластика и наружной лакотканевой оплеткой. В экспериментах использовали образцы провода сечением 10 мм² и длиной 50 мм.

Тест-культурой служил штамм *A. niger* ВКМ F-2039, являющийся активным биодеструктором полимерных материалов, в том числе лакоткани [2–6]. Все работы с грибом (пересев, выращивание, хранение, приготовление суспензии спор, определение ее концентрации, заражение, инкубирование образцов и др.) проводили, используя стандартизованные приемы, методы и режимы [11, 12]. Гриб выращивали на агаризованной среде Чапека–Докса при температуре $(29 \pm 2)^\circ\text{C}$ в течение 12 сут. Споры выросшего *A. niger* использовали для приготовления их суспензии в водной среде. Бактериологической петлей их переносили в колбу со средой и тщательно перемешивали. Плотность суспензии составляла $\sim 10^6$ клеток в 1 мл воды. Ее контролировали микроскопически с помощью счетной камеры Горяева.

Суспензию методом распыления наносили на предварительно очищенные от внешних загрязнений образцы. Количество спор гриба на их поверхности составляло $(1 \div 2) \cdot 10^5$. После заражения образцы выдерживали до испарения воды с поверхности в течение 20–40 мин и помещали в камеру тепла и влаги КТВ-0.15 объемом 150 дм³, где поддерживали режимы с различными сочетаниями температуры и влажности. Эксперименты проводили при температурах (t) 15, 20, 24, 28 $^\circ\text{C}$ и относительной влажности воздуха (ϕ) 75, 85, 98%. При выборе температурно-влажностных условий учитывали, что температура $(29 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительная влажность более 95% являются наиболее благоприятными для развития *A. niger* [11, 12, 14, 15]. Предварительные исследования показали, что дальнейшее повышение температуры приводит к

снижению интенсивности роста микроорганизма. При температуре 15 $^\circ\text{C}$ и влажности менее 75% признаки роста гриба на лакоткани не обнаруживаются.

Определение продолжительности периода адаптации микроорганизма к материалу проводили, основываясь на методе оценки интенсивности роста грибов на полимерных материалах [11, 12]. Образцы лакоткани извлекали из испытательной камеры и осматривали под микроскопом ($\times 100$), фиксируя внешние признаки развития *A. niger* – появление незначительно развитого мицелия. Осмотры проводили на 4-е сутки инкубации, затем – каждые сутки и через каждые 6–10 ч после появления признаков роста хотя бы на одном образце. При обнаружении на образце указанных внешних признаков его испытания прекращали, а при их отсутствии образец возвращали в камеру тепла и влаги. Величину L принимали равной интервалу времени от начала инкубации зараженного грибом образца до момента обнаружения на нем внешних признаков развития гриба. При каждом сочетании температуры и влажности испытывали пять образцов. Обработку экспериментальных данных проводили по алгоритмам программы STATISTICA 6.1. Разброс результатов не превышал 10%. Его характеризовали отношением среднего квадратичного отклонения (R^2) к математическому ожиданию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлены полученные методом наименьших квадратов линейные зависимости времени адаптации гриба *A. niger* к лакоткани от влажности воздуха (при различных постоянных значениях температуры). Средние значения L приведены с доверительным интервалом, определенным при уровне значимости $\alpha = 0.05$.

Видно, что в исследованном температурно-влажностном интервале параметр L чувствителен к варьируемым факторам внешней среды. Минимальное его значение, как и следовало ожидать, наблюдается при наиболее благоприятных для гриба условиях: $t = 28^\circ\text{C}$ и $\phi = 98\%$. Снижение температуры до 15 $^\circ\text{C}$ (при постоянной влажности воздуха) приводит к возрастанию времени адаптации гриба к материалу более чем в четыре раза. Снижение влажности до 75% (при постоянной температуре воздуха) сопровождается незначительным (менее 10%) увеличением величины L . Таким образом, влияние относительной влажности воздуха (при постоянной температуре) на продолжительность адаптации незначительно. Поэтому в качестве обобщающей характеристики периода адаптации гриба к материалу (при данной температуре) можно использовать среднее значение L_{cp} из полученных при всех исследованных влажно-

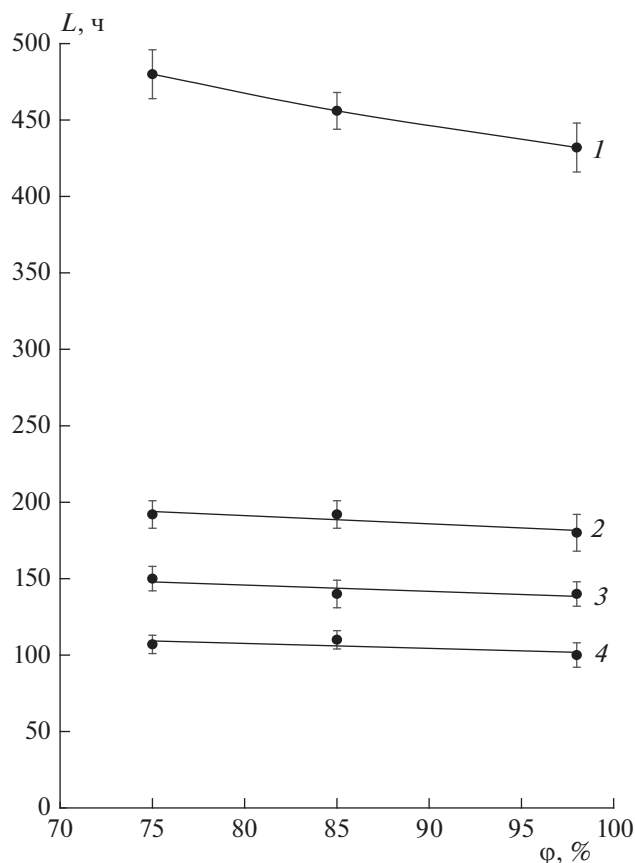


Рис. 1. Зависимость периода адаптации L спор гриба *A. niger* к лакоткани от относительной влажности воздуха ϕ при различных постоянных значениях температуры t : 1 – 15, 2 – 20, 3 – 24, 4 – 28°C. Средние значения L показаны с доверительным интервалом, определенным при уровне значимости $\alpha = 0.05$.

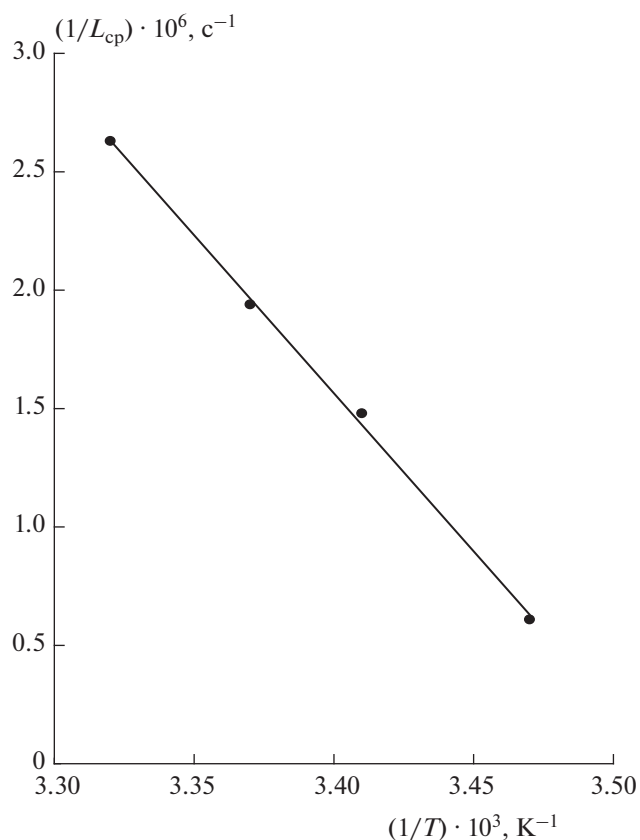


Рис. 2. Зависимость обратной величины периода адаптации $(1/L_{cp})$ спор гриба *A. niger* к лакоткани от температуры. Точки – средние величины при всех значениях относительной влажности при данной температуре (см. текст).

стях. Расчеты показали, что в изученном диапазоне температур зависимость L_{cp} от абсолютной температуры T с высокой точностью ($R^2 = 0.998$) описывается простым эмпирическим законом вида (рис. 2):

$$1/L_{cp} = a - b(1/T), \quad (1)$$

где T – в К, $a = (4.64 \pm 0.22) \cdot 10^{-2}$ в $с^{-1}$ и $b = (1.32 \pm 0.069) \cdot 10^{-2}$ в К/с – коэффициенты, полученные при численном моделировании.

Зависимость $1/L_{cp}$ от $1/T$ в форме уравнения Аррениуса

$$\ln(1/L_{cp}) = \ln A_L - E_L/RT, \quad (2)$$

где E_L – энергия активации процесса адаптации гриба к материалу, A_L – предэкспоненциальный множитель, а R – универсальная газовая постоянная, для тех же экспериментальных точек выполняется заметно хуже ($R^2 = 0.944$). Это объясняется тем обстоятельством, что температура $t = 15^\circ\text{C}$ (288 К) является в определенном смысле “пограничной”, ниже которой адаптация гриба к мате-

риалу не наблюдается. Если данные, полученные при 15°C при анализе средних значений L_{cp} не учитывать, то уравнение (2) выполняется с высокой точностью ($R^2 = 0.999$). Величина энергии активации E_L в этом диапазоне температур составляет (52.1 ± 1.9) кДж/моль, а значение параметра $A_L = (2.81 \pm 0.14) \cdot 10^3 с^{-1}$.

Период адаптации гриба к полимерному материалу является в определенном смысле аналогом индукционных периодов термо- [16–19] и фотодеструкции полимеров [20, 21]. Детальный анализ неингибированного термоокисления полимеров [16] свидетельствует о том, что величина индукционного периода определяется кинетическими закономерностями накопления и расходования гидропероксидных групп – основных промежуточных продуктов, ответственных за выродженно-разветвленный цепной характер процесса. Значения параметров уравнения Аррениуса зависят от химической структуры полимера и составляют (при оценке непосредственно величины индукционного периода) 10^6 – $10^{14} с^{-1}$ для A и 65–153 кДж/моль для E .

Полученные в данной работе при исследовании начального периода микробиологической деструкции лакоткани значения E_L существенно меньше, а значения A_L больше, чем при термоокислительной деструкции полимеров. Однако необходимо иметь в виду, что для биохимических процессов [22], так же как и для термических [16] наблюдается компенсационный эффект: чем меньше величина E , тем больше A .

Принято считать, что зависимость типа (2) в отличие от эмпирической зависимости (1) имеет определенный физический смысл. Можно полагать, что и в данном случае параметры A_L и E_L в известной степени связаны с химическими и физическими процессами в системе микроскопический гриб – материал.

В частности, авторами монографии [22] при рассмотрении и анализе биохимических процессов обмена веществ в живом организме успешно использовались известные представления о протекании химических реакций. При этом смысл уравнения (2) для рассматриваемого процесса может быть объяснен следующим образом. Известно [15], что скорость процесса развития микроорганизма в период его адаптации к питательному субстрату контролируется специфическими для этого периода биохимическими реакциями синтеза ферментов и других биологически активных веществ, необходимых для последующего роста биомассы. Тогда величина $1/L$ будет характеризовать скорость увеличения содержания в клетках этих веществ, а уравнение (2) – ее зависимость от температуры.

По аналогии с химическими процессами можно полагать, что параметр E_L уравнения (2) характеризует энергетическую, а A_L – пространственную затрудненность процессов, определяющих скорость адаптации микроорганизма к материалу. Отмеченное выше различие параметров E_L и A_L от значений от аналогичных параметров для химических процессов, связано, очевидно, с особенностями биохимических процессов по сравнению с простыми химическими реакциями. Так, например, в работе [22] при исследовании термоинактивации микробных клеток оно объяснялось спецификой разрыва множества (а не единичных) химических связей при термораспаде белковых соединений.

Необходимо отметить, что эмпирический характер выявленных зависимостей ограничивает возможности их применения только для исследованной пары лакоткань – *A. niger*. Вместе с тем общность закономерностей процесса роста плесневых грибов на различных субстратах позволяет предполагать, что рассмотренный подход может быть использован для широкого спектра полимерных материалов и микроорганизмов-биодеструкторов. Кроме того, вероятно, что наряду с

уравнением Аррениуса для анализа исследуемого процесса могут быть использованы и другие закономерности протекания химических реакций, в частности присущие им кинетические уравнения. Целесообразно в дальнейшем оценить возможность и границы их применения для описания роста микроорганизмов-деструкторов на полимерных материалах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При благоприятных для развития грибов температуре (15–28°C) и влажности (75–98%) продолжительность периода, предшествующего увеличению массы плесневого гриба *A. niger* на лакоткани (периода адаптации гриба к материалу) определяется преимущественно температурой и практически не зависит от влажности окружающей среды. Предложена простая аналитическая зависимость, описывающая изменение периода адаптации во всем изученном диапазоне температур. Она позволяет вычислить продолжительность этого периода при любых сочетаниях величин температуры и влажности воздуха в исследованном диапазоне их изменения. Показано, что величина периода адаптации гриба к материалу в интервале температур, наиболее благоприятном для роста микроорганизмов (20–28°C), связана с температурой аналитической зависимостью, аналогичной уравнению Аррениуса. Полученные результаты могут быть использованы при разработке методов оценки и прогнозирования стойкости полимерных материалов к росту на них плесневых грибов в различных климатических условиях.

Работа выполнена в рамках финансирования госзадания ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семенова РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калинина И.Г., Иванов В.Б., Семенов С.А., Казарин В.В., Жданова О.А. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 11. С. 48.
2. Gumargalieva K.Z., Sevenov S.A., Kalinina I.G., Zaikov G.E., Zimina L.A., Artisi M.I. // RFP (Rubber, Fibre, Plastics) Intern. 2011. V. 6. № 2. P. 114.
3. Калинина И.Г., Семенов С.А., Гумаргалиева К.З., Казарин В.В. // Хим. физика. 2017. Т. 36. № 3. С. 54.
4. Калинина И.Г., Семенов С.А., Гумаргалиева К.З., Казарин В.В. // Хим. физика. 2018. Т. 37. № 2. С. 78.
5. Семенов С.А., Гумаргалиева К.З., Заиков Г.Е. // Вестн. МИТХТ. 2007. Т. 2. № 6. С. 3.
6. Семенов С.А., Гумаргалиева К.З., Заиков Г.Е. // Вестн. МИТХТ. 2008. Т. 3. № 2. С. 3.
7. Sudip Kumar Sen, Sangeeta Raut // J. Environ. Chem. Eng. 2015. V. 3. P. 4.
8. Whitehead K.A., Deisenroth T., Preuss A., Liauw C.M., Verran J. // Colloids Surf. B. 2011. V. 82. P. 483.
9. Заиков Г.Е., Пехташева Е.Л., Неверов А.Н. Биодеструкция и стабилизация природных и искус-

- ственных полимеров. Основные причины биоповреждений и способы их предотвращения. Saargbrucken, Germany: LAP Lambert Acad. Publ., 2012.
10. Калинина И.Г., Иванов В.Б., Семенов С.А., Казарин В.В., Жданова О.А. // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 6. С. 71.
 11. ГОСТ 9.048-89. ЕСЗКС. Изделия технические. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. М.: Изд-во стандартов, 1994.
 12. ГОСТ 9.049-91. ЕСЗКС. Материалы полимерные и их компоненты. Методы лабораторных испытаний на стойкость к воздействию плесневых грибов. М.: Изд-во стандартов, 1994.
 13. *Vivi V.K., Martins-Franchetti S.M., Attili-Angelis D.* // *Folia Microbiol.* 2019. V. 64. P. 1.
 14. ГОСТ 9.803-88. ЕСЗКС. Фунгициды. Метод определения эффективности.
 15. Шлегель Г. Общая микробиология. М.: Мир, 1987.
 16. Шляпников Ю.А., Кирюшкин С.Г., Марьин А.П. Антиокислительная стабилизация полимеров. М.: Химия, 1986.
 17. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. Химическая физика молекулярного разрушения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1988.
 18. Куценова А.В., Иванов В.Б., Родионова О. Е., Померанцев А.А. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 12. С. 74.
 19. Писаренко Л.М., Касаикина О.Т., Иванов В.Б. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 9. С. 31.
 20. *Zhuravlev M.A., Ivanov V.B.* // *Eur. Polym. J.* 1989. V. 25. P. 391.
 21. *Ivanov V.B., Bitt V.V., Solina E.V., Samoryadov A.V.* // *Polymers.* 2019. V. 11. № 10. 1579.
 22. Мунблит В.Я., Тальрозе В.Л., Трофимов В.И. Термоиноктивация микроорганизмов. М.: Наука, 1985.

ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРЫ, ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ КУКУРУЗНОГО КРАХМАЛА ПРИ МЕХАНИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКЕ

© 2022 г. Л. А. Вассерман^{1, 3}, А. А. Папахин², А. В. Кривандин¹,
А. Г. Филатова³, З. М. Бородина², И. Г. Плащина¹

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

²Всероссийский научно-исследовательский институт крахмалопродуктов – филиал Федерального научного центра им. В.М. Горбатова Российской академии наук, Люберцы, Московская обл., Россия

³Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук, Москва, Россия

*E-mail: lwasserma@mail.ru

Поступила в редакцию 27.07.2021;

после доработки 17.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

Приведены результаты исследований структуры, термодинамических и физико-химических свойств нормального кукурузного крахмала, подвергнутого механической обработке в шаровой мельнице в течение различных интервалов времени. Показано, что в процессе механической обработки происходит истирание и расщепление гранул крахмала, образование на их поверхности шероховатостей и трещин, увеличение гранул в размерах. В процессе обработки происходит разрушение кристаллических областей структуры, вплоть до их полного исчезновения после 8 ч обработки. Наблюдаемые изменения являются следствием разрушения структуры кристаллических ламелл амилапектина. Крахмал, подвергнутый механической обработке, характеризуется более низкими значениями температуры, энтальпии и уровня кооперативности процесса плавления. В то же время механически модифицированный крахмал обладает более высокими показателями водорастворимости, водопоглощения, ферментативной доступности по сравнению с нативным. Механическая обработка гранул крахмала в шаровой мельнице в течение различных промежутков времени может быть использована для модификации физико-химических свойств кукурузного крахмала в заданных пределах.

Ключевые слова: кукурузный крахмал, механическая обработка, структура, морфология, термодинамические параметры, дифференциальная сканирующая микрокалориметрия, водопоглощение, водорастворимость, ферментативная доступность.

DOI: 10.31857/S0207401X22020157

ВВЕДЕНИЕ

Крахмал – это наиболее распространенный возобновляемый биополимер, содержащийся в различных растениях (кукуруза, пшеница, рис, горох и др). Особенности строения и соотношение основных полисахаридов крахмала (амилоза и амилопектин) определяют как общую структуру крахмала, так и его физико-химические и функциональные свойства. Крахмалы разного ботанического происхождения и их модификаты широко применяются в различных областях промышленности как загустители, стабилизирующие и гелеобразующие агенты для производства продуктов пищевого и фармацевтического назначения, а также в качестве составляющих новых композиционных и биоразлагаемых материалов [1–4]. Наибо-

лее широко применяемым в промышленности является кукурузный крахмал, который составляет более 80% мирового рынка [5].

