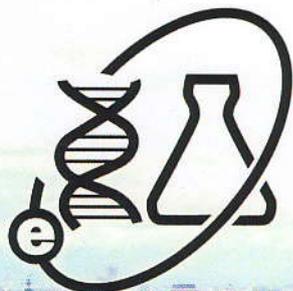


БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА

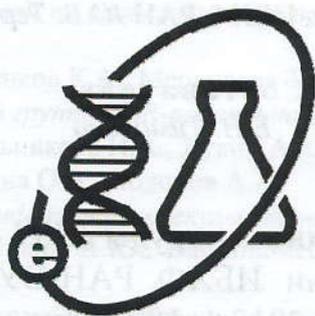


**ТРУДЫ
XVI ЕЖЕГОДНОЙ МЕЖДУНАРОДНОЙ
МОЛОДЕЖНОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
ИБХФ РАН-ВУЗЫ**

Москва 24–26 октября 2016 г.

Москва
2017

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ ХИМИИ И НАУК О МАТЕРИАЛАХ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук (ИБХФ РАН)



БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА

Труды
XVI Ежегодной международной
молодежной конференции
ИБХФ РАН-ВУЗЫ

Москва
24–26 октября 2016 г.

Москва
2017

УДК 577.1:53(063)

ББК 28.072+22.3

Б63

Редакция ИБХФ РАН:

д.х.н., проф., зам. директора ИБХФ РАН, председатель *А.А. Попов*;
к.х.н., начальник отдела по подготовке научных кадров ИБХФ РАН *Л.В. Недоспасова*;
к.ф.-м.н., с.н.с. ИБХФ РАН *Е.Н. Тимохина*;
к.х.н., с.н.с. ИБХФ РАН *Ю.В. Тertyшная*

Составитель –

Е.Н. Тимохина

Б63 Биохимическая физика : труды XVI Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. Москва, 24–26 октября 2016 г. – Москва : РУДН, 2017. – 183 с. : ил.

Всего в XVI Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика» (Москва, 24–26 октября 2016 г.) участвовало 182 человека из 11 ВУЗов (МГУ, МФТИ, МГУ(МИТХТ), РЭУ, РХТУ, МПГУ, МЭИ, СамГУ (Самара), СамГТУ (Самара), ВГАУ (Волгоград), СХИ (Кострома), 4 Учреждений РАН (ИБХФ, ИХФ, ИНЭОС, ИНЭПХФ) и 7 других организаций (ГБОУ СОШ № 1400, г. Москва; ГБОУ Гимназия № 1583, г. Москва; ГБОУ Лицей № 17, г. Химки; Technische Universitat, Munich, Germany; RWTH Aachen University, Germany; Slovak University of Technology, Bratislava, Slovakia; Poznan University of Technology, Poland. Было сделано 5 пленарных докладов, 31 устное и 18 стендовых сообщений.

УДК 577.1:53(063)

ББК 28.072+22.3

ISBN 978-5-209-07915-6

© Коллектив авторов, 2017

© Российский университет дружбы народов, 2017

Оглавление

	Стр
ОГЛАВЛЕНИЕ	3
<i>Биодеградация пористых материалов на основе полиэтилена и природных наполнителей</i>	7
Григорьева Е.А., Попов А.А., Ольхов А.А., Колесникова Н.Н.	
<i>Биосовместимые многолучевые амфифильные блок-сополимеры на основе сверхразветвленного полиэфира 2, 2-бис(метилол)пропионовой кислоты, лактида и этиленоксида</i>	9
Пучков А. А., Гомзяк В. И., Чвалун С. Н.	
<i>Влияние кремнийорганических добавок на свойства резин на основе сополимеров этилена с винилацетатом</i>	10
Сяйлева М.В., Буканов А.М., Звезденков К.А., Меркулова Т.А., Волошин В.Н.	
<i>Влияние модификации хромофорной группы ESR-родопсина на его свойства</i>	11
Беликов Н.Е., Петровская Л.Е., Мельникова И.А., Лукин А.Ю., Варфоломеев С.Д., Шумский А.Н., Левин П.П., Чупин В.В., Демина О.В., Ходонов А.А.	
<i>Эффективные методы прямой модификации молекулы спиропирана</i>	12
Беликов Н.Е., Мельникова И.А., Лукин А.Ю., Варфоломеев С.Д., Шумский А.Н., Левин П.П., Демина О.В., Ходонов А.А.	
<i>Зависимость дифференциальной термоЭДС углеродных наночастиц от величины внешнего электрического поля</i>	14
Судоргин С.А., Лебедев Н.Г.	
<i>Сравнительное исследование закономерности АТМ-зависимого фосфорилирования гистона H2AX в мезенхимальных стволовых клетках человека после воздействия ионизирующего излучения в малых и умеренно-низких дозах.</i>	17
Грехова А.К., Пустовалова М.В., Осипов А.Н.	
<i>Фотосинтетическая активность тенелюбивых светолюбивых и тенелюбивых видов традесканции</i>	18
Беньков М.А.	
<i>Сравнительная оценка антиоксидантной активности и химического состава различных сортов малины урожая 2016 года</i>	20
Алексашина С.А., Макарова Н.В., Деменина Л.Г.	
<i>Пути использования вторичного полиэтилентерефталата</i>	24
Абдуллаев Р.А., Овчинникова Г.П., Устинова Т.П.	
<i>Сравнительный анализ эффективности антиоксидантов, используемых в пищевой промышленности</i>	26
Юрина О.В., Елисеева Л.Г.	
<i>The study of patterns of controlled release of insecticide microcapsules.</i>	30
Vazhenova A.A., Litvishko V.S.	
<i>Environmental safety of pesticidal microencapsulated polymeric forms</i>	31
Khristinina E.V., Litvishko V.S.	
<i>Исследование свойств и активности в сверхмалых дозах пептидно-белкового комплекса, выделенного из ткани склеры глаза быка</i>	33
Сидорский Е. В., Краснов М. С., Ильина А. П., Ямскова В. П., Ямсков И. А.	
<i>Исследование способов сбора нефтепродуктов и свойств сорбентов</i>	37
Ушкова Н.А.	
<i>Изменение содержания антиоксидантов фенольной группы после измельчения клубники</i>	42
Быкова Т.О., Макарова Н.В.	
<i>Мембранотропные пептиды, выделенные из гепатопанкреаса краба: физико-химические свойства и гепатопротекторная активность</i>	44
Богданов В. В., Мальцев Д. И., Куликова О. Г., Ильина А.П., Ямскова В.П., Ямсков И.А.	
<i>Моделирование спектров поглощения агрегатов бактериохлорофиллов с помощью современных методов квантовой химии.</i>	48
Поляков И.В., Хренова М.Г., Немухин А.В.	
<i>Исследование состава, строения и физико-химических свойств супрамолекулярных структур, выделенных из грибов</i>	50
Новиков В.И., Мальцев Д.И., Ильина А.П., Ямскова В.П., Ямсков И.А.	

<i>Возможности сепарирования методом диэлектрофореза в свободном потоке клеток <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>	55
Божкова О. А., Леонович В.А. Сорокина О.Н., Климов М.А., Пронкин П.Г., Коварский А.Л., Подойницын С.Н.	
<i>Изоморфизм карбоксилэстеразы-1 человека</i>	60
Кулакова А.М., Коц Е.Д.	
<i>Изучение ранозаживляющих свойств мембранотропного гомеостатического тканеспецифического биорегулятора сыворотки крови крупного рогатого скота и его отдельных компонентов на модели лоскутной раны кожи мыши <i>in vivo</i></i>	61
Гимадиева Д.В., Рыбакова Е.Ю., Мальцев Д.И., Ильина А.П., Ямскова В.П., Ямсков И.А.	
<i>Melting and crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyrate) in PHB-based fiber material</i>	66
Jużków J., Solovova Yu.V., Shibryaeva L.S., Olkhov A.A., Popov A.A.	
<i>Исследование прочностных характеристик съедобной упаковки на основе яблочного пюре с добавкой пластификатора карбоксиметицеллюлозы</i>	68
Демидова А.В., Макарова Н.В., Быков Д.Е., Бахарев В.В., Еремеева Н.Б., Быкова Т.О., Гибштейн А.А., Кирюшина В.А.	
<i>Протеиновые напитки в питании студентов-спортсменов</i>	71
Акимова Н.А., Страхова В.В., Бутко А.А., Владимирова С.Ф.	
<i>Качественный анализ белковой добавки сушеной на наличие незаменимых аминокислот, углеводов и витаминов группы В</i>	72
Владимирова С.Ф., Страхова В.В., Бутко А.А.	
<i>Популяционно-геронтологический подход к решению вопроса о характере взаимоотношений между старением и болезнями, зависящими от возраста.</i>	77
Коновалова Т.А., Мамаев В.Б.	
<i>Структурные факторы, определяющие защитные способности комплексных частиц на основе казеината натрия по отношению к окислению инкапсулированных в них ПНЖК</i>	82
Смотрова Н.В., Чеботарёв С.А., Воробьёва Н.С., Theissen Saskia, Babejová Patrícia, Kittl Thomas, Антипова А.С.	
<i>Исследование адсорбции и радикального сшивания белков на наночастицах</i>	87
Лопухова М.В., Бычкова А.В., Милютин А.Н., Данилова Т.А., Акинфиев В.С., Чикунова А.П., Пронкин П.Г., Розенфельд М.А.	
<i>Роль аминокислотных остатков активного центра ферментативного комплекса <i>Ras-GAP</i> в электростатической стабилизации переходного состояния реакции и количественные оценки этой стабилизации</i>	92
Лычко Л.А., Анучин Н.М.	
<i>Лиганд-зависимые элементы булевой логики на основе наночастиц и ДНК-интерфейсов</i>	94
Васильева А.В., Черкасов В.Р., Никитин М.П.	
<i>Исследование влияния активаторов теломеразы на пролиферативный потенциал нормальных диплоидных клеток человека</i>	95
Насонов М.М., Мамаев В.Б.	
<i>Изучение кинетических характеристик термического разложения керогена баженовской свиты</i>	99
Митюрёв Н.А., Спасенных М.Ю., Козлова Е.В., Николаев Е.Н.	
<i>Хиральная лестница во внутримолекулярных структурах белков</i>	102
Мальшко Е.В., Твердислов В.А.	
<i>Исследование свободнорадикального окисления фибриногена методом масс-спектрометрии</i>	105
Юрина Л.В., Васильева А.Д., Бычкова А.В., Бугрова А.Е., Индейкина М.И., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А.	
<i>Взаимодействие природных тиолов с активными формами кислорода</i>	108
Зинатуллина К. М., Касаикина О. Т., Каспаров В.В., Коварский А.Л., Кузьмин В.А., Храмеева Н.П.	
<i>Исследование пространственной модификации альбумина под действием системы Фентона</i>	113
Акинфиев В.С., Горобец М.Г., Бычкова А.В., Мисин В.М.	
<i>Новые <i>Vi</i>-содержащие слоистые соединения со структурой, производной от фаз Ауривиллиуса: направленный синтез и кристаллохимический анализ</i>	116
Акинфиев В.С. , Чаркин Д.О.	

<i>Поиск наиболее вероятного пути и оценка скорости выхода фосфата из активного центра ферментативного комплекса Ras-GAP</i>	116
Анучин Н.М., Лычко Л.А.	
<i>Влияние термо- и фотоокисления на структуру и свойства композиций на основе полилактида и вторичного полиэтилена</i>	118
Подзорова М.В., Тертышная Ю.В., Монахова Т.В., Попов А.А.	
<i>Нановолокнистые материалы на основе полигидроксibuтирата и железо(III)-порфиринов медицинского назначения</i>	122
Тюбаева П.М., Ольхов А.А., Староверова О.В., Лобанов А.В.	
<i>Исследование качества сокосодержащих продуктов</i>	123
Нагиева С., Табуридзе Д., Трофимова Т.В.	
<i>Локализация нарушений упорядоченности структуры транс-1,4- звеньев бутадиена в междефектных областях матрицы бутадиен-нитрильных эластомеров</i>	126
Михайлов И.А., Сухарева К.В., Ливанова Н.М., Карпова С.Г., Андриасян Ю.О., Попов А.А., Турлачева Т.С.	
<i>Влияние громоздких звеньев и паракристаллических структур в этиленпропилендиеновых эластомерах на совмещение с бутадиен-нитрильными каучуками</i>	129
Сухарева К.В., Михайлов И.А., Ливанова Н.М., Андриасян Ю.О., Попов А.А., Русакова Н.В.	
<i>Система Фентона и озон для генерации свободных радикалов в растворах белков</i>	134
Горобец М.Г., Бычкова А.В., Акинфиев В.С., Сульtimoва Н.Б., Константинова М.Л., Розенфельд М.А.	
<i>Исследование фибринстабилизирующего плазменного фактора свертывания крови методом масс-спектрометрии</i>	139
Васильева А.Д., Бычкова А.В., Бугрова А.Е., Индейкина М.И., Юрина Л.В., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Розенфельд М.А.	
<i>Моделирование влияния растворителя на каталитические способности матричной металлопротеиназы ММР-2</i>	144
Капуста Д. П., Хренова М. Г., Фирсов Д. А.	
<i>Функциональные напитки для питания студентов</i>	147
Сывороткина И., Грибова Н.А., Беркетова Л.В., Акимова Н.А.	
<i>Разработка термостойких композиционных материалов с заданными электрофизическими свойствами</i>	148
Мальцев А.А., Бибииков С.Б., Щеголихин А.Н., Калинин В.Н.	
<i>Получение и анализ биоконъюгатов на основе модифицированных частиц нанокремния.</i>	153
А.А.Ищенко, Е.В.Смирнова, Шаронова Н.В.	
<i>Разработка метода масс-спектрометрического экспресс-анализа тканей</i>	156
Бормотов Д.С., Жванский Е.С., Кононихин А.С., Попов И.А., Николаев Е.Н.	
<i>Особенности обмена дейтерия в организме млекопитающих</i>	157
Косенков А.В., Гуляев М.В., Лобышев В.И.	
<i>Крупнозернистая модель молекулы ДНК</i>	159
Королева(Кикоть) И.П., Ковалева Н.А., Зубова Е.А., Мазо М.А.	
<i>Различия в строении ацетилхолинэстераз различных видов и влияние его на кинетику взаимодействия с ингибиторами</i>	161
Новичкова Д.А., Лущекина С.В.	
<i>Модифицирующее действие ограниченного протеолиза папаином на структуру и свойства легуминов</i>	162
Поляков А.В.	
<i>Изменение биологической активности иммобилизованных БАВ на хитозансодержащих матрицах в процессе получения и хранения</i>	166
Досадина Э.Э., Бикинеева М.А., Евдокименко А. Ю., Савельева Е.Е., Медушева Е.О., Павлова Л.А., Пятигорская Н.В., Белов А.А.	
<i>Скрининговые методы исследования в радиационной безопасности мегаполиса</i>	170
Зайцев В.В., Ручьева О.А.	
<i>Зависимость деформационно-прочностных свойств смесей полиэтилена низкой плотности с натуральным каучуком от их состава.</i>	172

Варьян И.А., Колесникова Н.Н., Масталыгина Е.Е., Азизова С.А., Попов А.А., Mariano Pracella	
<i>Water absorption capacity of biocomposites based on ethylene-octene copolymer (EOC) and wood flour in dependence to filler content</i>	175
Zykova A.K., Pantyukhov P.V., Kolesnikova N.N, Popov A.A, Ramos C.C.	
ЛАУРЕАТЫ	177
ФОТОРЕПОРТАЖ	178

Биодеградация пористых материалов на основе полиэтилена и природных наполнителей



Григорьева Е.А.¹, Попов А.А.^{1,2}, Ольхов А.А.^{1,2}, Колесникова Н.Н.¹

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

² Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования «Российский экономический
университет им. Г. В. Плеханова», г. Москва

В последние годы увеличилось производство и повысился спрос на полимерные упаковочные материалы. Такие материалы изготавливаются из термопластичных синтетических полимеров. Наиболее распространенными полимерами для изготовления упаковочных и сельскохозяйственных пленок, пакетов, сумок и т. п. являются полиолефины. Они имеют высокие показатели химических, физико-механических, эстетических свойств, длительный срок эксплуатации. Период разложения отслуживших полиолефиновых материалов в природных условиях составляет десятки лет. Их захоронение в почве наносит вред окружающей среде длительным пребыванием в виде прочных монолитных включений, а также продуктами распада.

Целью исследования является разработка полимерного биокомпозита для изготовления упаковочных материалов и изделий, способных разлагаться в условиях окружающей среды после окончания срока их эксплуатации.

Объектами исследования являются полимерные композиционные материалы, в состав исходных веществ которых входят следующие компоненты: синтетический полимер - полиэтилен низкой плотности, газообразующий агент – гидроцерол, мелкодисперсные добавки природного происхождения: древесная мука, кукурузный крахмал.

Изготовление композиций осуществляли на обогреваемых смесительных вальцах при температуре 120 °С и фрикции 1,4. Образцы для исследований получали методом прямого горячего прессования с одновременным вспениванием на лабораторном прессе с термостатируемыми плитами при температуре 160 °С и давлении 1 МПа.

Для исследований водопоглощения и биодеградации были разработаны рецептуры на основе полиэтилена низкой плотности, которые представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Рецептуры объектов исследования

Компоненты	Рецептура												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Полиэтилен, %	99	97	95	90	85	80	80	80	80	70	70	70	70
Гидроцерол, %	1	3	5	10	15	5	5	5	5	15	15	15	15
Древесная мука фракции 0-80мкм, %						15				15			
Древесная мука фракции 0-140мкм, %							15				15		
Древесная мука фракции 0-200мкм, %								15				15	
Крахмал									15				15

Поскольку газонаполненные композиционные материалы предлагается использовать для изготовления конструктивных элементов одноразовой упаковки, для изучения

влияния природной влаги образцы в виде пластинок в твёрдом состоянии были подвергнуты воздействию воды в соответствии с ГОСТ 12020-72 «Пластмассы. Методы определения стойкости к действию химических сред».

Результат определения водопоглощения в течение одиннадцати суток для образцов нескольких газонаполненных композиционных материалов и монолитного полиэтилена (для сравнения) показан на рисунке 1.

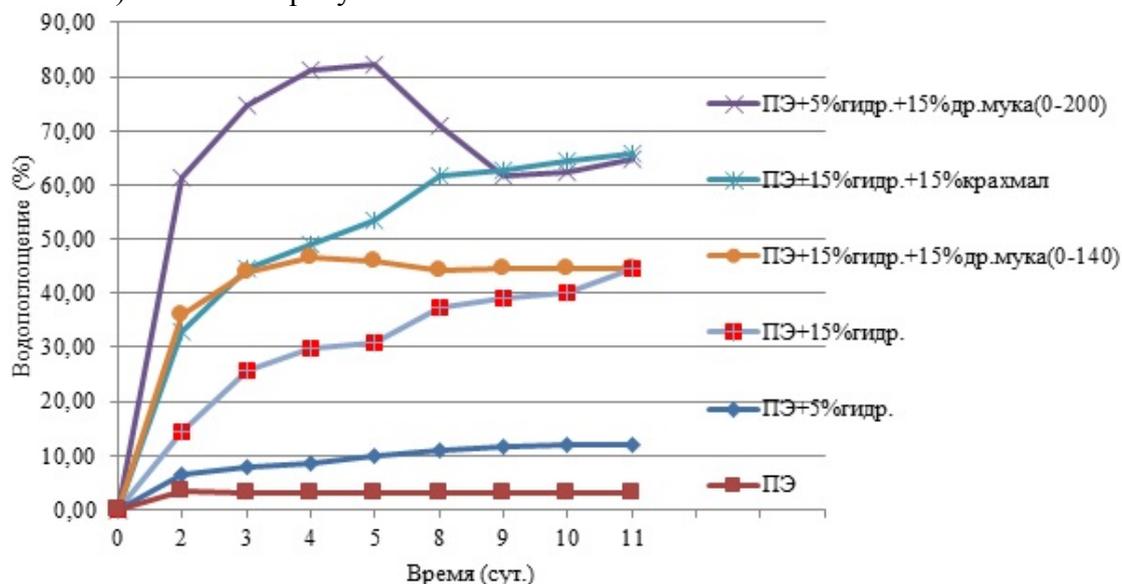


Рисунок 1 – Водопоглощение образцов полиэтилена и газонаполненных композиционных материалов

Для всех полученных композиций получены характерные зависимости изменения массы образцов от времени выдерживания их в водной среде. На начальной стадии процесса происходит максимальное увеличение массы. Затем внутри материала достигается равновесная концентрация влаги, прекращаются процессы диффузии и сорбции, масса перестаёт меняться. Одновременно может происходить небольшое снижение массы образцов, связанное с вымыванием наполнителя и низкомолекулярных фракций из полимерной матрицы композита.

В условиях окружающей среды процесс набухания может занимать несколько лет. Учитывая пористую структуру образцов, можно сказать, что основными факторами, влияющими на скорость влагопоглощения, являются:

- химическая природа полимера и газа, то есть проницаемость стенок ячеек данного полимера для данного вида жидкости;
- размер ячеек и пор; большое количество мелких ячеек оказывает более сильное сопротивление проникновению влаги, чем малое количество больших ячеек;
- степень замкнутости ячеек и наличие уплотнённой поверхностной корки;
- конфигурация изделия из пенопласта: газообмену с окружающей средой подвергаются сначала поверхностные слои, и только потом – более глубокие слои; поэтому, чем больше толщина образца изделия, тем медленнее скорость влагопоглощения;
- условия хранения: температура и влажность окружающей среды.

Деструкцию газонаполненных полимерных материалов в окружающей среде исследовали путём погружения стандартизованных образцов (прессованных пластинок) в почву, приготовленную по ГОСТ 9.060-75 «Ткани. Метод лабораторных испытаний на устойчивость к микробиологическому разрушению».

Ход разрушения полимеров контролировали по уменьшению массы образцов. Образцы газонаполненных композиционных материалов находились в почве более трёх лет. На рисунке 2 показана величина отклонения их массы от первоначальной (100%) через тридцать шесть месяцев после начала эксперимента.

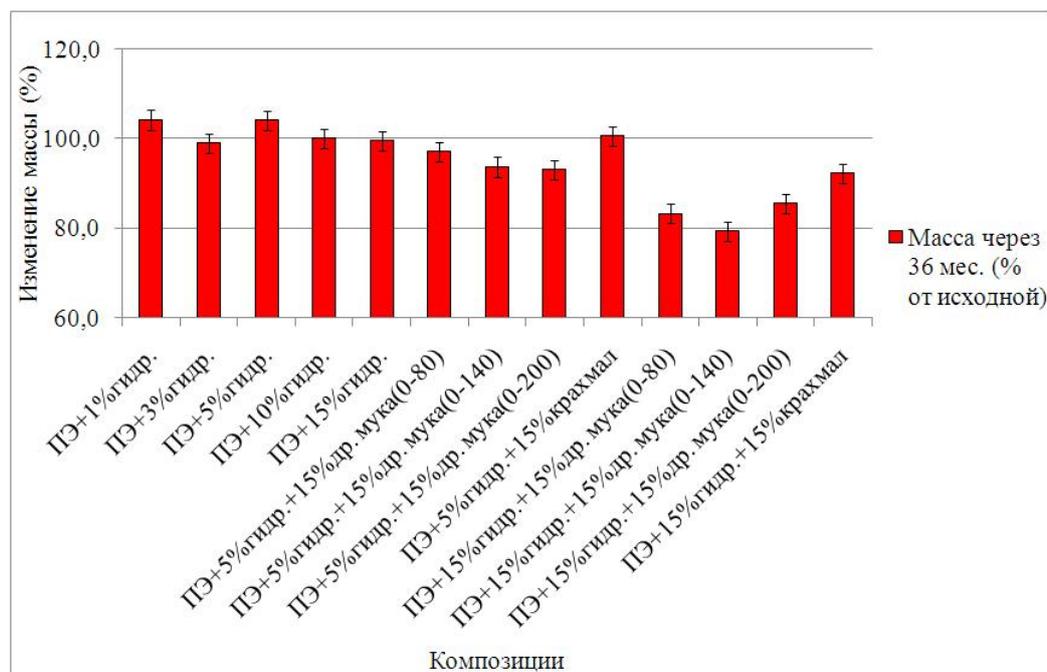


Рисунок 2 – Изменение массы образцов газонаполненных композиционных материалов при нахождении в почве

Из рисунка видно, что образец, содержащий 15% гидроцера и 15% древесной муки фракцией до 140 мкм, потерял почти 18% от исходной массы.

Неоднородная структура материалов является хорошей предпосылкой для разложения в условиях окружающей среды. Из полученных результатов видно, какой вклад в величину водопоглощения и деструкции в почве делает структура с включениями пор и природных добавок. Водопоглощение материалов связано с набуханием материалов за счёт наличия пор в структуре, а также содержания в системе гидрофильного наполнителя у композитов с природными добавками. При нахождении образцов в почве наблюдаются потеря массы за счёт фрагментации образца и перехода природного наполнителя в безвредный для окружающей среды остаток. Образец в почве может разрушаться под воздействием микроорганизмов. При этом разрушаться быстрее остальных будут материалы, наполненные биодоступными наполнителями: древесной мукой и крахмалом.

Биосовместимые многолучевые амфифильные блок-сополимеры на основе сверхразветвленного полиэфира 2, 2-бис(метилол)пропионовой кислоты, лактида и этиленоксида



Пучков А. А.¹, Гомзяк В. И.^{1,2}, Чвалун С. Н.^{1,2}

¹Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий), Москва, Россия

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

e-mail: puchkov1208@gmail.com

Синтез многолучевых звездообразных полимеров, в частности биоразлагаемых для медицинского применения, а также изучение их свойств, являются актуальными и важными задачами современной полимерной химии. За последние десятилетия синтезированы макромолекулы различной сложной архитектуры: звездообразные, сверхразветвленные, дендримеры и др. Особый интерес представляют гибридные

линейно-дендритные блок-сополимеры, макромолекулы которых состоят из линейного и сверхразветвленного фрагментов. Главной особенностью строения таких полимеров, определяющей их поведение в растворе, является наличие компонентов, различающихся как по химической природе, так и по архитектуре (линейные и разветвленные блоки).