Для получения крахмалов с заданными свойствами используют биологические, химические и физические методы их модификации. В результате биологической модификации, а именно энзиматического гидролиза, возможно, например, получать крахмалы с пористой структурой. Химическая модификация позволяет изменять гидрофильные, эмульгирующие и вязкостные свойства крахмалов [6, 7]. Физическая модификация крахмалов имеет преимущества перед другими способами, так как процесс такой модификации является безотходным и в результате такой модификации получаются

крахмалы, безопасные для использования в пищевых и косметических продуктах [8].

Влияние механической обработки на свойства крахмалов различного ботанического происхождения широко изучаются (см., например, работы [8–11]). В процессе обработки крахмалов в шаровой мельнице в результате трения, столкновения, удара и других механических воздействий происходит изменение кристаллической структуры крахмалов, что приводит к изменению их физико-химических свойств, таких как, например, растворимость, ферментативная атакуемость, термические и морфологические характеристики и др. [8]. В результате такой обработки кристаллическая часть деградирует, а аморфная часть в крахмалах увеличивается, даже когда процесс происходит при комнатной температуре и без добавления воды или другого растворителя, например спирта [9]. Степень изменения свойств крахмалов зависит от способа механической обработки, оборудования, технологических параметров процесса (время, температура, частота воздействия) и других факторов.

В настоящее время является актуальным поиск различных путей модификации крахмалов с заданными свойствами. Одним из возможных способов модификации является предварительная механическая обработка крахмалов. Учитывая, что кукурузный крахмал, а именно крахмал с содержанием амилозы 22–24% — так называемый нормальный кукурузный крахмал, наиболее широко применяется в различных областях промышленности, является актуальным поиск возможных путей его модификации является актуальной задачей. Поэтому цель данного исследования состояла в изучении влияния времени механической обработки нормального кукурузного крахмала в шаровой мельнице на его физико-химические свойства.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

МАТЕРИАЛЫ

В работе использовали нормальный кукурузный крахмал влажностью 24.4% с содержанием амилозы 24.4%, белка — 0.4% и золы — 0.1%, который был получен от Новлянского крахмало-паточного завода (Россия).

МЕТОДЫ

Механическая обработка крахмалов

Механическую обработку крахмала осуществляли на вибрационной шаровой мельнице в течение 8 ч с отбором образцов после 0, 2, 4, 6, 8 ч помола. Объем барабана мельницы — 100 см³. Использовали смесь шаров с диаметрами 15 мм ($m_1 = 3.2$ г) и 10 мм ($m_2 = 1.2$ г) при соотношении $m_1 : m_2 = 3.5 : 1$. Масса обрабатываемого крахмала была равна 100 г, соотношение масс шаров и крахмала — 10 : 1, ча-

стота вибрации активатора — 50 Гц, амплитуда колебаний — 1.5 мм.

Световая микроскопия и сканирующая электронная микроскопия

Морфологию гранул нативного и подвергнутого механической обработке кукурузного крахмала определяли с помощью световой микроскопии и сканирующей электронной микроскопии.

Световая микроскопия. Определение формы и вида гранул крахмала осуществляли на микроскопе марки Leica DMLM (Germany). Образцы нативного и обработанного крахмала суспендировали в смеси глицерин : вода в соотношении 1 : 1 и затем помещали на предметное стекло. Анализ морфологии гранул крахмала проводили при 500-кратном увеличении микроскопа.

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

Рентгенодифракционный анализ

Рентгенодифракционное исследование крахмалов проводили в воздушно-сухом состоянии методом Брэгга–Брентано на дифрактометре HZG-4 производства компании Freiburger Präzisionsmechanik (Germany) с использованием рентгеновской трубки с медным анодом и никелевого β -фильтра), как в работе [12].

Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия

Термодинамические параметры плавления 0.3%-ных (по весу) водных дисперсий нативного крахмала и крахмала, подвергнутого механической обработке в течение различного времени, определяли с помощью метода высокочувствительной сканирующей микрокалориметрии (ДСК) на микрокалориметре ДАСМ-4 (Пушино, Россия). Измерения проводили в диапазоне температур 20–120°C при скорости нагревания 2°C/мин и постоянном давлении 2.5 МПа. Объем исследуемого образца в закрытой ячейке составлял 0.5 см³. Калибровку шкалы избыточной теплоемкости проводили с помощью эффекта Джоуля–Ленца для каждого эксперимента. Ранее было показано, что в данных условиях нет необходимости в учете термического запаздывания и продолжительности обработки образца в калориметрической ячейке [13]. В качестве раствора сравнения при измерении использовали деионизованную воду, полученную при помощи системы очистки воды Direct-Q3

(Millipore, France) с удельным сопротивлением 18.2 МОм · см при температуре 25°C.

Средние значения термодинамических параметров плавления кристаллических ламелей крахмалов определяли из не менее чем трех параллельных измерений. Значение температуры плавления соответствовало максимуму пика теплоемкости на термограмме. Значение экспериментальной энтальпии плавления соответствовало площади под пиком кривой избыточной теплоемкости как функции температуры. Расчет молярной энтальпии плавления (ΔH_{cal}) проводили на ангидроглюкозный остаток (162 г/моль). Процесс плавления крахмалов в первом приближении можно считать квазиравновесным [12, 14], что дает возможность применять одностадийную модель плавления, в которой этот процесс описывается как равновесная реакция между нативным и расплавленным состояниями.

Определение интенсивности синего окрашивания (“синего” числа) йодных комплексов и содержания амилозы

“Синее” число и содержание амилозы в испытуемых образцах крахмала определяли по методике, описанной в работе [15].

Определение водоудерживающей способности и водорастворимости

Индексы водопоглощения и водорастворимости образцов нативного и подвергнутого механической обработке кукурузного крахмала определяли в соответствии с методикой, описанной Di-ор с соавт. [16].

Определение ферментативной атакуемости

Ферментативную атакуемость нативного и подвергнутых механической обработке образцов кукурузного крахмала оценивали путем определения степени гидролиза 5%-ной суспензии испытуемого крахмала в присутствии очищенной глюкоамилазы из *Asp. niger* (Optidex L-400, Du Pont, Danisco, USA) при дозировке фермента 20 ед. ГлС/г сухого вещества крахмала, рН = 4.2, температуре 50°C и продолжительности процесса 1 ч при постоянном перемешивании в соответствии с методикой, разработанной ранее [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Световая микроскопия и сканирующая электронная микроскопия были применены для определения изменений морфологии гранул нормального кукурузного крахмала, подвергнутых обработке в шаровой мельнице в зависимости от времени (рис. 1). В литературе показано, что сте-

пень разрушения гранул определяется условиями обработки, такими как время, температура, влажность, частота вибрации [18, 19].

Из микрофотографий световой микроскопии (рис. 1а–з) видно, что с увеличением времени обработки в шаровой мельнице гранулы крахмала увеличиваются в размерах, а часть гранул разрушается, и появляются их осколки (особенно это заметно при обработке в течение 8 ч). При этом в процессе обработки поверхность гранул изменяется и становится рыхлой. Видно, что для нативного крахмала наблюдается характерная картина двулучепреломления в виде “мальтийского креста”, что говорит о радиальной ориентации упорядоченных молекул амилопектина по отношению к поверхности гранулы (рис. 1а). В результате механической обработки “мальтийский крест” начинает исчезать, и в крахмале, обработанном в течение 8 ч, он полностью отсутствует (рис. 1б–з). Вероятно, в процессе механической обработки крахмалов происходит истирание и расщепление гранул крахмала, что сопровождается исчезновением “мальтийского креста”.

Из приведенных микрофотографий, полученных с использованием сканирующей электронной микроскопии (рис. 1д–з), видно что гранулы нативного кукурузного крахмала характеризуются овальной или многогранной формой; поверхность гранул гладкая, без царапин, но со случайно распределенными углублениями или ямками очень малой глубины (лунками). При механической обработке в шаровой мельнице в течение 2 ч гранулы начинают разрушаться на маленькие гранулы, теряя овальную форму. Большинство гранул характеризуются многогранной формой, на их поверхности начинают появляться трещины и бороздки.

При дальнейшей обработке на поверхности гранул начинают увеличиваться дефекты и трещины, маленькие гранулы начинают слипаться и прилипать к большим гранулам. В результате размеры гранул увеличиваются. С увеличением времени обработки доля маленьких гранул уменьшается, что коррелирует с литературными данными [10, 18, 19]. Наиболее существенные изменения в морфологии гранул наблюдаются при максимальной обработке в течение 8 ч – гранулы характеризуются потерей гладкости поверхности и становятся шероховатыми (рис. 1з). Количество дефектов в гранулах увеличивается, поврежденные гранулы группируются вместе и прилипают к поверхности более крупных гранул. В результате в крахмале присутствуют гранулы нерегулярной кубической формы с шероховатой поверхностью, в основном характеризующиеся большими размерами. Вероятно, в зависимости от времени механической обработки существует два этапа растрескивания и реструктурирования гранул крахмала: в начале механиче-

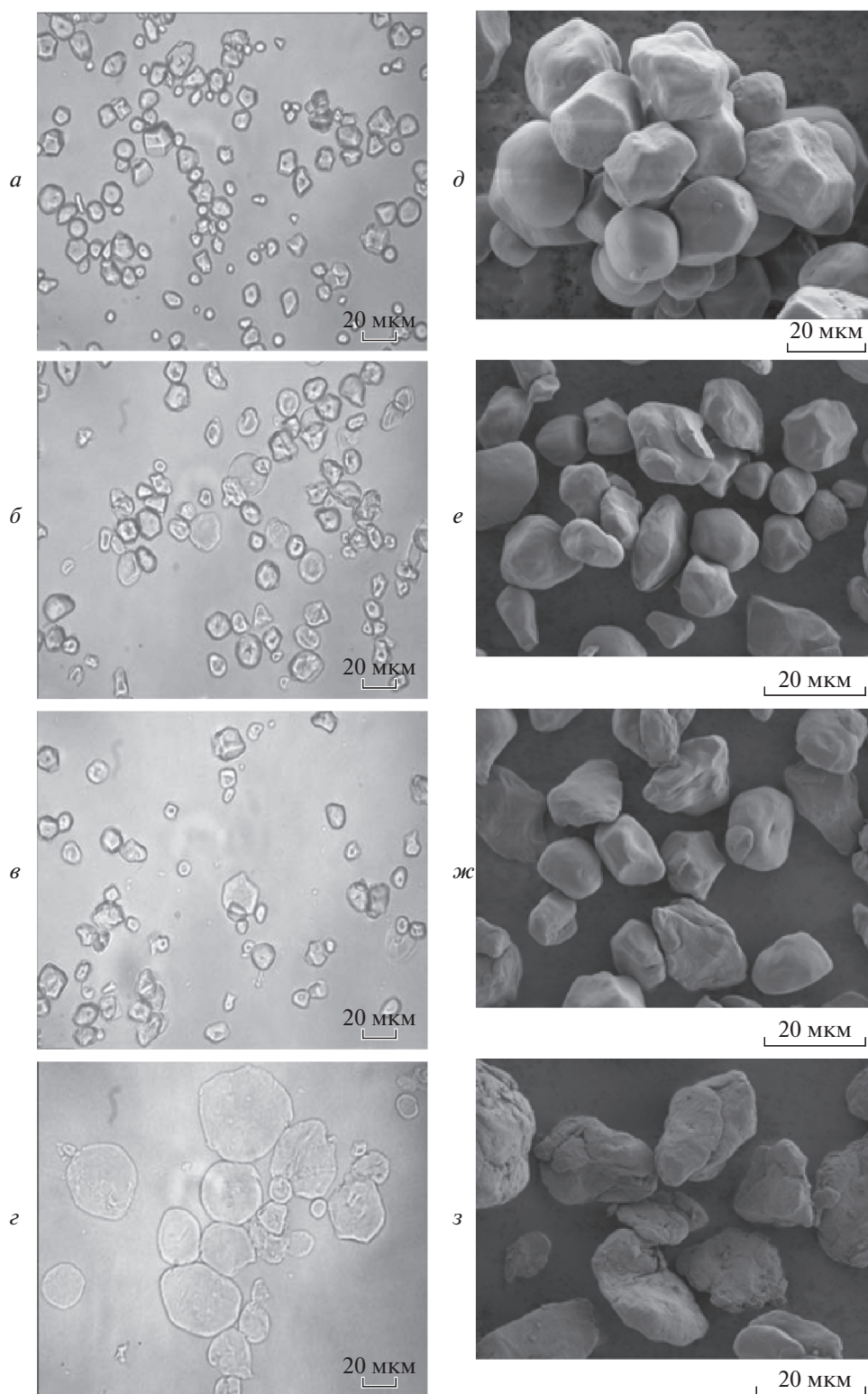


Рис. 1. Фотографии гранул нативного (*а, д*) и размолотого кукурузного крахмала в течение различного времени, полученные с помощью световой (*б–г*) и сканирующей электронной (*е–з*) микроскопий. Время обработки: 2 ч (*б, е*), 4 ч (*в, ж*), 8 ч (*г, з*).

ской обработки происходит разрушение гранул на мелкие фрагменты, и затем с увеличением времени обработки крошечные фрагменты крахмальных гранул либо объединяются в новые гранулы, либо присоединяются к имеющимся гранулам, при этом их размер возрастает [10, 18].

На рис. 2 представлены дифрактограммы образца нативного кукурузного крахмала (кривая 1) и крахмала, обработанного в шаровой мельнице в течение 2, 4, 6 и 8 ч (кривые 2, 3, 4 и 5 соответственно). Из этого рисунка (кривая 1) видно, что исходный крахмал имеет характерную для кукурузного крахмала аморфно-кристаллическую структуру, кристаллическая часть которой, как следует из положения дифракционных линий, представлена А-формой полиморфной структуры [20, 21]. Степень кристалличности этого крахмала, рассчитанная по рентгенодифракционным данным, составляет ~30%.

В результате обработки в шаровой мельнице интенсивность дифракционных пиков кристаллической части крахмала уменьшается, причем уменьшается тем больше, чем больше время такой обработки (рис. 1, кривые 2–5). Следовательно, при обработке крахмала в шаровой мельнице происходит разрушение его кристаллических областей. Положение дифракционных пиков кристаллической части крахмала при этом не изменяется (рис. 1, кривые 1–4), и, соответственно, кристаллическая форма этой части крахмала при обработке в шаровой мельнице остается прежней (А-форма).

После обработки крахмала в шаровой мельнице в течение 8 ч все дифракционные пики, соответствующие его кристаллической части, исчезают и крахмал становится полностью рентгеноаморфным (рис. 1, кривая 5). Термин “рентгеноаморфный” применительно к какому-либо веществу означает, что это вещество является либо аморфным, либо состоит из кристаллитов, которые имеют столь малый размер и/или настолько сильно искаженную кристаллическую структуру, что для них не наблюдаются дифракционные пики, присущие более крупным кристаллитам этого вещества.

Таким образом, данные рентгеновской дифракции (рис. 1, кривые 1–5) показывают, что механическая обработка в шаровой мельнице кукурузного крахмала вызывает разрушение его кристаллических областей, в результате которого эти области становятся либо аморфными, либо столь сильно изменяются (а также, возможно, становятся при этом и менее упорядоченными), что дифракционные пики, присущие кристаллической части нативного крахмала, полностью исчезают. Эти результаты коррелируют с литературными данными [9, 22].

Термодинамические параметры плавления и термограммы плавления водных дисперсий на-

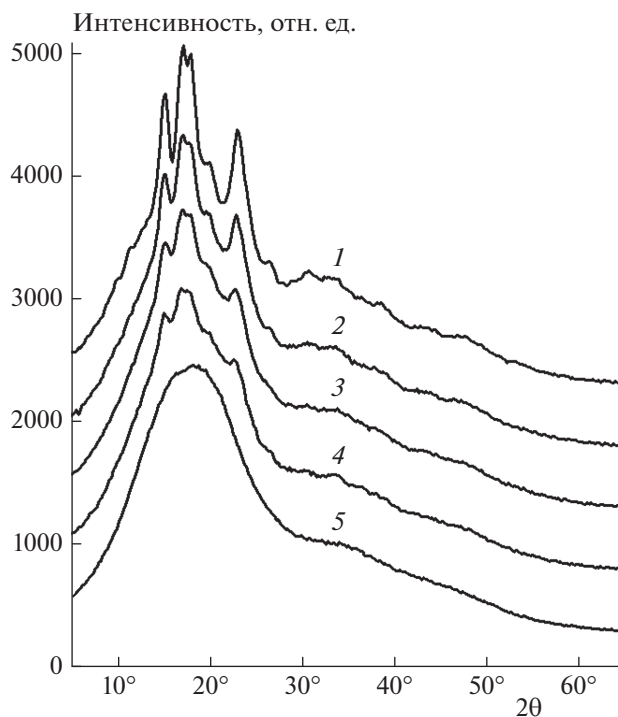


Рис. 2. Дифрактограммы нативного (1) и подвергнутого механической обработке в течение 2 (2), 4 (3), 6 (4) и 8 ч (5) кукурузного крахмала. Дифрактограммы 1, 2, 3 и 4 сдвинуты вверх по оси ординат на 2000, 1500, 1000 и 500 ед. интенсивности соответственно.

тивного и подвергнутого механической обработке в течение различного времени нормального кукурузного крахмала приведены на рис. 3 и в табл. 1. Термограмма нативного нормального кукурузного крахмала, полученная методом ДСК, является типичной для этого крахмала [13, 23]. На ДСК-термограммах (рис. 3а–г) наблюдаются два пика, первый из которых соответствует плавлению кристаллических ламелл амилопектина, а второй – диссоциации амилозо-липидного комплекса [13, 23].

Механическая обработка приводит к уменьшению термодинамических параметров плавления (температуры, энтальпии) кристаллических ламелл амилопектина кукурузного крахмала (табл. 1). Причем увеличение времени обработки крахмала сопровождается большим уменьшением значений температуры и энтальпии плавления кристаллических ламелл амилопектина по сравнению с соответствующими значениями для нативного кукурузного крахмала, что сопровождается уширением пика плавления на ДСК-термограммах и, соответственно, увеличением разности температур начала и окончания процесса желатинизации (ΔT). Увеличение значения ΔT с возрастанием времени обработки может указывать на понижение уровня кооперативности процесса плавления

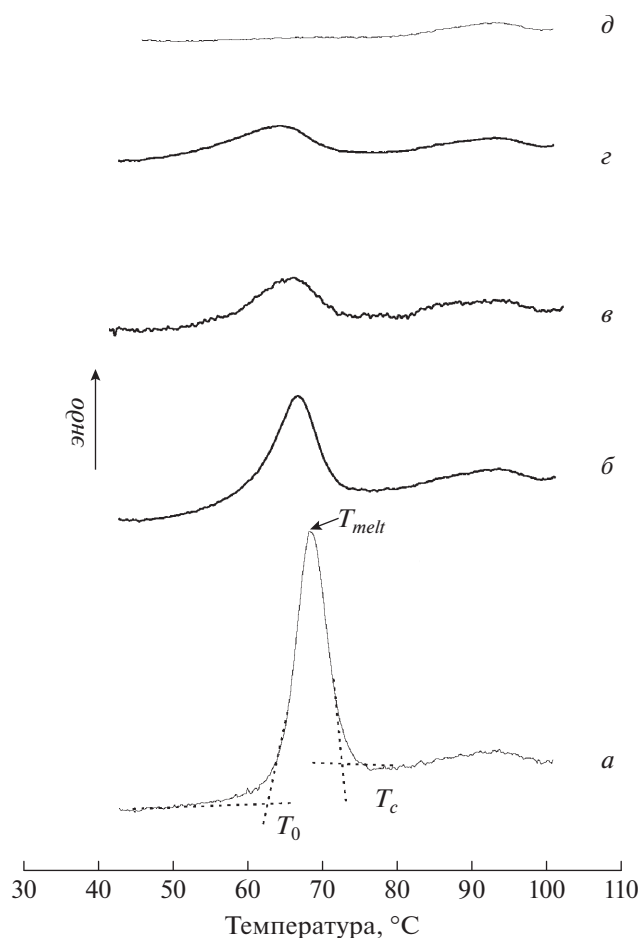


Рис. 3. ДСК-термограммы плавления 0.3%-ных (в/в) водных дисперсий нативного (а) и подвергнутого механической обработке кукурузного крахмала в течение 2 (б), 4 (в), 6 (г) и 8 ч (д); T_{melt} – температура плавления амилопектина, T_0 и T_c – температуры начала и конца желатинизации соответственно.

кристаллических ламеллей, а также на увеличение гетерогенности гранул крахмала каждого образца в процессе механической обработки [24, 25].

Как видно из приведенных данных, значения температуры и энтальпии диссоциации амилозо-липидных комплексов практически одинаковы для всех исследуемых образцов и не зависят от времени обработки (табл. 1). Следовательно, обработка при исследуемых условиях на шаровой мельнице не затрагивает амилозо-липидный комплекс кукурузного крахмала.

Таким образом, механическая обработка в шаровой мельнице кукурузного крахмала в исследуемых условиях приводит к нарушению структуры кристаллических ламеллей амилопектина, при этом полное разрушение кристаллических структур наблюдается при восьми часовой обработке. Этот эффект сопровождается полным отсутствием первого пика плавления на ДСК-термограмме (рис. 3д). По всей видимости, в процессе механической обработки происходит превращение гетерогенной матрицы крахмальных гранул в гомогенную за счет разрушения кристаллических ламеллей [26, 27].

Хорошо известно, что значение “синего” числа связано с взаимодействием крахмала и йода, которое является характерной реакцией для полисахаридов. Причем полисахариды крахмала при взаимодействии с йодом дают реакцию разного цвета, а именно – при взаимодействии йода с амилозой наблюдается интенсивное синее окрашивание, а в случае амилопектина красное-фиолетовый цвет, который менее интенсивный, чем синий. Показано, что механическая обработка некоторых крахмалов приводит к увеличению содержания амилозы вследствие нарушения $\alpha(1-6)$ -связей амилопектина и образованию линейных молекул с меньшей молекулярной массой [25, 28]. В табл. 2 приведены значения “синего” числа и рассчитанное кажущееся содержание амилозы в исследуемых образцах кукурузного крахмала. Из приведенных данных видно, что механическая обработка на шаровой мельнице сопровождается незначительным увеличением значения “синего” числа и, соответственно, содержания амилозы с возрастанием времени механической

Таблица 1. Термодинамические параметры плавления нативного и подвергнутого механической обработке кукурузного крахмала

Время обработки, ч	T_{melt} , °C	ΔH_{cal} , кДж/моль	$\Delta T = T_0 - T_c$	T_{aml} , °C	ΔH_{aml} , кДж/моль
0	68.1 ± 0.2	4.0 ± 0.6	9.9	92.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1
2	66.8 ± 0.2	2.0 ± 0.4	15.0	92.7 ± 0.0	0.5 ± 0.1
4	65.7 ± 0.2	1.3 ± 0.3	16.0	92.7 ± 0.1	0.5 ± 0.1
6	64.4 ± 0.1	1.1 ± 0.3	23.0	92.9 ± 0.1	0.5 ± 0.1
8	—	—	—	92.7 ± 0.0	0.3 ± 0.0

Примечание: T_{melt} и ΔH_{cal} – температура и экспериментальная молярная энтальпия плавления кристаллических ламеллей; T_{aml} и ΔH_{aml} – температура и энтальпия диссоциации амилозо-липидного комплекса; T_0 и T_c – температура начала и окончания желатинизации.

Таблица 2. Значение “синего” числа и кажущееся содержание амилозы в нативном и подвергнутом механической обработке кукурузном крахмале

Время обработки, ч	“Синее” число	Содержание амилозы, %
0	2.41	20.1
2	2.42	20.2
4	2.43	20.3
6	2.43	20.3
8	2.45	20.5

обработки. Таким образом, примененные условия обработки практически не влияют на изменение содержания амилозы в исследуемых крахмалах.

Нативные крахмалы не растворяются в холодной воде, что обусловлено их частично кристаллической структурой. Водорастворимость и водопоглощающая способности кукурузного крахма-

ла возрастают с увеличением продолжительности механической обработки (рис. 4а), причем резкое увеличение указанных показателей происходит в период от 6 до 8 ч обработки. С увеличением времени обработки в большей степени происходит разрушение гранул крахмала, а также в большей степени нарушаются водородные связи двойных спиралей амилопектина. При этом освобождается больше гидроксильных групп, которые связываются с водой, что и сопровождается увеличением водорастворимости и водопоглощающей способности крахмала. Таким образом, в процессе механической обработки на шаровой мельнице происходит разрушение кристаллических областей амилопектина, что приводит к увеличению индексов водорастворимости и водопоглощения в холодной воде по сравнению с нативным крахмалом [24, 25].

На рис. 4б приведена зависимость степени гидролиза глюкоамилазой от времени механической обработки кукурузного крахмала. Из приведенной зависимости видно, что степень гидролиза возрастает с увеличением времени обработки, причем с ростом продолжительности механической обработки до 8 ч степень гидролиза возрастает в 2.3 раза по сравнению с необработанным крахмалом. Таким образом, в результате разрушения кристаллической области амилопектина вследствие механической обработки происходит активация процесса низкотемпературной биоконверсии нативного кукурузного крахмала. Этот факт представляет особый интерес при разработке новых способов получения модифицированных крахмалов в результате ферментативного гидролиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что в процессе механической обработки нормального кукурузного крахмала в шаровой мельнице происходит изменение его физико-химических свойств, причем чем больше время обработки, тем более существенно изменяются его физико-химические свойства. Механическая обработка в шаровой мельнице вызывает разрушение гранул нормального кукурузного крахмала и кристаллической области амилопектина, что сопровождается повышением показателей водорастворимости и водопоглощения крахмала, а также степени гидролиза крахмала глюкоамилазой с увеличением времени его обработки. Таким образом, с помощью механической обработки на шаровой мельнице можно модифицировать физико-химические свойства крахмала в заданных пределах.

Работа выполнена в рамках государственных заданий по темам №№ 0084-2014-0005 (регистрационный номер 01201253307) и 0082-2018-0006 (регистрационный номер АААА-А-18-118020890097-1).

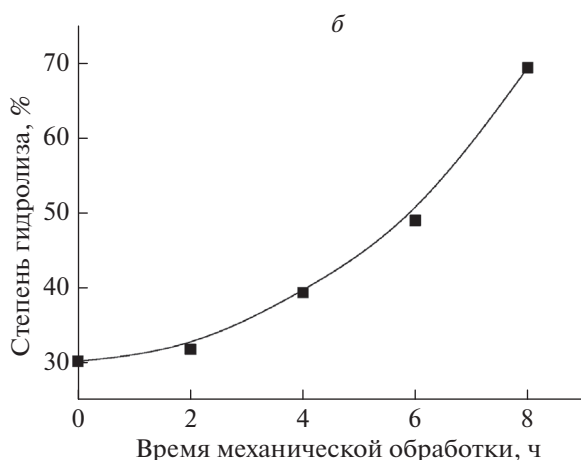
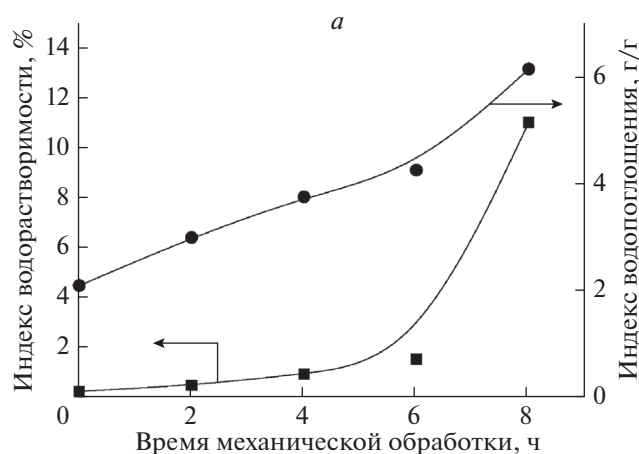


Рис. 4. Изменение индексов водорастворимости (а, ■) и водопоглощения (а, ●), а также степени гидролиза (б) кукурузного крахмала в зависимости от времени механической обработки в шаровой мельнице.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Сергеев А.И., Шилкина Н.Г., Вассерман Л.А., Шилов С.И., Staroszczyk H.* // Хим. физика. 2017. Т. 36. С. 71.
2. *Асеева Р.М., Сахаров П.А., Сахаров А.М.* // Хим. физика. 2009. Т. 28. С. 89.
3. *Роговина С.З., Алексанян К.В., Владимиров Л.В., Берлин А.А.* // Хим. физика. 2019. Т. 38. С. 39.
4. *Жорина Л.А., Кузнецова О.П., Роговина С.З. и др.* // Хим. физика. 2018. Т. 37. С. 74.
5. *Jobling S.* // Curr. Opin. Plant. Biol. 2004. V. 7. P. 210.
6. *Zhang B., Cui D., Liu M. et al.* // Intern. J. Biol. Macromol. 2012. V. 50. P. 250.
7. *Tharanathan R.N.* // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 2005. V. 45. P. 371.
8. *Kaur B., Ariffin F., Bhat R., Karim A.A.* // Food Hydrocoll. 2012. V. 26. P. 398.
9. *Anzai M., Hagiwara T., Watanabe M., Komiyama J., Suzuki T.* // J. Food Eng. 2011. V. 104. P. 43.
10. *Shi L., Cheng F., Zhu Pu-X., Lin Y.* // Starch-Stärke. 2015. V. 67. P. 772.
11. *Wu Y., Chen Z., Li X., Wang Z.* // LWT-Food Sci. Technol. 2010. V. 43. P. 492.
12. *Wasserman L.A., Papakhin A.A., Borodina Z.M. et al.* // Carbohydr. Polym. 2019. V. 212. P. 260.
13. *Andreev N.R., Kalistratova E.N., Wasserman L.A., Yuryev V.P.* // Starch-Stärke. 1999. V. 50. P. 422.
14. *Вассерман Л.А., Кривандин А.В., Филатова А.Г. и др.* // Хим. физика. 2020. Т. 39. P. 63.
15. *Madeneni M.N., Faiza S., Ramaswamy R., Guha M., Pullabhatla S.* // Starch-Stärke. 2011. V. 63. P. 570.
16. *Dior C.I.K., Li H.L., Xie B.J., Shi J.* // Starch-Stärke. 2011. V. 63. P. 96.
17. *Папахин А.А., Бородин З.М., Лукин Н.Д., Гулакова В.А., Маннова И.Г.* // Хранение и переработка сельхозсырья. 2014. № 4. С. 14.
18. *Liu T.Y., Ma Y., Yu S.F., Shi J., Xue S.* // Innovat. Food Sci. Emerg. Technol. 2011. V. 12. P. 586.
19. *Zhang Y., Huang Z., Yang C. et al.* // Starch-Stärke. 2013. V. 65. P. 461.
20. *Zobel H. F.* // Methods in Carbohydrate Chemistry. V. 4 / Ed. Whister R.L. N.Y.: Acad. Press, 1964. P. 109.
21. *Buléon A., Colonna P., Planchot V., Ball S.* // Intern. J. Biol. Macromol. 1998. V. 23. P. 85.
22. *Huang Z., Lu J., Li X., Tong Z.* // Carbohydr. Polym. 2007. V. 68. P. 128.
23. *Вассерман Л.А., Филатова А.Г., Хатеев Э.Б., Гольдштейн В.Г., Плащина И.Г.* // Хим. физика. 2021. Т. 40. № 2. С. 74.
24. *Li E., Dhital S., Hasjim J.* // Starch-Stärke. 2014. V. 66. P. 15.
25. *Moraes J., Alves F.S., Franco C.M.L.* // Starch-Stärke. 2013. V. 65. P. 200.
26. *Kuo W.Y., Lai H.M.* // Carbohydr. Polym. 2007. V. 69. P. 544.
27. *Garcia V., Colonna P., Bouchet B., Gallant D.J.* // Starch-Stärke. 1997. V. 49. P. 171.
28. *Tang H., Mitsunaga T., Kawamura Y.* // Carbohydr. Polym. 2005. V. 59. P. 11.

ХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА
ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

УДК 541.64; 542.86; 543.944; 544; 677.014; 678

УГЛЕРОДНЫЕ ВОЛОКНА НА ОСНОВЕ ПЕКА: СОСТОЯНИЕ
ПРОИЗВОДСТВА И МОДИФИКАЦИЯ СВОЙСТВ

© 2022 г. И. В. Клименко*

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

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

Поступила в редакцию 27.07.2021;

после доработки 10.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

В работе проведен анализ состояния производства углеродных волокнистых материалов, в том числе углеродных волокон (УВ) на основе пека. Показано, что в Российской Федерации имеются большие предпосылки для создания промышленных производств пековых углеродных волокон. Значительное внимание уделяется возможным способам модификации пековых УВ в целях улучшения их электрических свойств. Показана эффективность применения газообразного брома для снижения электрического сопротивления пековых УВ. На основании анализа данных рентгеноструктурного анализа и спектроскопии комбинационного рассеяния света показано, что уменьшение электрического сопротивления в процессе бромирования в 7 раз связано с изменениями, происходящими в структуре волокна.

Ключевые слова: пековые углеродные волокна, бромирование, электропроводность, структура.

DOI: 10.31857/S0207401X22020054

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в связи с открытием новых форм углерода (фуллерены, нанотрубки, графен) и увеличением объемов потребления промышленностью композиционных материалов с контролируемо изменяемыми свойствами возобновлен интерес к исследованию свойств углеродных волокнистых материалов (УВМ) [1–12]. Последние являются армирующей основой при производстве современных конструкционных материалов, композитов и углепластиков (композиционных материалов, состоящих из нитей углеродного волокна (УВ) диаметром преимущественно 5–15 мкм, расположенных в матрице из полимерных смол, обычно эпоксидных и полиэфирных). Работы ведутся в основном по трем направлениям: а) исследование физико-химических свойств новых волокнистых материалов и тщательное изучение связи между строением материала и его электронными свойствами с целью расширения областей применения, в том числе создание материалов для применения в медицине; б) поиск путей снижения стоимости волокон; в) поиск способов использования волокон в различных композиционных материалах, в том числе в углепластиках, где в качестве связующих применяются разнообразные термоактивные синтетические смолы и термопласты [13, 14].

Отрасли промышленности, в которых применяются УВМ, различны: электротехническая, химическая, атомная, строительная, аэрокосмическая, а также машиностроение и металлургия. Углеродные волокнистые материалы используются при производстве авиационной и ракетной техники, спортивного инвентаря, товаров медицинского и бытового назначения и т.д. Благодаря отсутствию токсичности и наличию биосовместимости углерода с биологическими тканями эндопротезы из углепластиков начинают широко применяться в хирургии; полые УВ используются как дренажное средство в нейрохирургии, офтальмологии и кардиологии, повязки из графитированной ткани — при лечении глубоких ожоговых и других открытых ран. Такой широчайший спектр применения УВМ объясняется уникальным сочетанием их механических и тепловых свойств, стойкостью при высоких температурах и в агрессивных средах, малым удельным весом и хорошими электро- и теплопроводностью при высокой прочности и жесткости, высокой биосовместимостью, а также возможностью получения различных текстильных форм, например, непрерывных нитей, тканых или нетканых материалов, жгутов, пряжи, ровингов, лент, холстов и т.д.

Основные виды сырья для сложного и высокотехнологичного производства УВМ — это полиакрилонитрил (ПАН), гидратцеллюлоза и пек из

продуктов переработки каменного угля и нефти. Углеродные волокна на основе ПАН обладают хорошими прочностными и модульными свойствами, тогда как волокна на основе пека имеют более высокий модуль упругости, но меньшие прочностные характеристики. Основные объемы УВМ производят Япония, США и Германия [15]. В Российской Федерации УВМ производят ОАО “НПК “Химпромжиниринг” (г. Москва), ООО “Аргон” и ООО “Балаково Карбон Продакшн” (Саратовская область, г. Балаково), ООО “Композит-Волокно” (ХК “Композит”, г. Саратов), “Алабуга-волокно” (ХК “Композит” и Госкорпорация “Росатом”, Татарстан), ООО “Заводуглеродных и композиционных материалов” (г. Челябинск), ООО СНВ (г. Саратов), АО “Препрег-СКМ” (в том числе Препрег-Дубна) (г. Москва), ООО “Порше современные материалы” (Калужская обл.) и др. Количество производимого углеродного волокна на этих производствах составляет менее 1% от его мирового производства (~400 т) [13, 16], в настоящее время наблюдается дефицит УВМ, который в большей степени покрывается импортом.

Стоит заметить, что сегодня в Российской Федерации нет действующих промышленных установок для получения нефтяных пеков, при этом в мировом масштабе доля пекового сырья в производстве УВМ составляет 30% [16]. Вместе с тем нефтяные пеки в отличие от каменноугольных обладают рядом достоинств, например меньшей канцерогенностью и высокой реакционной способностью в термохимических процессах [17, 18]. Использование пеков в качестве сырья при производстве УВ является большим преимуществом благодаря их низкой стоимости, высокому содержанию углерода в них и, как следствие, большому выходу конечного продукта. Это, в свою очередь, приводит к экономии энергоресурсов и ускорению технологического процесса. Но, тем не менее, из-за вредных факторов процесса производства, недостатка оборудования, способного минимизировать выбросы пекококсовых заводов в атмосферу, производство каменноугольного пека также неуклонно сокращается.

В настоящее время УВ из нефтяных пеков получают в Японии, США и некоторых странах Западной Европы. В России пековое волокно производят очень небольшими опытными партиями, однако имеются большие предпосылки для создания промышленных производств пековых углеродных волокон, а именно, огромные сырьевые ресурсы, производственные мощности нефтехимических предприятий, большой научный потенциал [16].

Пек как сырье для производства УВМ представляет собой сложную смесь ароматических углеводородов, которая включает в себя структуры с тремя–восемичленными кольцами с боковыми

алкильными группами со средней молекулярной массой 300–400 [19]. Согласно [20], пек состоит из четырех основных классов химических соединений – низкомолекулярные алифатические соединения, низкомолекулярные нафтеновые ароматические углеводороды, полярные ароматические соединения с более высокой молекулярной массой и гетероциклической природой и асфальтены – фракция пека с наивысшими молекулярной массой и ароматичностью, являющаяся наиболее термически стабильной. Из-за низкого молекулярного веса пеки имеют невысокую температуру плавления и низкую вязкость в расплавленном состоянии, поэтому сформировать из пека можно только хрупкое грубое волокно. Для придания пек-волокнообразующих свойств он подвергается термической и термоокислительной обработке (окислительная стабилизация на воздухе, карбонизация и графитация) с целью повышения молекулярного веса и удаления летучих низкомолекулярных соединений. Содержание углерода в волокне в зависимости от конечной температуры карбонизации составляет 80–99%. Графитация волокна проводится при температурах 2600–3000 °С, и содержание углерода достигает значений >99%. Надмолекулярная структура УВ в большой степени зависит от конечной температуры термообработки: чем она выше, тем больше степень графитации и размер кристаллитов (пачки параллельных турбостратных плоскостей) и меньше дефектность структуры.