В данной работе были синтезированы тройные блок-сополимеры на основе сверхразветвленного полиэфира 2, 2-бис(метил)пропионовой кислоты, L-лактида и этиленоксида. Строение полученных сополимеров было подтверждено методами ЯМР-спектроскопии, гель-проникающей хроматографии, ИК-спектроскопии. Проведено сравнительное исследование поверхностных свойств ряда синтезированных блок-сополимеров. Определены критические концентрации агрегации, размеры и ζ -потенциалы полученных наночастиц. Установлено, что синтезированные многолучевые блок-сополимеры образуют в воде устойчивые мономолекулярные и супрамолекулярные мицеллы, что позволяет солюбилизировать в них различные гидрофобные соединения (лекарственные препараты и проч.).

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (проект № 15-33-20986)

Влияние кремнийорганических добавок на свойства резин на основе сополимеров этилена с винилацетатом



Сяйлева М.В.*, Буканов А.М.*, Звезденков К.А.*, Меркулова Т.А.***, Волошин В.Н.*****

**ФГБОУ ВО «Московский технологический университет» (МИТХТ), г. Москва, Россия;*

***«Всероссийский научно-исследовательский, проектно-конструкторский и технологический институт кабельной промышленности» (ОАО ВНИИКП), г. Москва, Россия;*

e-mail: msyayleva@mail.ru

Сополимеры этилена с винилацетатом – этиленвинилацетатные каучуки (ЭВА) относятся к группе каучуков специального назначения, на основе которых изготавливают материалы, обладающие высокой тепло-, масло-, атмосферо- и озоностойкостью, а также хорошими электроизоляционными и высокими физико-механическими характеристиками, в том числе повышенным сопротивлением раздиру.

Ценный комплекс свойств ЭВА в сочетании со способностью к высокому наполнению позволяет разработать на его основе резины, необходимые для создания изделий с требуемым комплексом свойств.

Известно, что кремнийорганические добавки (КОД), как бифункциональные соединения, способны реагировать как с минеральными наполнителями, так и с органическими полимерами, с образованием прочных химических связей между наполнителем и матрицей каучука, улучшая механические и сохраняя электрические свойства резин при воздействии влаги и пара.

Исследования влияния КОД проводили на модельных резинах на основе ЭВА с содержанием 40% винилацетата, вулканизованных пероксидом с соагентом вулканизации - триаллилциануратом. В качестве наполнителей была использована комбинация микроталька и тригидрата оксида алюминия в соотношении 50:50 мас.ч. на 100 мас.ч. каучука.

Изучалось влияние различных типов кремнийорганических добавок класса органосиликоновых силанов: винилтриэтоксисилан (А-151), винилтриметоксисилан (А-171), винилтрис(2-метоксиэтокси)силан (А-172), 3-метакрилоксипропилтриметоксисилан (А-174). Исследовано влияние КОД в дозировках от 0 до 2,0 мас.ч. на комплекс свойств резин на основе ЭВА.

Установлено, что применение всех КОД оказывает положительное влияние на упруго-прочностные и на электроизоляционные характеристики резин. А наиболее существенное повышение свойств наблюдается при использовании кремнийорганической добавки А-174 в количестве 1,5 мас.ч., что позволяет сохранить высокий уровень диэлектрических характеристик резин и увеличить прочностные показатели на 20 %.

Влияние модификации хромофорной группы ESR-родопсина на его свойства



Беликов Н.Е.¹, Петровская Л.Е.², Мельникова И.А.³, Лукин А.Ю.³, Варфоломеев С.Д.¹, Шумский А.Н.¹, Левин П.П.¹, Чупин В.В.², Демина О.В.¹, Ходонов А.А.¹

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

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Москва, Россия

³Московский технологический университет, Москва, Россия

С середины прошлого века во всем мире развернуты исследования функциональной роли производных ретиноидов в процессах преобразования энергии светового кванта в различных биологических системах. Уникальной особенностью этих соединений является способность полиеновой цепи молекулы ретиноида подвергаться под действием определенных факторов и стимулов направленной изомеризации из одного изомера в другой с резким изменением результата конечного физиологического ответа. В процессе эволюции это свойство молекулы ретиноидов было заложено природой в основу ряда путей трансформации энергии светового кванта в химическую или в определенный физиологический ответ в биологических системах, как у высших животных, так и в микроорганизмах.

Ретиналь-содержащие белки играют ключевую роль в ряде важнейших биологических и физиологических процессов - зрении, росте и дифференцировке тканей, размножении у высших животных и светозависимом транспорте протонов и ионов хлора, фототаксисе у некоторых видов микроорганизмов. Объектами настоящего исследования служили 1) бактериородопсин (BR) - достаточно хорошо-изученный светозависимый протонный насос из экстремального галофильного микроорганизма *Halobacterium salinarum*, для которого в течение последних 30 лет был разработан и апробирован целый арсенал новых современных методов исследования для определения взаимосвязи структура-функция и 2) ESR-родопсин (ESR) - новый представитель ретиналь-содержащих белков – уникальный протеородопсин из микроорганизма *Exiguobacterium sibiricum*, выделенного из образцов почвы вечной мерзлоты тундры возрастом 3 млн лет. Предварительные модели показывают, что механизмы фотоцикла и протонного транспорта ретиналь-содержащих белков: ESR-родопсина из *Exiguobacterium sibiricum* и бактериородопсина из *H. salinarum*, во многом различны, это обстоятельство делает интересным и актуальным выяснение причин этого явления путем сравнительного изучения влияния типа модификации их хромофорных групп на спектральные параметры этих белков и на их функционирование и структуру. Для исследования влияния природы хромофорной группы ESR-родопсина на его функционирование и структуру нами был разработан и осуществлен метод синтеза 4-оксоретиналя аналога природного хромофора, содержащего кетогруппу по С-4-атому молекулы ретиналя и было проведено сравнительное изучение процесса его взаимодействия с апобелками: ESR-опсином из *Exiguobacterium sibiricum* и бактериородопсином из *H. salinarum*, а также определены фотохимические характеристики полученных искусственных пигментов.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ (проект № 16-04-01254а).

Литература

[1]. Barachevsky V.A., Khodonov A.A., Belikov N.E., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Demina O.V., Luyksaar S.I., Krayushkin M.M. // *Dyes and Pigments*. – 2012. – V. 92, №2. – P. 831-837.

Эффективные методы прямой модификации молекулы спиропирана



Беликов Н.Е.¹, Мельникова И.А.², Лукин А.Ю.², Варфоломеев С.Д.¹, Шумский А.Н.¹, Левин П.П.¹, Демина О.В.¹, Ходонов А.А.¹

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

²*Московский технологический университет, Москва*

Перспективный способ разработки новых гибридных фотоактивных и фотоуправляемых систем и материалов заключается в ковалентном связывании фотохромных меток с помощью ковалентной «иммобилизации» на различных субстратах, например, полимерах, липидах, белках и квантовых точках. Для реализации этой процедуры будет необходима разработка нового поколения фотохромных меток, содержащих заместители с соответствующими типами функциональных групп. Одним из наиболее изученных классов фотохромных соединений являются индолиновые спиробензопираны. Структура потенциальных целевых соединений определяет природу реакционноспособной якорной группы. Спектральные свойства и параметры фотопревращений спиробензопиранов сильно зависят от природы имеющихся в молекуле заместителей, таким образом, направленное изменение их природы позволяет проводить поиск новых фотохромов с заданными свойствами и различными стимул-реагирующими структурными элементами. Ранее нами были изучены процесс формилирования спиробензопиранов в условиях реакции Даффа и влияние различных заместителей в пирановом цикле на ее региоселективность. Было обнаружено, что формилирование по Даффу фотохромных спиропиранов, обладающих электрон-акцепторными заместителями в пирановой части молекулы (R: 6-NO₂; 8-NO₂; 6-CHO; 6-CO₂Et; 6-CO₂H) проходит в основном по C5'-положению индольного фрагмента. Таким образом, нами был разработан новый метод синтеза ключевого карбонильного предшественника – 6-нитро-5'-формилспиропирана прямым формилированием 6-нитроспиропирана, в одну стадию с выходом 86% в условиях реакции Даффа [1]. Потенциал синтетического применения этих предшественников для направленной модификации молекулы фотохрома по 5'-положению был существенно расширен применением широко известных процедур синтеза (олефинирования по Виттигу и Хорнеру-Эммонсу; нуклеофильного присоединения по карбонильной группе реагентами, обладающими активной метильной или метиленовой группами; восстановительного аминирования; реакции [3+2]циклоприсоединения и других) [2-6]. В результате данного исследования был разработан ряд методов синтеза четырех серий новых 5'-замещенных спиробензопиранов, содержащих выбранные целевые реакционноспособные якорные группы с помощью прямой одностадийной процедуры введения заместителей различной природы [2-6].

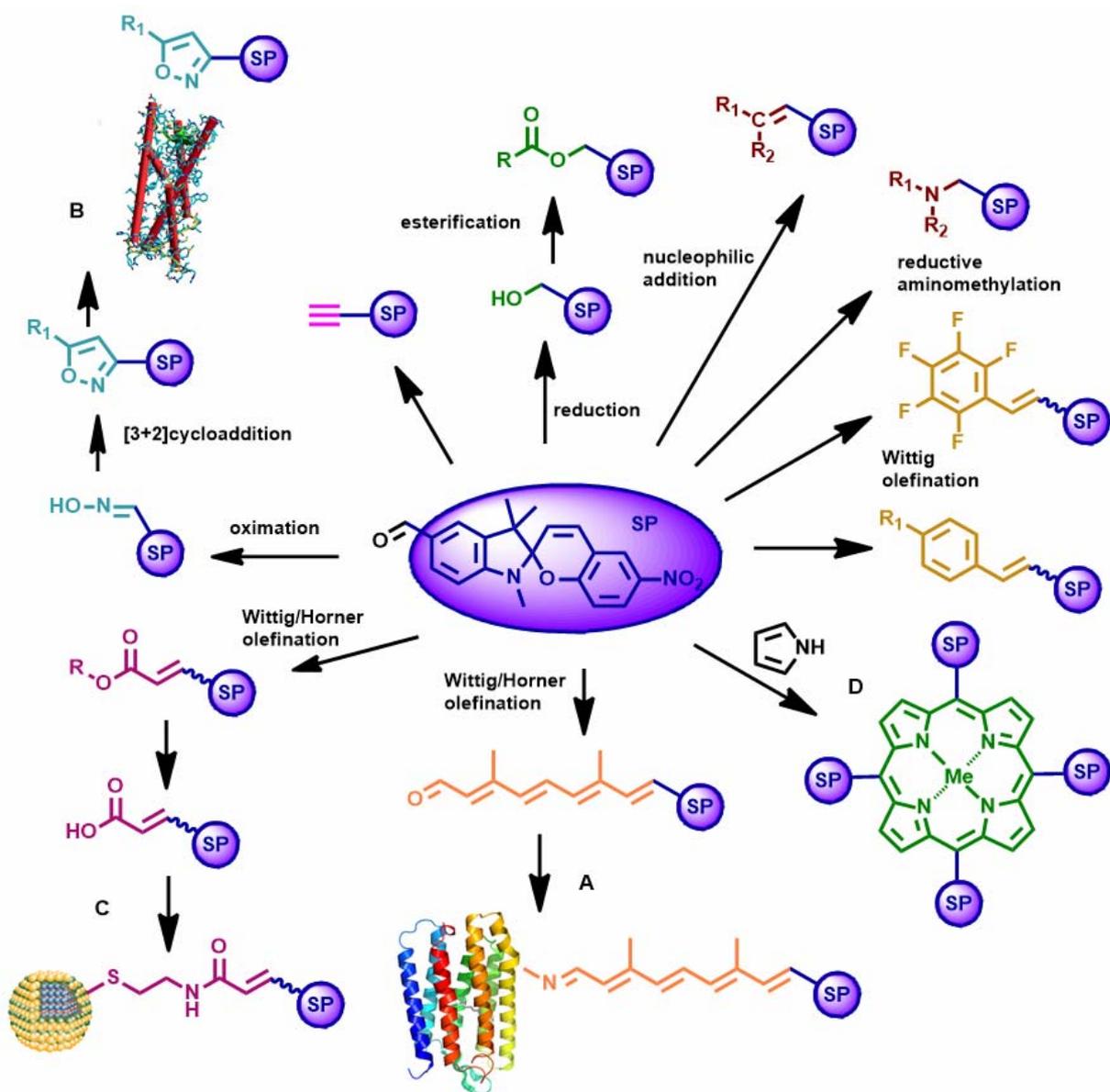


Рис. Основные направления дизайна молекул фотохромных зондов и меток

Работа была частично поддержана грантом РФФИ (проект № 16-03-0571а).

Литература

1. Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Shvets V.I., Demina O.V., Barachevsky V.A., Khodonov A.A. Patent RF 2358977.
2. Laptev A.V., Belikov N.E., Lukin A.Yu., Barachevsky V.A., Alfimov M.V., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Shvets V.I., Khodonov A.A. *High Energy Chemistry* 2008, 42(suppl.), 601-603.
3. Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Zemtsov R.V., Barachevsky V.A., Demina O.V., Varfolomeev S.D., Shvets V.I., Khodonov A.A. *High Energy Chemistry* 2010, 44, 211-215.
4. Zvezdin K.V., Belikov N.E., Laptev A.V., Lukin A.Yu., Demina O.V., Levin P.P., Brichkin S.B., Spirin M.G., Razumov V.F., Shvets V.I., Khodonov A.A. *Nanotechnologies in Russia* 2012, 7, 308–317.
5. Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Zvezdin K.V., Demina O.V., Barachevsky V.A., Varfolomeev S.D., Khodonov A.A. Shvets V.I. *Rus. Chem. Bull.*, 2014, (9), 2026-2035.
6. Laptev A.V., Lukin A.Yu., Belikov N.E., Barachevskii V.A., Demina O.V., Khodonov A.A., Varfolomeev S.D., Shvets V.I. *Mendeleev Commun.*, 2013, 23(3), 145-146.

Зависимость дифференциальной термоЭДС углеродных наночастиц от величины внешнего электрического поля



Судоргин Сергей Александрович, Лебедев Николай
Геннадьевич

*Волгоградский государственный аграрный университет,
Волгоград*

Новые материалы, такие, как углеродные нанотрубки (УНТ) и графен [1, 2], в настоящее время вызывают значительный интерес исследователей в связи с возможностью получения структур с заданными механическими, прочностными и электротранспортными характеристиками. Широкий спектр уникальных физико-химических свойств углеродных наночастиц, предполагает возможность практического применения их в различных областях современной электроники, материаловедения, химии и медицины [3]. Воздействие на теплопередачу и минимизация тепловых потерь являются в настоящее время одними из ключевых факторов при создании и модернизации компонентов нанoeлектронных устройств. Согласно экспериментальным данным [4], изменение температуры контактов вследствие термоэлектрического эффекта в нанoeлектронных устройствах может достигать 30 % от ее величины.

Одним из важнейших параметров, характеризующих термоэлектрические свойства вещества является дифференциальная термоЭДС, представляющая собой физическую величину, характеризующую скорость изменения разности потенциалов (ЭДС) индуцированной градиентом температуры при изменении температуры. Исследованию термоЭДС в низкоразмерных структурах посвящено значительное количество публикаций [4 – 9].

В работе рассмотрено влияние внешнего постоянного электрического поля на коэффициент дифференциальной термоЭДС углеродных наночастиц различных типов. Величина термоЭДС связана с электропроводностью материала широко известной формулой Мотта [10]:

$$S_x(\mu, T) = -\frac{\pi^2}{3e} k_B T \frac{d}{d\mu} [\ln \sigma_x(\mu, T = 0)] \quad (1)$$

где T – абсолютная температура, μ – химический потенциал носителей заряда, e – заряд электрона, k_B – постоянная Больцмана, $\sigma_x(\mu, T)$ – электропроводность материала.

Формула (1) является основополагающей при анализе экспериментальных данных, полученных при изучении термоэлектрических явлений. При этом следует учитывать, что применение данной формулы не всегда оказывается корректным, т.к. обнаружен ряд ситуаций, в которых поведение термоЭДС отличается от предсказываемого формулой Мотта [4 – 9].

В металлах энергия электронов практически не зависит от температуры, вследствие чего металлы обладают значительно меньшей величиной термоЭДС, чем полупроводники, электроны в которых диффундируют от более нагретого конца к менее нагретому. Интерес к исследованию термоэлектрических свойств низкоразмерных углеродных наночастиц обусловлен тем, что при помощи сильного постоянного электрического поля возможно управлять этими свойствами и добиваться их существенного изменения, как и в случае других транспортных коэффициентов: удельной электропроводности и коэффициента диффузии электронов [11 – 13]. Предложенный метод позволяет рассчитывать дифференциальную термоЭДС не только при слабых полях, когда параметр $eEd\tau / \hbar T \leq 1$, где d - расстояние между соседними атомами углерода в графене, τ -

время релаксации, T – температура, выраженная в энергетических единицах, но и при сильных полях, существенно больших, чем те, которые определены данным условием.

При постоянной концентрации электронов проводимости $n = \text{const}$ в линейном приближении по величине градиента температуры $\nabla_x T$ получено выражение для дифференциальной термоЭДС углеродных наночастиц во внешнем электрическом поле:

$$S(E) = \sum_s \int_{-\pi}^{\pi} \frac{\partial f}{\partial T} \sum_m A_{ms} m \sum_{m'} A_{m's} m' \left\{ \frac{E^2(m^2 + m'^2) + 1}{K(E, m, m')} * \right. \\ * [EmR(E, m, m', p_x) + M(E, m, m', p_x)] + \\ \left. + \frac{E^3(m'^3 - 2m^2 m') + Em'}{K(E, m, m')} T(E, m, m', p_x) \right\} dp_x + \quad (2)$$

$$+ \frac{1}{\sum_s \int_{-\pi}^{\pi} f dp_x} \sum_{s'} \int_{-\pi}^{\pi} f \sum_{s''} \int_{-\pi}^{\pi} \frac{\partial f}{\partial T} \sum_m A_{ms} m \sum_{m'} A_{m's} m' \frac{1}{P(E, m, m')} F(E, m, m', p_x, p_x'') dp_x' dp_x''$$

здесь введены следующие обозначения:

$$K(E, m, m') = [E^4(m^4 + m'^4 - 2m^2 m'^2) + 2E^2(m^2 + m'^2) + 1][E^2 m^2 + 1],$$

$$P(E, m, m') = [E^2 m^2 + 1]^2 [E^2 m'^2 + 1],$$

$$R(m, m', p_x) = \cos(mp_x) \sin(m'p_x) + \cos(m'p_x) \cos(mp_x) - \sin(mp_x) \sin(m'p_x),$$

$$M(m, m', p_x) = \sin(mp_x) \sin(m'p_x) + \sin(mp_x) \cos(m'p_x) + \cos(mp_x) \sin(m'p_x)$$

$$T(E, m, m', p_x) = [\cos(mp_x) \cos(m'p_x) - Em \sin(mp_x) \cos(m'p_x)]$$

$$F(E, m, m', p_x) = [\sin(m'p_x) + Em \cos(m'p_x)] *$$

$$* [\sin(mp_x) + 2Em \cos(mp_x) - E^2 m^2 \sin(mp_x)]$$

где A_{ms} и $A_{m's}$ - коэффициенты разложения энергии электронов в ряд Фурье, f – функция распределения Ферми-Дирака, T – абсолютная температура.

Проведено численное моделирование зависимости дифференциальной термоЭДС однослойных углеродных нанотрубок типа «зигзаг» от напряженности внешнего постоянного электрического поля. Электронное строение рассматриваемых УНТ описывается дисперсионным соотношением [14].

$$\varepsilon_k = \pm t_0 \left(1 + 4 \cos(ap_x) \cos(\pi s / n) + 4 \cos^2(\pi s / n) \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (3)$$

где t_0 – интеграл перескока электронов между соседними узлами кристаллической решетки, $a = 3b / 2\hbar$, $b = 0.142$ нм – расстояние между соседними атомами углерода, $p = (p_x, s)$ – квазиимпульс электронов углеродной нанотрубки, p_x - параллельная оси нанотрубки компонента квазиимпульса, $s = 1, 2, \dots, n$ – нумерует квантование компоненты импульса по окружности УНТ.

Установлено, что дифференциальная термоЭДС углеродных нанотрубок типа «зигзаг» нелинейно зависит от напряженности внешнего постоянного электрического поля. При увеличении амплитуды электрического поля дифференциальная термоЭДС сначала возрастает по абсолютной величине, а затем снижается и стремится к постоянному значению. Подобная зависимость термоЭДС от амплитуды поля наблюдается для всех рассмотренных типов УНТ: (5,0), (10,0) и (20,0). Для УНТ (10,0) типа максимальное по абсолютной величине значение дифференциальной термоЭДС

зафиксировано при напряженности поля порядка $3,29 \cdot 10^5$ В/м и составляет 78 мкВ/К при температуре $T = 300$ К. Знак термоЭДС определяется типом носителей заряда. Так как носителями заряда в рамках рассматриваемой модели являются электроны проводимости, то дифференциальная термоЭДС имеет отрицательный знак. При амплитуде внешнего электрического поля $E > 5 \cdot 10^6$ В/м величину термоЭДС рассмотренных типов однослойных УНТ можно считать практически постоянной величиной. Минимум дифференциальной термоЭДС в УНТ обуславливается периодическим и ограниченным законом дисперсии.

Изучено влияние температуры внешней среды на дифференциальную термоЭДС однослойных углеродных нанотрубок. Численный анализ температурных зависимостей термоЭДС полупроводниковых УНТ проведен для трубок типа (10,0). Получены зависимости дифференциальной термоЭДС от величины напряженности E внешнего постоянного электрического поля при различных температурах. При низких температурах термоЭДС значительно больше по абсолютной величине. При увеличении температуры от 50 К до 300 К абсолютные значения термоЭДС уменьшаются более чем в 40 раз, с 3,6 мВ/К до 78 мкВ/К для УНТ (10,0) типа, что происходит за счет собственной динамики носителей заряда, т.е. разницы тепловых энергий электронов на различных концах УНТ. Это явление вызывает дополнительный дрейф носителей тока от нагретого конца трубки к более холодному. Накопление носителей заряда на холодном конце и дефицит их на нагретом конце трубки вызывает появление термоЭДС.

Электронные свойства двухслойных графеновых нанолент описываются законом дисперсии, полученным в приближении сильной связи [15]. В качестве объекта исследования выбрана двухслойная графеновая лента типа (10,0). Изучение свойств лент (10,0) типа представляет большой практический интерес, т.к. именно такие ленты наиболее часто получают в экспериментах.

Зависимости дифференциальной термоЭДС от напряженности внешнего постоянного электрического поля для различных значений электростатического потенциала между слоями ленты исследовались на примере лент (10,0) типа. Численные расчеты показали, что сначала при увеличении постоянного напряжения между слоями ленты от 0 В до 2,2 В происходит снижение дифференциальной термоЭДС, а затем происходит ее рост при дальнейшем увеличении потенциала между слоями ленты. Данное явление обусловлено перестройкой электронного спектра двухслойных лент в присутствии внешнего постоянного электрического поля. Так же, как и для однослойных УНТ обнаружено, что дифференциальная термоЭДС двухслойных графеновых лент нелинейно зависит от напряженности внешнего электрического поля.

Проведены исследования температурных зависимостей дифференциальной термоЭДС двухслойных графеновых лент от амплитуды внешнего постоянного электрического поля. При низких температурах термоЭДС значительно больше по абсолютной величине. При увеличении температуры от 50 К до 300 К абсолютные значения термоЭДС уменьшаются более чем в 20 раз, как и для случая однослойных УНТ. Наиболее сильно уменьшение дифференциальной термоЭДС с увеличением температуры происходит именно при низких температурах.

Широкие двухслойные графеновые ленты обладают большими по абсолютной величине значениями термоЭДС при фиксированном электростатическом потенциале между слоями ленты, что вызвано меньшим числом носителей заряда в более узких лентах.

Литература:

1. Дьячков, П. Н. Электронные свойства и применение нанотрубок [Текст] / П. Н. Дьячков. – М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2010 г. – 488 с.
2. Novoselov K.S. Electric field effect in atomically thin carbon films / K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, I.V. Grigorieva, A.A. Firsov // Science. – 2004. – V. 306. – P.666 – 669.

3. Гочжун, Ц. Наноструктуры и наноматериалы, синтез, свойства и применение [Текст] / Ц. Гочжун, И. Ван, – Москва: Научный мир, 2012. – 520 с.
4. Grosse, K. L. Nanoscale Joule heating, Peltier cooling and current crowding at graphene–metal contacts [Текст] / K. L. Grosse, M.-H. Bae, F. Lian, E. Pop, W. P. King // Nature Nanotechnol. – 2011. – V. 6 – P. 287 – 290.
5. Wei, P. Anomalous thermoelectric transport of dirac particles in graphene [Текст] / P. Wei, W. Bao, Y. Pu, C. N. Lau, J. Shi // Phys. Rev. Lett. – 2009. – V. 102. – P. 166808.
6. Hwang, E.H. Theory of thermopower in two-dimensional graphene [Текст] / Hwang E.H., Rossi E., Sarma S. // Phys. Rev. B. – 2009. – V. 80. – P. 235415.
7. Мавринский, А.В. Термоэлектродвижущая сила углеродных нанотрубок [Текст] / А.В. Мавринский, Е.М. Байтингер // Физика и техника полупроводников. – 2009 г. – Т. 43. – № 4. – С. 501 – 506.
8. Алисултанов, З.З. Аномальный рост термоЭДС в однослойном графене, сформированном на перестраиваемом бислое графена [Текст] / З.З. Алисултанов // Письма в ЖЭТФ. – 2013 г. – Т. 98. – № 2. – С. 121 – 124.
9. Balandin, A. A. Thermal properties of graphene and nanostructured carbon materials [Текст] / Balandin A. A. // Nat. Mat. – 2011. – V. 10. – № 8. – P. 569 – 581.
10. Mott, N. F. The theory of the properties of metals and alloys 1st ed. [Текст] / Mott N. F., Jones H. – Oxford: Clarendon Press, 1936. – 326 p.
11. Белоненко, М. Б. Коэффициенты диффузии и проводимости полупроводниковых углеродных нанотрубок во внешнем электрическом поле [Текст] / М. Б. Белоненко, Н. Г. Лебедев, С. А. Судоргин // Физика твердого тела. – 2011 г. – Т. 53. – Вып. 9. С. 1841 – 1844.
12. Белоненко, М. Б. Электропроводность и коэффициент диффузии электронов в бислое графена [Текст] / М. Б. Белоненко, Н. Г. Лебедев, С. А. Судоргин // Журнал технической физики. – 2012 г. – Т. 82. – Вып. 7. – С. 129 – 133.
13. Sudorgin, S. A. Effect of electric field on the transport and diffusion properties of bilayer graphene ribbons [Текст] / Sudorgin S. A., Lebedev N. G., Belonenko M. B. // Physica Scripta. – 2013. – №. 87. – P. 015602.
14. Харрис, П. Углеродные нанотрубы и родственные структуры. Но-вые материалы XXI века [Текст] / П. Харрис. – М.: Техносфера, 2003 г. – 336 с.
15. Guinea, F. Electronic states and Landau levels in graphene stacks [Текст] / Guinea F., Castro Neto A. H., Peres N. M. R. // Phys. Rev. B – 2006. – V. 73. – P. 245426.