Пековые УВ делят обычно на два класса: полученные на основе изотропного пека и на основе анизотропного мезофазного пека с упорядоченной структурой. Эти два типа волокон имеют различную структуру, текстуру и физико-химические свойства. Пековые УВ на основе мезофазного пека, благодаря кристаллической графитовой структуре, высокой степени упорядоченности и непрерывной ориентации слоев вдоль оси волокна и, соответственно, высоким значениям модуля Юнга (1000 ГПа), небольшому удельному электрическому сопротивлению (1.0 мкОм·м), хорошей стойкости к высокотемпературной коррозии, широко используются в промышленности [1, 21]. Данные уникальные свойства связаны с идеальной графитоподобной структурой пекового волокна.

Для создания электропроводящего композита важным условием является наличие определенных характеристик у его двух составляющих (матрицы и наполнителя), в первую очередь механических и электрофизических. Для их обеспечения необходимо подобрать правильное сочетание следующих факторов: прочное связывание волокна с полимером, механическая прочность самих волокон, хорошие проводящие свойства. Для повышения адгезии углеродных волокон к полимеру используются различные методы, такие как термохимическая, электрохимическая, плазмохимическая обработка поверхности волокон и т.д. [22–27]. Механические

и электрические свойства волокон определяются их структурой, которая, как уже говорилось, зависит от значения температуры термообработки, вида исходного сырья, наличия дефектов и легирующих элементов.

Таким образом, модификация и контроль структуры и свойств УВ на основе пека могут быть достигнуты путем изменения природы исходного пека, температуры термообработки волокна, а также при помощи введения добавок, интеркалянтов, в само волокно. Интеркаляция может проводиться с использованием жидких, твердых или газообразных реагентов. Процесс получения интеркалированного соединения из газовой фазы наиболее прост, однако при этом требуется углеродное волокно с высокой степенью структурного порядка. Обычно увеличение проводимости при интеркаливании высокоориентированных графитовых волокон различными интеркалянтами (солями металлов, кислотами) происходит на один порядок [28]. Наибольший эффект в плане получения высокопроводящих волокон был достигнут при использовании в качестве интеркалянта AsF_5 . При интеркаляции этим соединением волокон на основе бензола с температурой термообработки $3300^\circ C$ получено максимальное значение проводимости (σ) при комнатной температуре: $\sigma = 10^{-3}$ мОм · см, что превышает даже проводимость меди $\sigma = 1.7 \cdot 10^{-3}$ мОм · см [29]. Это значение σ было получено при измерении сопротивления *in situ*.

Низкие значения электрического сопротивления волокон были получены при бромировании пековых УВ. Так, например, при бромировании УВ в газовой и жидкой фазах электрическое сопротивление уменьшается в несколько раз [5, 30–40]. Авторы работ [32, 41] сообщают об уменьшении сопротивления пековых волокон в 3–5 раз при бромировании в течение 7 дней. В работах [38, 39, 42] было обнаружено, что удельное электрическое сопротивление пековых волокон уменьшается в 7 раз в результате бромирования: с 1.19 до 0.17 мОм · см. Данные значения сопротивления достигаются при 30-часовом бромировании в газовой фазе. При дальнейшем увеличении времени бромирования до 144 ч происходит рост сопротивления до 0.35 мОм · см. Хорошая временная и термическая стабильность свойств бромированных волокон, довольно высокая электрическая проводимость и относительная простота их получения делают эти волокна привлекательными для практического использования.

Исследование самого процесса и механизма интеркаляции, в том числе интеркаляции брома в волокно, важно для понимания процессов, происходящих в структуре углеродного материала при его модификации [36, 43–48]. Так, например, изучение кинетики дебромирования [42] показало, что в процессе интеркаляции брома в волокно наряду с разрушением структуры волокна происходит образо-

вание химической связи С–Br, причем наиболее интенсивно она образуется только после 96-часового бромирования волокна. При этом с увеличением массы волокна на 55% оно становится более термостойким.

В настоящей работе модификация электрофизических свойств пековых волокон также была проведена в процессе бромирования в газовой фазе. Для изучения структурных преобразований, оказывающих влияние на электрическое сопротивление волокна и происходящих в нем после интеркаляции в него брома, проанализированы данные, полученные с помощью методов комбинационного рассеяния света (КРС) и рентгеновского анализа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бромирование в течение 2–144 ч пековых моноволокон было проведено при комнатной температуре в стеклянном сосуде, наполненном газообразным бромом [38]. Диаметр исходных волокон составлял 8–10 мкм. Далее, после удаления избыточного брома в течение 3 сут в вытяжном шкафу образцы выдерживали под вакуумом также в течение 3 сут. В результате бромирования произошло уменьшение электрического сопротивления в 7 раз: с 1.19 до 0.17 мОм · см, в течение первых 30 ч бромирования [38, 39, 42].

Спектры КРС моноволокон регистрировались с помощью спектрометра Т64000 фирмы “Jobin Yvon” (France) с двойным монохроматором, соединенным со спектрографом и охлаждаемым до $140^\circ C$ приемником. Источником излучения служил аргоновый лазер мощностью 1.5 мВт с длиной волны $\lambda = 458$ нм (размер пятна < 2 мкм). Использовали микроскоп с увеличением в 200 раз. Анализ спектров выполнен с помощью разложения формы линий на лоренцевы составляющие.

Структурные исследования исходных и бромированных пековых УВ выполнены с помощью рентгеновского дифрактометра “ДРОН-1,5” с модифицированной коллимацией на $Cu(K_\alpha)$ -излучении. Излучение $Cu(K_\alpha)$ отфильтровывалось никелевой пластиной толщиной 3 мм. Напряжение на трубке составляло 33 кВ, анодный ток – 27 мА. Использовался сцинтилляционный счетчик с амплитудным дискриминатором. Образцы УВ для обеспечения одинаковых условий проведения эксперимента и уменьшения влияния анизотропии измельчали и набивали в металлические кюветы с рабочим объемом $17 \times 17 \times 1.5$ мм³. При этом величина облучаемой поверхности образца была достаточной, чтобы получать истинную интенсивность рефлексов на медном излучении, начиная со значения брегговского угла $\theta = 2^\circ$. Запись образцов проводили в интервале углов θ от 1° до 45° . Измерение углового положения рефлексов осуществляли с

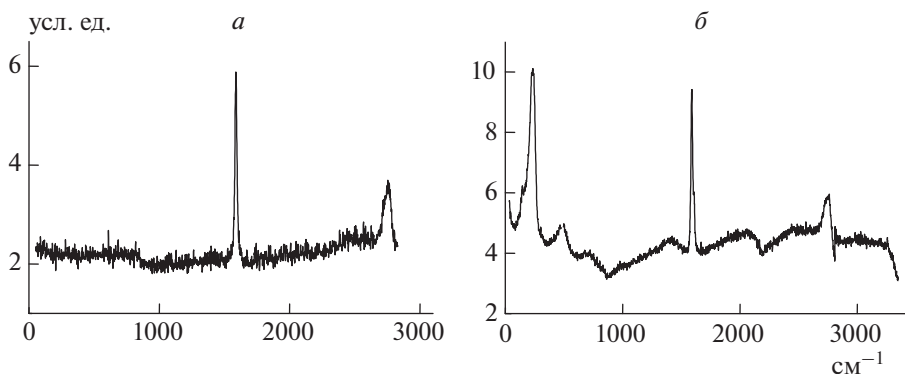


Рис. 1. Спектры КРС исходных (а) и бромированных в течение 48 ч (б) пековых моноволокон.

точностью до 0.01° . Все образцы исследовались как в отраженном, так и в прошедшем свете, что позволило получить дополнительные рентгенографические характеристики.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектры микро-КРС для исходных (а) и бромированных в течение 48 ч (б) пековых моноволокон приведены на рис. 1. Для исходного волокна (рис. 1а) характерны две интенсивные линии: линия вблизи $\sim 1582 \text{ см}^{-1}$, приписываемая активной КР-моду E_{2g_2} и связанная с $\text{C}=\text{C}$ -связью графитовой сетки, и линия вблизи $\sim 2740 \text{ см}^{-1}$ с плечом в области $\sim 2480 \text{ см}^{-1}$, соответствующая пику при $\sim 2730 \text{ см}^{-1}$ в спектре второго порядка чистого графита, а также малоинтенсивная линия в области $\sim 1360\text{--}1400 \text{ см}^{-1}$, индуцированная процессом разупорядочения графитовой структуры и связанная с мелкокристаллической структурой волокна. Малая величина отношений интегральных интенсивностей линий: S_{1360}/S_{1582} и S_{2480}/S_{2740} (табл. 1), характеризует исследуемое волокно как высокоупорядоченную систему. Ширина линий при ~ 1582 и $\sim 1360 \text{ см}^{-1}$ на полувысоте характеризует порядок в графитовых плоскостях [49]. Для наших исходных волокон ширина основной линии E_{2g_2} на полувысоте $(1/2)v_{1582}$ аналогична ширине основной линии на полувысоте у высокочистого мелкокристаллического графита [49]. При бромировании волокон происходят изменения в спектре КРС (рис. 1б): уширение основных линий при ~ 1582 и $\sim 2740 \text{ см}^{-1}$, возрастание интенсивностей линий при $\sim 1360\text{--}1400$ и $\sim 2480 \text{ см}^{-1}$, появление новых линий в областях ~ 242 , ~ 500 , ~ 700 , $\sim 1600\text{--}2000$, $\sim 3000 \text{ см}^{-1}$. Положение линий вблизи ~ 1582 и $\sim 2740 \text{ см}^{-1}$ практически не зависит от времени бромирования (табл. 2), что свидетельствует о наличии графитовой составляющей во всех образцах волокон. Положение линии при $\sim 1360 \text{ см}^{-1}$ не меняется при увеличении времени

бромирования до 96 ч, а затем наблюдается ее смещение в сторону высоких частот, которое составляет $\Delta v_{1360} = 19 \text{ см}^{-1}$. С увеличением времени бромирования (табл. 1) также происходит возрастание отношения интегральных интенсивностей всех линий спектра первого порядка, а также увеличение ширины на полувысоте линии в области $\sim 1582 \text{ см}^{-1}$ спектра первого порядка. Ширина на полувысоте линии при $\sim 1360 \text{ см}^{-1}$ резко возрастает после двухчасового бромирования и остается практически неизменной при увеличении времени последнего до 120 часов бромирования. Это свидетельствует о разупорядочении графитовой структуры, появлении беспорядка и аморфной фазы в структуре волокна при бромировании. Увеличение отношения интегральных интенсивностей линий S_{1360}/S_{1582} при бромировании в течение 96 ч при постоянном значении интегральной интенсивности S_{1582} указывает на интенсивное разрушение больших кристаллитов, рост мелкокристаллической фазы в волокне, а также на разрушение самой графитовой структуры и появление и рост аморфной фазы. При времени бромирования до 24 ч это отношение изменяется всего в 3 раза, при 24-часовом бромировании оно возрастает уже в 16 раз, при 48-часовом — в 33 раза, а после бромирования в течение 96 ч величина отношения S_{1360}/S_{1582} возрастает в 100 раз по сравнению с начальным значением. Об аморфной фазе в волокне при бромировании в течение ≥ 96 ч свидетельствует появление новой линии в спектре первого порядка в области $\sim 1530 \text{ см}^{-1}$, характерной для аморфного углерода.

Появление новых линий в низкочастотной области спектра (интенсивной линии при $\sim 242 \text{ см}^{-1}$ с плечом в области $\sim 160\text{--}170 \text{ см}^{-1}$ и менее интенсивных линий при ~ 500 и $\sim 750 \text{ см}^{-1}$) связано с присутствием брома в образце. Отношение площадей составляющей $\sim 160 \text{ см}^{-1}$ к линии $\sim 242 \text{ см}^{-1}$ S_{160}/S_{242} , равное 0.4, и отношение S_{500}/S_{242} , равное в среднем 0.4, практически не зависят от времени бромирования. Колебания в области $\sim 242 \text{ см}^{-1}$

Таблица 1. Отношения интегральных интенсивностей и ширин на полувысоте линий первого и второго порядка (вычисленных на основе разложения на лоренцианы) спектров КРС пековых моноволокон, бромированных в течение 0–120 ч

t_{Br} , ч	S_{1360}/S_{1582}	S_{1600}/S_{1582}	S_{1530}/S_{1582}	$(1/2)v_{1582}$	$(1/2)v_{1360}$	S_{2480}/S_{2740}	S_{3000}/S_{2740}	$(1/2)v_{2740}$	$(1/2)v_{2480}$
	первый порядок					второй порядок			
0	0.03	—	—	17.5	13.2	0.079	—	60	78
2	0.08	0.1	—	18.1	15.7	0.44	0.1	63	100
24	0.5	0.17	—	20.0	237	0.7	0.16	90	172
48	0.99	0.3	—	23.0	245	0.9	0.21	95	210
72	1.8	0.7	—	25.0	245	1.0	0.26	100	250
96	2.9	0.94	0.2	29.6	240	1.12	0.65	110	353
120	3.4	1.23	0.68	62.3	242	1.22	0.74	104	370

Таблица 2. Положение линий спектра КРС и рентгенографические характеристики пековых моноволокон, бромированных в течение 0–120 ч

t_{Br} , ч	v_{1360} , cm^{-1}	v_{1582} , cm^{-1}	v_{2740} , cm^{-1}	d_{002} , Å	L_c , Å	L_a , Å	C_r
0	1361	1582.4	2740	3.370	200	610	100.0
2	1361	1582.4	2740	3.371	210	610	100.5
24	1362	1582.4	2741	3.373	235	610	101.0
48	1363	1582.5	2742	3.375	255	610	103.0
72	1363.5	1582.3	2734	3.381	245	610	79.0
96	1380	1581.7	2743	3.381	200	610	64.5
120	1376	1581.8	2740	3.380	205	610	68.5

связаны с валентными колебаниями анионов брома Br_3^- и Br_5^- появившимися в графитовой структуре из-за переноса заряда (электрона) с графитовых слоев, граничащих с бромом, и являющимися свидетельством интеркалированного в графит брома [38]. Колебания в областях ~ 500 и ~ 750 cm^{-1} в спектрах КРС связаны с возникновением связи C–Br в процессе бромирования [38, 50, 51]. Следует, однако, заметить, что в работе [52] существовала отличная от нашей интерпретация колебаний в областях ~ 500 и ~ 750 cm^{-1} . Авторы работы [52] эти частоты рассматривают как удвоенное и утроенное значения частоты $\omega_0 \sim 242$ cm^{-1} . Линия при ~ 323 cm^{-1} , соответствующая частоте колебаний свободной молекулы Br_2 , не наблюдалась ни в одном из представленных образцов, что свидетельствует об отсутствии свободного брома во всех образцах волокон. Однако во всех бромированных образцах отчетливо наблюдается высоко-частотная, неразрешенная линия при ~ 1600 cm^{-1} в виде симметричного плеча основной полосы, связанная, возможно, с колебаниями связи C=C в приграничных к бромю слоях волокон; причем интенсивность ее растет с увеличением времени бромирования. Появление подобных слоев облегчает перенос зарядов и приводит к снижению

сопротивления бромированных волокон по отношению к исходному волокну в 7 раз.

Из табл. 1 также видно, что линии спектров КРС второго порядка шире, чем линии спектра первого порядка как в исходных, так и в бромированных волокнах; кроме того, спектр второго порядка плохо разрешен (рис. 1б). Тем не менее отношения интегральных интенсивностей линий спектра второго порядка аналогичны отношениям интегральных интенсивностей линий спектра первого порядка.

Доминирующей линией спектра второго порядка является линия при ~ 2740 cm^{-1} , которая может быть представлена как $2 \cdot 1365 = 2730$ cm^{-1} [51]. Широкая линия в области ~ 2480 cm^{-1} связана с комбинацией мод высокой плотности фононных состояний с различными волновыми векторами ($860 + 1620 = 2480$ cm^{-1}) [53]. Линия при ~ 3000 cm^{-1} появляется только в бромированных образцах. Эта линия, индуцированная процессом разупорядочения графитовой решетки, характеризуется комбинацией мод ($\sim 1365 + 1620 = 2985$ cm^{-1}) [53]. Отношение S_{3000}/S_{2740} незначительно меняется при увеличении времени бромирования до 72 ч (табл. 1). Большие изменения происходят при времени бромирования >96 ч, что также подтвер-

ждает факт разрушения графитовой структуры волокна и создание мелкокристаллической фазы при больших временах бромирования.

Для более точной характеристики разрушений в структуре волокна, происходящих при бромировании, были использованы данные рентгенографического анализа [54], который является прямым методом исследования фазового состава вещества, с помощью которого можно идентифицировать начальные и конечные продукты процесса и проследить последовательность изменений, происходящих в материале. Из рентгеновских дифракционных спектров проб графитированного волокна можно определить следующие важнейшие структурные характеристики [55–58]: d_{002} – расстояние между графитовыми плоскостями (002), L_c – размер кристаллитов вдоль оси “с”, L_a – размер кристаллитов перпендикулярно оси “с”, C_r – степень графитации, а также получить информацию о кристаллической структуре волокна и выявить преимущественную ориентацию кристаллитов относительно оси волокна. Значения L_c , L_a , d_{002} были определены с использованием формулы Брэгга и Шеррера [55, 56], а также формулы Селякова [59]: $n\lambda = 2d\sin\Theta$, $L = K\lambda/(\beta\cos\Theta)$, где Θ – угол рассеяния, d – внутриплоскостное расстояние, λ – длина волны рентгеновских лучей, β – полуширина максимума интенсивности линии в радианах. Значение K для L_c составляло 0,9, для L_a – 1,84 [60]. Степень графитации волокна рассчитывают по формуле $C_r = (3.440 - d_{002})/(3.440 - 3.354)$ [41, 61].

Однако в этой формуле используется лишь величина d_{002} без учета угловой ширины рефлекса. В работе [62] была предложена формула, учитывающая обе характеристики: $C_r = L_c/(d_{002} - 3.22)$. Однако в данном случае полуширину отражения d_{002} было предложено определять не прямым измерением на дифрактометре, а графическим методом, что усложняло процесс обработки спектра и служило источником дополнительных ошибок. Кроме того, для графитовых объектов значение поправочного коэффициента, равное 3,22 Å, кристаллохимически не оправдано. Поэтому для определения степени была использована скорректированная формула [54, 63], в которой величина 3,22 Å заменена на 3,35 Å, что соответствует величине d_{002} идеально окристаллизованного графита: $C_r = (L_c \cdot 10^{-2})/(d_{002} - 3.35)$. Рентгенографические характеристики d_{002} , L_c , L_a и C_r приведены в табл. 2. Значения C_r и L_c рассчитаны по спектрам, полученным в отраженном свете, а значения L_a – по спектрам, полученным в прошедшем свете, по рефлексу d_{110} .

Согласно данным рентгенографического анализа (увеличение d_{002} , уменьшение C_r ; см. табл. 1), в результате бромирования происходит некоторое разуплотнение графитовой структуры волокна.

Размеры кристаллитов изменяются таким образом: при постоянном значении L_a значение L_c сначала увеличивается, затем уменьшается. Это связано с тем, что наиболее интенсивно интеркалированное соединение образуется в местах наличия дефектов структуры. Сначала происходит кажущееся увеличение доли графитовой компоненты и своего рода “обогащение” УВ высокоориентированными кристаллами графита в связи с сокращением дефектов, что приводит к уменьшению электрического сопротивления волокна в 7 раз. Однако при увеличении времени бромирования от 48 до 96 ч из-за того, что количество дефектов в волокне за счет его контакта с бромом резко уменьшилось, также в небольшом количестве начинают образовываться связи С–Вг. Происходит некоторое измельчение графитовых частиц в направлении оси “с”, что приводит к уменьшению среднего размера L_c . При времени бромирования >96 ч бром начинает разрушать саму графитоподобную структуру волокна, интенсивно вступая в химическую связь с атомами углерода графитовой сетки. В результате этого наблюдается рост электрического сопротивления волокна (с 0,17 до 0,35 мОм · см) [38] и появляется линия при ~ 1530 см⁻¹ в спектре КРС, соответствующая аморфной фазе. Рентгенографические характеристики при времени бромирования >96 ч остаются практически неизменными (табл. 2). Наблюдается лишь незначительное кажущееся увеличение значения C_r , имеющее место благодаря уменьшению количества дефектов структуры, по которым происходит бромирование.

Таким образом, данные рентгеноструктурного анализа (усиление фона некогерентного рассеяния, уменьшение степени графитации, разуплотнение графитовой структуры волокна) и данные спектроскопии КРС (уширение основных линий при ~ 1582 и ~ 2740 см⁻¹, отвечающих за порядок в структуре волокна, возрастание интенсивностей линий при ~ 1360 –1400 и ~ 2480 см⁻¹, отвечающих за разупорядочение в графитоподобной структуре волокна, появление новых линий, связанных с присутствием брома) подтверждают факт разрушения графитоподобной структуры волокна в процессе бромирования. Данные изменения в структуре, происходящие на начальных стадиях бромирования и связанные с уменьшением количества дефектов на поверхности волокна благодаря воздействию газообразного брома, приводят к уменьшению электрического сопротивления пеккового УВ в 7 раз. При временах бромирования >96 ч происходят значительные разрушения уже самой графитоподобной структуры волокна, что приводит к появлению аморфной фазы и, соответственно, к некоторому увеличению электрического сопротивления. Соответственно, дальнейшее бромирование волокна является нецелесообразным, так как оно может привести к полному разруше-

нию графитоподобной структуры волокна и, соответственно, к значительному увеличению электрического сопротивления.

Следует заметить, что некоторое расхождение в величинах времени бромирования (для КРС – 48 ч, для рентгенографического анализа – 72 ч), определяющего начало значительных разрушений в графитовой структуре, в двух методах исследования связано с их спецификой. Спектроскопия КРС характеризует тонкий поверхностный слой толщиной ≈ 0.1 мкм и дает информацию о структуре волокна, усредненную по площади пучка лазера, в то время как рентгеновские методы из-за различных деформаций, изогнутости и возможных дефектов, присущих графитоподобным слоям волокна, позволяют определить не реальные физические размеры слоя, а некие эффективные параметры, относящиеся к областям когерентного рассеяния. Тем не менее оба метода подтверждают значительные изменения в структуре волокна, происходящие при бромировании.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований показали эффективность применения газообразного брома для модификации поверхности пекового углеродного волокна, которая приводит к снижению его электрического сопротивления в 7 раз. Процессы, происходящие при интеркалировании бромом пекового УВ, носят общий характер. Данные, представленные в настоящей статье, будут полезны для понимания процесса бромирования и при решении задач получения углеродных волокон, обладающих высокой проводимостью.

Работа выполнена в рамках госзадания ИБХФ РАН (регистрационный номер 01201253304).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yuan G., Xue Z., Cui Z. et al. // ACS Omega. 2020. V. 5. № 34. P. 21948.
2. Анпилова А.Ю., Масталыгина Е.Е., Храмеева Н.П. и др. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 1. С. 66; <https://doi.org/10.31857/S0207401X20010021>
3. Куперман А.М., Горбаткина Ю.А., Турусов Р.А. // Хим. физика. 2012. Т. 31. № 8. С. 50.
4. Guimarães C.J.B., Aguiar A.P., de Castro A.T. // Polímeros. 2021. V. 31. № 1. P. e2021011; <https://doi.org/10.1590/0104-1428.08720>
5. Kim B.-J., Kotegawa T., Eom Y. et al. // Carbon. 2016. V. 99. P. 649; <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.12.082>
6. Shimanoe H., Ko S., Jeon Y.-P. et al. // Polymers. 2019. V. 11. № 12. P. 1911; <https://doi.org/10.3390/polym11121911>
7. Özsin G., Pütün A.E. // J. Fac. Eng. Architect. Gazi Univ. 2018. V. 33. №. 4. P. 1433; <https://doi.org/10.17341/gazimmfd.4164440>
8. Kim B.-J., Kil H., Watanabe N. et al. // Current Org. Chem. 2013. V. 17. № 13. P. 1463; <https://doi.org/10.2174/1385272811317130013>
9. Ni G., Jiang W., Shen W. // Chem. Select. 2019. V. 4. № 13. P. 3690; <https://doi.org/10.1002/slct.201803764>
10. Liu J., Chen X., Liang D. et al. // Energy Sources, Part A: Recovery, Utilizat., Environ. Effects. 2020; <https://doi.org/10.1080/15567036.2020.1806952>
11. Arai Y. // High-Performance and Specialty Fibers. The Soc. Fiber Sci. Technol. Tokyo, Jap. (ed.): Springer, 2016. Ch. 21. P. 343; https://doi.org/10.1007/978-4-431-55203-1_21
12. Lim T.H., Yeo S.Y. // Sci Rep. 2017. V. 7. P. 4733; <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05192-5>
13. Kim C. // The Chemical J. 2014. № 10. С. 64; http://tcj.ru/wp-content/uploads/2014/11/2014_10_63-73_PLAST-Syre.pdf
14. Корнеева Н.В., Кудинов В.В., Крылов И.К. и др. // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 9. С. 67; <https://doi.org/10.1134/S0207401X19090036>
15. Morgan P. Carbon fibers and their composites. Boca Raton: Taylor & Francis Group, CRC Press. 2005.
16. Мухамерзянов А.Т., Мухамерзянова А.А., Гимаев Р.Н. и др. // Вестн. Башк. Ун-та. 2015. Т. 20. № 4. С. 1218.
17. Дошлов О.И., Кондратьев В.В., Угайев А.А. и др. // Изв. вузов. Прикл. химия и биотехн. 2014. № 2(7). С. 31.
18. Сидоров О.Ф., Селезнев А.Н. // Рос. хим. журн. 2006. Т. L. № 1. С. 16.
19. Matsumoto T. // Pure Appl. Chem. 1985. V. 57. P. 1553.
20. Riggs D.M., Shuford R.J., Lewis R.W. // Graphite fibers and composites / Ed. Lubin G. Handbook of Composites. N.Y.: Van Nostrand Reinhold Co., 1982. P. 196.
21. Yuan G., Li X., Xiong X. et al. // Carbon. 2016. V. 115. P. 59; <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.12.040>
22. Alexander M.R., Jones F.R. // Carbon. 1994. V. 32. № 5. P. 785.
23. Severini F., Formaro L., Pegoraro M. et al. // Carbon. 2002. № 40. P. 735.
24. Lee S., Kim T.R., Ogale A.A. et al. // Synth. Met. 2007. V. 157. P. 644.
25. Bing X., Wang X., Lu Y. // Appl. Surf. Sci. 2006. V. 253. Issue. 5. P. 2695.
26. Ma Y.J., Wang J.L., Cai X.P. // Intern. J. Electrochem. Sci. 2013. V. 8. P. 2806.
27. Alway-Cooper R.M., Anderson D.P., Ogale A.A. // Carbon. 2013. V. 59. P. 40; <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.02.048>
28. Dresselhaus M.S., Endo M. // Graphite Intercalation Compounds II: Transport and Electronic Properties / Eds. Zabel H., Solin S.A. Springer Ser. Mater. Sci. V. 18. Berlin: Springer-Verlag, 1992. P. 347.
29. Shioy J., Matsubara H., Murakami S. // Synth. Met. 1986. V. 14. P. 113.
30. Hooley J.G., Deitz V.R. // Carbon. 1978. V. 16. № 4. P. 251.

31. Dresslhaus M.S., Dresslhaus G. // *Adv. Phys.* 1981. V. 36. № 2. P. 139;
<https://doi.org/10.1080/00018738100101367>
32. Ho C.T., Chung D.D.L. // *Carbon*. 1990. V. 28. Issue 6. P. 831;
[https://doi.org/10.1016/0008-6223\(90\)90331-R](https://doi.org/10.1016/0008-6223(90)90331-R)
33. Klimenko I.V., Zhuravleva T.S., Jawhari T. // *Synth. Met.* 1997. V. 86. Issue 1–3. P. 2337;
[https://doi.org/10.1016/S0379-6779\(97\)81150-2](https://doi.org/10.1016/S0379-6779(97)81150-2)
34. Kim B.J., Eom Y., Kato O. et al. // *Carbon*. 2014. V. 77. P. 747;
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2014.05.079>
35. Choi Y.O., Yang K.S. // *Fibers Polym.* 2001. V. 2. P. 178;
<https://doi.org/10.1007/BF02875342>
36. Liang D., Liu D., Yang S. et al. // *Polymers*. 2020. V. 12. № 12. P. 3059;
<https://doi.org/10.3390/polym12123059>
37. Mathur R.B., Bahl I.P., Kannan A. et al. // *Carbon*. 1996. V. 34. Issue 10. P. 1215;
[https://doi.org/10.1016/0008-6223\(96\)00089-9](https://doi.org/10.1016/0008-6223(96)00089-9)
38. Klimenko I.V., Zhuravleva T.S. // *Mater. Today: Proceedings*. 2018. V. 5. Issue 12. P. 25987;
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.08.017P.25987>
39. Klimenko I.V., Shchegolikhin A.N., Zhuravleva T.S. // *Synth. Met.* 1995. V. 71. P. 1773
40. Gaier J., Ditmars N.F., Dillon A.R. // *Carbon*. 2005. V. 43 Issue 1. P. 189;
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2004.09.005>
41. Jaworske D.A., Gaier J.R., Maciag C. et al. // *Carbon*. 1987. V. 25. Issue 6. P. 779.
42. Клименко И.В., Журавлева Т.С., Бибииков С.Б. // *Высокомолекуляр. соединения. А*. 2000. Т. 42. № 2. С. 320.
43. Jacquesa E., Kjell M.H., Zenkerta D. et al. // *Carbon*. 2014. V. 59. P. 246;
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.03.015>
44. Ouchi Y., Takenaka A., Kinumoto T. et al. // *Carbon*. 2013. V. 55. P. 372;
<https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.12.040>
45. Johannisson W., Harnden R., Zenkert D. // *Proc. Nation. Acad. Sci.* 2020. V. 117. № 14. P. 7658;
<https://doi.org/10.1073/pnas.1921132117>
46. Ghosh S., Bhattacharjee U., Patchaiyappan S. et al. // *Adv. Energy Mater.* 2021. V. 11. P. 2100135;
<https://doi.org/10.1002/aenm.202100135>
47. Fredi G., Jeschke S., Boulaoued A. et al. // *Multifunction. Mater.* 2018. V. 1. № 1. P. 015003;
<https://doi.org/10.1088/2399-7532/aab707>
48. Гришин М.В., Гатин А.К., Сарвадий С.Ю. и др. // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 7. С. 63;
<https://doi.org/10.31857/S0207401X20070067>
49. Knight D.S., White W.B. // *J. Mater. Res.* 1989. V. 4. № 2. P. 385.
50. Huong P.V. // *Sol. State Comm.* 1993. V. 88. № 1. P. 23.
51. Tebbe F., Harlow R., Chase D. et al. // *Science*. 1992. V. 256. P. 822.
52. Dresselhaus M.S., Dresselhaus G. *Light Scattering in Solids III* / Cardona M., Guntherodt G. V. 51. *Topics in Appl. Phys.* Berlin: Springer-Verlag, 1982.
53. Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Sugihara R. et al. *Graphite Fibers and Filaments*. Springer Proc. Mater. Sci. V. 5. Berlin: Springer, 1988.
54. Клименко И.В., Королев Ю.М., Журавлева Т.С. // *Высокомолекуляр. соединения. А*. 2001. Т. 43. № 2. С. 357.
55. Mohindar S.S., Pavlovic A.S. // *Carbon*. 1993. V. 31. Issue 4. P. 557.
56. Endo M., Kim C., Karaki T. et al. // *Ibid.* 1998. V. 36. Issue 11. P. 1633
57. Rezende L., Oliveira Chaves A., Moraes S.L.L. // *Braz. J. Geol.* 2021. V. 51. № 1. P. e20200083;
<https://doi.org/10.1590/2317-4889202120200083>
58. Tagiri M., Yago Y., Tanaka A. // *The Island Arc*. 2000. V. 9. № 2. P. 188;
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1738.2000.00272.x>
59. Selyakow N.Zs. // *Phys.* 1925. V. 31. P. 439.
60. Warren B.E. // *Phys. Rev.* 1941 V. 59. P. 693.
61. Pacault A. *Chemistry and Physics of Carbon*. / Ed. Walker L., Jr. V. 7. N.Y.: Marcel Dekker, 1971.
62. Tagiri M. // *J. Japan. Assoc. Min. Petr. Econ. Geol.* 1981. V. 76. № 11. P. 345;
<https://doi.org/10.2465/ganko1941.76.345>
63. Луковников А.Ф., Королев Ю.М., Голован Г.С. // *ХТТ*. 1996. № 5. С. 3.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДИОКСИДА АЗОТА С ТЕРЛОНОМ – ПОЛИ-*n*-ФЕНИЛЕНТЕРЕФТАЛАМИДОМ

© 2022 г. Т. В. Похолок^{1*}, С. М. Ломакин¹, И. Г. Калинина²

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

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

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

Поступила в редакцию 27.07.2021;
после доработки 16.08.2021;
принята в печать 20.08.2021

Изучение свойств полимерных волокон представляет собой актуальную задачу, важную для создания новых перспективных материалов и модификации их свойств в условиях эксплуатации. С помощью методов ЭПР- и ИК-спектроскопии, термоаналитических методов, электронной сканирующей микроскопии проведено комплексное исследование низкотемпературного окисления на воздухе волокон поли-*n*-фенилентерефталамида (терлона), предварительно нитрованного окислами азота, и представлен механизм этого процесса. В качестве инициатора окисления установлены образующиеся при нитровании фенилнитритные фрагменты макромолекул. Деструкция полимера происходит в результате распада *N*-нитрозоамидов, *N*-нитросоединений и *N*-нитритов – продуктов нитрования терлона. Методом ИК-спектроскопии определены основные продукты нитрования терлона – сложные эфиры и карбоновые кислоты.

Ключевые слова: ароматический полиамид терлон, диоксид азота, азотсодержащие радикалы, *N*-нитрозо соединения, ИК-спектры.

DOI: 10.31857/S0207401X2202008X

ВВЕДЕНИЕ

Терлон относится к классу “арамидных волокон” и входит как сополимер в состав высокомолекулярных, термо- и огнестойких волокон в процентном соотношении, превышающем 70%. Благодаря этим качествам “арамидные волокна” широко используются в авиационной технике и в изделиях специального назначения. Для “арамидов” характерна высокая устойчивость к воздействию многих внешних факторов: кислорода, света, радиации. Это связано с высокой прочностью связей *N*–*N* и ароматических связей *C*–*H*, препятствующих образованию в них свободных радикалов при температурах ниже 300°C. Однако в атмосфере, содержащей оксиды азота, их эксплуатационные свойства значительно ухудшаются. Резко падают как прочностные свойства, так и термическая стабильность.

Ранее нами было показано [1–6], что по отношению к диоксиду азота (NO_2) эти полимеры (арамидические полиамиды, полиамидимиды и полиимиды) весьма реакционноспособны уже при комнатной температуре. Специфическое ион-радикальное инициирование превращает химически инертные ароматические кольца в более активные циклогексадиеновые структуры [7]. В

качестве инициатора выступает нитрозилнитратная (*HN*) форма NO^+NO_3^- , представленная в реакции диоксида азота с ароматическим полиамидом фенилоном. При этом осуществляется перенос электрона с *NH*-группы мономерного звена на катион нитрозилнитрата NO^+NO_3^- [7]. В полимере накапливаются азотсодержащие макрорадикалы, служащие источником большого числа разнообразных валентно-насыщенных продуктов нитрования фенилона [8], первичными из которых являются *N*-нитрозо- и *N*-нитрито-производные. Они легко распадаются, и в арамиде возникает много относительно стабильных при комнатной температуре соединений, чьи полимерные звенья содержат фенильные кольца и присоединенные нитро-, нитрит- и нитрозогруппы, вызывая резкое ухудшение термостойкости и ударной прочности полимера [8, 9].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали волокна терлона (бледно-желтого цвета) промышленного поли-*n*-фенилентерефталамида – аналога кевлара, полученного посредством поликонденсации дихлорангидрида

терефталевой кислоты и *n*-фенилендиамин. Диоксид азота получали путем термического разложения $Pb(NO_3)_4$ в вакууме (продукты: $Pb(NO_3)_2 + 2NO_2 + O_2$). Смесь $2NO_2 + O_2$ пропускали через заполненную P_2O_5 трубку для удаления воды с последующей конденсацией NO_2 в ловушку, охлажденную до $-35^\circ C$ смесью ацетона с сухим льдом. Полученный NO_2 очищали от следов кислорода трехкратным повторением цикла “замораживание газа до 77 К и откачка O_2 до $\approx 10^{-3}$ Торр – размораживание до комнатной температуры” [9]. Очищенный NO_2 хранили в специальной емкости, присоединенной к вакуумной установке. Для проведения опыта образец волокна терлона массой 0.06 г помещали в цилиндрическую кварцевую ампулу для ЭПР-измерений, соединенную с шарообразной колбой емкостью 500 см^3 , которая была снабжена встроенными кранами, обеспечивающими вакуумирование и напуск газов в ампулу и спектроскопическую кварцевую кювету для определения концентрации NO_2 . После откачки системы до давления в 1.3 Па колбу с ампулой отключали краном от вакуумной установки и заполняли очищенным NO_2 . Параллельно этот же газ заполнял и снабженную краном кварцевую кювету. После заполнения системы газом краны на колбе и кювете закрывали. Концентрацию NO_2 определяли по оптической плотности при длине волны $\lambda = 410\text{ нм}$ [9]. Регистрацию спектров осуществляли на спектрофотометре компании Shimadzu UV mini-1240 (Japan). Ампулу с образцом заполняли газом NO_2 концентрацией $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л и при $98^\circ C$ прогревали в течение 8 ч. Затем образец хранили при комнатной температуре 3 мес в атмосфере NO_2 . Для исследования ИК-спектров NO_2 скачивали, волокна терлона распушали и помещали в специальную кювету. Оставшиеся волокна хранили на воздухе в темном месте в ампуле. Для ЭПР-измерений ампулу с образцом, заполненную газом ($[NO_2] = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л), помещали непосредственно в резонаторе ЭПР-спектрометра. Использовали спектрометры РЭ-1306 и ЭПР-10 МИНИ (ООО “Резонанс-М”, Санкт-Петербург) со следующими характеристиками: частота ВЧ-модуляции – 100 кГц, амплитуда ВЧ-модуляции – 1–3 Гс, мощность СВЧ – 1–3 мВт.