Сравнительное исследование закономерности АТМ-зависимого фосфорилирования гистона H2AX в мезенхимальных стволовых клетках человека после воздействия ионизирующего излучения в малых и умеренно-низких дозах.



Грехова^{1,2,3} А.К., Пустовалова^{2,3} М.В., Осипов^{2,3} А.Н.

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

*Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва,
Россия.*

*Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И.
Бурназяна ФМБА России, Москва*

Изучение закономерностей биологических эффектов малых доз ионизирующих излучений (ИИ) становится все более актуальным и представляет большой интерес для медицины, поскольку ИИ широко применяется в диагностических целях. Однако, ИИ вызывает множество разнообразных повреждений ДНК, среди которых наиболее

критическими для дальнейшей судьбы клетки являются двунитевые разрывы (ДР). Известно, что биологическим маркером ДР ДНК являются фокусы фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX), а основной киназой, фосфорилирующей H2AX вокруг ДР, индуцированных ионизирующим излучением, является киназа *ataxia telangiectasia mutated* (ATM). В связи с чем, целью данной работы являлось сравнительное исследование закономерности ATM-зависимого фосфорилирования гистона H2AX в культивируемых мультипотентных мезенхимных стромальных клетках (ММСК) человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения в малых (20, 40 и 80 мГр) и умеренно-низких (160 и 250 мГр) дозах.

В работе был проведен детальный анализ изменений количества фокусов γ H2AX, фокусов фосфорилированного (активного) ATM (pATM) и их солокализации в зависимости от дозы и времени после облучения. Показано, что в течение 60 мин после облучения во всем изученном диапазоне доз в клетках отмечается линейно-зависимое от дозы увеличение количества фокусов γ H2AX. Усредненный количественный выход фокусов на единицу дозы, рассчитанный в точке максимума (60 мин), равен $\sim 37 \pm 3$ фокуса/клетка/Гр. В течение следующих 2-4 ч после облучения отмечаются различия в характере изменений количества фокусов γ H2AX после облучения в умеренно-низких и малых дозах. В отличие от существенного (на 40-60%) снижения количества фокусов γ H2AX, наблюдаемого через 4 ч после облучения в умеренно-низких дозах, после облучения в малых дозах значимого снижения фокусов γ H2AX не наблюдалось. При этом кинетики изменений количества фокусов активной киназы ATM, фосфорилирующей H2AX, были сходны во всем изученном дозовом диапазоне. Максимум активности ATM наблюдался через 30-60 мин ($\sim 32 \pm 3$ фокуса pATM/клетка/Гр), после чего отмечалось снижение как фокусов pATM, так и солокализованных фокусов pATM практически до контрольных значений. Полученные данные свидетельствуют о том, что механизмы поддержания количества фокусов γ H2AX через 2-4 часа после облучения в малых дозах являются ATM независимыми.

Фотосинтетическая активность тенелюбивых светолюбивых и тенелюбивых видов традесканции

Беньков М.А.

Аспирант

*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова
Физический факультет
m.benkov93@gmail.com*

Флуоресцентный анализ хлорофиллов широко применим в экофизиологических исследованиях, т.к. с его помощью можно понять ответную реакцию растений на внешний раздражитель. Поэтому проблема изучения фотозащитных механизмов весьма актуальна. В данной работе проводится сравнительный флуоресцентный анализ фотосинтетической активности листьев светолюбивых и тенелюбивых растений. Измерения флуоресценции хлорофилла дают информацию об эффективности процессов превращения энергии в фотореакционных центрах фотосистемы II (ФСII) и диссипации излишней энергии, полученной с помощью фотособирающей антенны (нефотохимическое тушение – NPQ). Изучение активности ФСII проводится методом РАМ флуометрии.

В представленном исследовании проводились изучения двух видов растений: *T.fluminensis* (тенелюбивое растение) и *T.sillamontana* (светолюбивое растение), выращенных на ярком свете ($HL = 875-1000 \text{ мкЭ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$) и в затемнённых условиях ($LL = 50-125 \text{ мкЭ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$). Интенсивность флуоресценции хлорофилла была измерена с помощью РАМ-флуорометра FluorPen FP100. Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла характеризуется параметром $q_{NPQ} = (F_m^0 - F_m)/F_m$, где F_m^0 –

это показатель интенсивности флуоресценции, измеренный после насыщающей вспышки света, а F_m – это интенсивность флуоресценции во время освещения актиничным светом.

Показана разная кинетика нефотохимического тушения флуоресценции листьев *T.fluminensis* и *T.sillamontana* при интенсивностях актиничного света: 800, 400, 200 и 100 $\text{мкЭ м}^{-2} \text{с}^{-1}$. Данные различия отражают экофизиологические особенности в адаптации тенелюбивых и светолюбивых растений. Высокая чувствительность *T.fluminensis* при высоких интенсивностях позволяет организовать оптимальное функционирование и смягчить негативный эффект от флуктуаций интенсивности света в естественных условиях. В то же время, пустынное растение *T. Sillamontana* выдерживает сильные изменения интенсивности естественного света.

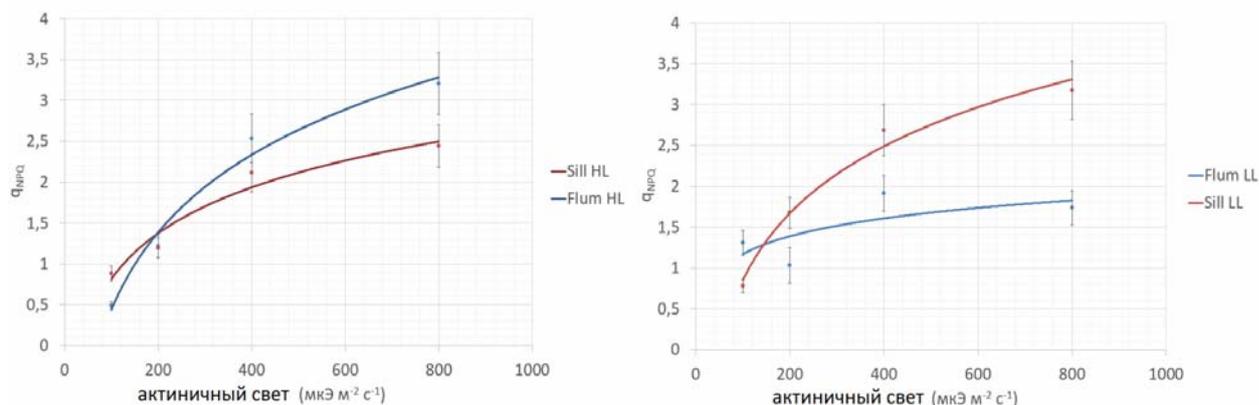


Рисунок 1 Зависимость $qNPQ$ от интенсивности актиничного света (летний сезон 05.06.15-30.06.15) данные выбраны при времени равном 15 минутам. Вертикальные линии обозначают погрешности. Каждые измерения проводились на 4 разных листьях, расположенных на центральной части ветки

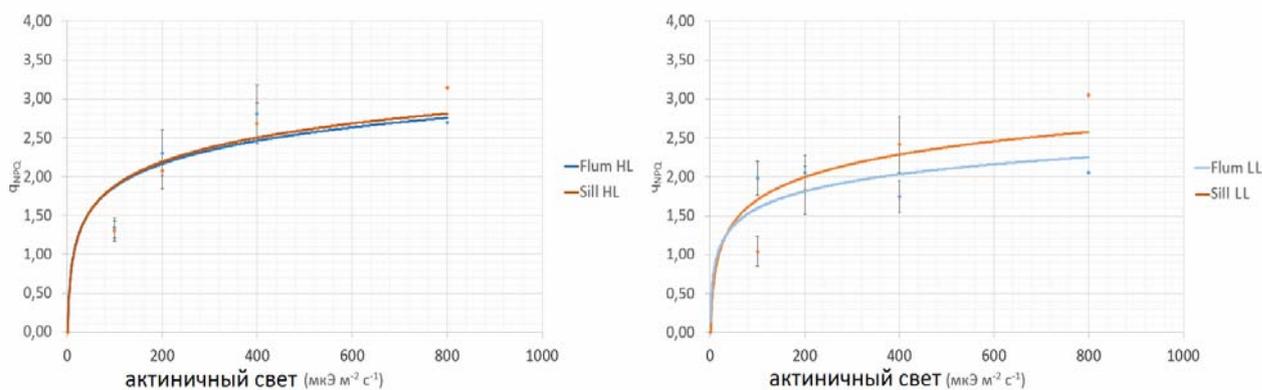


Рисунок 2 Зависимость $qNPQ$ от интенсивности актиничного света (осенний сезон 20.09.15-15.10.15) данные выбраны при времени равном 12 минутам. Вертикальные линии обозначают погрешности. Каждые измерения проводились на 4 разных листьях, расположенных на центральной части ветки

Литература

- 1) Samoilova, O.P., Ptushenko, V.V., Kuvykin, I.V., Kiselev, S.A., Ptushenko, O.S., Tikhonov, A.N., 2011. Effects of light environment on the induction of chlorophyll fluorescence in leaves: a comparative study of Tradescantia species of different ecotypes. *BioSystems* 105, 41–48
- 2) Schreiber, U., 2004. Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), *Chlorophyll a Fluorescence. A Signature of Photosynthesis*. Springer, Dordrecht, pp. 279–319.
- 3) Roberto B., Egbert J., Jan P., Stefan J., Dario L., Structure, function and regulation of plant photosystem// *Biochim Biophys Acta*. 2007 May;1767(5):335-52.

Сравнительная оценка антиоксидантной активности и химического состава различных сортов малины урожая 2016 года



Алексахина С.А.¹, Макарова Н.В.¹, Деменина Л.Г.²

¹ФГБОУ ВО Самарский государственный технический университет

Россия, 443100, г. Самара, ул. Молодогвардейская, 244,
2345@mail.ru

²Государственное бюджетное учреждение Самарской области научно-исследовательский институт садоводства и лекарственных растений «Жигулевские сады» (ГБУ СО НИИ «Жигулевские сады»), 443072, г. Самара, 18 км., поселок опытной станции по садоводству; тел.: 8(846)998-32-80; e-mail: golden-apple08@mail.ru

УДК 664.85

Все большую актуальность приобретают проблемы преждевременного старения организма человека, развитие многих хронических заболеваний, а так же снижение иммунитета. В связи с этим сокращается качество и продолжительность жизни населения. Большинство ученых сходятся во мнении, что причиной таких губительных изменений является избыток в организме человека свободных радикалов – молекул, имеющих не спаренный электрон на внешней орбитале [1-2].

Одним из действенных способов замедления окислительных процессов является обеспечение организма человека антиоксидантами. Эти соединения различной химической природы, способные приостанавливать губительное действие свободных радикалов [1].

Богатейшим источником природных антиоксидантов являются фрукты и ягоды. Наш организм не способен либо синтезирует в недостаточном количестве многие антиокислители (антиоксиданты) – например, витамин С, соединения фенольной природы. В связи с этим, с учетом ухудшающейся экологической обстановкой, рацион питания человека обязательно должен содержать биологически активные вещества антиоксидантной природы. Такие меры позволяют повышать устойчивость нашего организма к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Малина – одна из наиболее популярных ягод Самарского региона. Она цениться не только за свои вкусовые и ароматические свойства, но и за накопление целого ряда биологически активных веществ.

Целью данной работы является определение содержания в образцах малины значения антиоксидантной активности, фенольных веществ, флавоноидов, антоцианов, витамина С, общей титруемой кислотности, сахаров и сухих растворимых веществ. Так же установление влияния такого фактора, как «сорт» на антиоксидантную активность и химический состав анализируемого сырья.

В качестве объектов исследования выбраны сортовые образцы малины из коллекции НИИ «Жигулевские сады»: «Бальзам», «Вольница», «Любетовская».

Определение содержания фенольных веществ – один из основных анализов, при изучении антиоксидантной активности. Была выбрана методика определения фенольных веществ с реактивом Folin-Ciocalteu [3]. Из анализируемого сырья были получены водно-этанольные экстракты в соотношении 1:10. Экстракт смешивают с реактивом Folin-Ciocalteu, насыщенным раствором карбоната натрия в соотношении 1:1:2, после чего в конечной смеси измеряли коэффициент поглощения на фотоэлектроколориметре при 725

нм. Суммарное содержание фенолов выражено как эквивалент мг галловой кислоты/100 г исходного сырья.

Общее содержание флавоноидов было определено спектрофотометрическим методом, основанным на формировании флавоноид-алюминиевого комплекса при длине волны 510 нм. Суммарное содержание флавоноидов выражено как эквивалент мг катехина/100 г исходного вещества по калибровочной кривой [4].

Антоцианы – вещества, обуславливающие темную окраску плодов и ягод. Содержание антоцианов определялось в водно-этанольных экстрактах спектрофотометрически в смеси экстракт-буфер в соотношении 1:3 с рН 1,0 и 4,5 при длине волны 515 и 700 нм. Результаты исследований представлены, как пересчет на содержание цианидин-3-гликозида.

Результаты определения содержания фенольных веществ, флавоноидов и антоцианов представлены в табл.1.

Таблица 1 Общее содержание фенолов, флавоноидов и антоцианов в малине различных сортов

Сорт	Общее содержание фенольных соединений, мг галловой кислоты/100 г сырья	Общее содержание флавоноидов, мг катехина/100 г сырья	Общее содержание антоцианов, мг цианидин-3-гликозида/100 г сырья
Малина «Бальзам»	371	112	110,14
Малина Вольница»	445	67	88,92
Малина «Любетовская»	461	98	95,27

По содержанию фенольных веществ среди анализируемых образцов первенствует сорт «Любетовская» - 461 мг галловой кислоты/100 г сырья. Следует отметить сорт «Бальзам», чей показатель содержания фенолов (371) значительно меньше прочих представленных образцов.

Проявляющие Р-витаминную активность биологически активные флавоноиды в сортах малины содержатся не одинаково – от 67 до 112 100 мг катехина/100 г сырья.

Максимальное содержание антоцианов, отвечающих за красно-фиолетовую окраску плодов растений, наблюдаются в образце сорта «Бальзам» (110,14 мг цианидин-3-гликозида/100 г сырья), что несколько выше других представленных сортов.

Изучение DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) теста проводилось спектрофотометрическим методом со спиртовым раствором радикала DPPH при длине волны 517 нм. В результате статических испытаний измерения были проведены через 30 мин и построены кривые зависимости % ингибирования радикалов DPPH от концентрации исходного антиоксиданта.

Метод по восстановлению антиоксидантами железа: (ferric reducing antioxidant power - FRAP) [5] – позволяет осуществить прямое определение низкомолекулярных антиоксидантов. При низких рН восстановление Fe(III)-трипиридил-5-триазинового комплекса в Fe(II)-комплекс сопровождается появлением интенсивной голубой окраски. Измерения основаны на способности антиоксидантов подавлять окислительный эффект реакционных частиц, генерируемых в реакционной смеси. Этот метод отличается простотой, быстротой и небольшими затратами при исполнении.

Способ определения антиоксидантной активности в системе линолевой кислоты основан на фотоколориметрии железотиацианатных комплексов [6]. По этому способу образец смешивают с 1 мл этанола (в соотношении 1:1 с дистиллированной водой), 1 мл раствора линолевой кислоты и 1 мл фосфатного буфер. Смесь инкубируют при 40 °С и через 120 ч определяют концентрации гидропероксидов по железотиацианатному методу.

Для этого к смеси добавляют 15% раствор этанола, 30% NH_4CNS . Через 3 мин добавляют FeCl_3 , и измеряют оптическую плотность при 500 нм.

Результаты определения антиоксидантных свойств представлены в табл. 2.

Таблица 2 Данные определения антиоксидантных свойств в малине различных сортов

Сорт	Восстанавливающая сила по методу FRAP, ммоль Fe^{2+} /1 кг сырья	Антиоксидантная активность по методу DPPH, мг/мл	Антиоксидантная активность в системе линолевой кислоты, % ингибирования
Малина «Бальзам»	18,18	24	51,5
Малина Вольница»	17,46	17	30,6
Малина «Любетовская»	17,10	13	53,1

По трем представленным методам высокие показатели демонстрирует малина сорта «Бальзам», при этом сортность так же влияет на полученные результаты.

Витамин С реализует свой антиоксидантный эффект в плазме, межклеточной жидкости и на внеклеточном уровне. Некоторые исследователи относят его к представителям первичной линии обороны от оксидативного стресса, обладающего высокой окислительной активностью. Витамин С в исследуемом сырье определяли титриметрическим методом по ГОСТ 24556-89 «Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения витамина С». Экстрагирование осуществляли 2%-м раствором соляной кислоты. Массовую долю аскорбиновой кислоты в процентах рассчитывали по формуле приведенную в ГОСТ 24556-89. Общее содержание кислот в анализируемом сырье проводилось визуальным методом по ГОСТ ISO 750-2013 «Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения титруемой кислотности», основанным на титровании исследуемого раствора до значения pH 8,1 раствором 0,1 М гидроксида натрия. Результаты исследований представлены в табл. 3.

Таблица 3 Содержание витамина С и органических кислот в малине различных сортов

Сорт	Содержание витамина С, %	Кислотность, в пересчете на лимонную кислоту, %
Малина «Бальзам»	0,09	4,29
Малина Вольница»	0,1	0,64
Малина «Любетовская»	0,14	2,12

Содержание витамина С еще один важный показатель характеризующий антиоксидантные свойства ягод. Из изученных образцов малины наибольший процент аскорбиновой кислоты был зафиксирован у сорта «Любетовская» - 0,14%. В зависимости от сорта процент витамина С колеблется не значительно.

В ягодах малины содержатся различные органические кислоты, среди которых преобладает лимонная. Максимальный процент кислотности принадлежит сорту малины «Любетовская», противоположный наименьший результат показал образец сорта «Вольница».

Содержание редуцирующих сахаров в овощном сырье определяли по ГОСТ ГОСТ 8756.13-87 «Продукты переработки плодов и овощей. Методы определения сахаров» фотоколориметрическим методом. Растворимые сухие вещества определяли по ГОСТ ISO

2173-2013, рефрактометрическим методом. Результаты определения содержания сахаров и растворимых сухих веществ сведены в табл. 4.

Таблица 4 Содержание сахаров и сухих растворимых веществ в малине различных сортов

Сорт	Содержание редуцирующих сахаров, %	Массовая доля растворимых сухих веществ, %
Малина «Бальзам»	9,66	12
Малина «Вольница»	9,66	10
Малина «Любетовская»	9,73	12

Сахар обуславливает приятный сладкий вкус плодов и ягод. Все представленные образцы показали почти одинаковые результаты содержания редуцирующих сахаров, среди которых лидером является сорт «Любетовская» - 9,73 %.

Массовая доля растворимых сухих веществ в анализируемых образцах колеблется от 10% (сорт «Вольница») до 12% (сортов «Бальзам» и «Любетовская»).

Таким образом, прослеживается разнородность показателей антиоксидантных свойств и химического состава различных сортов представленных образцов малины. Известно, что содержание химических веществ в сортовых ягодах и плодах изменяется в зависимости от сорта, климата, состава почвы и условий выращивания [7].

Из анализируемых образцов высокие результаты по содержанию фенольных веществ, флавоноидов и антоцианов показал сорт «Бальзам». Высокую антиоксидантную активность, с учетом показателей витамина С имеет малина сорта «Любетовская». Лидером технологических показателей (кислотности, содержания редуцирующих сахаров, содержания сухих растворимых веществ) является образец сорта «Бальзам». Данные сорта малины представляют значительный интерес для использования не только в свежем виде, но в качестве полуфабрикатов в пищевой промышленности.

Список литературы

1. Абрамова, Ж. И. Человек и противокислительные вещества/ Ж.И. Абрамова, Г.И. Оксенгендлер. – Л.: Наука, 1985. – 232 с.
2. Макарова Н.В., Зюзина А.В. Исследование антиоксидантной активности по методу DPPH полуфабрикатов производства соков. Техника и технология пищевых производств. – 2011. – №3. – С 1.
3. Wijngaard, H.H. A survey of Irish fruit and vegetable waste and byproducts as a source of polyphenolic antioxidants / H.H. Wijngaard, C. Rolle, N. Brunton // Food Chemistry. – 2009. – Vol. 116. – № 1. – P. 202–207.
4. Zin, Z.M. Antioxidative activities of chromatographic fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morindacitrifolia* L.) / Z.M. Zin, A.A. Hamid, A. Osman, N. Saari// Food Chemistry. –2006. –Vol. 94. –№ 2. – P.169-178.
5. Benzie, I.F. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay / I.F.Benzie, J.J.Strain // Analytical Biochemistry. – 1996. – V. 239. – P. 70–76.
6. Chung, S.K. Hydroxy radical scavengers from white mustard (*Sinapisalba*) / S. K. Chung, T. Osawa// Food Science and Biotechnology. – 1998. – Vol. 7. – №4. – P. 209–213.
7. Широков, Е. П.Хранение и переработка продукции растениеводства с основами стандартизации и сертификации. Часть 1. Картофель, плоды, овощи / Е. П. Широков, В. И. Полегаев.–М.: Колос, 2000. –3-16 с.

Пути использования вторичного полиэтилентерефталата



Р.А. Абдуллаев, Г.П. Овчинникова, Т.П. Устинова

Энгельсский технологический институт СГТУ
E-mail: abdullaev_70@list.ru

Использование вторичных полимеров, в частности термопластов, является актуальной проблемой современности. Её решение способствует эффективному использованию вторичных термопластов и прогнозированию конкретных областей применения новых модифицированных материалов не только с нужным уровнем свойств, но и более дешевых [1]. Значительный интерес среди всех вторичных термопластичных полимеров занимает вторичный полиэтилентерефталат (ВПЭТФ), объемы и области применения которого весьма разнообразны благодаря широкому спектру свойств и возможности управлять его кристалличностью [2]. Основное его применение связано с изготовлением бутылок для газированных напитков, т.к. ПЭТФ обладает замечательными барьерными свойствами. Проблема, связанная с его переработкой- самопроизвольная кристаллизация, т.е. «старение». Вторичный ПЭТФ может быть переработан всеми известными способами при соответствующих модификациях.

Известные направления рециклинга вторичных термопластов (материальный и сырьевой рециклинг) были использованы в представленной работе для повторной переработки ВПЭТФ. В качестве модифицирующих методов избраны : наполнение, пластификация, удлинение полимерной цепи и химическая деполимеризация.

Введение наполнителей в широком интервале концентраций всегда сопровождается изменением всего комплекса свойств полимерной матрицы [3]. Эти изменения связаны с изменениями в структуре полимера на различных уровнях её организации, происходящих при формировании наполненной системы. В качестве наполнителя во ВПЭТФ вводилась отработанная базальтовая вата (БВ), которая после механической деструкции превратилось в систему: 90% дисперсных частиц размером 45- 60 мкм и 10% армирующих волокон с размером 0,5- 1 мм. Введение 10% БВ привело к улучшению всех физико- механических характеристик в 1,5- 2 раза (табл. 1).

Таблица 1. Физико- механические свойства модифицированного ВПЭТФ.

№ пп	Композиция	δ р, МПа	ε , %	δ изг, МПа	α уд, кДж/м ²	δ сж, МПа
1.	ПЭТФ (первичный)	50- 70	2- 4	70- 90	90	80
2.	ВПЭТФ (флекс)	14	3	-	28	40
3.	ВПЭТФ+ 10% ДБФ	12	2	16	41	30
4.	ВПЭТФ+ 10% ДБФ+ 5% БВ	22	4	22	67	65

Улучшенные свойства ВПЭТФ объясняются структурными изменениями в полимере в присутствии наполнителя, который ускоряет релаксационные процессы, повышает плотность упаковки образующихся структур, снижает уровень остаточных напряжений в полимерной матрице.

В расширении ассортимента термопластов при получении изделий с заданными свойствами распространенной тенденцией становится разработка полимер- полимерных композиций путем сплавления составляющих.

Такое сочетание ВПЭТФ со ВПЭНД (добавка ВПЭНД от 30 до 50%), вызывает облегчение переработки ВПЭТФ и улучшение свойств каждого полимера. При этом α уд увеличивается с 58 до 66 кДж/м², δ сж- с 28 до 35 МПа. В условиях переработки композиции ВПЭТФ не успевает полностью гомогенизироваться в расплаве, и его частицы играют роль наполнителя, при этом увеличивается упаковка макромолекул ВПЭНД, приводящая к повышению физико- механических свойств композиции.

Перевод ВПЭТФ в вязкотекучее состояние для повторной переработки затруднен из- за высокой вязкости и высокого межмолекулярного взаимодействия в полимере.

Для пластификации полимера и снижения его вязкости использовали добавление к полимеру дибутилфталата (ДБФ) и полиэтилсилоксана (ПЭС- 5), что заметно повлияло на свойства пластифицированного ВПЭТФ (табл. 2).

Таблица 2. Свойства пластифицированного ВПЭТФ.

№ пп	Композиция	Тпл, °С	ρ , кг/м ³	ПТР, г/10 мин	δ р, МПа	ε , %	δ изг, МПа
1.	ПЭТФ (первичный)	248	1455	8,3*	50	2-4	70
2.	ВПЭТФ	240	1300	24**	15	3	18
3.	ВПЭТФ+ 10% ДБФ	150	918	23**	12	2	17
4.	ВПЭТФ+ 40% ДБФ	150	918	20**	13	3	15
5.	ВПЭТФ+ 20% ПЭС-5	140	918	28***	18	4	19

Примечание: *- определено при температуре 265°С;

** - определено при температуре 260°С;

***- определено при температуре 250°С;

Положительным фактором пластификации оказалось снижение температуры переработки ВПЭТФ с 248- 250 °С до 140- 150 °С. Это свидетельствует об улучшении перерабатываемости ВПЭТФ в пластифицированном виде. При этом снижается Тпл, повышается вязкость и текучесть расплава. Выбранные пластификаторы проявили свой ярко выраженный пластифицированный эффект за счет их высокой термодинамической совместимости с полимером [4].

В отдельных случаях повторное использование ВПЭТФ требует увеличения его молекулярной массы, что может быть достигнуто путем введения в полимер «удлинителя» цепи. В этом качестве могут быть использованы эпоксидиановые смолы ЭД- 20 и ЭД- 40. Условия взаимодействия (количество ЭД, температура испытания, время прибывания компонентов в расплаве) оказывают влияние на молекулярную массу (М) и полидисперсность (П) композиции (табл. 3).

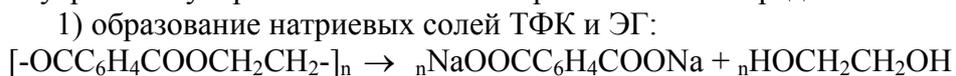
Таблица 3. Молекулярная масса и полидисперсность модифицированного ВПЭТФ.

№ пп	Композиция	М • 10 ³	П
1.	ПЭТФ	32,7	16,8
2.	ВПЭТФ	29,3	15,3
3.	ВПЭТФ+0,5% ЭД- 40	31,2	16,5
4.	ВПЭТФ+0,5% ЭД- 20	33,9	19,0

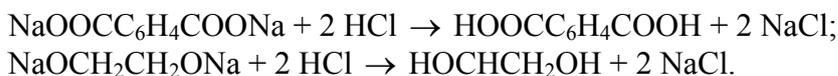
При введении ЭД во ВПЭТФ М композиции возрастает с 29,3 тыс. до 33,9 тыс. ПТР композиции при этом уменьшается с 8,2 до 7,5 г/мин. Исследованиями установлено, что оптимальное количество эпоксида должно быть от 0,5 до 1%, при этом может быть обеспечена как высокая М, так и достаточный ПТР.

В представленной работе проведена попытка получения терефталевой кислоты (ТФК) и этиленгликоля (ЭГ) из ВПЭТФ методом химического рециклинга, что в настоящее время получило интенсивное развитие за рубежом. В качестве компонента для

обеспечения среды использовали NaOH. Модель реакции деполимеризации с разрывом внутримолекулярных связей в полимере может быть представлена следующим образом:



2) химическая реакция восстановления ТФК и ЭГ из натриевых солей с помощью HCl:



В подобранных условиях (продолжительность деполимеризации 90 мин.) обеспечивается кислотное число ТФК- 652. Выход ТФК при этом достигает 93,02%, выход ЭГ- 93,11%.

Таким образом проведенные исследования по модификации полимера позволяют обеспечить повторное использование ВПЭТФ для различных целей:

- получить качественные исходные продукты (ТФК и ЭГ), удовлетворяющие требованиям ТУ на них;
- улучшить переработку ВПЭТФ, снизив Тпл, полимера путем его пластификации;
- при необходимости обеспечить повышенную М ВПЭТФ;
- использовать БВ в качестве армирующего наполнителя ВПЭТФ при изготовлении изделий строительного назначения (тротуарная плитка). Апробация изделий в условиях эксплуатации и сравнение свойств разработанных материалов с аналогами показало их технико- экономические преимущества.

Литература

1. Штарке Л. Использование промышленных и бытовых отходов пластмасс: Пер. с нем./ под ред. В. Брагинского- Л.: Химия. 1987.- 176 с.
2. Вторичная переработка пластмасс / Под ред. Франческо Ла Мантии.- С.Пб.: Профессия, 2007.
3. Овчинникова Г.П., Артеменко С.Е. Рециклинг вторичных полимеров: Учебное пособие.- Саратов, СГТУ, 2000.- 22 с.
4. Абдуллаев Р.А., Овчинникова Г.П., Артеменко С.Е. Пластификация вторичного полиэтилентерефталата для его повторного использования./ Вестник СГТУ.- 2006.- №1.- Вып.2.- С.82-85.

Сравнительный анализ эффективности антиоксидантов, используемых в пищевой промышленности



Юрина О.В., Елисеева Л.Г.

ФГБОУ ВО «Российский экономический университет им. Г.В. Плеханова», г. Москва

Одним из актуальных направлений исследований в области пищевой промышленности является увеличения сроков годности пищевой продукции, богатой жирами. Такие пищевые продукты, как растительные масла, характеризуются стремительным течением окислительных процессов, что приводит к образованию неприятного вкуса и запаха прогорклости, накоплению продуктов окисления, которые обладают мутагенным и канцерогенным действием. Для предупреждения развития

окислительных процессов в пищевой промышленности активно применяются как искусственные, так и натуральные антиоксиданты.

Синтетические антиоксиданты (БОА, БОТ, ТБГХ) наиболее часто используются в пищевой промышленности благодаря их высокой эффективности при малых концентрациях и невысокой цене по сравнению с натуральными антиоксидантами. Тем не менее, имеются некоторые ограничения по использованию искусственных антиоксидантов, и их безопасность является постоянным вопросом. Так, ТБГХ запрещен в Японии и некоторых европейских странах. Также установлено, что БОА и БОТ оказывают токсический эффект. [1] Поэтому особое внимание в настоящее время учеными всего мира уделяется получению и применению безопасных и эффективных натуральных антиоксидантов. Растения богаты такими антиоксидантами, как флавоноиды, танины, кумарины, фенольные вещества, лигнаны и терпеноиды. Эти компоненты являются перспективными источниками использования натуральных антиоксидантов в пищевой промышленности.

Согласно исследованиям [6], наилучшие результаты по замедлению скорости течения окислительных процессов в соевом масле, подвергнутом ускоренному окислению при 70 °С по изменениям в значениях перекисного числа и образованию конъюгированной линоленовой кислоты оказались трет-бутилгидрохинон в максимально допустимой концентрации и смесь токоферолов в концентрации 1600 мг/кг. Использование данных антиоксидантов в комбинации с аскорбилпальмитатом в различных концентрациях показало еще более оптимистичные результаты. Среди токоферолов наибольшую антиоксидантную активность показали по изменению значения перекисного числа δ -токоферолы в концентрации 600 мг/кг, а по изменению содержания конъюгированной линоленовой кислоты – α -токоферолы и γ -токоферолы в концентрации 600 мг/кг. Интересно заметить, что эти же токоферолы в более высоких концентрациях (до 1800 мг/кг) оказывали меньшую антиокислительную способность как по изменению значения перекисного числа, так и по изменению содержания конъюгированной линоленовой кислоты. Причем такие высокие концентрации токоферолов только способствовали активизации окислительных процессов по сравнению с контрольным образцом. Данный факт объясняется более высокой стабильностью γ -токоферолов и быстрым разрушением α -токоферолов в процессе фотоизомеризации. Также α -токоферолы обладают наименьшим окислительно-восстановительным потенциалом по сравнению с другими токоферолами, которые являются более сильными донорами водорода и больше подвержены окислению.

Исследователи [4] изучали возможность применения экстракта розмарина в качестве антиоксиданта. Основными компонентами экстракта, обладающими наибольшей антиокислительной способностью, являются карнозол, карнозная кислота и розмариновая кислота, которые прерывают развитие свободнорадикальной цепной реакции путем отдачи атома водорода. Некоторые авторы показали, что экстракт розмарина совместно с аскорбиновой кислотой обладают синергическим эффектом на ингибирование развития окислительных процессов. По данным исследований, применение смеси розмаринового экстракта и аскорбиновой кислоты (в концентрации 1 г/кг и 500 мг/кг соответственно) позволяет увеличить сроки годности жиросодержащей продукции в 2 раза по результатам оценки значений тиобарбитурового числа жира и органолептических показателей качества в процессе хранения.

Другие исследования показали, что экстракт розмарина является одним из сильнейших природных антиоксидантов. Определение перекисного, тиобарбитурового и *p*-анизидинового чисел подсолнечного масла, подвергнутого ускоренному окислению, показало, что добавление экстракта розмарина в концентрации 200 мг/кг позволяет значительно замедлить течение окислительных процессов по сравнению с добавлением БОА и БОТ. Тем не менее, ТБГХ имеет более сильное антиокислительное действие. Показано, что экстракт розмарина имеет наилучшие антиокислительные свойства среди

следующих природных антиоксидантов: α -токоферола, аскорбилпальмитата и лимонной кислоты.

Авторами [2] были проведены исследования антиоксидантной активности трет-бутилгидрохинона в совокупности с лимонной кислотой и β -каротином при хранении соевого масла. В качестве упаковочного материала для хранения масла использовались бутылки из полиэтилентерефталата с добавлением компонента Tinuvin 234 (2-(2-hydroxy-3,5-di(1,1-dimethylbenzyl)phenyl)benzotriazole), который абсорбирует ультрафиолетовый свет, что способствует торможению окислительных процессов. В процессе исследования антиоксиданты в различных концентрациях и соотношениях (трет-бутилгидрохинон в концентрации от 0 до 200 мг/кг, β -каротин в концентрации от 7,25 до 975 мг/кг и лимонная кислота – от 0 до 60 мг/кг) добавлялись в соевое масло. Tinuvin 234 добавлялся в пластиковые бутылки в концентрации от 0,05 до 0,20 %. В результате оценки органолептических показателей и определения значений перекисного числа ученые установили наибольшую антиоксидантную активность трет-бутилгидрохинона. Причем добавление в пластиковые бутылки поглощающего ультрафиолет компонента не дало такого эффективного антиокислительного эффекта. β -каротин и лимонная кислота показали крайне низкую степень торможения окислительных процессов, но тем не менее был отмечен синергический эффект действия антиоксидантов и установлена наибольшая эффективность при добавлении 120 мг/кг ТБГХ, 7 мг/кг β -каротина, 15 мг/кг лимонной кислоты и добавлении 0,1 % Tinuvin 234 в пластиковые бутылки.

Другими исследователями [3] изучались антиокислительные способности α -токоферола и α -токотриенола. По данным исследований, одна молекула токоферола может защитить от окисления около 10^6 - 10^8 молекул полиненасыщенных жирных кислот. Показано, что антиоксидантная активность токоферолов при низких температурах уменьшается в порядке $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, а при высоких температурах в обратном порядке. В результате исследований было выявлено, что при высоких температурах (180 °С) и α -токоферолы, и α -токотриенолы оказывают антиоксидантное действие. При таких температурах α -токоферолы (в концентрации 500 мг/кг) в меньшей степени подвергаются разрушению, и их полная деградация наступает лишь после 6 часов нагревания, в то время как разрушение α -токотриенолов наступает уже после 2 часов нагревания. Интересно заметить, что при совместном добавлении в масло α -токоферолов и α -токотриенолов их полное разрушение наступает после 3 часов нагревания. Также α -токоферолы в концентрации 150 мг/кг показали наибольшую антиокислительную стабильность по сравнению со смесью α -токоферолов и α -токотриенолов в концентрации 70 мг/кг α -токоферолов и 70 мг/кг α -токотриенолов.

Другими авторами [8] проводились сравнительные испытания антиоксидативного действия галловой кислоты, эллаговой кислоты, кверцетина, β -каротина и ретинола в масле, полученном из фундука. Антиоксиданты вводились в масло в концентрации 0,1 %. Образцы масла хранились при температуре 40 °С в присутствии света и воздуха в течении 120 дней. По результатам определения содержания свободных жирных кислот, перекисного и цветного числа жира удалось установить, что кверцетин оказал наиболее сильный антиоксидантный эффект в процессе хранения. По сравнению с контрольным образцом, все виды антиоксидантов показали более хорошие результаты.

Исследователями [5] был показан антиоксидантный эффект кофейной кислоты и ее эфиров. Кофейная кислота относится к фенольным кислотам, и имеет *o*-дифенольную и гидроксидинамольную структуру. Антиоксидантный механизм действия полифенолов представляется образованием хинона из дигидроксibenзола. Кофейная кислота содержится в большинстве растений в виде эфиров. Например, хлорогеновая кислота и розмариновая кислота являются эфирами кофейной кислоты, обладающими антиоксидативным действием. Исследователями показан антиоксидантный эффект простейшего эфира кофейной кислоты – метилкофеата.

Исследователями [1] изучалось влияние добавления масла розмарина, орегано и лавра в подсолнечное масло, используемое при обжарке ядер арахиса в сравнении с добавлением синтетического БОТ. Антиоксидантные свойства розмарина, орегано и лавра обусловлены содержанием в них фенольных компонентов с высокой активностью по захвату свободных радикалов. В масле данных растений содержатся такие компоненты как тимол (в орегано), эвгенол (в лавре) и камфара (в розмарине). Масла розмарина, орегано и лавра, а также БОТ добавлялись в подсолнечное масло в концентрации 0,01 %. По результатам оценки органолептических показателей, значения перекисного и анизидинового чисел, а также содержания конъюгированных диенов в процессе хранения при комнатной температуре обжаренных ядер арахиса в течении 120 дней удалось установить, что наиболее сильным антиокислительным действием обладает синтетический БОТ, за ним следуют масла розмарина, лавр и орегано. Необходимо заметить, что данные натуральные антиоксиданты, особенно розмарин, обладают специфическим вкусом, ароматом и цветовыми характеристиками, которые могут ограничить концентрацию применяемого антиоксиданта или вообще исключить его применение для конкретного пищевого продукта. Помимо этого, содержание активных ингредиентов в экстракте розмарина крайне мало (составляет не более 5 %), что значительно увеличивает стоимость данного антиоксиданта.

Другими исследователями [7, 9] изучалось антиоксидантное действие БОТ, экстракта розмарина, гамма-оризанола (антиоксидант, получаемый из рисовых зерен) и сезамола (антиоксидант, получаемый из кунжутного семени) на смесь омега-3 жирных кислот в процессе хранения при 30 и 50 °С в течение 14 дней. Антиоксиданты добавлялись в концентрациях 20 мг/кг и 200 мг/кг. По результатам определения перекисного числа, содержания конъюгированных диенов и летучих веществ (2-пентанала и 2,4-гептадиенала) было установлено, что наибольшей антиоксидантной активностью, как и во многих других исследованиях обладает БОТ, за ним следуют экстракт розмарина, сезамол и гамма-оризанол. Авторами установлено, что сезамол обладает высокой способностью захвата свободных радикалов по отношению к радикалам 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic кислоты, которая превышает способность ТБГХ. Но антиоксидантная активность сезамола значительно снижается при высоких температурах ввиду его распада.

Проведенный анализ литературных данных показал, что наиболее сильным антиоксидативным действием обладают синтетические антиоксиданты. Но в то же время в исследованиях приводятся различные виды природных антиоксидантов, эффективность действия которых при достаточных концентрациях сравнима с эффективностью действия синтетических антиоксидантов.

Список использованной литературы:

1. Xianli Wu, Gary R. Beecher, Joanne M. Holden, David B. Haytowitz, Susan E. Gebhardt and Ronald L. Prior. Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52 (12), pp 4026–4037
2. 100. H.M.C. de Azeredo, J.A.F. Faria and M.A.A.P. da Silva. The Efficiency of TBHQ, β -carotene, Citric Acid, and Tinuvin 234® on the Sensory Stability of Soybean Oil Packaged in PET Bottles. *Journal of Food Science*. Volume 68, Issue 1, pages 302–306, January 2003
3. Rubén Olmedo, Valeria Nepote, Marta G. Mestrallet and Nelson R. Grosso. Effect of the essential oil addition on the oxidative stability of fried–salted peanuts. *International Journal of Food Science & Technology*. Volume 43, Issue 11, pages 1935–1944, November 2008
4. Xiaoqiang Chen, Ying Zhang, Yuangang Zu, Lei Yang, Qi Lu and Wei Wang. Antioxidant effects of rosemary extracts on sunflower oil compared with synthetic antioxidants. *International Journal of Food Science & Technology*. Volume 49, Issue 2, pages 385–391, February 2014

5. Hordur G. Kristinsson, Charlotte Jacobsen, Anna Frisenfeldt Horn, Ann-Dorit Moltke Sørensen, K. H. Sabeena Farvin and Nina Skall Nielsen. Antioxidative strategies to minimize oxidation in formulated food systems containing fish oils and omega-3 fatty acids. *Antioxidants and Functional Components in Aquatic Foods*

6. Chang Zheng, Mei Yang, Qi Zhou, Chang-Sheng Liu and Feng-Hong Huang. Changes in the content of canolol and total phenolics, oxidative stability of rapeseed oil during accelerated storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Volume 116, Issue 12, pages 1675–1684, December 2014

7. Matthew Phaner, Hong-Sik Hwang, Jill K. Winkler-Moser, Erica L. Bakota and Sean X. Liu. Protection of fish oil from oxidation with sesamol. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Volume 118, Issue 6, pages 885–897, June 2016

8. Elizabeth S. Budilarto and Afaf Kamal-Eldin. Stabilization of cod liver oil with a quaternary combination of α -tocopherol and synergists: Method of assessment. *European Journal of Lipid Science and Technology*. Volume 117, Issue 10, pages 1598–1606, October 2015

9. Ninnart Chinprahast, Teerapat Tungsomboon and Patlapa Nagao. Antioxidant activities of Thai pigmented rice cultivars and application in sunflower oil. *International Journal of Food Science & Technology*. Volume 51, Issue 1, pages 46–53, January 2016

The study of patterns of controlled release of insecticide microcapsules.



A. A. Bazhenova, V. S. Litvishko.

Plekhanov Russian University of Economics, Moscow.

Currently, intensive development was received by systems of controlled release of chemically and biologically active substances. One of the variants of the excretory systems of diffusion type are microcapsules (MC) in which the encapsulated substance (ES) enclosed in a polymer shell.

It is known that the rate of mass transfer is directly proportional to the diffusion coefficient (D), differences of concentration of ES on both sides of the polymer membrane and inversely proportional to its thickness.

Obviously, comparing the D values for the same type of capsules membranes based on different polymers could to evaluate their influence on the permeability of MC.

The paper presents the results of research on the development of refractometric method the determination of insecticide (dimetiltrofeniltiofosfat), as well as data on the allocation of the ES from the capsules which allowed to assess the permeability of the membranes.

Investigated MC, obtained by the method of interfacial polycondensation with a polyurea shell. The capsules were placed in a fluid (p-xylene), dissolving the core material. It turned out that the diffusion coefficients for MC of different composition are in ranges of values 10-12- 10-11cm²/sec.

Using D, able to estimate granulometric indicators MC and the concentration of ES and its mass fraction in capsules for optimal release rates.

Thus, shows the possibility of using the refractometric method for evaluating the release of insecticide from the microcapsules. Creating a design scheme that allows on the basis of the diffusion coefficient for the polymer membranes of different nature determine the basic operational MC prolonged action.

Obviously, this method can be used in the development of microencapsulated food additives diffusion release, for example based on the fragrant and aromatic substances, spices, condiments, etc.

References

1. *Sosnovski P.A., Litvishko V.S., Afanasev A.G.* Evaluation of kinetic parameters for the allocation of microcapsules // Proceedings of the XI Youth conference IBCP RAS- Universities «Biochemical physics». - Moscow. - 2011.-pp.262-264.
2. *Литвишко В.С.* Микрокапсулированная форма инсектицида пролонгированного действия // *Universum: Химия и биология: электронный научный журнал.* -2014.-№ 3 (4).URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/1071> (дата обращения: 14.12.2015).
3. *Litvishko V.S., Myaskovskaya T.V.* Microencapsulation as way to increase the effectiveness of insecticides // «Theoretical and Applied Sciences in the USA»: Selection Collection of articles based on materials of 1-st International scientific conference. New York: Cibunet publishing. - 2014. -№5- pp.3-6.
4. *Литвишко В.С.* Микрокапсулированная форма метафоса регулируемого выделения // *Международный научный журнал «Наука и мир».* – Волгоград.- 2014. - № 5 (9). - том. 3. - с.109-110.
5. *Литвишко В.С.* Микрокапсулированная форма дихлорона длительного выделения // *Материалы XVI Международной научно-практической конференции «Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии».* - Москва: «Международный центр науки и образования». -2014. -№ 4. - с. 165-170.
6. *Litvishko V.S., Myaskovskaya T.V.* Ecologization of agrotechnologies // “Austrian Journal of Technical and Natural Sciences”.- Austria, Vienna, 2015.- № 5-6, - pp.31-34.
7. *Литвишко В.С.* Микрокапсулированные инсектициды регулируемого выделения // «Инновации в науке»: сборник статей по материалам XLV международной научно-практической конференции. Новосибирск: АНС «Сибак». -2015. - № 5(42). - с.39-43.
8. *Litvishko V.S., Litvishko O.V., Myaskovskaya T.V.* Permeability of microcapsulas polymeric systems for controlled release // «European Journal of Analytical and Applied Chemistry». - 2016. - № 2. - pp.43-46.

Environmental safety of pesticidal microencapsulated polymeric forms



E.V. Khristinina, V.S. Litvishko

Plekhanov Russian University of Economics, Moscow

Traditional forms of pesticides application, such as emulsions and wetting powders, are characterized by relatively high level of toxic influence on warm-blooded, humans and on environment in general.

Application of pesticidal microencapsulated forms based on polymeric membrane materials allows to implement an effective protection of plants from vermin, diseases and weeds by long release of pesticides in minimal doses which are not bigger than toxic norms for humans and animals [1,2,3,4,5].

Application of synthetic polymers as shells for microencapsulated materials are known (polyurethane, polyurea, polyamide, polyester) [6,7].

Developed pesticidal microencapsulated forms have increased safety during storage and exploitation. Decreasing of their oral-dermal toxic influence more than one order compared with emulsion forms is achieved. Because of this fact it is possible for some pesticides to decrease

their level of risk according to hygienic classification [8,9]. It allows to decrease ecological load on environment and decrease the risk of soil contamination.

Microencapsulated polymeric forms of pesticides don't have any skin-resorptive and skin-irritating effect, characterized by lack of embryotropic and teratogenic effects during ontogenesis and their postnatal growth and evolution [10,11,12,13].

Reference

1. Рахмедов Б.Ч., Литвишко В.С. Экологические аспекты применения микрокапсулированных систем // «Экологическая, продовольственная и медицинская безопасность человечества»: Материалы первого международного конгресса. Москва: Изд-во РЭУ им. Г. В. Плеханова. - 2011. часть 2. -с. 210-211.
2. Колесникова Л.А. К вопросу об антропогенном загрязнении земель // «Результаты научных исследований»: сборник статей международной научно-практической конференции. Уфа: ООО «Аэтерна» .-2016.-том 2.-с.62-64.
3. Диденко А.В., Литвишко В.С. Ecologization of plant protection products usage technology// «Современные проблемы биохимической физики» материалы XIV международной молодежной конференции ИБХФ- РАН-ВУЗы. Москва: РУДН. - 2014. – с. 295.
4. Litvishko V.S. Ecological systems of food protection // International scientific journal «Science and world». Volgograd: «Scientific survey». -2015. - №9 (25).-vol.1-pp.27-29.
5. Litvishko V.S. Ecologization of agrotechnologies // «Austrian Journal of Technical and Natural Sciences». -Austria, Vienna, 2015. - № 5-6, -p.31-34.
6. Литвишко В.С. Особенности микрокапсулирования метафоса // «Инновации в науке»: сборник статей по материалам LIII международной научно-практической конференции. Новосибирск: АНС «Сибак». -2016.-часть 1.- № 1(50).-с. 11-15.
7. Myaskovskaya T.V., Litvishko V.S. Microencapsulation as way to increase the effectiveness of insecticides // «Theoretical and Applied Sciences in the Usa»: Selection Collection of articles based on materials of 1-st International scientific conference. New York: Cibunet publishing. - 2014. -№5- pp.3-6.
8. Myaskovskaya T.V., Litvishko V.S. Reducing toxicity chemicals plant protection products // European Science Review. Vienna: «East west» – 2014. - № 5-6, pp.112-114.
9. Литвишко В.С. Пути снижения токсического действия химических средств защиты растений // «Инновации в науке»: сборник статей по материалам XXVIII международной научно-практической конференции. Новосибирск: АНС «Сибак». -2013.- № 12(25).-с. 67-71.
10. Литвишко В.С. Микрокапсулированная форма инсектицида пролонгированного действия // Universum: Химия и биология: электронный научный журнал. -2014.- № 3 (4).URL: <http://7universum.com/ru/nature/archive/item/1071> (дата обращения: 14.12.2015).
11. Litvishko V.S. Microencapsulated form of metaphos regulated allocation // Science and world. Volgograd: «Scientific survey». -2014. - №5 (9).-с.109-110.
12. Литвишко В.С. Микрокапсулированные инсектициды регулируемого выделения // «Инновации в науке»: сборник статей по материалам XLV международной научно-практической конференции. Новосибирск: АНС «Сибак». -2015. - № 5(42). - с.39-43.
13. Литвишко В.С. Микрокапсулированная форма дихлорона длительного выделения//«Научная дискуссия: вопросы математики, физики, химии, биологии» материалы XVI международной научно-практической конференции. Москва: «Международный центр науки и образования». - 2014. -№4(16). - с. 165-170.

Исследование свойств и активности в сверхмалых дозах пептидно-белкового комплекса, выделенного из ткани склеры глаза быка.



Сидорский Е. В.¹, Краснов М. С.¹, Ильина А. П.¹, Ямскова В. П.², Ямсков И. А.¹

¹ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Москва

²ФГБУН Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва.

Мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ) - новая группа биологически активных веществ, обнаруженная в различных тканях позвоночных и беспозвоночных животных, а также в растениях и грибах. МГТБ представляют собой пептидно-белковый комплекс, состоящий из регуляторных пептидов и белков-модуляторов, проявляющих значительную устойчивость к различным воздействиям: изменению pH, температуры, действию хелатирующих агентов. Для биорегуляторов данной группы характерна высокая Ca^{2+} -связывающая активность. В растворах МГТБ образуют устойчивые наноразмерные ассоциаты [1]. В СМД биорегуляторы данной группы оказывают влияние на основные биологические процессы: адгезию и миграцию клеток, клеточную пролиферацию и дифференцировку. Было установлено, что МГТБ стимулируют восстановительные и репаративные процессы в травмированных и патологически измененных тканях. В данной работе исследовали биорегулятор данной группы, выделенный из склеры глаза быка. На первой стадии исследования был получен тканевой экстракт склеры в Ca^{2+} содержащем растворе при 4°C, который далее фракционировали путем высаливания белков в насыщенном растворе сернокислого аммония. При высаливании тканевого экстракта происходит распределение пептидно-белкового комплекса биорегуляторов данной группы во фракцию супернатанта (надосадочная жидкость) и во фракцию осадка [1]. Далее полученные фракции разделяли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Как показано на рис.1 в супернатанте обнаруживается белковая фракция с временем удерживания 44,7 мин. которая обозначена как ВЭЖХ-фракция С2.