Значения *g*-факторов и констант сверхтонкого взаимодействия $A_{||\perp}^N$, определяли при одновременной регистрации сигналов ЭПР образца и ионов Mn^{2+} в решетке MgO. ИК-спектры исходных и экспонированных в NO_2 образцов регистрировали методом многократного нарушенного полного внутреннего отражения на ИК-спектрометре с фурье-преобразователем марки Tensor 27 (Bruker) со стандартной АТР-ячейкой Pike Miracle (ZnSe). Воспроизводимость измерений составляла 1–2%.

Термогравиметрический и дифференциальный термический анализы (далее – ТГА и ДТА) образцов исходного и нитрованного терлона проводили на синхронном термоанализаторе STA 449 F3 компании NETTZCH (Germany). Навески образцов составляли 10–12 мг. Процесс деструкции полимеров проводили на воздухе при скорости потока газа 30 мл/мин и линейной скорости нагрева $10^\circ C/\text{мин}$ в диапазоне температур 30– $900^\circ C$. Изменения потери массы регистрировались с точностью до 1–3 мг, относительная погрешность измерения температуры составляла $\pm 1.5^\circ C$, тепловых эффектов – $\pm 3\%$. Процесс описывали зависимостями потери массы (ТГА), скорости потери массы (ДТГ) и тепловых эффектов (ДТА) от температуры. В качестве параметров, характеризующих деструкцию, были выбраны: по кривым ТГА – температуры стадийности процесса потери массы (*T*) и по кривым ДТГ – максимальная скорость потери массы (W_{max}), по кривым ДТА – величины тепловых потоков, сопровождающих стадии потери массы (*Q*, кДж/г). Термомеханические свойства исследовали на приборе ТМА-402 фирмы Netzsch (Germany) со сферическим индектором диаметром 3 мм при нагрузке 50 г и скорости нагрева $10\text{ град}/\text{мин}$ в диапазоне температур 25– $600^\circ C$. Измерения проводили на воздухе.

Испытание механической прочности нитей нитрованного терлона проводились на разрывной машине Instron 3365 (USA). Микроструктура волокон изучена методом сканирующей электронной микроскопии на приборе Tescan MiraL MU компании Tescan (Czech) при низких значениях тока и ускоряющего напряжения 1 кВ в режиме высокого вакуума без напыления.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом ЭПР-спектроскопии изучено действие диоксида азота на термостойкий ароматический полиамид (поли-*n*-фенилентерефталамид) терлон. Показано, что при длительном экспонировании терлона в диоксиде азота (до 8 ч) и последующем прогреве при $98^\circ C$ в течение 15 ч и более в спектре ЭПР наблюдается сигнал, представляющий собой анизотропный триплет иминоксильных радикалов (R_{im}) со следующими параметрами:

$$A_{||}^N = (4.4 \pm 0.1) \text{ мТл}, \quad g_{||} = (2.0020 \pm 0.0003)$$

$$\text{и } A_{\perp}^N = (2.6 \pm 0.1) \text{ мТл}, \quad g_{\perp} = (2.0055 \pm 0.0003);$$

$$a_{cp}^N = \frac{1}{3}(A_{||}^N + 2A_{\perp}^N) = (3.2 \pm 0.2) \text{ мТл}$$

$$\text{и } g = \frac{1}{3}(g_{||} + 2g_{\perp}) = 2.0043 \pm 0.0003;$$

концентрация $[R_{im}] = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/кг, скорость образования иминоксильных радикалов в терлоне W_0 равна $3.3 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$. Образование R_{im} про-

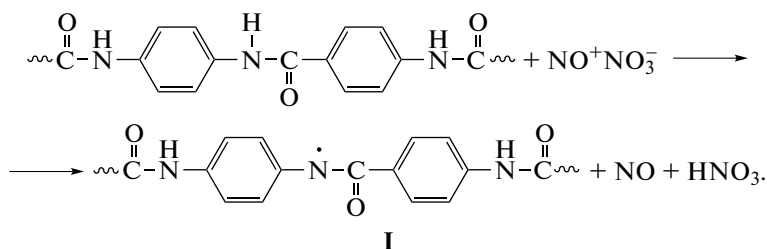
исходит при термическом распаде оксимов или нитрозосоединений, которые являются продуктами нитрования полимера при комнатной температуре. Образующиеся в терлоне иминоксильные макрорадикалы устойчивы в инертной атмосфере при 20°C и на воздухе. При 135°C они начинают гибнуть. При прогреве нитрованного терлона в вакууме выше 130°C наблюдается четырехкратное увеличение центральной компоненты спектра, характерной для синглета с *g*-фактором свободного электрона, равным 2.0023. С понижением температуры до комнатной интенсивность спектра уменьшается, а синглет сохраняется в течение нескольких лет.

Рассмотрим возможный механизм взаимодействия терлона с диоксидом азота. Реакция терлона с окислами азота инициируется переносом

электрона с NH-группы на катион нитрозилнитрата NO^+NO_3^- , находящегося в химическом равновесии с неполярной формой димера N_2O_4 [6, 7]: $\text{O}_2\text{N}-\text{NO}_2 \leftrightarrow 2\text{NO}_2 \leftrightarrow \text{ONONO}_2$.

Нитрозилнитрат проявляет сильные окислительные свойства и способен инициировать радикальные реакции в первичном процессе переноса электрона от амидных групп арамида на NH с образованием промежуточных катион-макрорадикалов и оксида азота [6, 7]. В роли доноров электрона могут выступать амидные группы и фениленовые кольца макромолекул, и происходит окислительное взаимодействие амидных групп мономерного звена полимера с нитрозилнитратной формой димера NO_2 (Схема 1).

Схема 1

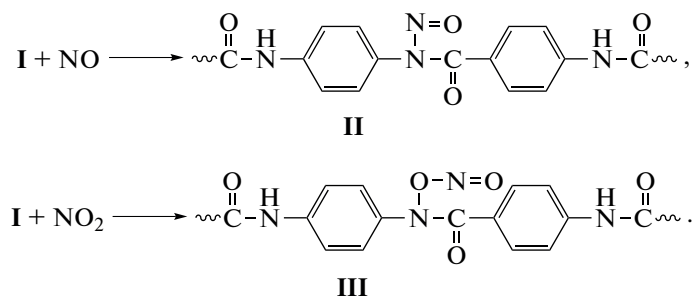


На первой стадии образуется радикальная пара, включающая NO и амидильный радикал **I**. Изомерными формами радикала **I** являются радикалы циклогексадиенильного типа, существующие в нескольких электронно-таутомерных формах [6, 7]. Присоединяя оксид азота, они превращаются в нитрозосоединения и легко изомеризуются в оксимы, которые в реакции с NO_2 генерируют стабильные иминоксильные радикалы, как описано нами [6, 7] на примере нитрования фенолона.

Инициированные амидильные радикалы **I** реагируют с NO_2 и NO, образуя широкий набор

стабильных N-нитро-, N-нитрит- и N-нитрозо-бензолных соединений, которые термически не стабильны и разрушаются при нагревании и хранении терлона с разрывом полимерной цепи и накоплением сложных эфиров и карбоновых кислотных групп, вызывая резкое ухудшение термостойкости и ударной прочности полимера [10–12]. К первичным валентно-насыщенным продуктам реакции относятся распадающиеся при нагревании N-нитрозо- (**II**) и N-нитрит-производные (**III**) [6, 7] (Схема 2).

Схема 2



Среди вторичных продуктов образуются свободные иминоксильные радикалы R_{im}^{\bullet} , из которых наиболее устойчивыми являются радика-

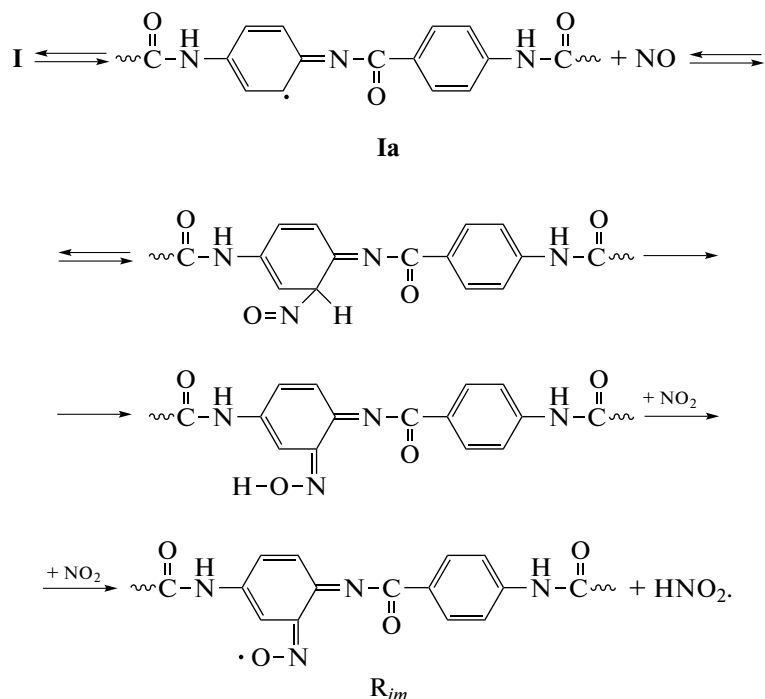
лы, обладающие орто-хиноидным строением [6, 7]. Наличие подобных структур обуславливает сильное окрашивание нитрованных образ-

цов (волокон) по типу представленного в нашей статье [8].

В соответствии с работами [6, 7] иминок- сильные радикалы (R_{im}) образуются с участием

промежуточного электронного таутомера **Ia** путем “внутриклеточных” реакций. Основные стадии процесса нитрования терлона приведены на *Схеме 3*.

Схема 3



Термическая нестабильность соединений **II** и **III** обусловлена ослаблением связи N–N и N–O вследствие отталкивания несвязывающих неподеленных пар электронов на атомах N и O.

Инфракрасные спектры нитрованного терлона

В ИК-спектрах образцов терлона, обработанных в разных режимах нитрования диоксидом азота NO₂ в концентрации 2 · 10⁻³ моль/л и продолжительности экспозиции их на воздухе, было проведено исследование трех групп образцов: 1-я группа – 3 мес нитрования; 2-я – 7 лет хранения на воздухе; 3-я – 10 лет хранения. Сравнивая ИК-спектры исходных и нитрованных волокон (рис. 1), можно выделить группы полос с интенсивностью, уменьшающейся в интервале частот $\nu = 3600\text{--}2500$, проходящей через максимум при $\nu = 3322\text{ см}^{-1}$, $1743\text{--}1000\text{ см}^{-1}$ и возрастающей при $\nu = 1442\text{--}1000\text{ см}^{-1}$. Первая группа полос относится к полосам исходного терлона и расходованию связей N–H ($\nu = 3340\text{ см}^{-1}$) и водородных связей ($\nu = 3500\text{--}2500\text{ см}^{-1}$) между амидными группами, обеспечивающими прочность полимера и разрушающимися при нитровании терлона. К полосам с возрастающей интенсивностью относятся ча-

стоты функциональных групп продуктов нитрования. Усредненные значения частот пиков: 1610, 1510, 1407, 1307, 1250, 1113, 1016, 959, 859–890 см^{-1} , в дальнейшем позволяют отнести их к концевым фрагментам макромолекул – сложным эфирам ароматических и карбоновых кислот, идентичных бензальдегиду и бензойной кислоте, являющихся фрагментами концевых групп молекулы терлона), а к продуктам нитрования полимерной молекулы – ароматические нитросоединения, нитриты, нитраты, азотную кислоту [13–16]. Полосы, соответствующие этим соединениям, появляются в ИК-спектрах нитрованного терлона, один из которых представлен на рис. 1. Принципиальным отличием представленного на этом рисунке ИК-спектра является наличие полосы с максимумом $\nu = 1442\text{ см}^{-1}$, соответствующей N-нитрозосоединениям, которая отсутствует в спектрах при больших временах экспозиции на воздухе.

Как будет показано ниже, распад N-нитрозосоединений приводит к разрыву молекулы терлона и последующей деструкции полимера. Следует отметить, что пики полосы в диапазоне частот $3600\text{--}2500\text{ см}^{-1}$ смещаются и расплываются за счет аморфизации кристаллической фазы при действии диоксида азота на терлон. По этой же причине уве-

личивается полоса с максимумом $\nu = 1018 \text{ см}^{-1}$. Химическая структура волокон отличается высокой степенью ориентированности и жесткости. Эти характеристики, в частности, обусловлены наличием в структуре большого количества ароматических бензольных колец. По своей структуре волокно может быть отнесено к сетчатым полимерам. Жесткие полимерные цепи находятся в распрямленном состоянии и образуют очень плотную упаковку в объеме волокон, что определяет его высокие механические свойства. Кристаллическая природа полимера обеспечивает высокую термическую стойкость волокон, а наличие ароматических колец в структуре макромолекулы обуславливает стабильность волокон терлона [17].

Механическая прочность волокон терлона

Проведенные нами измерения механической прочности нитрованных волокон терлона методом разрывного напряжения показали, что прочность волокон уменьшается на 30–35% после трехсуточной экспозиции нитей при комнатной температуре, предварительно нитрованных в NO_2 с концентрацией $1.5 \cdot 10^{-3}$ моль/л в течение 6 ч при $T = 98^\circ\text{C}$. Относительная разрушающая нагрузка нити терлона (P/P_0) для образцов, нитрованных в NO_2 с концентрацией $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л при $T = 98^\circ\text{C}$ и хранившихся разное время при 25°C в атмосфере NO_2 (1, 3, 7, 14 сут и 3 мес) составила 0.855, 0.785, 0.584, 0.54–0.58, 0.48–0.51, соответственно, при $P_0 = (8.35 \pm 0.45) \text{ кГс}$.

В работах [11, 12] предложен механизм распада соединений типа N-нитрозо- и N-нитритпроизводных II и III, а также N-нитроамидов, образующихся при нитровании амидов и полиамидов. Показано, что продуктами распада являются сложные эфиры с выходом 81–84%, органические кислоты с выходом 16–18% и азот. В работе [12] на примере нитрования диоксидом азота нитей нейлона по объему выделившегося азота были определены кинетические параметры деструкции поликапрамида (ПКА) в трех средах: в ксилоле, керосине и воде в интервале температур 80–110°C, и показано, что процесс описывается кинетическим уравнением реакции первого порядка. Были определены значения энергии активации распада $E_a = 26 \text{ ккал/моль}$, констант скорости распада k_d в указанном выше интервале температур, времен полураспада $\tau_{0.5}$. Так, при $T = 80^\circ\text{C}$ $\tau_{0.5} = 33 \text{ мин}$, $k_d = 0.021 \text{ мин}^{-1}$. Величина k_d в воде в 2 раза больше, чем в ксилоле и керосине. Молекулярный вес нейлона уменьшался от 10.000–12.000 ед. до 300–500 ед. за 3 мес. Волокно приобретало бледно-кремовый цвет и рыхлую поверхность за счет деструктивных процессов в полимере, связанных с выделением азота и разрывами макромолекул при распаде N-нитрозоамидов. На лицо разруше-

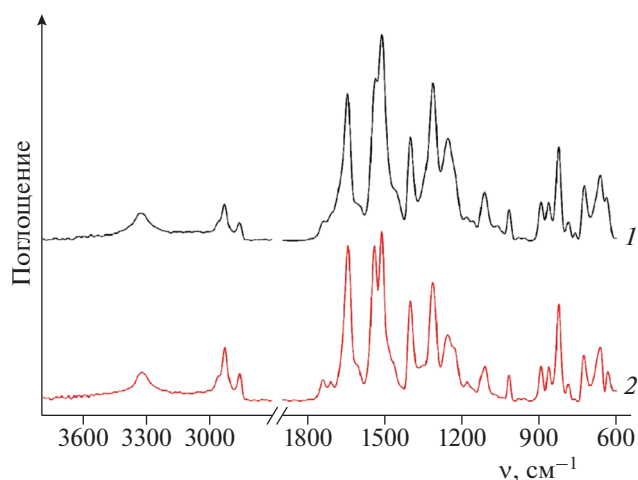


Рис. 1. ИК-спектры волокон терлона до (1) и после нитрования (2) в течение 6 ч при $[\text{NO}_2] = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л при $T = 98^\circ\text{C}$ и хранения их в течение 3 мес при 25°C .

ние полимера при действии диоксида азота на алифатический полиамид.

Эффективный процесс деструкции пленок ПКА наблюдали в работе [6]. Нитрозирование как алифатических, так и ароматических полиамидов диоксидом азота приводит к разрушению системы водородных связей между соседними макромолекулами и ухудшению механических свойств полимера. Экспонированные в NO_2 при $[\text{NO}_2] = (4\text{--}8.5) \cdot 10^{-5}$ моль/л тонкие (1–5 мкм) пленки ПКА разрушались при минимальных механических воздействиях и после более чем 10 ч нитрования превращались в желтую, очень вязкую жидкость. Для ароматического полиамидида в присутствии NO_2 было установлено, что в результате протекания последовательности реакций значение начальной скорости накопления иминоксильных макрорадикалов является нижней границей для скорости деструкции макромолекул, $(W_d)_0$ [6]. Проведенная оценка показала, что в условиях экспериментов при 25°C $(W_d)_0 = 10^{-8}$ моль/кг · с.

Используя эти значения и приведя их к реальным условиям хранения и эксплуатации, можно спрогнозировать техническую пригодность волокна и определить его конкретный ресурс [18–21]. Так, для ПКА рассчитанная величина $k_d = 1.06 \cdot 10^{-3} \text{ мин}^{-1}$ при 25°C в 20 раз меньше значения k_d , полученного при 80°C , а время полураспада N-нитрозоамида нейлона составляет 26 ч. Приблизительная оценка величины k_d при 25°C для нитрованного терлона с учетом времени полураспада (разрушения) волокна (4 года) равна $3.3 \cdot 10^{-5} \text{ мин}^{-1}$. Величина k_d для терлона до 300 и более раз меньше k_d для нитрованного ПКА.