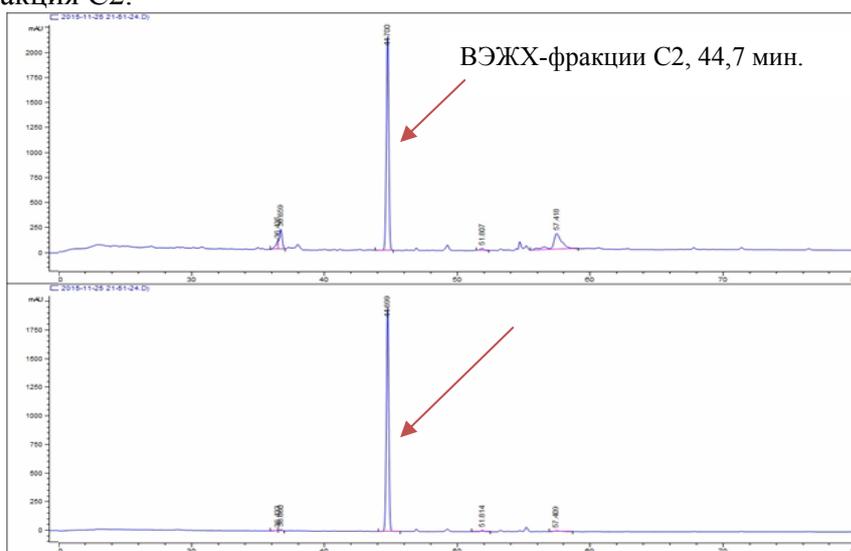


Рис 1. ВЭЖХ супернатанта, выделенного из тканевого экстракта склеры глаза быка Хроматограф Agilent 1100 Series (США), колонка Kromasil C4 (4.6x250мм), элюент - 0,1% трифторуксусная кислота – ацетонитрил, от 0% до 60%, 1 мл/мин, 60мин. По оси абсцисс –

время удерживания, мин; по оси ординат оптическая плотность A_{214} (верхний график), A_{280} (нижний график).

Разделение методом ВЭЖХ в тех же условиях осадка показало присутствие так же одной наиболее количественно представленной белковой фракции с временем удерживания 54 мин. Она была обозначена как ВЭЖХ-фракция O2 (Рис. 2).

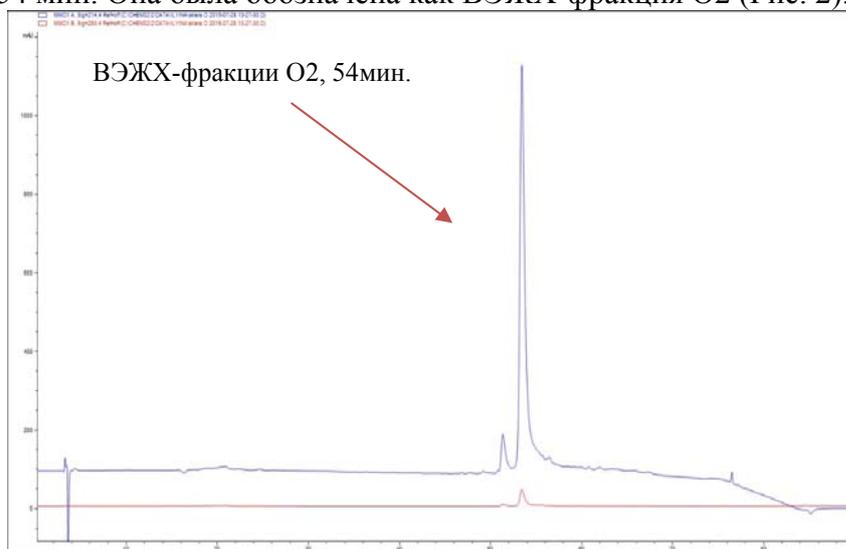


Рис 2. ВЭЖХ осадка, выделенного из тканевого экстракта склеры глаза быка. Хроматограф Agilent 1100 Series (США), колонка Kromasil C4 (4.6x250мм), элюент - 0,1% трифторуксусная кислота – ацетонитрил, от 0% до 60%, 1 мл/мин, 60мин. По оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат оптическая плотность A_{214} (синяя линия), A_{280} (красная линия).

Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии было установлено, что во фракции С2 были идентифицированы пептиды с молекулярными массами 1054-4360Да. Данная фракция была препаративно получена, а с помощью метода биотестирования было установлено, что она не проявляет мембранотропной активности, характерной для биорегуляторов данной группы. Этим же методом было показано, что в ВЭЖХ-фракции O2 присутствует белок с молекулярной массой 66385Да, который соответствует молекулярной массе БСА, изоформы которого, как было показано ранее, входят в состав МГТБ и являются белками-модуляторами, а также были обнаружены белки с мол. массами 33200Да и 22125Да. При секвенировании по методу Эдмона белка ВЭЖХ-фракции O2 была получена его N-концевая аминокислотная последовательность (15 а.о.): DTHKSEIAHRFKDLG. Анализ по базе данных Mascot выявил 100% гомологию с фрагментом бычьего сывороточного альбумина (БСА). Далее методом биотестирования установлено, что ВЭЖХ-фракция O2 проявляет мембранотропную активность, характерную для МГТБ, в концентрациях, соответствующих 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-13} , 10^{-15} , 10^{-16} мг/мл. (Рис.3).

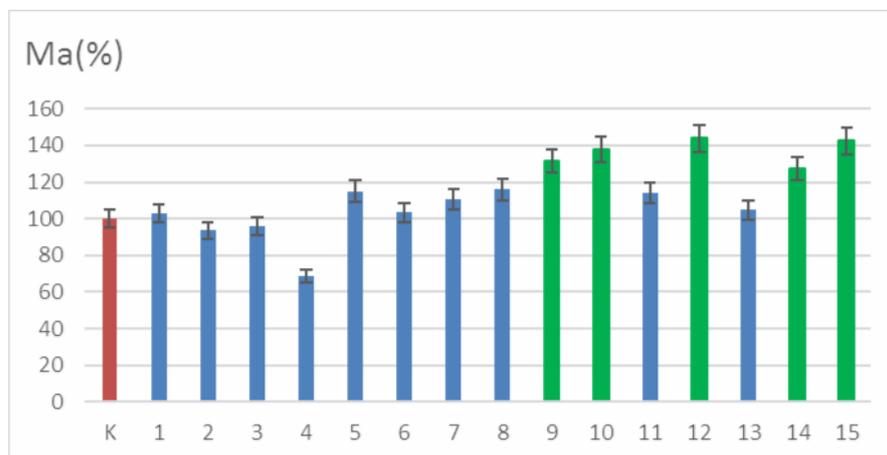


Рис.3 Мембранотропная активность ВЭЖХ фракции O2. По оси абсцисс - степень последовательного десятикратного разбавления данной фракции (исходная концентрация 50 мкг/мл). По оси ординат – величина мембранотропного эффекта, Ма(%); к – контроль;. Зеленым цветом отмечены столбцы, соответствующие разведениям фракций, в которых была обнаружена мембранотропная активность.

Полученные результаты показывают, что ВЭЖХ-фракция O2 проявляет свойства, характерные для МГТБ и позволяет выдвинуть предположение о том, что она представляет собой биорегулятор, выделенный из склеры. Как известно, МГТБ проявляют специфическую активность, которая характеризуется тканевой специфичностью и протекторным действием на ткань в условиях культивирования *in vitro*. Специфическая биологическая активность ВЭЖХ-очищенных фракций C2 и O2 была изучена на ранее разработанной модели культивирования заднего отдела глаза тритона *Pl.waltl* [2].

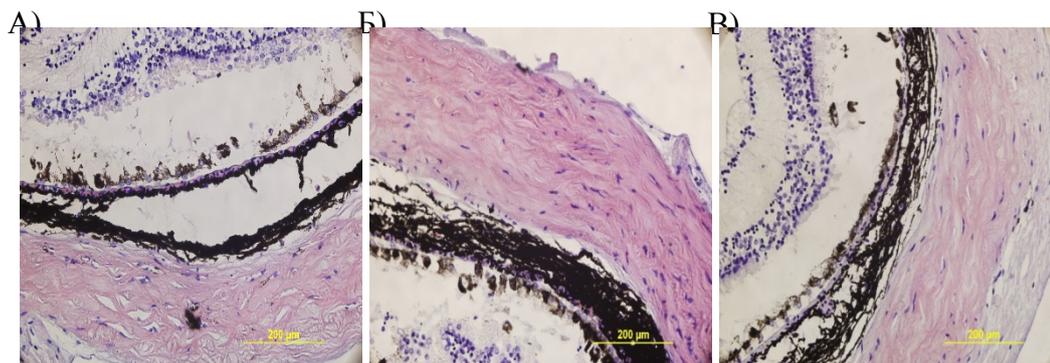


Рис. 4 Микрофотографии тканей после 5-ти дневного стационарного культивирования заднего отдела глаза тритона *Pl. waltl*. Ув. ок.х10, об.х20. А) Контроль; Б) с добавлением в среду ВЭЖХ-фракции O2; В) с добавлением ВЭЖХ-фракции C2.

Добавление в среду культивирования ВЭЖХ-фракции O2 способствовало сохранению пространственной организации тканей заднего отдела глаза. Это выразилось в улучшении взаимодействия между сосудистой и склеральной оболочками, причем в пределах хороида можно отметить сохранение компактных адгезивных взаимодействий. Слой ПЭ также находился в лучшем состоянии по сравнению с контролем: пигмент распределен равномерно в клетках, между клетками сохраняются адгезивные взаимодействия. В склере наблюдали более компактное и плотное расположение волокон, с менее заметными расслоениями, чем в контроле. Фибробласты в склере также выглядели более жизнеспособными, судя по морфологии их ядер (Рис. 4Б). Таким образом, полученные данные указывают на способность ВЭЖХ-фракции O2 препятствовать развитию дегенеративных процессов в склеральной оболочке и поддерживать адгезивные взаимодействия между склерой и прилежащими тканями, т.е. оказывать выраженное протекторное действие на состояние склеры, сосудистой оболочки и ПЭ. Подсчет фибробластов в ткани склеры культур опытной и контрольной серий показал, что количество жизнеспособных фибробластов при воздействии ВЭЖХ-фракции O2 приблизительно в 2,5 раза больше чем в контроле (Рис. 6). Суммирование данных, полученных при исследовании действия ВЭЖХ-фракции O2 на модели органотипического стационарного культивирования ткани склеры заднего отдела глаза тритона *Pl. waltl*, свидетельствует о выраженном протекторном действии проявляемой данной фракции в СМД. Эти результаты полностью согласуются с результатами МГТБ, выделенных из других тканей животных, которые показали их тканеспецифическое протекторное действие на моделях органотипического культивирования тканей позвоночных животных *in vitro*. Исследование ВЭЖХ-фракции C2 показало отсутствие ее влияния на ткани заднего сектора глаза в условиях органотипического культивирования (Рис. 4В). Отмечается существенно меньшее количество жизнеспособных фибробластов в ткани склеры, нарушение адгезивных взаимодействий между склерой, хороидом и ПЭ (Рис. 6). Эти данные позволяют выдвинуть предположение, что для образования

пептидно-белкового комплекса, лежащего в основе МГТБ должно быть соблюдено определенные соотношения между пептидами и белком-модулятором. Не исключено, что в образовании такого комплекса может участвовать один специфический пептид и определенная изоформа БСА. В таком случае добавление других веществ, которые могут неспецифически взаимодействовать с другими сайтами связывания БСА приведет к изменению конформации комплекса биорегулятора и изменению его биологического действия. Для проверки этого предположения было проведено исследование специфической и мембранотропной активности смеси ВЭЖХ-фракции O2 с ВЭЖХ-фракцией C2 в соотношении по массе 20:1, 2:1, 1:2. Они были обозначены соответственно, как K1, K2, K3. Исследование мембранотропной активности данных комплексов показало, что данный тип активности проявлял только K2 в концентрациях, соответствующих 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} мг/мл. Таким образом данные этого исследования показывают, что взаимодействие ВЭЖХ-фракций O2 и C2 привело к утрате биологического действия фракции O2 или смещении интервала активных концентраций в область наиболее высоких значений. Исследование трех комплексов на модели органотипического стационарного культивирования ткани склеры заднего отдела глаза тритона *Pl. waltl* не выявило протекторного действия на ткани глаза: во всех случаях наблюдалась такая же картина деградации тканей и гибели клеток, как и в контроле (Рис. 5).

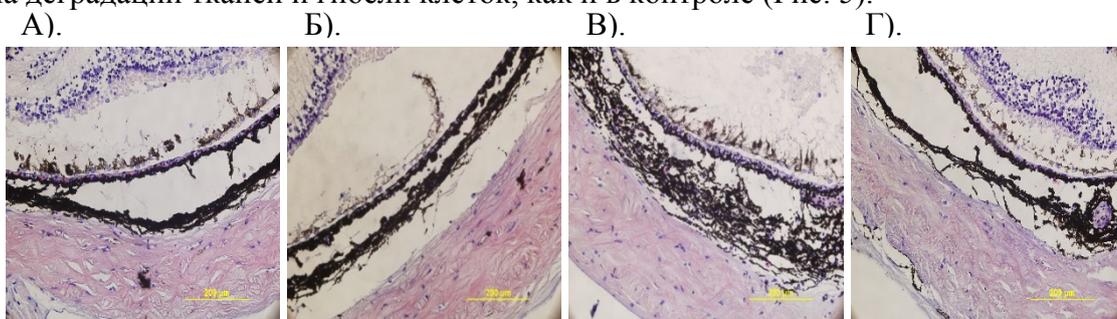


Рис. 5 Микрофотографии тканей после 5-ти дневного стационарного культивирования заднего отдела глаза тритона *Pl. waltl*. Ув. ок.х10, об.х20. А) Контроль; Б) с добавлением в среду комплекса K1; В) с добавлением в среду комплекса K2; Г) с добавлением в среду комплекса K3.

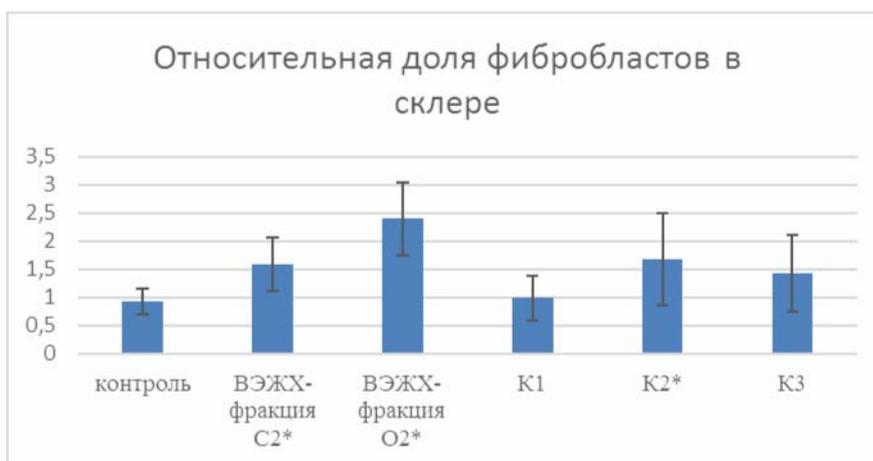


Рис. 6 Количество фибробластов в ткани склеры глаза тритона *Pl. waltl*. при органотипическом культивировании ткани в составе заднего сектора глаза *in vitro*. По оси абсцисс - название экспериментальных серий. По оси ординат - площадь фибробластов в ткани склере относительно общей площади гистологического среза в %, *ImageJ*. *- достоверное отличие $p < 0,05$.

Полученные данные показывают, что взаимодействие биологически-активной ВЭЖХ-фракции O2 с другой фракцией, содержащей пептиды, привело к утрате ее биологического действия. Учитывая наличие в молекуле БСА различных сайтов

связывания с гидрофильными и гидрофобными молекулами можно предположить, что произошло взаимодействие БСА фракции O2 с пептидами фракциями C2, в результате чего изменилась его конформация. В таком случае полученный результат можно объяснить предположением, что имеет место связь между конформацией белка-модулятора при образовании комплекса со специфическим пептидом и его биологическим действием [3]. Таким образом полученные нами результаты показывают, что в ткани склеры содержится биорегулятор, проявляющий свойства МГТБ, выделенных из других тканей животных, в том числе и глаза быка. Так же, как и другие МГТБ данный биорегулятор содержит БСА, полная гомология данного белка показана методами электрофореза, MALDI TOF масс-спектромерии и идентификацией N-концевой аминокислотной последовательности. Предполагается, что в состав биорегулятора (ВЭЖХ-фракция O2) входят пептиды, которые примененными методами не удалось отделить от БСА. Исследованная фракция биорегулятора на модели органотипического стационарного культивирования ткани склеры заднего отдела глаза тритона *Pl. walii* проявила биологическое действие, характерное для МГТБ. При добавлении её в питательную среду в СМД она способствовала увеличению количества жизнеспособных фибробластов и поддержанию структуры ткани в виде сохранения адгезионных взаимодействий и целостности коллагеновых волокон.

Список литературы.

1. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. // Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing. 2012. p. 136.
2. Краснов М.С., Григорян Э.Н, Ямскова В.П. Модель органотипического культивирования сетчатки вместе с тканями заднего сектора глаза тритона для изучения действия адгезивных гликопротеинов // Изв. Акад. Наук. Серия биол. 2003. №1. С. 22-36.
3. Petters T. All about albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications // Academy Press. 1995. P. 233-236.

Исследование способов сбора нефтепродуктов и свойств сорбентов



Ушкова Н.А.

Муниципальное автономное общеобразовательное учреждение
Лицей № 17 г. Химки

Нефть является самым распространённым опасным веществом, загрязняющим окружающую среду. Нефть и её продукты оказывают отрицательное воздействие на гидросферу Земли, почву и их обитателей.

На сегодняшний день известны следующие методы локализации разлива нефти и нефтепродуктов: механический, термический, микробиологический, но наиболее часто используется физико-химический метод, основанный на использовании различных сорбентов.

В настоящее время для сбора проливов нефтепродуктов стараются использовать полностью экологичные сорбенты, не ставя под сомнение их показатели, в то же время отказываются от более эффективных средств, полученных путем химических реакций.

Такой подход "псевдоэкологии" может стать причиной несвоевременной ликвидации экологической катастрофы.

Для проведения сравнительного эксперимента выбран физико-химический метод с использованием сорбентов на основе измельченной скорлупы кокосового ореха и расширяемого графита. В качестве способа сбора в данной работе рассматривается автоматизированный и ручной способ.

1. Автоматизированный способ сбора

1.1. Условия проведения эксперимента

Тип нефтепродукта: отработанное синтетическое масло.

Полный объем емкости: 200 л.

Площадь зеркала: 0,84 м²

Температура воды: +6 °С

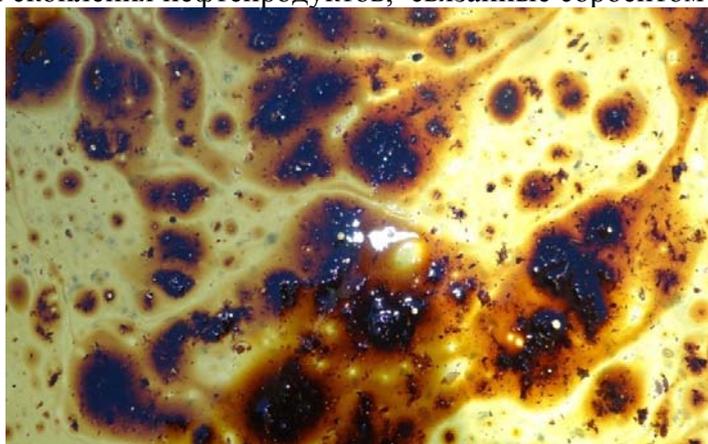
Установка для сбора нефтепродуктов состоит из погружного насоса, фильтра грубой очистки и шлангов. Для имитации реальных условий сброс очищенной воды производился в ту же емкость, в которой производится сбор нефтепродуктов.

1.2. Описание эксперимента с использованием автоматизированного способа сбора кокосового сорбента

Масса нефтепродуктов определялась в соответствии с показателем нефтепоглощения (масса кокосового сорбента - 48,15 гр., масса нефтепродуктов - 192,6 гр.).

Нефтепродукт равномерно разливался по поверхности воды.

Кокосовый сорбент наносился на загрязненные участки и перемешивался, таким образом, имитировалось естественное волнение воды. В результате на поверхности образовались очаги скопления нефтепродуктов, связанные сорбентом (рис. 1).



Стоит отметить негативное свойство кокосового сорбента при его нанесении на поверхность воды - значительная часть затонула, данный объем сорбента не успел связать нефтепродукты. Следовательно, указанный недостаток не приводит к погружению нефтепродуктов на дно, но способствует увеличению расхода кокосового сорбента (до +50% к расчетной массе).

По истечению часа приступили к нейтрализации пролива нефтепродуктов. Водозаборник насоса располагался на минимальной глубине (вблизи зеркала воды) и в процессе нейтрализации перемещался практически по поверхности. Загрязненная масса воды подавалась на вход фильтра, при этом сорбент оставался на сетке, а очищенная вода поступала в исходную емкость.

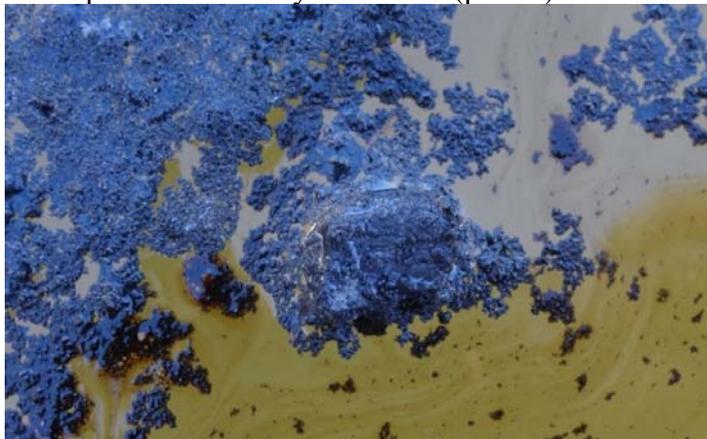
Примерно через 10 минут процесса нейтрализации поверхность воды очистилась от крупных скоплений нефтепродуктов, но мелкие пятна остались.

После проведения нейтрализации кокосовым сорбентом взята проба воды для последующего химического анализа на содержание нефтепродуктов.

1.3. Описание эксперимента с использованием автоматизированного способа сбора графитового сорбента

Исходя из заявленного производителем значения нефтепоглощения, необходимая масса графитового сорбента составляет - 5 гр., но предварительные пробы нанесения показали, что данное количество явно недостаточно. После внесения поправки масса графитного сорбента увеличена до 15,03 гр.

Реакция происходила намного быстрее (в сравнении с кокосовым сорбентом), на поверхности образовались плотно связанные «островки», за пределами которых скопления нефтепродуктов практически отсутствовали (рис. 2).



После проведения нейтрализации по вышеописанному алгоритму получено практически чистое зеркало воды с незначительными следами масляной пленки. Взята проба воды для хим. анализа.

Для графитового сорбента возможно использование "налипных" фильтров. Благодаря равномерно измельченной структуре при прохождении воды через сетчатый фильтр графит создает на его поверхности равномерный слой, который становится самостоятельным фильтрующим элементом для последующего объема воды. Для кокосового волокна данная технология не работает, так как структура данного сорбента не равномерна и не может создать полноценный фильтрующий слой, к тому же, из-за более крупных размеров частиц использование кокосового сорбента приводит к быстрому засорению фильтра.

2. Ручной способ сбора

2.1. Условия проведения эксперимента

В двух одинаковых емкостях исследуется способ ручного сбора сорбентов при помощи фильтров "промокашек" (бумажные салфетки).

Тип нефтепродукта: отработанное синтетическое масло.

Полный объем емкости: 3 л.

Площадь зеркала: 0,07 м²

Температура воды: +15 °С

Масса кокосового сорбента: 19,12 гр.

Масса графитового сорбента: 6,05 гр.

2.2. Описание эксперимента с использованием ручного способа сбора кокосового и графитового сорбента

В емкости добавлялся равный объем нефтепродуктов, на поверхность воды наносились сорбенты.

Графитовый сорбент полностью покрывал зеркало воды. Кокосовый сорбент распределялся равномерно, но по краям оставались свободные пятна нефтепродуктов.

По истечению часа проведен сбор сорбента при помощи бумажной салфетки. Объем собранного графитового сорбента за один проход салфетки значительно больше кокосового.

После очистки кокосовым сорбентом на поверхности осталось множество волокон. Также, как и при использовании автоматизированного способа сбора, значительная часть кокосового сорбента затонула.

3. Утилизация и регенерация (восстановление) сорбентов

При утилизации собранного сорбента рассматривалась возможность его использования в качестве топлива.

Поджог производился при помощи газовой горелки ($T=1500\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Кокосовый сорбент легко воспламенялся и поддерживал горение.

Графитовый сорбент не воспламенялся, но при воздействии температуры выгорал впитавшийся объем нефтепродуктов. После полного выгорания нефтепродуктов графитовый сорбент приобрел исходный вид и структуру.

4. Сравнение полученных результатов

Полученные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1

Наименование показателя	Наименование сорбента			
	Кокос		Графит	
	Автоматиз. способ	Ручной способ	Автоматиз. способ	Ручной способ
Температура воды, $^{\circ}\text{C}$	6	15	6	15
Объем емкости, л	200	3	200	3
Объем нефтепродуктов, мл	200	3	200	3
Объем нефтепродуктов на один литр воды, мл	1		1	
Масса сорбента, наносимого на зеркало воды, гр.	48,15	19,12	15,03	6,05
Время, затраченное на очистку одного литра воды, с	3	88	3	63
Содержание нефтепродуктов после очистки *, мг/л мл/л	31,3** 0,039	6,3 0,008	17,5 0,022	2,1 0,003
Масса собранного сорбента до осушения, гр	44,7	взвешивание не проводилось	92,86	взвешивание не проводилось
Использование отработанного сорбента в качестве углеводородного топлива	возможно		не возможно из-за высокой температуры горения	
Многokrатное использование сорбента	данный вопрос не рассматривался из-за отсутствия необходимых технических средств (центрифуги)		возможно после термообработки	

5. Выводы

Автоматизированный метод позволяет сократить время сбора реагента, но при этом качество сбора нефтепродуктов неудовлетворительное (см. таб. 1). Вероятно, данное обстоятельство связано с перемешиванием нефтепродуктов в толще воды по причине сброса очищенной массы в непосредственной близости от сбора.

Для повышения качества автоматизированным методом, необходимо осуществлять сброс воды за пределы защитного бона, но в реальных условиях это требует дополнительных технических средств и усложняет процесс сбора. Данная проблема

требует дальнейшего исследования, и при определенных доработках эффективность автоматизированного способа можно повысить.

Ручной способ показывает гораздо лучшие результаты по нейтрализации нефтепродуктов, но при этом время сбора на порядок превышает автоматизированный способ.

Исходя из полученных результатов, для нейтрализации проливов нефтепродуктов применимы оба реагента, но, несомненно, что сорбент на основе графита более эффективен (рис. 3).



Несмотря на то, что в технологии его производства задействованы химически активные компоненты (серная и азотная кислота), использование данного сорбента дает неоспоримое преимущество при ликвидации проливов нефтепродуктов, по сравнению с экологически чистым кокосовым сорбентом.

Главным недостатком кокосового сорбента являются большие потери полезной массы при его затоплении в пресной воде. К расчетной массе данного сорбента необходимо добавлять до 50% запаса (рис. 4).



Окончательный выбор способа нейтрализации и типа сорбента зависит от многих факторов, таких, как размер пятна, объем пролива, скорость течения, география пролива, метеоусловия и т.д.

Изменение содержания антиоксидантов фенольной группы после измельчения клубники



Быкова Т.О., Макарова Н.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный технический университет», г. Самара

Растительное сырье является для человека источником различных, необходимых для нормального функционирования организма, биологически активных веществ – витаминов, минеральных веществ, пищевых волокон, органических кислот и антиоксидантов. Каждое вещество по-своему влияет на организм: пищевые волокна стимулируют работу кишечника, антиоксиданты снижают действие окислительного стресса на организм и т.д. Однако в процессе переработки растительного сырья происходят необратимые процессы потери полезных веществ и их биологической ценности вследствие действия кислорода воздуха, температур и т.д. на сырье. Остановить такие процессы невозможно, но возможно каким-либо образом снизить их воздействие на перерабатываемое сырье, что положительно скажется на обеспечении организма необходимыми веществами в результате потребления получаемого пищевого продукта.

Поэтому целью данной работы стало исследование влияния времени выдержки на содержание веществ-антиоксидантов в клубнике после ее измельчения. Измельчение – наиболее распространенная технологическая операция, которая присутствует как при переработке растительного сырья в промышленных масштабах, так и в условиях предприятий пищевой промышленности малой мощности. Клубника же является одной из распространенных и востребованных потребителем ягод, которая употребляется при выработке кондитерских изделий, йогуртов и т.д.

Измерялось содержание следующих веществ: общее содержание фенолов, общее содержание флавоноидов и общее содержание антоцианов спектрофотометрическим способом [1, 2, 3].

Временные интервалы измерения показателей клубники составили 30, 60 и 90 мин после измельчения. В качестве контроля выступают показатели свежеизмельченной клубники – 0 мин после измельчения.

Результаты определения общего содержания фенолов представлены на рис. 1. Следует полагать, что после 30 мин выдержки фенольные соединения подвергаются окислению и потому их содержание уменьшается. Однако до этого происходит их частичное образование из веществ-предшественников.

Результаты определения общего содержания флавоноидов представлены на рис. 2. Флавоноиды проявляют Р-витаминную активность, способствуя укреплению стенок кровеносных сосудов, поэтому максимальное их сохранение в продуктах питания важно для поддержания здоровья сердечно-сосудистой системы. Как и в случае с фенольными соединениями, снижение уровня содержания флавоноидов начинается после 30 мин выдержки измельченной клубники.

Результаты определения общего содержания антоцианов представлены на рис. 3. Эти вещества отвечают в том числе и за красно-фиолетовую окраску плодов. Снижение их содержания приводит, помимо прочего, к потере привлекательного яркого цвета. Постепенное снижение содержания антоцианов происходит сразу после измельчения сырья.

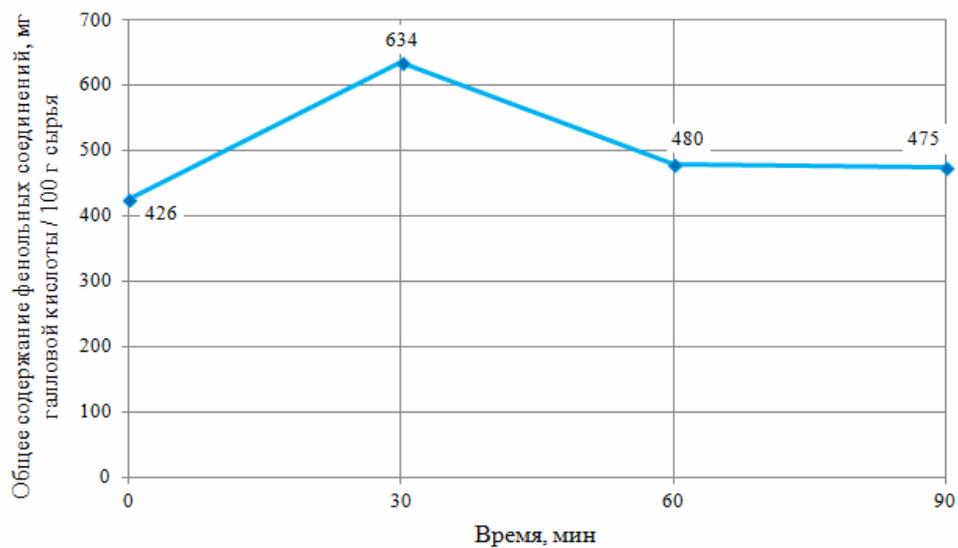


Рис. 1. Общее содержание фенольных соединений в измельченной клубнике

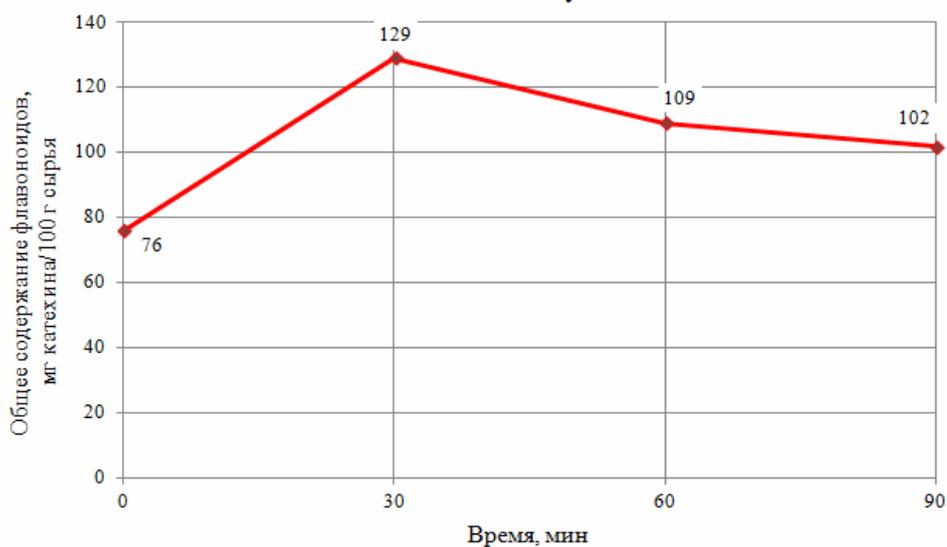


Рис. 2. Общее содержание флавоноидов в измельченной клубнике

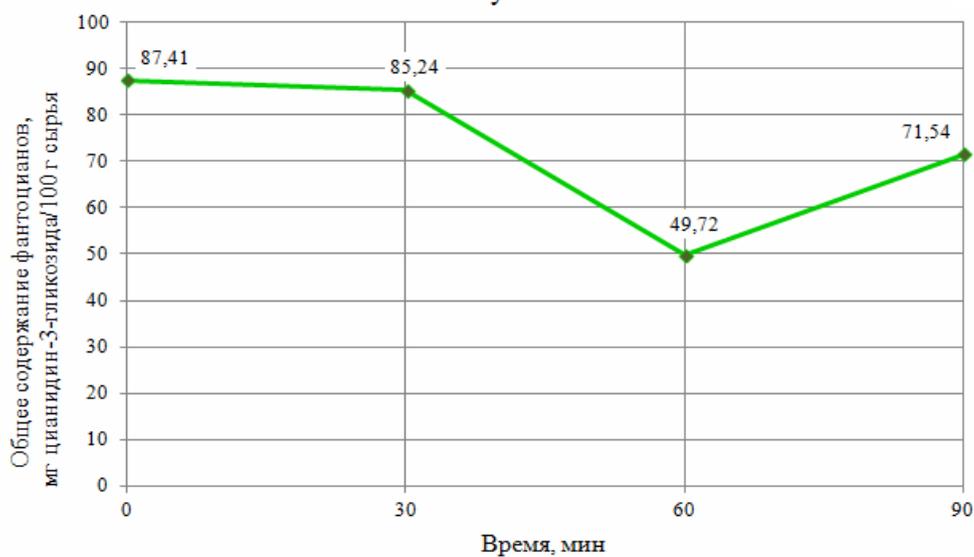
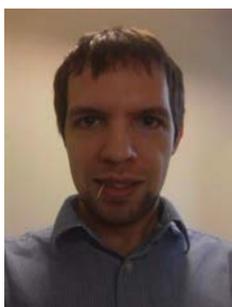


Рис. 3. Общее содержание антоцианов в измельченной клубнике

Таким образом, технологические операции переработки такого растительного сырья,

как клубника, должны осуществляться так, чтобы между непосредственно процессом измельчения и следующей стадией переработки клубники с учетом промежуточных операций (накопление измельченной массы в мезгосборнике, поступление/перекачка из мезгосборника на следующую операцию) осуществлялись не более, чем в течение 30 мин. Такие ограничения по времени будут способствовать созданию продукции с максимальным сохранением биологической ценности перерабатываемой клубники и созданию из нее продуктов функционального назначения и высокого качества.

Мембранотропные пептиды, выделенные из гепатопанкреаса краба: физико-химические свойства и гепатопротекторная активность



**Богданов В. В., Мальцев Д. И.*, Куликова О. Г., Ильина А.П.,
Ямскава В.П.*, Ямсков И.А.**

*ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А. Н.
Несмеянова РАН*

**ФГБУН Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН*

Мембранотропные гомеостатические тканеспецифические биорегуляторы (МГТБ) представляют собой новую группу внеклеточных биорегуляторов, имеющих сложное строение, основу которых представляют пептидно-белковые комплексы. Из-за сходства физико-химических свойств и характера биологической активности они были объединены в отдельную группу [1, 2]. В настоящее время МГТБ найдены в различных тканях позвоночных животных, растений [3] и в грибах [4]. МГТБ оказывают влияние на основные биологические процессы – клеточную адгезию, пролиферацию, миграцию и дифференцировку, причем их биологическое действие характеризуется проявлением тканевой, но не видовой специфичности. Важным свойством этих биорегуляторов является их способность проявлять свою активность в растворах низких концентраций, соответствующих 10^{-8} - 10^{-15} мг белка. Было установлено, что МГТБ способствуют увеличению жизнеспособности клеток при культивировании *in vitro*, а также стимулируют процессы восстановления и репарации в травмированных и патологически измененных тканях [5, 6]. Так, например, биорегуляторы, выделенные из сыворотки крови и листа подорожника большого, демонстрируют ранозаживляющее действие в условиях экспериментальной травмы кожи *in vivo* [7], а МГТБ, выделенный из печени крыс, способствовал активации пигментированных клеток печени у амфибий *in vitro* [8]. Пигментированные клетки печени амфибий (аналоги Купферовых клеток печени млекопитающих) функционируют как макрофаги, поглощая различные частицы, например, микроорганизмы, вирусы, а также осуществляют детоксикацию различных ксенобиотиков [9]. Дополнительная активация пигментированных клеток (увеличение их количества и миграции с образованием клеточных кластеров) обусловлена условиями содержания амфибий и зависит, например, от сезона, от воздействий повреждающих факторов на животное – интоксикации, гипоксемии, травм и отражает защитную реакцию организма, выражающуюся в образовании больших кластеров этих клеток, локализованных в кортикальном слое и околососудистых пространствах – зонах кроветворения, а также присутствуют в паренхиме печени [10, 11]. Биорегуляторы, выделенные из печени крыс, а также гепатопанкреаса камчатского краба, способствовали образованию крупных кластеров пигментированных клеток в печени тритона при роллерном органотипическом культивировании *in vitro*, то есть, стимулировали защитные функции железы амфибии [9, 11]. В настоящей работе предпринята попытка изучить действие данных биорегуляторов на модели CCl_4 -индуцированного фиброза в печени у крыс *in vivo*.

Материалы и методы. Биорегулятор выделяли из печени крысы и гепатопанкреаса краба согласно ранее разработанной методике [1, 12]. Тканевые экстракты получали из следующих источников: печень крыс Wistar обоего пола, весом 200 – 250 г; ткань гепатопанкреаса краба камчатского, предварительно подвергнутую глубокой заморозке. Печень крыс после декапитации животных под эфирным наркозом перфузировали охлажденным до 4°C раствором Рингера (6,5 г NaCl, 0,42 г KCl и 0,25 г CaCl₂ в 1 литре воды), нарезали на мелкие фрагменты и экстрагировали р-ром Рингера при 4°C в течение 2-3 часа. После центрифугирования в тканевой экстракт добавляли сухой сульфат аммония до образования насыщенного раствора (780 г/литр) и оставляли при 0-4°C не менее, чем на 72 часа, надосадочную жидкость (супернатант) длительно диализовали до полного удаления ионов аммония (контролируя по реакции с реактивом Несслера) и далее исследовали на проявление мембранотропной активности адгезиометрическим методом [1]. Аналогично получали тканевой экстракт гепатопанкреаса краба, экстрагируя ее после оттаивания физиологическим раствором для тканей ракообразных (2,92 г NaCl; 0,075 г KCl; 0,44 г CaCl₂ на 100 мл). В образовавшихся фракциях супернатантов и осадков определяли мембранотропную активность с помощью адгезиометрического метода биотестирования МГТБ [1].

ССl₄-индуцированный фиброз вызывали в печени крыс Wistar (150 г, самцы) 8-кратными внутрибрюшинными инъекциями гепатотоксина, проводимыми через 2 дня в течение 60 дней. Были исследованы следующие препараты: водный раствор супернатанта экстракта печени крыс в концентрации 10⁻¹⁴ мг белка в мл (группа 1); водный раствор супернатанта экстракта гепатопанкреаса краба в концентрации 10⁻¹⁰ мг белка в мл (группа 2). Фармакологический препарат Силимар был взят в качестве положительного контроля, его добавляли в питьевую воду в концентрации, соответствующей терапевтической дозе в пересчете на массу тела крыс (группа 3). Контрольная группа животных принимала воду (группа 4). Животные принимали препараты с питьевой водой постоянно после первого введения гепатотоксина. В каждой группе находилось по 7 крыс, которых выводили из эксперимента на 60-й день – по 3 животных, на 120-й день – по 4 животных. Печень фиксировали в растворе формалина и приготавливали гистологические препараты, которые окрашивали по Маллори.

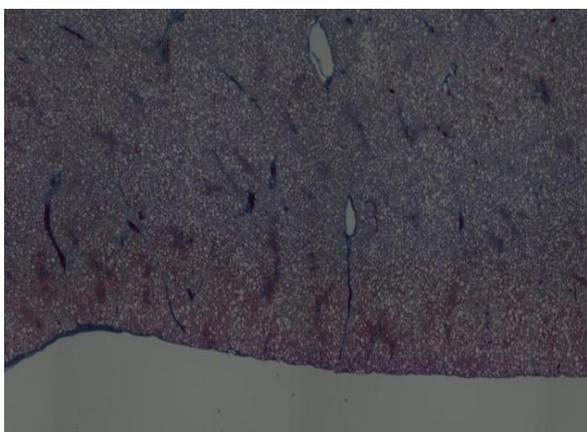
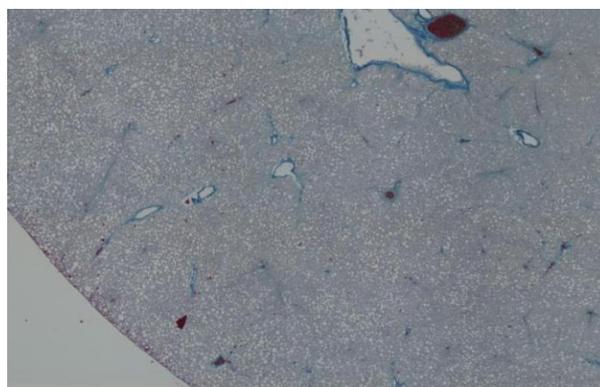
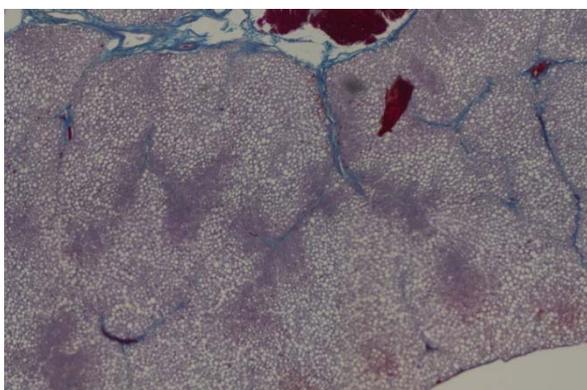
Оценку состояния ткани печени осуществляли на основании данных гистологического исследования. Степень поражения ткани печени фиброзом оценивали количественно, используя свободно распространяемую программу ImageJ путем подсчета площади, занимаемой на одном конкретном гистологическом срезе фиброзной ткани, имеющей характерную окраску по Маллори, и приведению ее к общей площади всего гистологического среза. Для каждой экспериментальной точки для каждого животного изучали не менее 5 срезов. Полученные данные обрабатывали статистически с применением критерия Манна-Уитни.

Полученные после высаливания сульфатом аммония тканевых экстрактов фракции супернатантов и осадков изучали методом биотестирования для обнаружения МГТБ [1]. Было показано, что все фракции супернатантов обладают характерной для данных биорегуляторов мембранотропной активностью, поэтому их далее исследовали на модели индуцированного фиброза печени крыс *in vivo*. На 60-й день эксперимента печень крыс всех групп характеризуется значительным развитием жировой дистрофии и наличием признаков фиброза. Обращает внимание значительное развитие фиброза у крыс в группах 1 (принимавших препарат, полученный из печени крыс) и 3 (фармакологический препарат Силимар) (рис. 1). На 120-й день эксперимента состояние печени в группе 1 практически не изменяется, но значительно отличается от состояния печени крыс контрольной группы, у которых происходит дальнейшее развитие фиброза. Полученные данные указывают на способность препарата, выделенного из печени крыс, тормозить развитие возникшего у животных фиброза печени, несмотря на отмеченное свойство стимулировать первоначальный этап развития патологии. Следует отметить, что сходные результаты

получены для группы крыс, получавших лекарственный препарат Силимар (экстракт, полученный из плодов расторопши пятнистой *Silibum marianum L.*). Поскольку ранее было установлено, что в основе фармакологического действия Силимара лежит его антиоксидантное свойство, а именно стабилизация ПОЛ в плазматических мембранах гепатоцитов [13], а также его способность стимулировать регенерацию печени за счет активации РНК-полимеразы, можно предположить, что препарат, выделенный из печени крыс, может также влиять на эти процессы. Данные, приведенные в таблице 1, показывают на эффективное действие препарата, выделенного из ткани гепатопанкреаса краба камчатского: он препятствовал дальнейшему прогрессу фиброза в печени крыс 2-й группы, а его прием в период с 60 по 120-й день эксперимента вызвал значительное уменьшение признаков развития жировой дистрофии в печени животных. (рис. 2).

Таблица 1. Влияние исследуемых препаратов на развитие CCl₄-индуцированного фиброза печени крыс *in vivo*

Группа животных	Исследуемый препарат	Площадь фиброзной ткани / площадь гистологического среза (%);	
		60 дней эксперимента	120 дней эксперимента
1	Супернатант экстракта печени крысы	3,6±0,4	3,4±0,3
2	Супернатант экстракта гепатопанкреаса краба	1,8±0,2	1,8±0,2
3	Силимар	3,8±0,4	2,2±0,2
4	Контроль	1,7±0,17	5,6±0,6



а
в

б
г

Рис. 1. Гистологические срезы печени крыс на 60-й день развития экспериментального CCl_4 -индуцированного фиброза. а) – воздействие препарата супернатанта, выделенного из тканевого экстракта печени крыс (группа 1); б) воздействие препарата супернатанта выделенного из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба (группа 2); в) воздействие препарата Силимар (группа 3); г) контрольная группа (группа 4).

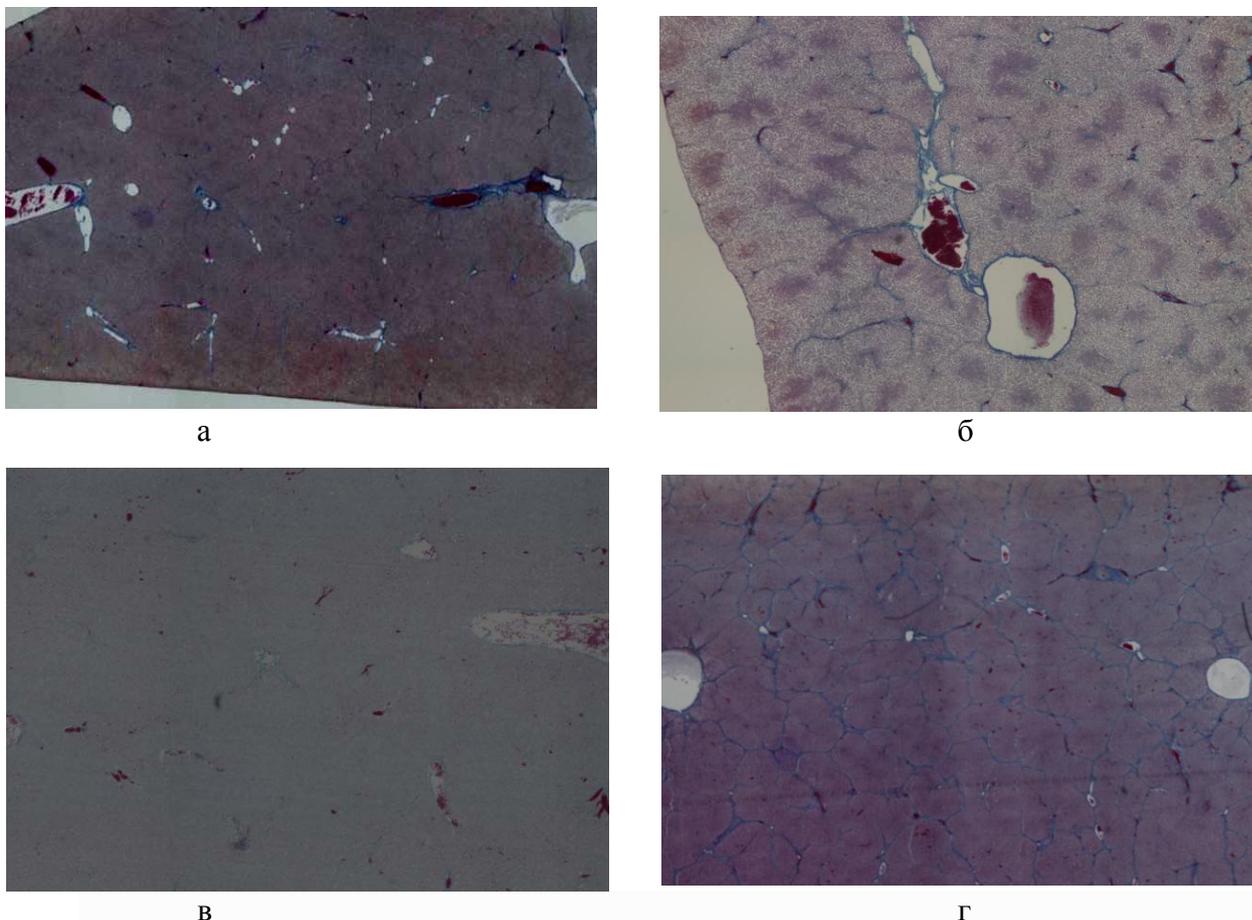


Рис. 2. Гистологические срезы печени крыс на 120-й день развития экспериментального CCl_4 -индуцированного фиброза. а) – воздействие препарата супернатанта, выделенного из тканевого экстракта печени крыс (группа 1); б) воздействие препарата супернатанта выделенного из тканевого экстракта гепатопанкреаса краба (группа 2); в) воздействие фармакологического препарата Силимар (группа 3); г) контрольная группа (группа 4).

Литература

1. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов. Saarbrücken: Lambert Academic Publishing. 2012. 136 Р.
2. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения. Изд-во МАКС Пресс. Москва. 2009. 84 С.
3. Куликова О.Г., Ямскова В.П., Ильина А.П., Маргасюк Д.В., Молявка А.А., Ямсков И.А. Идентификация в луке репчатом нового биорегулятора, действующего в сверхмалых дозах // Прикладная биохимия и микробиология, 2011. Т. 47. №4. С. 1-5.
4. Богданов В. В., Фаткулина Э. Ф., Березин Б. Б., Ильина А. П., Ямскова В. П., Ямсков И. А. Пептидсодержащая фракция из культуральной среды *Fusarium*

- Sambucinum*: состав и биологическое действие // Прикладная биохимия и микробиология. 2014. Т. 50. № 2. С. 177–183.
5. Константиновский А.А., Краснов М.С., Ямскова В.П., Рыбакова Е.Ю., Ямскова И.А. Исследование ранозаживляющего действия биорегуляторов, выделенных из тканей глаза и сыворотки крови быка, на модели экспериментальной травмы роговицы у кроликов *in vivo* // БЭБМ. 2012. № 2. С.177-182.
 6. Ямскова В. П., Резникова М. М. Низкомолекулярный полипептид сыворотки крови теплокровных: влияние на клеточную адгезию и пролиферацию // Журнал общей биологии. 1991. Т.52. №2. С.181-191.
 7. Краснов М.С., Ямскова В.П., Куликова О.Г., Ильина А.П., Маргасюк Д.В., Рыбакова Е.Ю., Ямсков И.А. Изучение новой группы биорегуляторов, выделенных из подорожника большого // Прикладная биохимия и микробиология. 2011. Т. 47. №2. С. 146-153.
 8. Ямскова В.П., Борисенко А.В., Краснов М.С., Ильина А.П., Рыбакова Е.Ю., Мальцев Д.И., Ямсков И.А. Влияние биорегуляторов, выделенных из печени, сыворотки крови и желчи млекопитающих, на состояние ткани печени тритона при органотипическом культивировании // Клеточные технологии в биологии и медицине. 2010. № 3. С. 156–164.
 9. Воронцова М.А., Лиознер Л.Д., Маркелова И.В., Пухальская Е.Ч. Тритон и аксолотль. Москва. Изд. «Советская наука». 1952. 295 С.
 10. Sichel G., Scalia M., Corsaro C. // *Microsc. Res. Tech.* 2002. V. 57. P. 477–490.
 11. Карапетян А.Ф., Дживанян К.А. О регенераторном потенциале печени озерной лягушки *Rana Ridibunda* после частичной гепатэктомии // Цитология. 2006. Т. 48. С. 346–354.
 12. Богданов В. В., Березин Б. Б., Ильина А. П., Ямскова В. П., Ямсков И. А. Биологически активные пептиды гепатопанкреаса камчатского краба // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. №4. С. 1–7.
 13. Lozano-Sepulveda SA, Bryan-Marrugo OL, Cordova-Fletes C, Gutierrez-Ruiz MC, Rivas-Estilla AM. Oxidative stress modulation in hepatitis C virus infected cells // *World J Hepatol.* 2015 Dec 18 V. 7 I. 29 P. 2880-2889.