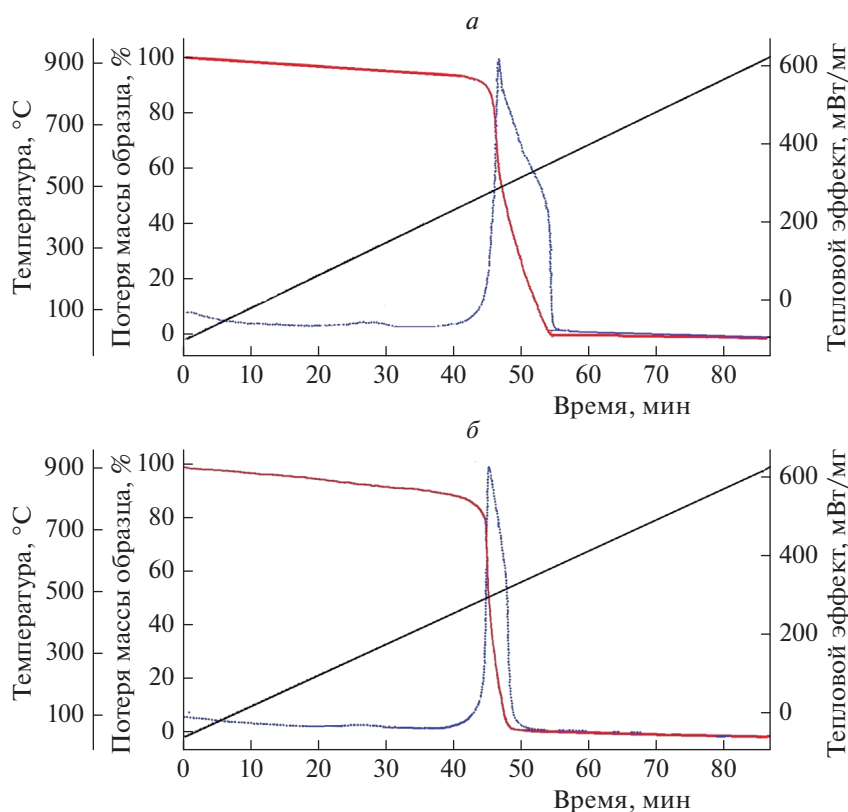


Рис. 2. Потеря массы волокон терлона по данным ТГА и ДТА до (а) и после нитрования (б) в течение 6 ч при $[\text{NO}_2] = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л при $T = 98^\circ\text{C}$ и 3 мес хранения при 25°C .

Термическая устойчивость и изменения структуры нитрованного терлона

Для установления влияния диоксида азота на термическую устойчивость волокна терлона было проведено исследование образцов терлона, обработанных в разных режимах нитрования и продолжительности экспозиции их на воздухе, термоаналитическими методами ТГА, ДТА и термомеханического анализа (ТМА). На рис. 2, 3 приведены соответствующие кривые ТГА, ДТА, ТМА, из которых видно что, свойства и параметры нитрованных образцов существенно отличаются от исходных, не нитрованных волокон. Так, из сравнения параметров, приведенных на рис. 2 видно, что термическая деструкция нитрованного волокна протекает при меньших значениях температур и потери массы (Δ), чем деструкция исходного терлона. Температура начала интенсивной потери массы – $T_{н1} = 488.43^\circ\text{C}$ при 7%-ной потере массы для исходного терлона и $T_{н2} = 475.31^\circ\text{C}$ при 12%-ной потере массы для нитрованного терлона; T_{max1} при максимальной скорости деструкции равна 497.75°C для исходного терлона и T_{max2} равна 482.17°C для нитрованного терлона. Температура окончания деструкции $T_{к1} = 572.47^\circ\text{C}$ и $T_{к2} = 510.80^\circ\text{C}$ при потере массы около 99.7% (т.е.

оба полимера разлагаются без твердого остатка). Из анализа кривых ДТА рис. 2 следует, что величины площадей эндопиков исходного, $A_1 = -241388.861 \text{ мкВ} \cdot \text{с}$ и нитрованного терлона, $A_2 = -122680.179 \text{ мкВ} \cdot \text{с}$, различаются в два раза, причем площадь пика для нитрованного терлона меньше, чем площадь эндопика для исходного терлона, что свидетельствует о меньших энергетических затратах и указывает на более интенсивный процесс деструкции нитрованного полимера.

Как показано в работах [22–25], основными продуктами деструкции в начальной стадии процесса (до 10% потери массы) являются газообразные CO , CO_2 и H_2O . При $T \geq 500^\circ\text{C}$ в состав продуктов распада входят фрагменты макромолекулы терлона, включая бензойную кислоту, *n*-фенилендиамин, бензонитрил, анилин, терефталонитрил. Предполагается, что деструкция терлона происходит по амидным группам мономерного звена полимера. Энергия активации термической деструкции на воздухе и в атмосфере азота равна 207 и 219 $\text{кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ соответственно.

Основные продукты термической деструкции терлона идентичны продуктам нитрования волокон, идентифицированным выше по ИК-спектрам: сложным эфирам ароматических и карбо-

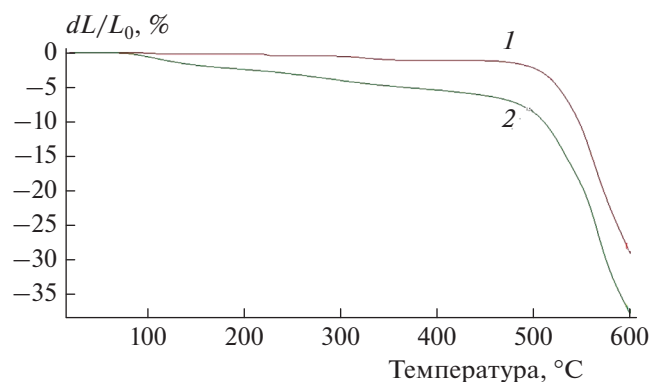


Рис. 3. Температурная зависимость потери прочности волокон терлона до (1) и после нитрования (2) в течение 6 ч при $[\text{NO}_2] = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л при $T = 98^\circ\text{C}$ и 3 мес хранения при 25°C по данным ТМА.

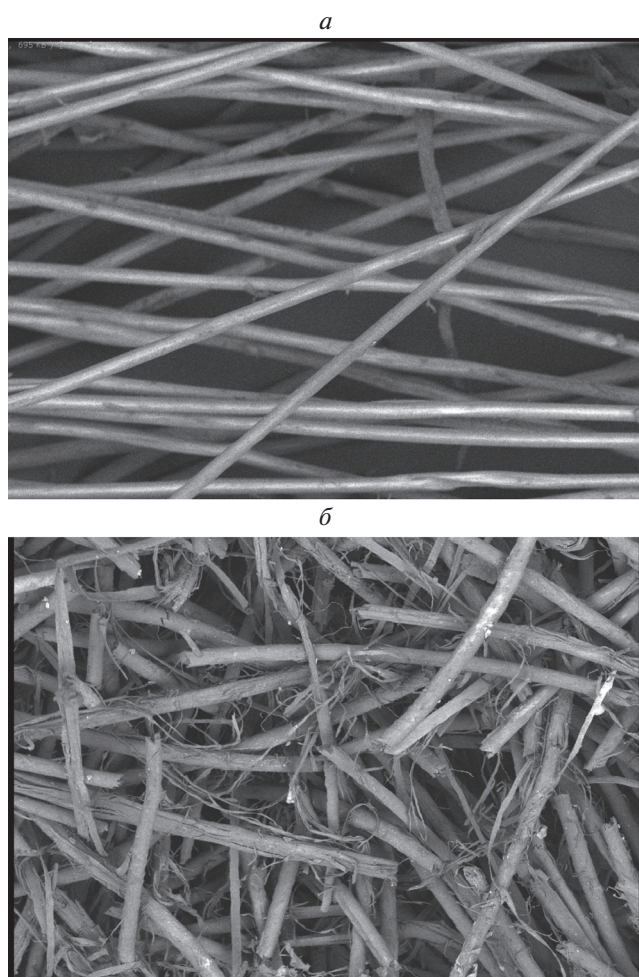


Рис. 4. Снимки ЭСМ волокон терлона до (а) и после нитрования (б) в течение 6 ч при $[\text{NO}_2] = 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л при $T = 98^\circ\text{C}$ и 3 мес хранения при 25°C , выдержанных затем 5 лет на воздухе.

новых кислот — бензальдегиду и бензойной кислоте, являющимся фрагментами концевых групп молекулы терлона.

Изменения структуры волокон терлона при нитровании

Разрушающее действие диоксида азота на структуру волокна наблюдается из снимков образцов, сделанных с помощью электронного сканирующего микроскопа (ЭСМ) при одинаковых параметрах съемки. Степень разрушения волокна терлона можно визуальнo оценить по рис. 4. Сравнивая исходное и нитрованное волокно, хранившееся на воздухе более двух лет, отметим, что различий почти нет. Упакованные в ровные прямолинейные “снопы” волокна в основном однородны по внешнему виду. На некоторых участках появляются первые дефекты в виде заусенцев и разломов, похожих на разрезы. С увеличением времени экспозиции (хранения) до трех и более лет дефектность волокон усиливается, на поверхности появляются изломы, каверны, сколы, трещины. Прямолинейность волокон исчезает, они теряют прозрачность, становятся хрупкими, чешуйчатыми и превращаются в стружку, а затем — в опилки (почти в труху). Все повреждения наглядно видны на рис. 4б. Кроме этого, наблюдается изменение окраски волокон от бледно-желтого до насыщенного желтого цвета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью методов ЭПР и ИК-спектроскопии, ТГА, ДТА, ТМА и ЭСМ проведено комплексное исследование взаимодействия диоксида азота с терлоном и представлен универсальный механизм низкотемпературного окисления на воздухе волокон термостойкого ударопрочного ароматического полиамида поли-*n*-фенилентерефталамида (терлона). Димер NO_2 в форме нитрозилнитрата инициирует ион-радикальные реакции с образованием продуктов нитрозирования за счет переноса электрона с NH -группы мономерного звена на катион нитрозилнитрата. Разнообразные превращения возникающего катион-радикала приводят к синтезу широкого набора относительно стабильных N -нитро-, N -нитрит-, N -нитрозобензольных соединений и стабильных азотсодержащих радикалов, что приводит к резкому ухудшению эксплуатационных свойств терлона. Показано, что деструкция нитрованного терлона на воздухе происходит и при комнатной в результате распада основных продуктов нитрования N -нитрозоамида и N -нитритамида. При этом образуются сложные эфиры ароматических кислот (фенилбензоатные фрагменты) и кислотные группы бензойной кислоты в качестве концевых групп разрывов полимерной цепи. Прочность нитрованных волокон терлона уменьшается на 30% за одни сутки экспозиции в диоксиде азота при $[\text{NO}_2] = 1.5 \cdot 10^{-3}$ моль/л за счет распада водородных связей, а дальнейшее хранение этих волокон на воздухе в течение 3–4 лет

приводит к полному их разрушению. Эти результаты приводят к выводу о высокой чувствительности терлона – ароматического полиамида к диоксиду азота и требованию особой чистоты атмосферы в помещениях, в которых хранятся или функционируют изделия из ароматических полиамидов (даже в следовых количествах).

Авторы выражают огромную благодарность А.Е. Флатовой за измерения микроструктуры волокон и А.А. Далинкевич за измерения разрывной прочности волокон.

Работа выполнена за счет субсидии, выделенной на выполнение госзадания (регистрационный номер 0120125305), а также в рамках финансирования госзадания ФИЦ ХФ им. Н.Н. Семёнова РАН № ГЗ-0082-2019-0008 (регистрационный номер АААА-А20-120030590042-8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ломакин С.М., Хватов А.В., Сахаров П.А. и др. // Хим. физика. 2020. Т. 39. № 11. С. 58.
2. Ломакин С.М., Шаулов А.Ю., Коверзанова Е.В. и др. // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 4. С. 74.
3. Коверзанова Е.В., Усачев С.В., Ломакин С.М. и др. // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 6. С. 53.
4. Хватов А.В., Бревнов П.Н., Шилкина Н.Г., Ломакин С.М. // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 6. С. 71.
5. Бревнов П.Н., Новокшионова Л.А., Крашенинников В.Г. и др. // Хим. физика. 2019. Т. 38. № 9. С. 54.
6. Zaikov G., Davydov E., Gaponova I., Pokholok T., Pariskii G. Interaction of Polymers with Polluted Atmosphere. Shawbury, SY4 4NR. UK: iSmithers – A Smithers Group Company, 2009. P. 264.
7. Pokholok T.V., Gaponova I.S., Davydov E.Ya., Pariskii G.B. // Polym. Degrad. Stab. 2006. V. 91. № 10. P. 2423.
8. Похолок Т.В., Гапонова И.С., Парийский Г.Б. и др. // Вестн. технологич. ун-та. 2015. Т. 18. № 5. С. 51.
9. Похолок Т.В., Гапонова И.С., Парийский Г.Б., Ломакин С.М., Михеев Ю.А. // Хим. физика 2017. Т. 36. № 9. С. 11.
10. White E.H. // J. Amer. Chem. Soc. 1955. № 20. V. 77. P. 6011.
11. White E.H. // Ibid. P. 6014.
12. Porter M.R. // J. Polym. Sci. 1958. № 126. V. 33. P. 447.
13. Беллами Л. ИК-спектры сложных молекул. М.: Мир, 1963.
14. Тарасевич Б.Н. ИК-спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы. М.: Изд-во МГУ, 2012.
15. George W.O., McIntyre P.S. Infrared Spectroscopy Analytical Chemistry by Open Learning / Ed. Mowthorpe D.J. Publ. on behalf of ACOL, Thames Polytechnic. London: By John Wiley and Sons, 1987.
16. Васильев А.В., Гриненко Е.В., Шукин А.О., Федуллина Т.Г. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений. Учебное пособие. СПб.: СПбГЛТА, 2007.
17. Перепелкин К.Е. Структура и свойства волокон. М.: Химия, 1985.
18. Бенсон С. Термохимическая кинетика. М.: Мир, 1971.
19. Денисов Е.Т., Саркисов О.М., Лихтенштейн Г.И. Химическая кинетика. М.: Химия, 2000.
20. Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л. Химическая физика старения и стабилизации полимеров. М.: Наука, 1982.
21. Эмануэль Н.М., Кнорре Д.Г. Курс химической кинетики. М.: Высш. шк., 1984.
22. Pramoda K.P., Chung T.S., Liu S.L., Oikawa H., Yamaguchi A. // Polym. Degrad. Stab. 2000. V. 67. P. 365.
23. Gowenlock Brian G., Pfab Josef, Young Victor M. // J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1997. V. 2. P. 1793.
24. Brown James R., Holgeman Daryl K.C. // Polymer. 1982. V. № 3. P. 365.
25. Калашник А.Т., Паникарова Н.П., Довбий Е.В. и др. // Высокомолекуляр. соединения. А. 1977. Т. 19. № 12. С. 2747.

МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА И ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА С КАУЧУКАМИ

© 2022 г. Ю. В. Тергышная^{1, 2*}, А. В. Хватов¹, А. А. Попов^{1, 2}

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

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

*E-mail: terj@rambler.ru

Поступила в редакцию 25.06.2021;

после доработки 17.08.2021;

принята в печать 20.08.2021

В работе изучено влияние эластомеров — натурального каучука и синтетического этилен-пропиленового каучука на морфологию и физико-механические характеристики композиционных материалов на основе полилактида и поли-3-гидроксибутирата соответственно. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии показаны различия в закономерностях изменения теплофизических характеристик композиций полилактидов — натуральный каучук (с содержанием каучука 5–15 мас.%) и поли-3-гидроксибутират — синтетический этилен-пропиленовый каучук (10–30 мас.%). Температура плавления и степень кристалличности увеличиваются в случае с полилактидом и уменьшаются в эксперименте с поли-3-гидроксибутиратом. Механические характеристики исследуемых композиций имеют подобные зависимости: с увеличением содержания каучуков повышается относительное удлинение и снижаются прочность при растяжении и модуль упругости.

Ключевые слова: полилактид, поли-3-гидроксибутират, относительное удлинение, прочность при растяжении, каучук.

DOI: 10.31857/S0207401X22020133

ВВЕДЕНИЕ

Полилактид (ПЛА) и поли-3-гидроксибутират (ПГБ) — биodeградируемые полимеры, линейные полиэфиры. Последний (ПГБ) относится к классу полигидроксиалканоатов. Это высококристаллический полимер, получаемый в процессе биосинтеза с помощью микроорганизмов *Alcaligenes eutrophus*, *Ralstonia eutropha*, *Azotobacter chroococcum* и некоторых других. ПГБ синтезируется в клетках микроорганизмов как запасное вещество [1, 2].

Полилактид — бесцветный прозрачный термопласт, который получают из природного сырья путем молочнокислого брожения суслу кукурузы, картофеля, зерновых культур [3, 4]. Затем из мономера — молочной кислоты в процессе полимеризации синтезируют полилактид.

Основное преимущество ПЛА и ПГБ — способность быстро разрушаться до углекислого газа и воды, не нанося вреда окружающей среде [5, 6]. Тем не менее эти полимеры сами по себе хрупки и обладают минимальным относительным удлинением, ограничивающим их потенциальное применение.

Физико-механические характеристики полимерного материала важны для процесса его переработки и эксплуатации. Например, волокнистые материалы наматывают на бобины или сматывают в рулоны. В процессе намотки полотно находится в натяжении, а значит важны такие свойства, как эластичность и прочность. При эксплуатации полотна в качестве защитного материала от воздействия внешних факторов вышеуказанные механические свойства определенного уровня тоже необходимы. Существует много работ по изучению морфологии, транспортных и антибактериальных свойств волокнистых материалов на основе ПЛА и ПГБ [7–9]. Для пленочных материалов, используемых для упаковки различных товаров, эластичность и прочность также являются необходимыми свойствами.

Для модификации ПЛА и ПГБ используют низкомолекулярные пластификаторы различных видов и эластомеры [10, 11]. Введение эластомера в матрицу ПЛА приводит к существенному увеличению эластичности и ударной вязкости материала [12, 13]. Введение каучука в термопласт превращает его хрупкий разрыв при деформации. Наибольшую опасность при ударе представляют

микротрещины, которые затем разрастаются в микродефекты и трещины. Каучук может деформироваться обратимо на большую величину, и энергия растущей трещины тратится на деформацию частиц каучука. Рост трещины прекращается, а часть энергии, сохраненная в частице каучука, возвращается при следующем сокращении частицы, что способствует “залечиванию” трещины. Механизм пластической деформации был описан еще в 1970-х годах, и подтвержден современными исследованиями [14, 15].

Если ударные характеристики улучшаются с введением каучука в стеклообразный полимер, то прочность материала снижается. Степень ухудшения прочности зависит от наличия или отсутствия межфазных взаимодействий, прочностных характеристик компонентов смеси. В настоящем исследовании изучается влияние матричного строения дисперсионной среды и содержания синтетического каучука этилен-пропиленового (СКЭП) на механические свойства пленочных композиций ПГБ/СКЭП, а также натурального каучука (НК) на аналогичные свойства нетканого материала ПЛА/НК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение образцов

В работе использовали СКЭП марки СО-059 фирмы “Dutral” (Italy) с содержанием сомономеров, мольн. %: 67.4 этилена и 32.6 пропилена плотностью 0.86 г/см³, и ПГБ фирмы “Biomer” (Germany) в виде тонкодисперсного порошка со среднечисловой молекулярной массой $1.9 \cdot 10^5$ г/моль плотностью 1.25 г/см³. Предварительное смешение полимеров осуществляли при температуре 150 °С в течение 3 мин на лабораторных обогреваемых микровальцах ВК-6 со следующими параметрами: диаметр валков – 80 мм, коэффициент трения – 1.4, скорость вращения тихоходного валка – 8 об/мин, зазор – 0.05 мм. Из полученных смесей формовали пленки толщиной (90 ± 10) мкм на прессе ПРГ-10 (Россия) при температуре (190 ± 3) °С в течение 3 мин при давлении 5 МПа.

Нетканые волокнистые материалы ПЛА/НК были получены методом электроформования из раствора хлороформа. Характеристики полилактида марки 4032D производства компании Nature works (USA): среднечисловая молекулярная масса – $1.7 \cdot 10^5$ г/моль, плотность – 1.24 г/см³ и показатель текучести расплава – 4–6 г/10 мин. Для модификации полилактида использовали натуральный каучук марки SVR-3L (Vietnam) с вязкостью по Муни 50 ± 5 (100 °С) и содержанием поли(цис-1,4-изопрена) в количестве 91–96 мас. %.

Дифференциальная сканирующая калориметрия

Теплофизические характеристики определяли на дифференциальном сканирующем микрокалориметре NETZSCH POLYMA 214 (Germany). Нагревание и охлаждение образцов осуществлялось в температурном диапазоне 30–200 °С при скорости сканирования 10 град/мин. Навеска образца составляла (5 ± 0.3) мг. Точность измерения температуры – 0.1 °С.

Величину степени кристалличности $\chi_{кр}$ рассчитывали по формуле

$$\chi_{кр} (\%) = 100 \left(\frac{\Delta H_{пл}}{\Delta H_{пл}^*} \right),$$

где $\Delta H_{пл}^*$ – теплота плавления идеального кристалла, равная 93.1 Дж/г для полилактида [16] и 164 Дж/г для поли-3-гидроксипропиридата [17].

Определение физико-механических характеристик

Механические характеристики определяли на разрывной машине РМ-10 с программным обеспечением “Stretch Test” при скорости нагрузки 50 мм/мин. Количество пленочных образцов для серии эксперимента было не менее семи для каждой композиции.

Относительное удлинение при разрыве, ϵ , рассчитывается по формуле $\epsilon (\%) = \Delta l / l_0 \cdot 100$, где l_0 – расстояние между держателями, мм; Δl – приращение расчетной длины в момент разрыва, мм.

Прочность при растяжении определяется следующим образом: $\sigma_p = P / bh$, где P – нагрузка, при которой происходит разрушение образца, Н; b – ширина образца в узкой части, м; h – толщина образца в узкой части, м.

Модуль упругости определяется графически или рассчитывается по формуле $E_{упр} = (\Delta P / bh) / \Delta l$, где ΔP – приращение нагрузки, Н.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Композиции ПЛА/НК и ПГБ/СКЭП – полимерные системы, один компонент которых является кристаллизующимся полимером. Методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) были определены температуры фазовых переходов ПЛА и ПГБ, а также степени их кристалличности в образцах различного состава.

Согласно данным табл. 1, температура плавления ($T_{пл}$) ПГБ в пленочных образцах изменяется на 1–2 °С. Более заметное понижение, на 2–3 °С, наблюдается для температуры кристаллизации ($T_{кр}$). Теплота плавления ПГБ и степень кристалличности ($\chi_{кр}$) изменяются незначительно, но имеют тенденцию к снижению. Следует отметить возможность уменьшения значений $\chi_{кр}$ из-за низких скоростей структурной релаксации жест-

коцепного ПГБ, что должно отразиться на характере взаимодействия компонентов смеси. Отсутствие значительных изменений в величинах $T_{пл}$ и $T_{кр}$ говорит о том, что СКЭП не образует дополнительных центров зародышеобразования при кристаллизации ПГБ, и небольшое уменьшение степени кристалличности при введении каучука происходит за счет увеличения вязкости системы и стерических эффектов.

В табл. 2 представлены результаты эксперимента, полученные методом ДСК волокнистых образцов ПЛА/НК. Температура “холодной” кристаллизации ($T_{х.кр}$) в композициях ПЛА/НК наблюдается при несколько более высоких температурах по сравнению с температурой в чистом ПЛА, вероятно, потому, что нет очевидного гетерогенного эффекта зародышеобразования НК в процессе “холодной” кристаллизации ПЛА. Некоторое увеличение значений $T_{пл}$ и $\chi_{кр}$ полилактида следует отнести к возможному повышению сегментарной подвижности макроцепей ПЛА в присутствии каучука при кристаллизации из раствора. Изменение температуры стеклования (T_c) ПЛА на 3–4 °С может быть следствием изменения кристаллической структуры, в частности плотности упаковки кристаллитов или перехода α -формы кристаллических образований в α' -форму [18], а также не исключено влияние различий в коэффициентах теплового расширения смешиваемых компонентов [19].

Известно, что получить эмпирическое значение температуры стеклования можно из соотношения [14], которое для полимеров с несимметричной конфигурацией макромолекул выглядит следующим образом: $T_c/T_{пл} = 2/3$. Как полилактид, так и поли-3-гидроксибутират относятся к полимерам с несимметричной конфигурацией макромолекул (рис. 1), однако для них данное соотношение выполняется с большой погрешностью.

Так, расчетное значение температуры стеклования ПГБ составляет около 20 °С, хотя экспериментальные значения лежат в области температур 4–7 °С, а для ПЛА расчетная величина составляет 18 °С, что на 40–45 °С ниже, чем экспериментальные значения температуры стеклования. Пока не очень понятно, чем можно объяснить этот факт, хотя для других, “несимметричных” синтетических полимеров, например для ПЭТФ или ПАБ, вышеуказанное соотношение выполняется довольно точно.

Температура стеклования является важной характеристикой полимера, определяющей характер разрушения исследуемых композиций. Температура эксперимента по определению физико-механических свойств составляла (20 ± 2) °С. Это значит, что ПГБ в условиях эксперимента находился в высокоэластическом состоянии, а ПЛА — в стеклообразном. Однако важны не только темпера-

Таблица 1. Теплофизические характеристики смесевых композиций ПГБ/СКЭП

ПГБ/СКЭП, мас. %	$T_{пл}$, °С	$T_{кр}$, °С	$\Delta H_{пл}$, Дж/г	$\chi_{кр}$, %
100/0	174.1	64.2	88.6	54
90/10	173.8	61.3	86.8	53
80/20	173.2	62.4	87.1	53
70/30	172.4	61.1	85.7	52

Таблица 2. Теплофизические характеристики образцов нетканого материала ПЛА/НК

ПЛА/НК, мас. %	T_c , °С	$T_{х.кр}$, °С	$T_{пл}$, °С	$\chi_{кр}$, %
100/0	60.3	101.2	164.2	34
95/5	63.0	102.3	168.1	36
90/10	64.8	104.1	167.2	38
85/15	64.1	103.6	166.0	37

турные характеристики полимера, но и его степень кристалличности.

Известно, что кристаллическая структура полимера играет большую роль в способности последнего выдерживать те или иные виды нагрузки. Укладку макромолекулы полимера можно представить в виде фибриллы со складчатыми доменами. Домены — участки макромолекулярных цепей, уложенных параллельно друг другу и соединенных проходными цепями, плотность которых значительно ниже, чем внутри домена. Соответственно, проходные цепи и граничные области являются слабыми местами в структуре полимера, а домены — прочными. Следовательно, в слабых местах под нагрузкой зарождаются субмикротрещины, механизм образования которых, согласно Журкову и Закревскому [20], начинается с разрыва цепи под действием напряжения. Затем на концах этой цепи образуются радикалы, которые

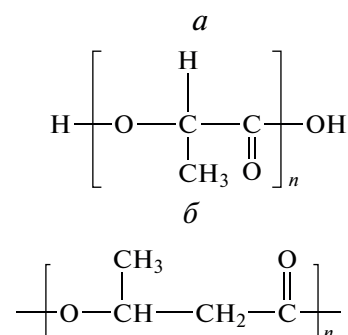


Рис. 1. Структурные схемы полилактида (а) и поли-3-гидроксибутирата (б).

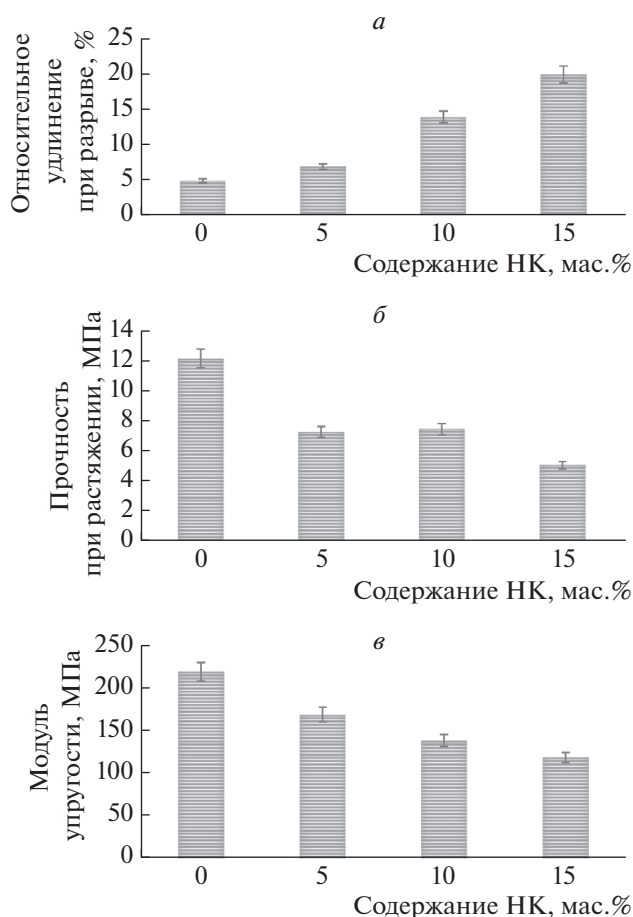


Рис. 2. Относительное удлинение при разрыве (а), прочность при растяжении (б) и модуль упругости (в) образцов ПЛА/НК в зависимости от содержания НК.

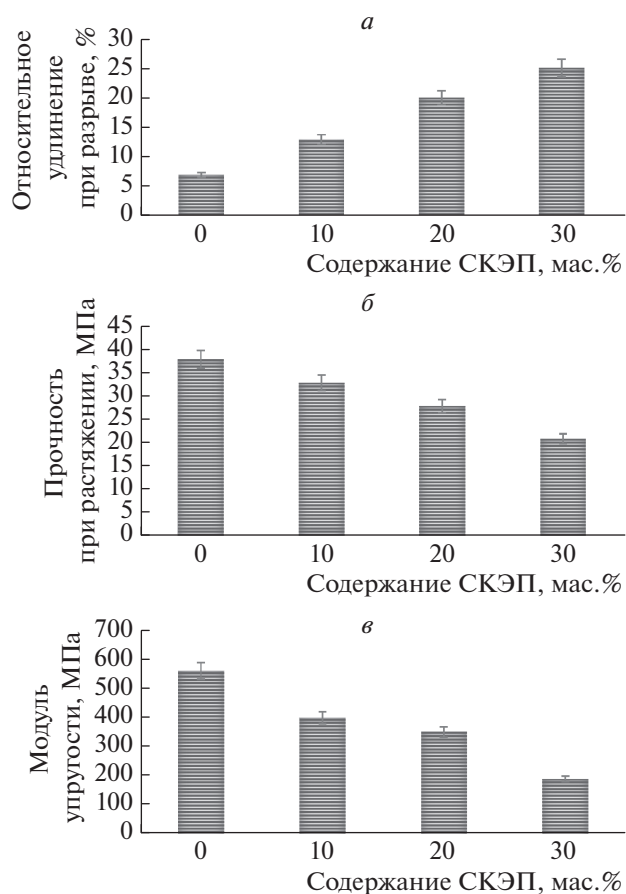


Рис. 3. Относительное удлинение при разрыве (а), прочность при растяжении (б) и модуль упругости (в) образцов ПГБ/СКЭП в зависимости от содержания СКЭП.

атакуют основную цепь, в результате чего образуются новые радикалы и т.д.

Теория Бартенева [21], объясняет образование микротрещин наличием областей в структуре полимера с пониженной плотностью. В кристаллизующихся полимерах такой областью является аморфная фаза, которая выступает в качестве ловушек для радикалов и родоначальников субмикротрещин.

Согласно Петерлину [22], концы микрофибрилл, расположенные в основном на поверхности фибрилл, под действием напряжения вытягиваются и образуют субмикротрещины, которые затем разрастаются в трещины.

Существует еще множество теорий трещинообразования и прочности полимеров и полимерных смесей. Несмотря на разницу подходов в упомянутых теориях, очевидно, что введение аморфного компонента в матрицу кристаллизующегося полимера увеличит долю аморфной фазы в композиционном материале, что, в свою очередь, обязательно отразится на прочностных характе-

ристиках материала. Исходя из вышесказанного, следует ожидать уменьшения прочности исследуемых образцов материалов вследствие увеличения доли аморфной фазы.

Механические свойства полимерных систем определяются следующими параметрами: долей дисперсной фазы, ее размером и формой, механическими свойствами дисперсной фазы и дисперсионной среды, а также межфазными взаимодействиями [23]. Содержание дисперсной фазы обычно не превышает 30–40%. При его увеличении дисперсная фаза может стать дисперсионной средой и произойдет инверсия фаз. В данном исследовании условие для соотношения компонентов выполняется: содержание СКЭП в матрице ПГБ составляет максимальное 30 мас.%. Добавление СКЭП в ПГБ или небольшое количества НК к ПЛА (5–15 мас.%) приводит к увеличению относительного удлинения при разрыве (ϵ , %) в несколько раз. Введение каучука в кристаллизующийся полимер влияет на релаксационные процессы, и величина относительного удлинения возрастает.

В случае систем ПЛА/НК величина ϵ повышается в 3–4 раза, в композициях ПГБ/СКЭП – в 4–5 раз (рис. 2а и 3а).

Введение каучуков в ПГБ и ПЛА ожидаемо уменьшает прочность последних при растяжении и модуль упругости (рис. 2б, в и 3б, в). Следует отметить, что при различном матричном строении: волокнистом (ПЛА/НК) либо пленочном (ПГБ/СКЭП), и разном содержании каучуков закономерности изменения механических свойств имеют схожий характер.

Полилактид и поли-3-гидроксibuтират имеют достаточно высокие величины степени кристалличности. Согласно результатам ДСК более 50% ПГБ и около 40% ПЛА имеют дальний порядок, т.е. кристаллическую структуру. Добавление эластомеров (СКЭП и НК) к полиэфирам увеличивает количество аморфной фазы – так называемых “слабых мест”, и прочность уменьшается. Даже увеличение степени кристалличности ПЛА на 3–4% не влияет на величину прочности вследствие увеличения доли аморфной фазы полимерной композиции. Следует отметить, что полимерные системы ПГБ/СКЭП и ПЛА/НК относятся к несовместимым [24, 25], и, хотя наличие некоторого межфазного взаимодействия (ограниченной сегментарной растворимости) вполне допустимо, но так или иначе для подобных полимерных систем характерна низкая межфазная адгезия, которая тоже может служить причиной снижения модуля упругости и прочности при растяжении [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере образцов ПГБ/СКЭП в виде пленок, содержащих 10–30 мас.% СКЭП, и нетканых волокнистых материалов ПЛА/НК, содержащих 5–15 мас.% НК, продемонстрировано улучшение эластичности по сравнению с чистыми полимерами (ПГБ и ПЛА). Несмотря на некоторое увеличение степени кристалличности (на 3–4%) в композициях ПЛА/НК прочность при растяжении при добавлении НК снизилась в 1.5–2 раза по сравнению с чистым ПЛА. Для образцов ПГБ/СКЭП показана та же тенденция: уменьшение модуля упругости и прочности при растяжении при увеличении содержания каучука.

Работа выполнена с использованием приборов Центра коллективного пользования (ЦКП ИБХФ РАН) “Новые материалы и технологии” и Центра коллективного пользования РЭУ им. Г.В. Плеханова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ravenelle F., Marchessault R.* // *Biomacromolecules*. 2003. V. 4. P. 856.
2. *Steinbuechel A.* *Biomaterials* / Ed. Byron D.B. Macmillan: Basingstoke. 1996. P. 221.

3. *Nampoothiri K.M., Nair N.R., John R.P.* // *Bioresour. Technol.* 2010. V. 101. P. 8493; <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.092>
4. *Garlotta D.* // *J. Polym. Environ.* 2001. V. 9. P. 63; <https://doi.org/10.1023/A:1020200822435>
5. *Тертышная Ю.В., Подзорова М.В.* // *Хим. физика*. 2020. Т. 39. № 1. С. 57; <https://doi.org/10.31857/S0207401X20010173>
6. *Tertyshnaya Y., Podzorova M., Moskovskiy M.* // *Polymers*. 2021. V. 13. P. 461; <https://doi.org/10.3390/polym13030461>
7. *Карпова С.Г., Ольхов А.А., Тобаева П.М., Шилкина Н.Г., Попов А.А., Иорданский А.Л.* // *Хим. физика*. 2019. Т. 38. № 3. С. 37; <https://doi.org/10.1134/S0207401X19030038>
8. *Jia W., Gong R.H., Hogg P.J.* // *Composites: Part B*. 2014. V. 62. P. 104; <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2014.02.024>
9. *Casasola R., Thomas N.L., Trybala A., Georgiadou S.* // *Polymer*. 2014. V. 55. P. 4728–4737; <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.06.032>
10. *Kulinski Z., Piorkowska E.* // *Polymer*. 2005. V. 46. P. 10290; <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.07.101>
11. *Li Y., Shimizu H.* // *Europ. Polym. J.* 2009. V. 45. P. 738; <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.12.010>
12. *Zhang W., Chen L., Zhang Y.* // *Polymer*. 2009. V. 50. P. 1311; <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2009.01.032>
13. *Li Y., Shimizu H.* // *Macromol. Biosci.* 2007. V. 7. P. 921.
14. *Гуль В.Е., Кулезнев В.Н.* Структура и механические свойства полимеров. Изд. 2-е. М.: Высш. шк., 1972.
15. *Kowalczyk M., Piorkowska E.* // *J. Appl. Polym. Sci.* 2012. V. 124. P. 4579; <https://doi.org/10.1002/app.35489>
16. *Lim L.-T., Auras R., Rubino M.* // *Prog. Polym. Sci.* 2008. V. 33. P. 820; <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.05.004>
17. *El-Hadi, Schnabel R., Straube E., Muller G., Henning S.* // *Polym. Testing*. 2002. V. 21. P. 665.
18. *Zhang J., Tashiro K., Tsuji H., Domb A.J.* // *Macromol. Symp.* 2006. V. 242. P. 274; <https://doi.org/10.1002/masy.200651038>
19. *Кулезнев В.Н.* Смеси полимеров. М.: Химия, 1980.
20. *Журков С.Н., Закревский В.А., Томашевский Э.Е.* // *ФТТ*. 1964. Т. 6. С. 1912.
21. *Бартнев Г.М.* Прочность и механизм разрушения полимеров. Л.: Химия, 1984.
22. *Peterlin A.* // *Zeitschrift für Physik*. 1938. V. 111. № 3–4. S. 232.
23. *Баранов А.О., Ерина Н.А., Мединцева Т.И., Купцов С.А., Прут Э.В.* // *Высокомолекуляр. соединения. А*. 2001. Т. 43. № 11. С. 2001.
24. *Xu C., Yuan D., Fu L., Che Y.* // *Polym. Test*. 2014. V. 37. P. 94; <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2014.05.005>
25. *Pongtanayut K., Thongpin C., Santawitee O.* // *Energy Proced.* 2013. V. 34. P. 888; <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2013.06.826>
26. *Кулезнев В.Н., Шершнев В.А.* Химия и физика полимеров. 3-е изд. СПб.: Лань, 2014.