Моделирование спектров поглощения агрегатов бактериохлорофиллов с помощью современных методов квантовой химии.

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



1. Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Российская Федерация, 119991 Москва, Ленинские горы, 1/3.

2. Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН, Российская Федерация, 119334 Москва, улица Косыгина, 4.

В настоящей работе исследовано применение модели экситонного (эффективного) гамильтониана H_{eff} [1] к изолированным агрегатам молекул бактериохлорофилла А (BChl) с целью теоретической оценки максимума полосы поглощения Q_y светособирающего комплекса пурпурной бактерии (LH1-RC). Подробное описание построения пространственной структуры модельной системы LH1-RC приведено в работе [2]. Расчеты производились с помощью программы GAMESS(US)[3].

В ходе предварительной оценки точности метода временно зависимой теории функционала плотности (TD-CAMB3LYP) применительно к данной задаче производились расчеты энергий вертикального перехода модели BChl в метаноле в рамках

континуальной модели растворителя. Полученное значение 1.642 эВ (TD-CAMB3LYP/aug-cc-pVTZ//CPCM, геометрические параметры PBE0/6-31+G**/CPCM) неплохо согласуется с экспериментальным максимумом полосы поглощения Q_y (1.609 эВ) бактериохлорофилла А в метаноле. Однако, результат подобного моделирования довольно сильно зависит от используемого базисного набора, и в случае обычно применяемого в подобных задачах 6-31G* мы получили 1.713 эВ. Таким образом, можно примерно оценить коррекцию в 0.071 эВ (на базисный набор), или же в 0.104 эВ (на эксперимент).

Оценка диагональных элементов экситонного гамильтониана производилась в рамках метода конфигурационного взаимодействия с учетом однократных возбуждений (CIS) и временно-зависимой теории функционала плотности (TD-CAM-B3LYP) для изолированных молекул BChl, используя базисный набор 6-31G*. Ближайшие недиагональные элементы рассчитывались из энергий нижнего вертикального перехода для соответствующих пар BChl и мономеров. В случае TD-CAM-B3LYP наименьшие собственные значения H_{eff} 32x32 (вся антенна) составили 1.535, 1.541 и 1.543 эВ; а для CIS-1.551, 1.554 и 1.560 эВ.

Мы провели сравнения рассчитанных энергий возбуждения в рамках подхода экситонного гамильтониана и прямых расчетов кластеров BChl вплоть до 16 молекул (половина антенны LH1). Для агрегата из 4 BChl ошибка наименьшего собственного значения H_{eff} составила 0.01 эВ, а для 16 уже 0.04 эВ. Таким образом, следует понимать, что в случае H_{eff} 32x32 погрешность еще более значительная.

Рассчитанные недиагональные элементы методом CIS оказались сильно переоцененными - в среднем на 47% относительно TD-CAMB3LYP - что объясняется завышенным дипольным моментом перехода бактериохлорофиллов при описании в рамках CIS. В случае же TD-CAM-B3LYP полученные недиагональные элементы (491 см⁻¹ в среднем) оказались несколько выше, чем в работе [4], что может объясняться более близким расположением BChl в рассматриваемой нами антенне LH1. В недавней статье [5] приведены средние значения недиагональных элементов H_{eff} антенны LH1 1550 и 1750 см⁻¹, что во много раз превышает как наши результаты, так и все известные ранее цифры для подобных систем [4]. Наши пробные расчеты методом CASSCF(2/2)/6-31G*, использованном в [4], показали, что подобная ситуация сложилась из-за очевидной значительной переоценки дипольного момента перехода BChl в рамках применяемого метода. По всей видимости, в подобной ситуации авторам [4] не стоило бы гнаться за подгонкой экспериментального результата, а честно масштабировать полученные данные на более разумные (например, экспериментальные) значения дипольного момента перехода BChl.

После внесения поправок были получены следующие собственные значения - 1.376, 1.382 и 1.384 эВ (разрешенные переходы), которые неплохо согласуются с экспериментальным максимумом полосы поглощения Q_y светособирающей антенны *Thermochromatium tepidum* (1.355 эВ).

Авторы выражают благодарность научно-исследовательскому вычислительному центру МГУ имени М.В. Ломоносова, МСЦ РАН за предоставленное машинное время суперкомпьютеров.

1. X. Hu, T. Ritz, A. Damjanovic, and K. Schulten. Pigment Organization and Transfer of Electronic Excitation in the Photosynthetic Unit of Purple Bacteria // *J. Phys. Chem. B*, 101, 3854-3871 (1997).
2. M.G. Khrenova, B.L. Grigorenko, J.P. Zhang, P. Wang, A.V. Nemukhin. Computational characterization of the all-atom structure and the calcium binding sites of the LH1-RC core complex from *Thermochromatium tepidum* // *J. Theor. Comput. Chem.*, 15, 1650020 (2016)
3. M.W. Schmidt, K.K. Baldrige, J.A. Boatz, S.T. Elbert, M.S. Gordon, J.H. Jensen, S. Koseki, N. Matsunaga, K.A. Nguyen, S. Su, T.L. Windus, M. Dupuis, J.A. Montgomery. General Atomic and Molecular Electronic Structure System // *J. Comput. Chem.*, 14, 1347-1363 (1993).

4. S. Tretiak, C. Middleton, V. Chernyak, and S. Mukamel. Exciton Hamiltonian for the Bacteriochlorophyll System in the LH2 Antenna Complex of Purple Bacteria// J. Phys. Chem. B, 104, 4519-4528 (2000)

5. M.I. Kozlov, V.V. Poddubnyy, I.O. Glebov, A.S. Belov, D.V. Khokhlov. Ab initio calculation of excitonic Hamiltonian of light-harvesting complex LH1 of *Thermochromatium tepidum* // Chem. Phys. Lett., 645, 48–52 (2016)

Исследование состава, строения и физико-химических свойств супрамолекулярных структур, выделенных из грибов



¹Новиков В.И., ²Мальцев Д.И., ¹Ильина А.П., ²Ямскова В.П.,
¹Ямсков И.А.

¹ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н.
Несмеянова РАН

²ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова
РАН

Введение

В настоящее время особое внимание уделяется веществам природного происхождения, а среди них - получаемых из растений и грибов. Например, из грибов были выделены полисахариды (лентинан, гетерогалактан и др.) на основе которых созданы эффективные лекарственные препараты [1]. Отмечено, что экстракты грибов проявляют широкий спектр биологической активности, в том числе, показывают гепатопротекторное действие [2].

В этом аспекте значительный интерес вызывает новая группа биорегуляторов - мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ), которые были обнаружены ранее во многих тканях млекопитающих, растений, а также в культуральной среде микромицелия (*fusarium s*) [3]. МГТБ оказывают влияние на ход и направленность всех основных биологических процессов, протекающих в организме. Они стимулируют восстановление и регенерацию в повреждённых (травмированных) тканях. Установлено, что такое свойство МГТБ обусловлено их способностью дополнительно активировать клеточные источники регенерации в тканях (в том числе, стволовых клеток). МГТБ имеют сложное строение [4]. Показано, что биологическая активность соответствует пептидно-белковой компоненте биорегуляторов [5]. Взаимодействие пептидов с белками, которые модулируют их биологическое действие (белки-модуляторы), осуществляется по механизму, опосредованному ионами кальция. Эта компонента содержит небольшие пептиды (мол. масса до 6000 Да) и белки, в МГТБ тканей млекопитающих представленных различными формами альбумина сыворотки крови [6]. Для некоторых МГТБ животного и растительного происхождения удалось идентифицировать пептиды, входящие в состав МГТБ [5]. Они представляли собою продукты протеолиза изученных ферментов и адгезивных белков межклеточного пространства тканей. МГТБ проявляют своеобразные физико-химические свойства: они не изменяют своей биологической активности при воздействии ряда факторов - температуры, изменение ионного состава раствора, действия хелатов, протеаз. Иммуногистохимическими методами показано, что МГТБ локализованы внеклеточно. Следует отметить, что в растворах они присутствуют в виде крупных наноразмерных частиц (более 100 нм) [4]. Можно предположить, что МГТБ представляют собою ранее не изученную надмолекулярную структуру межклеточного пространства, которая участвует в передаче и распространении по ткани регуляторного сигнала [4].

В связи с этим поиск МГТБ-подобных биологически активных веществ является весьма актуальным. В настоящей работе, применив экспериментальный подход, ранее разработанный для получения и исследования МГТБ, в экстрактах грибов шиитаке (*lentinula edodes*), веселка (*phallus impudicus*), агарик бразильский (*agaricus brasiliensis*), эноки (*flammulina velutipes*) были обнаружены МГТБ-подобные вещества.

Целью настоящей работы явилась идентификация в межклеточном пространстве плодового тела высших грибов МГТБ-подобных веществ, исследование ряда их физико-химических свойств и биологической активности, которая была изучена на модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* [7]. В процессе выделения и очистки МГТБ-подобных веществ их присутствие во фракциях определяли путем оценки мембранотропной активности – методом биотестирования МГТБ.

Экспериментальная часть

Экстракция МГТБ из грибов

В работе использовали высушенные порошкообразные грибы: шиитаке (*lentinula edodes*), веселка (*phallus impudicus*), агарик бразильский (*agaricus brasiliensis*), эноки (*flammulina velutipes*) фирмы «Русские корни», в количестве 70 гр. каждого вида. Порошок экстрагировали 40%-ным раствором этилового спирта в течение 2-х часов при 4-8 °С. Далее удаляли этиловый спирт, используя роторный вакуумный испаритель. Определение концентрации белка в экстрактах осуществляли спектрофотометрически [8]. Определяли концентрацию углеводов с помощью фенол-сернокислого метода [9].

Осаждение белков сульфатом аммония

Полученные экстракты высаливали сульфатом аммония, насыщая раствор до 100%-ного насыщения [10]. Супернатант тканевого экстракта и осадок собирали центрифугированием и длительно диализовали до удаления ионов аммония. Обе фракции исследовали на наличие мембранотропной активности.

Метод определения мембранотропной активности биорегуляторов

Мембранотропную активность экстрактов, выделенных из грибов, а также фракций этих экстрактов определяли адгезиометрическим методом, используя экспериментальные модели множественных органных культур ткани печени мышей линии F1 CBA/C57Bl, самцы 18-20 г [11].

SDS-электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез в 15%-ном полиакриламидном геле проводили в денатурирующих условиях по методу Лэмли (толщина геля – 0,75 мм, размер 8x10 см). Окрасивание гелей проводили с помощью красителя Кумасси G-250 [12].

MALDI-TOF масс-спектрометрия

Масс-спектры исследуемых образцов были получены на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Ultraflex II BRUKER (Германия), оснащенном УФ лазером (Nd) в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона и в тандемном режиме (MS/MS); точность измеренных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.005% (50ppm), точность измеренных моноизотопных масс фрагментов в пределах 2 Да.

Подготовка образцов для масс-спектрометрии проводилась следующим образом: на мишени смешивали по 0.5 мкл раствора образца и раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты (Aldrich, 20 мг/мл в 20 %-ном ацетонитриле в воде с 0.5%-ной ТФУ), полученную смесь высушивали на воздухе.

Определение размеров частиц методом динамического лазерного светорассеяния

Эксперименты по определению гидродинамического радиуса частиц в растворах фракций выполняли методом динамического рассеивания света на приборе «PhotoCor Complex» (фирма «ФотоКор», Россия), снабженном автоматическим гониометром, мульти-временным коррелятором реального времени «PhotoCor-FC» и гелий-неоновым лазером «Uniphase 1135P» мощностью 20 мВт ($\lambda=633\text{nm}$) в качестве источника света. Измерения проводили при угле 90° и температуре 25 °С.

Исследование проводили на тритонах, самцы, которые разводят в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Под наркозом (0,1М MS-222), животное декапитировали, вынимали печень и вырезали фрагменты ткани печени размером 3x3 мм. Использовали среду культивирования, состоящую из среды 199 (70%), дистиллированной воды (30%), буфера HEPES (30 мкл на 100 мл среды), гентамицин сульфата (200 мкл на 100 мл среды) и 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки. Перед внесением в пузырьки среда проходила холодную стерилизацию через мембранные фильтры типа "Millex-GV" фирмы Millipore (Ирландия) с размером пор 0,2 мкм. Фрагменты печени помещали в культуральные флаконы из темного стекла объемом 10 мл. В каждый наливали по 5 мл среды. Во флаконы опытных серий в питательную среду однократно добавляли 0,1 мл раствора исследуемой фракции в соответствующей концентрации, которую приготавливали путем 10-кратных последовательных разведений исходного раствора препарата (табл. 3). Все флаконы закрывали стерильными крышками, затем пленкой Parafilm M и ставили в термостат. Культивирование печени тритона проводили в темноте при температуре 20±1°C при скорости вращения 35 об/мин в течение 3 суток. Содержание кислорода в пробирках составляло 9.1 мг/дм³. Культуральную среду в течение всего опыта не меняли, при этом показатели pH оставались практически неизменными.

Результаты и обсуждение

Методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле в экстрактах были обнаружены белки с различными значениями молекулярных весов (рис. 1).

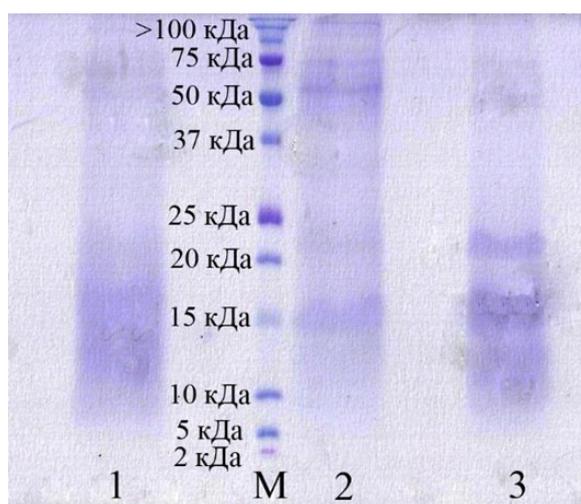


Рисунок 1. SDS-электрофорез в ПААГ экстрактов, выделенных из веселки (1), шиитаке (2) и агарика бразильского (3).

Дорожка 1 – Спиртовой экстракт веселки (*phallus impudicus*).

Дорожка 2 – Спиртовой экстракт шиитаке (*lentinula edodes*).

Дорожка 3 – Спиртовой экстракт агарика бразильского (*agaricus brasiliensis*).

Дорожка М – Маркеры (апротинин из легкого быка - 6,5 кДа, α-лактальбумин - 14,2 кДа, соевый ингибитор трипсина - 20,0 кДа, трипсиноген из поджелудочной железы быка - 24,0 кДа, карбоангидраза - 29,0 кДа, глицеральдегид - 3 - фосфатгидрогеназа - 36,0 кДа, овальбумин - 45,0 кДа, альбумин - 66,0 кДа.)

С помощью SDS-электрофореза было показано, что в экстракте гриба веселка (*phallus impudicus*) присутствуют вещества с мол. массой от 10 до 15 кДа, также 50 и 75 кДа. В экстракте гриба шиитаке (*lentinula edodes*) присутствуют вещества с мол. массой 15, 23, 50 и 75 кДа; в экстракте гриба агарик бразильский (*agaricus brasiliensis*) - от 10 до 15 кДа, также 20 и 50 кДа.

После высаливания тканевых экстрактов были получены две фракции – супернатант и осадок, исследование которых показало, что мембранотропная активность соответствует только фракции супернатанта. Характеристики фракций супернатантов, выделенных из экстрактов грибов приведены в (табл. 1).

В настоящей работе было проведено исследование состава фракций супернатантов, полученных после высаливания экстрактов грибов эноки (*flammulina velutipes*) и агарик бразильский (*agaricus blaizeii*) сульфатом аммония, методом MALDI-TOF масс-спектрометрии (табл. 2).

Таблица 1. Характеристики фракций супернатантов, выделенных из экстрактов грибов.

Название гриба (фракции)	Степень 10-кратного последовательного разведения исходного препарата, в которой определяется мембранотропная активность	Исходная концентрация белков (мг/мл)	Исходная концентрация углеводов (мг/мл)	Размер частиц (нм)
Шиитакэ (<i>Lentinula edodes</i>)	10, 11	0,039±0,005	0,020±0,005	505±50
Веселка (<i>Phallus impudicus</i>)	5, 16	0,059±0,005	0,015±0,005	310±31
Эноки (<i>Flammulina velutipes</i>)	7, 9, 14	0,070±0,005	0,005±0,005	320±32
Агарик Бразильский (<i>Agaricus Blaizeii</i>)	5, 10, 15	0,022±0,005	0,010±0,005	357±36

Таблица 2. Результаты MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа супернатантов, выделенных из экстрактов грибов.

Фракция	Молекулярные ионы (m/z) ± 2 Да
Эноки (<i>Flammulina velutipes</i>)	1090, 1160, 1179, 1204, 1295, 3792, 4298, 4610, 4817, 4934, 5943, 7756, 7892, 9650, 9785, 10298, 10482
Агарик бразильский (<i>Agaricus Blaizeii</i>)	1468, 1550, 1580, 1626, 1668, 1792, 1836, 1907, 1994, 2138, 2505, 2918, 3885, 3925, 4287, 4390, 4659, 4701

Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии было показано присутствие в биологически активных супернатантах низкомолекулярных пептидов. Следует отметить, что исследование растворов супернатантов методом лазерного динамического светорассеяния показало, что в них содержатся крупные наноразмерные частицы (табл. 1). Эти данные согласуются с ранее полученными результатами для МГТБ, выделенных из других источников [4].

Для исследования специфической активности МГТБ ранее были разработаны модели роллерного органотипического культивирования тканей позвоночных животных (млекопитающих и хвостатых амфибий) *in vitro*. В настоящем исследовании, учитывая тканеспецифический, но не видоспецифический характер биологической активности МГТБ, использовали модель органотипического культивирования печени тритона (*pleurodeles waltl*) *in vitro*. В качестве параметра, отражающего биологическое действие МГТБ, была выбрана площадь, занимаемая пигментированными клетками печени тритона (*pleurodeles waltl*), которую оценивали морфометрически [7]. Данные литературы

показывают что пигментированные клетки печени амфибий - это аналоги Купферовых клеток печени млекопитающих. Они функционируют как макрофаги, поглощая различные частицы, микроорганизмы, вирусы и др., а также осуществляют детоксикацию различных ксенобиотиков. Увеличение количества пигментированных клеток в печени хвостатых амфибий является ответом организма на неблагоприятные условия [13].

В табл. 3 представлены результаты, полученные в условиях 3-х дневного роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* при воздействии супернатантов, выделенных из экстрактов грибов. Было показано, что все исследуемые фракции способствовали увеличению площади пигментированных клеток в культурах печени тритона по сравнению с контрольными. Супернатант экстракта печени крысы был использован как препарат сравнения, на основании ранее полученных результатов, показывающих наличие тканеспецифического характера мембранотропной активности данного препарата. [7]. Как показано в табл. 3 все исследуемые фракции в СМД оказывают влияние на значения исследуемого параметра. Наибольшим эффектом обладает супернатант экстракта, выделенного из экстракта гриба энюки (*flammulina velutipes*), а менее выраженным – выделенным из экстракта веселки (*phallus impudicus*). Тем не менее, все приведенные значения изучаемого параметра были статистически достоверными по сравнению с контрольными ($p < 0,05$). Учитывая литературные данные, которые указывают на определенную защитную функцию пигментированных клеток печени хвостатых амфибий, можно предположить, что данные исследуемые фракции, выделенные из грибов проявляют гепатопротекторное свойство.

Таблица 3. Влияние супернатантов, выделенных из экстрактов грибов, на состояние печени тритона при 3-х дневном роллерном органотипическом культивировании печени тритона *in vitro*.

Исследованная фракция	Степень последовательного 10-кратного разбавления препарата*	Площадь, занимаемая пигментированными клетками в % от общей площади среза по отношению к контролю, %**
Нативная ткань		111,5 ± 5,6
Контроль		100,0
Печень крысы (супернатант)	10	142,0 ± 7,1
Энюки (<i>Flammulina velutipes</i>)	9	150,0 ± 7,5
Шиитаке (<i>Lentinula edodes</i>)	10	135,1 ± 6,8
Веселка (<i>Phallus impudicus</i>)	16	116,1 ± 5,8
Агарик бразильский (<i>Agaricus Blaizeii</i>)	5	132,8 ± 6,6

*- исходные концентрации супернатантов приведены в табл. 1

** - представлены данные одного конкретного эксперимента

Таким образом, в рамках данной работы было показано присутствие в межклеточном пространстве плодового тела высших грибов МГТБ-подобных веществ. Были исследованы их некоторые физико-химические свойства, а также биологическая активность на модели роллерного органотипического культивирования печени тритона *in vitro* [7]. Согласно полученным результатам, супернатанты экстрактов грибов проявляют гепатопротекторное свойств, что согласуется с данными литературы [2].

Список литературы

1. Xiaofei Xu , Huidan Yan , Jian Tang , Jian Chen & Xuewu Zhang, Polysaccharides in *Lentinus edodes*: Isolation, Structure, Immunomodulating Activity and Future Prospective // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54:474–487 (2014).
2. Ayano Itoh, Katsuhiro Isoda, Masuo Kondoh, Masaya Kawase, Akihiro Watari, Masakazu Kobayashi, Makoto Tamesada and Kiyohito Yagi, Hepatoprotective Effect of Syringic Acid and Vanillic Acid on CCl₄-Induced Liver Injury // *Biol. Pharm. Bull.* 33(6) 983—987 (2010)
3. Богданов В.В., Фаткулина Э.Ф., Березин Б.Б., Ильина А.П., Ямскова В.П., Ямсков И.А. Пептидосодержащая фракция из культуральной среды *Fusarium sambucinum*: состав и биологическое действие // *Прикладная биохимия и микробиология*, 2014, том 50, № 2, с. 177–183
4. Ямскова В.П., Краснов М.С., Ямсков И.А. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Lambert academic publishing
5. Ямскова В.П. Скрипникова В.С., Краснов М.С. Ямсков И.А. // *Биохимия*. -2009. - Т. 74. - № 9. - С. 1195 - 1203.
6. Д.И. Мальцев, В.П. Ямскова, А.П. Ильина, Б.Б. Березин, И.А. Ямсков. Биорегулятор из печени крыс // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2016, 52 (3): 1-4.
7. Borisenko, A.V., Yamskova, V.P., Krasnov, M.S et al . et al // *In: New Trends in Biochemical Physics Research*, NY, Nova Science Publishers Inc.- 2007. - P.35-46.
8. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. *Справочник биохимика*. М.: Мир, 1991. С.544.
9. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J., Robers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // *Analyt. Chem.* 1956. V. 28. P. 350-356
10. Ямскова В.П., Туманова Н.Б., Логинов А.С. Сравнительное исследование действия экстрактов печени мышей линии C57Bl и СВА на адгезию гепатоцитов // *Бюлл. экспер. биол. и мед.* 1990. N.3. с.303-306.
11. Ямскова В.П., Резникова М.М. // *Журн. общей биол.* 1991. Т. 52, № 2. С. 181-191.
12. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. 1970. V.227. P.680-685.
13. Sichel G. Amphibia Kupffer cells / G. Sichel, M. Scalia, C. Corsaro // *Microsc. Res. Tech.* – 2002. – V.57. – P.477–490.

Возможности сепарирования методом диэлектрофореза в свободном потоке клеток *Saccharomyces cerevisiae*



**Божкова О. А., ¹Леонович В.А. ²Сорокина О.Н., ³Климов М.А.,
²Пронкин П.Г., ²Коварский А.Л., ²Подойницын С.Н.**

*Российский химико-технологический университет им. Д.И.
Менделеева, Москва*

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва*

Предложена действующая модель сепарационного устройства, а также описан метод разделения микробиологических образцов на основе диэлектрофореза в свободном потоке. Эффективность устройства была продемонстрирована теоретически и экспериментально на примере сепарации клеток *Saccharomyces cerevisiae*. Разрабатываемый метод отличается высокой производительностью и простотой использования.

ВВЕДЕНИЕ

Точный контроль за биологическими частицами (клетками, вирусами, белками, молекулами ДНК) имеет важное значение для развития биомедицины, биотехнологии и др. областей науки, тесно связанных с биологическими микро- и нанообъектами.

В последние десятилетия для захвата, фокусировки и характеристики микро- и наночастиц наряду с оптическими, механическими и магнитными подходами все чаще используются электрические методы контроля. Электрическое поле является наиболее подходящим инструментом управления биочастицами. К его преимуществам можно отнести сильное контролирующее воздействие, простота управления, высокая эффективность, незначительный повреждающий эффект для целевых клеток.

Перспективным методом контроля и манипулирования биологическими частицами с помощью электрического поля может считаться метод диэлектрофореза, который находит свое применение в таких областях как клиническая диагностика, лечение различных заболеваний, фармакология, иммунология, разделение клеточных культур и многое другое [1].

В настоящей работе для разделения микробиологических объектов был предложен подход на базе метода ДЭФ с электродами барьерного типа [2]. Тестирование сепарационного устройства было проведено на примере разделения дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*.

ДИЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Метод **диэлектрофореза (ДЭФ) (Dielectrophoresis, DEP)** основан на перемещении микрочастицы в неоднородном электрическом поле, вызванном взаимодействием между вынужденным (индуцируемым) диполем в микрочастице и внешним электрическим полем. «Положительный» диэлектрофорез (**pDEP**) соответствует перемещению, в котором микрочастица движется в область более сильного электрического поля, а «отрицательный» (**nDEP**) – в противоположном направлении.

В основе **DEP** лежит явление взаимодействия частиц с неоднородным электрическим полем в среде, что является активным подходом к разделению. В переменном электрическом поле клетки проявляют разные диэлектрические свойства в зависимости от характеристик этого поля. Выбирая соответствующую частоту поля для образца, можно разделить различные типы клеток и сконцентрировать в различных областях микроэлектродов в зависимости от их индивидуальных диэлектрических откликов на прикладываемое электрическое поле.

Электрически нейтральные частицы в неоднородном электрическом поле будут подвергаться воздействию диэлектрических сил. Величина и направление силы ДЭФ представляют собой сложную функциональную зависимость от диэлектрических свойств всей многослойной системы клетки. Усредненная во времени диэлектрическая сила, действующая на сферическую частицу, может быть определена из выражения:

$$F_{DEP} = 2\pi R^2 \epsilon_0 \epsilon_m \text{Re}[CM_f(\omega)] \nabla E^2 \quad (1)$$

где R – радиус частицы, ϵ_0 – диэлектрическая проницаемость вакуума, ϵ_m – электропроницаемость среды, $\text{Re}[CM_f(\omega)]$ – действительная часть константы Клаузиуса-Масотти (КМ), $\nabla|E^2|$ – градиент квадрата напряженности электрического поля.

$$CM_f = \frac{\epsilon_1^* - \epsilon_2^*}{\epsilon_1^* + 2\epsilon_2^*} \quad (2)$$

Проницаемости ϵ^* представляет собой комплексную переменную, описывающую частотную зависимость величины константы КМ:

$$\epsilon^* = \epsilon_0 \epsilon_r - j \frac{\sigma}{\omega} \quad (3)$$

где ϵ_r – электропроницаемость материала (клетки), σ – электропроводность материала (клетки), ω – угловая частота приложенного электрического поля.

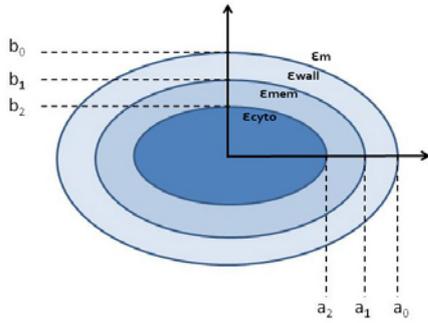


Рис.1 Модель многослойной клетки формы вытянутого сфероида.

Выражения (2) и (3) применяются для расчета константы КМ частиц с однородными диэлектрическими свойствами. Клетки микроорганизмов имеют более сложную структуру и представляют собой многослойные системы, каждый слой которой имеет свои диэлектрические свойства.

Поэтому для определения константы КМ необходимо использовать модифицированные выражения для многослойной модели клетки эллиптической формы [3]:

$$\epsilon_{ik}^* = 1/3 \sum_{k=x,y,z} \frac{\epsilon_{ik}^*}{\epsilon_{ik}^* + \epsilon_{ik}^*} \quad (4)$$

$$\epsilon_{1k}^* = \epsilon_{wall}^* \frac{\epsilon_{wall}^* + (\epsilon_{2k}^* - \epsilon_{wall}^*)A_{1k} + \lambda_1(\epsilon_{2k}^* - \epsilon_{wall}^*)(1 - A_{1k})}{\epsilon_{wall}^* + (\epsilon_{2k}^* - \epsilon_{wall}^*)A_{1k} - \lambda_1(\epsilon_{2k}^* - \epsilon_{wall}^*)(1 - A_{0k})} \quad (5)$$

$$\epsilon_{2k}^* = \epsilon_{mem}^* \frac{\epsilon_{mem}^* + (\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{mem}^*)A_{2k} + \lambda_2(\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{mem}^*)(1 - A_{1k})}{\epsilon_{mem}^* + (\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{mem}^*)A_{2k} - \lambda_2(\epsilon_{cyto}^* - \epsilon_{mem}^*)A_{1k}} \quad (6)$$

В свою очередь, значения λ_1 и λ_2 определяются уравнениями:

$$\lambda_1 = \frac{a_1 b_1 c_1}{a_0 b_0 c_0} \quad \lambda_2 = \frac{a_2 b_2 c_2}{a_1 b_1 c_1} \quad (7)$$

A_{ik} ($i=1,2,3$) – фактор деполяризации вдоль каждой координатной оси. Для вытянутого сфероида справедливо допущение, что $a_0 > b_0 = c_0$. Тогда фактор может быть вычислен по следующей формуле:

$$A_{ix} = \frac{q_i}{(q_i^2 - 1)^{3/2}} \ln \left\{ q_i + \left([q_i^2 - 1]^{1/2} \right) \right\} - \frac{1}{q_i^2 - 1} \quad (8)$$

$$A_{iy} = A_{iz} = \frac{1}{2}(1 - A_{ix}) \quad (9)$$

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* были выбраны в качестве объекта для тестирования возможностей метода ДЭФ сепарации в свободном потоке.

Подготовка образца. Навеска прессованных дрожжевых клеток массой 10.5 мг растворяли в деионизованной воде объемом 21 мл. В результате концентрация клеток в пробе составила $5 \cdot 10^6$ клеток/мл. Диаметр клеток дрожжей 5 – 8 мкм.

Сепарационная установка. Элементами установки для сепарации являются: сепарационное устройство, генератор переменного сигнала, цифровой осциллограф, инфузионный насос. Сепарационное устройство представляет собой две тождественные пластины, разделенные свободным пространством (*рабочая камера сепаратора*), формирующимся с использованием диэлектрической прокладки толщиной 150 мкм.

Процедура. Образец поступает в сепаратор через шприц, установленный в инфузионный насос соединенного системой трубок с входным отверстием сепаратора. Скорость потока в экспериментах по ДЭФ сепарации *S. cerevisiae* составляла 40 мл/ч. Переменное электрическое поле создаваемое генератором переменного сигнала имело

частоту 100 кГц и амплитуду 20 В. Амплитуду электрического поля в системе контролировали при помощи цифрового осциллографа.

Концентрацию клеток определяли спектрофотометрически. Измерения спектров поглощения проводились на спектрофотометре СФ-2000 (Россия) в стандартных 1 см кварцевых кюветах.

СЕПАРАЦИОННОЕ УСТРОЙСТВО

Сепарационное устройство представляет собой две пластины с электродами, формирующие сепарационную камеру (100x30x0.15 мм), разделенную тонкой диэлектрической прокладкой рис.2. Разрабатываемое сепарационное устройство имеет одно входное отверстие для подачи суспензии разделяемых частиц (*в*) и два выводных отверстия для забора фракций образцов с сильным (*д*) и слабым (*з*) ДЭФ эффектом. Переменный электрический сигнал подается на входные электроды (*б*) сепарационного устройства, расположенные на корпусе сепаратора (*а*).

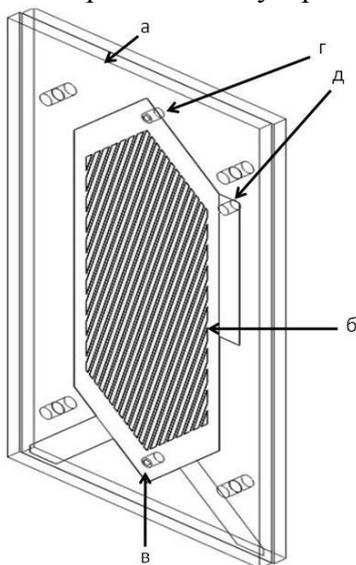
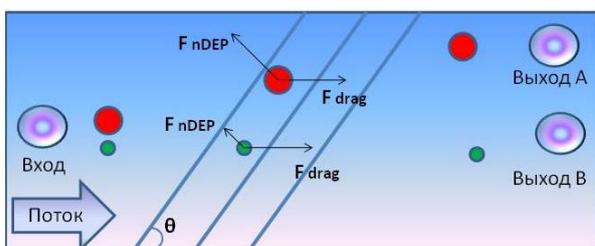


Рис. 2. Общий вид сепарационного устройства для ДЭФ сепарации в свободном потоке. *а* – корпус сепарационного устройства, *б* – электроды, *в* – входное отверстие, *з* и *д* – выходные отверстия для фракции со слабым сильным ДЭФ воздействием соответственно.

Основной принцип работы сепарационного устройства основан на формировании узких барьеров градиентного электрического поля непроницаемых для частиц, подверженных сильному диэлектрофоретическому воздействию. Тонкие полевые барьеры формируются в объеме сепарационной камеры за счет взаимной ориентации электродов в пространстве. При этом ориентация барьеров градиентного электрического поля приводит к латеральному смещению потока частиц с сильным ДЭФ эффектом (рис. 3), когда сила ДЭФ воздействия (F_{DEP} ур.1)

$$F_{drag} = 6\pi r \eta V \quad (10)$$



Частицы с нулевым или несущественным ДЭФ эффектом могут свободно преодолевать барьеры высокоградиентного электрического поля, и направление их движения не смещается в пространстве. Таким образом, происходит непрерывное разделение частиц в потоке.

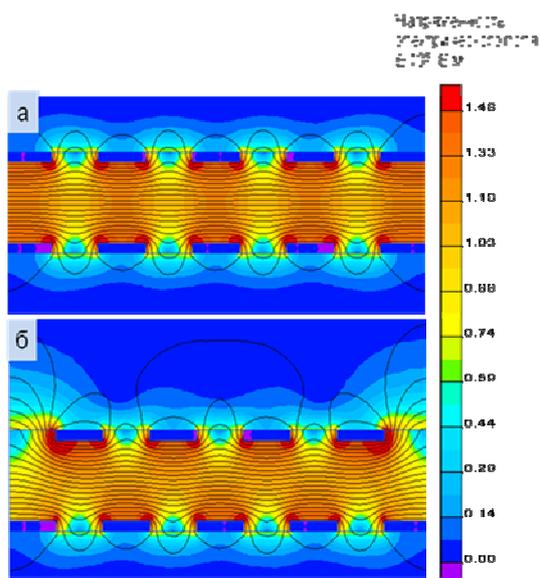
Рис. 3 Схема действия векторов сил в сепарационном устройстве.

К преимуществам такой конфигурации электродов можно отнести то, что частицы, подверженные ДЭФ воздействию, не меняют своего направления движения, а лишь смещаются в потоке. Это позволяет увеличивать эффективность сепарационного устройства за счет снижения вклада силы от смещения частицы в потоке (F_{drag}):

$$F_{drag} = 6\pi r \eta V \sin \theta \quad (11)$$

где η – гидродинамическая вязкость среды ($1.01 \cdot 10^{-3}$ Па с для воды при комнатной температуре), θ – угла между электродами и потоком (30° в экспериментах)

ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ РАСЧЕТ И КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ



Компьютерное моделирование распределения электрических полей в сепарационном устройстве было выполнено с использованием коммерческого ПО EICut. Были созданы модели для различной ориентации электродов друг относительно друга – электроды напротив (а), в шахматном порядке (б).

Градиентное электрическое поле формируется в зазоре между электрическими проводниками.

Конфигурация расположения электродов (а) более эффективна для ДЭФ сепарации, т.к. позволяет достичь более высоких значений градиента E .

Рис. 3 Компьютерное моделирование распределения напряженности электрического поля в сепарационном устройстве при разности потенциалов 20 В и различной ориентации электродов друг относительно друга – электроды напротив (а), в шахматном порядке (б).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* можно рассматривать как сферу диаметром 5 – 8 мкм, состоящую из нескольких оболочек с разными диэлектрическими свойствами (рис. 1). Клетка состоит из цитоплазматического пространства, содержащего клеточные органеллы и клеточной оболочки, которая состоит из тонкой мембраны и толстой клеточной стенки, разделенных переплазматическим пространством. Диэлектрические свойства отдельных оболочек клетки *Saccharomyces cerevisiae* представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Диэлектрические свойства оболочек клетки *Saccharomyces cerevisiae*, необходимые для расчета константы Клаузиуса-Массоти.

Диэлектрические и размерные параметры	Клеточная стенка	Плазматическая мембрана	Цитоплазма
Диэлектрическая проницаемость (ϵ)	60	6	50
Проводимость (σ), (Ом м) ⁻¹	0.014	$3 \cdot 10^{-6}$	0.45
Толщина, нм	100	7	3400

Расчетный параметр константы Клаузиуса-Массоти (ур. 4), полученный в рамках модели многослойной клетки [3] для *Saccharomyces cerevisiae* в деионизованной воде ($\epsilon_{med} = 78$, $\sigma_{med} = 0.0001$ (Ом м)⁻¹) при частоте 100 кГц, составляет $CM_f = 0.86$.

Оценки параметров сил, действующих на клетку *Saccharomyces cerevisiae* в сепарационном устройстве F_{DEP} и F_{drag} , проводилась исходя из градиентов напряженностей электрического поля, полученных в результате компьютерного моделирования, и составляли $F_{DEP} = 8.23$ pN (для электродов напротив друг друга), $F_{DEP} = 4.06$ pN (для электродов в шахматном порядке) $F_{drag} = 14.2$ pN.

Определение концентрации дрожжевых клеток в исходной суспензии и в образцах, полученных после сепарации, проводилось по спектрам поглощения аналогично методике, предложенной в работе [4]. Показано, что этот метод дает хорошие корреляции ($r = 0.980$) с методами прямого микроскопического подсчета клеток [5]. Результаты сепарации представлены в Таблице 2. Фракции частиц 1 и 2 отбираются в процессе прокачки суспензии через сепаратор из выходного отверстия (з, рис. 2) и представляют собой фильтрат без частиц или с частицами со слабым ДЭФ эффектом. Частицы,

подвергающиеся значительному ДЭФ воздействию, собираются в специальном «депо» и выводятся через выходное отверстие (д, рис. 2) после отключения электрического поля посредством вымывания из «депо» при высокой скорости прокачки.

Таблица 2. Результаты сепарирования клеток *Saccharomyces cerevisiae*

Фракция	Содержание клеток,	
	мл ⁻¹	%
Исходный	1.38 x 10 ⁷	100
1	1.10 x 10 ⁵	0.7
2	1.10 x 10 ⁵	0.7
Смыв 1	1.95 x 10 ⁷	142
Смыв 2	2.28 x 10 ⁷	165

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дрожжевые клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* были выделены из среды методом диэлектрофореза в свободном потоке. Эффективность разделения клеток сепарационным устройством составила ~99%. Предложенный метод сепарации отличается высокой производительностью и простотой использования. Разрабатываемый метод ДЭФ сепарации в свободном потоке может оказаться перспективным для разного типа биологических объектов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16-08-00704.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Qian, H. Huang, L.Chen, X.Li, Z. Ge, T.Chen, Z.Yang and L.Sun. Dielectrophoresis for Bioparticle Manipulation. Int. J. Mol. Sci. 2014, 15, 18281-18309; doi:10.3390/ijms151018281.
2. D.Lee, B. Hwang, Y. Choi, B. Kim. Negative Dielectrophoretic Force based Cell Sorter with Simplified Structure for High Reliability. International journal of precision engineering and manufacturing. Int. J. Precis. Eng. Manuf. (2016); doi:10.1007/s12541-016-0032-x.
3. S.Park, Y. Zhang, T.-H. Wang, S.Yang Continuous dielectrophoretic bacterial separation and concentration from physiological media of high conductivity Lab Chip, 2011,11,2893-2900; doi: 10.1039/C1LC20307J.
4. J.A.R. Price, J.P.H. Butt, R. Pethig, Biochim. Biophys. Acta, 964 (1988), 221-230.
5. G.H. Markx, M.S. Talary, R. Pethig Journal of Biotechnology 32 (1994) 29-37.

Изоморфизм карбоксилэстеразы-1 человека



Кулакова А.М., Коц Е.Д.

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

Карбоксилэстеразы – ключевые ферменты первой стадии гидролитического метаболизма терапевтических средств, содержащих сложноэфирную, карбаматную или амидную группировки. Изучение механизмов их действия важно для современной молекулярной медицины.

Для карбоксилэстеразы-1 человека существуют 3 изоформы, отличающиеся наличием или отсутствием определённых коротких участков аминокислотной

последовательности. Наиболее распространена в природе изоформа 1, содержащая в своей последовательности аминокислотный остаток глутамина в 362 положении (Рис. 1). В данной работе рассматривалось влияние различных изоформ на доступ субстрата к активному центру фермента. В качестве субстрата в расчетах рассматривался паранитрофенилацетат.

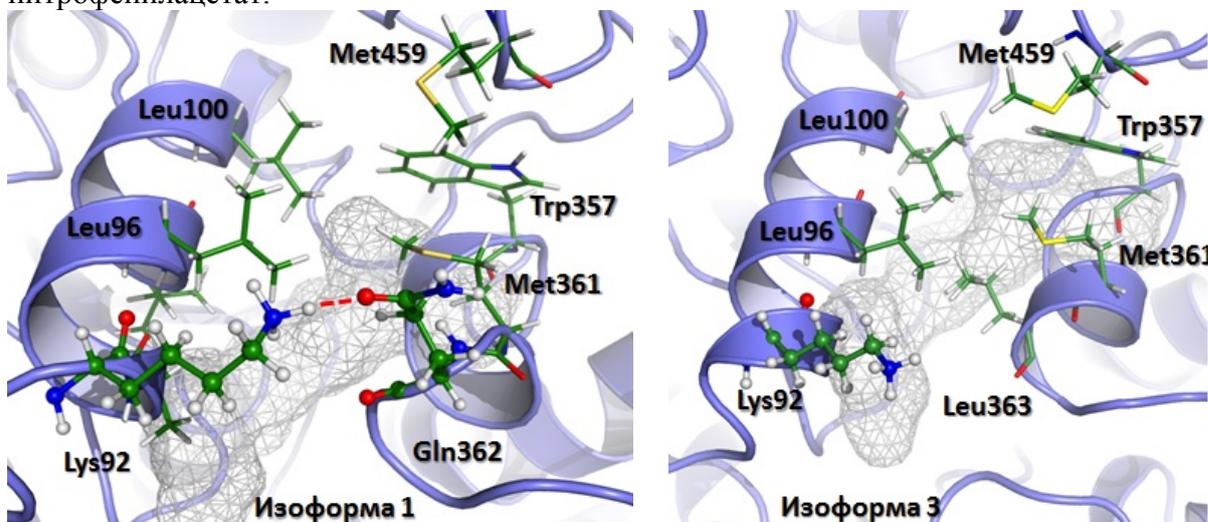


Рис. 1. Структура фермента в районе входа в активный центр для различных изоформ карбоксилэстеразы-1 человека. Пунктирной линией показана водородная связь, влияющая на поступление субстрата в активный центр.

В результате расчетов с использованием метода направленной молекулярной динамики было показано, что наличие глутамина в 362 положении влияет на поступление субстрата в активный центр фермента за счет образования водородной связи между Gln362 и Lys92.

Изучение ранозаживляющих свойств мембранотропного гомеостатического тканеспецифического биорегулятора сыворотки крови крупного рогатого скота и его отдельных компонентов на модели лоскутной раны кожи мыши *in vivo*



Гимадиева Д.В.¹, Рыбакова Е.Ю.², Мальцев Д.И.², Ильина А.П.³, Ямскава В.П.², Ямсков И.А.³

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, 125047, Москва, Миусская площадь, 9

² Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26

³ Учреждение Российской Академии Наук Институт элементоорганических соединений им. А. Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28

Введение

Ранее в сыворотке крови теплокровных животных был обнаружен биорегулятор, который принадлежит группе мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов (МГТБ) [1] и растений и представляют собой внеклеточно локализованные пептидно-белковые комплексы, которые в растворах образуют крупные наноразмерные частицы [2]. Биорегуляторы данной группы обладают сходными физико-химическими свойствами и характером биологической активности. МГТБ влияют на

адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференцировку клеток. Биологическая активность биорегуляторов этой группы характеризуется проявление в сверхмалых дозах (СМД), наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности [3]. Важным свойством МГТБ является их способность стимулировать процессы восстановления и репарации в травмированных и патологически измененных тканях. Ранее было показано, что биорегулятор, выделенный из сыворотки крови, проявляет ранозаживляющее действие в СМД на моделях раны роговицы глаза у кроликов [4], проявлял свойства морфогена на модели культивирования регенератов хвостов тритона *in vitro*, поддерживая жизнеспособность клеток всех тканей регенерата [3]. Как и все другие МГТБ, биорегулятор, выделенный из сыворотки крови, состоит из белка-модулятора, представленного изоформой сывороточного альбумина, и нескольких пептидов с мол. массой от 1 до 6 кДа. Во фракции биологически активного МГТБ, выделенного из сыворотки крови, были обнаружены жирные кислоты [5]. Однако не было изучено их влияние на активность данного МГТБ.

В настоящей работе предпринята попытка изучить влияние на биологическое действие липидов, входящих в состав фракции МГТБ, выделенного из сыворотки крови. Для этого экстракцией липиды удаляли из фракции биорегулятора и отдельно исследовали биологическую активность оставшегося пептидно-белкового комплекса и фракции липидов. Биологическую активность данных препаратов исследовали на моделях оценки мембранотропной активности и лоскутной раны кожи мыши *in vivo*.

Материалы и методы

1. Получение биорегулятора из сыворотки крови

Биорегулятор получали из сыворотки крови (стерильный, инактивированный коммерческий препарат, используемый в качестве добавки в ростовую среду клеточных культур, производства ФГУП «Предприятие по производству бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАМН»). Сыворотку высаливали, создавая насыщенный раствор сернокислого аммония, центрифугированием собирали супернатант, диализовали против воды до удаления соли, определяли мембранотропную активность. Супернатант лиофилизировали, и многократно экстрагировали смесью хлороформ-метанол (2:1).

2. Получение фракции липидов

Хлороформ-метанольные вытяжки собирали, отгоняли органические растворители в роторном вакуумном испарителе, остаток светло-коричневого цвета растворяли в этиловом спирте. Далее приготавливали растворы с различной концентрацией липидов из спиртового раствора, последовательно 10-кратно разбавляя его в физ.растворе (в 199 среде) для исследования биологической активности методом оценки мембранотропной активности или в эксперименте на модели лоскутной раны кожи мыши *in vivo*.

Оставшиеся после экстракции смеси хлороформ-метанола белки растворяли в физ.растворе или среде 199.

3. Метод определения мембранотропной активности

Мембранотропную активность изучаемых фракций определяли адгезиометрическим методом, используя экспериментальные модели множественных органных культур ткани печени мышей линии F1 CBA/C57Bl, самцы 18-20 г [1].

4. Белковый SDS-электрофорез в полиакриламидном геле

Электрофорез в 15%-ном полиакриламидном геле проводили в денатурирующих условиях по методу Лэмли (толщина геля – 0,75 мм, размер 8x10 см). Окрашивание гелей проводили с помощью красителей Кумасси G-250 и Судана черного.

5. Метод кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма в УФ-области (195-260 нм) [6] снимали на КД-спектрометре Jasco 720 (Япония) при 20°C в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 мм. Содержание элементов вторичной структуры оценивали с помощью программ CDNN и k2d [7].

6. Модель экспериментальной лоскутной раны кожи у мышей *in vivo*

Эксперимент проводили на мышах F1 (СВА/С57В1) самцах, весом 20-22 г. Животных разделяли на группы по 5 шт. в каждой. У каждой мыши, наркотизированной эфиром, на спине вырезали лоскут кожи, размером около 1 см² и ежедневно 1 раз в день в область раны вводили 200 мкл следующих растворов: К – физ.раствор, О1 – МГТБ сыворотки крови 10⁻¹⁴ мг/мл (супернатант), О2 – белковая фракция 10⁻¹⁴ мг/мл, О3 – липидсодержащая фракция 10⁻⁸ мг/мл. На 13-ые сутки после нанесения ран животных выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков под эфирным наркозом. Фиксировали фрагменты кожи нейтральным забуференным формалином. Затем по стандартной методике фрагменты кожи заливали в парафин и приготавливали гистологические срезы толщиной 7 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином-эозином и по Маллори. Просмотр и съемку гистологических препаратов производили на микроскопе Keyence VZ 9000 (Япония).

7. Триптический гидролиз белков в полиакриламидном геле

Фрагмент геля размером около 2 мм², дважды промывали для удаления красителя в 100 мкл 40%-ного раствора ацетонитрила в 0,1 М NH₄HCO₃ в течение 20 мин при комнатной температуре. После удаления раствора для дегидратации геля добавляли 100 мкл ацетонитрила. К гелю, после удаления ацетонитрила и высушивания, прибавляли 4 мкл раствора трипсина (Promega) в 0,05 М NH₄HCO₃ с концентрацией 15 мкг/мл. Гидролиз проводили в течение 18 ч при 37°C, затем к раствору добавляли 7 мкл 0,5 % ТФУ в 10%-ном растворе ацетонитрила в воде и тщательно перемешивали. Идентификацию белков осуществляли при помощи программы Mascot. Поиск проводился в базе данных NCBI среди белков всех организмов с указанной точностью с учетом возможного окисления метионинов кислородом воздуха и возможной модификации цистеинов акриламидом. Кандидатные белки, имеющие параметр достоверности score >83 в базе данных NCBI считали определенными надежно (p<0,05).

8. Лазерное динамическое светорассеяние

Выполняли на приборе "PhotoCor Complex" (фирма "ФотоКор", Россия), снабженном автоматическим гониометром, мульти-временным коррелятором реального времени "PhotoCor-FC" и гелий-неоновым лазером "Uniphase 1135P" мощностью 20 мВт (λ 633нм) в качестве источника света. Белок после экстракции липидов растворяли в физ.растворе, обеспыливали фильтрованием через мембраны "Dugapore" с диаметром пор 0,22 мкм ("Millipore") и сразу проводили измерения.

Результаты

Таблица.1 Количественные характеристики изучаемых фракций.

Название фракции	Объем, мл	Концентрация белка, мг/мл	Степень разбавления, 10 ^x	Мембран отропная активность, Ма, %	Гидродинамический радиус, нм
Сыворотка крови КРС	3800	20	-	Не активна	
Супернатант II сыворотки крови КРС	500	0,045	10 ⁶ , 10 ⁷ , 10 ¹³ , 10 ¹⁴	165	612±30
Белковая фракция	-	0,12 г	10 ⁶ , 10 ⁷ , 10 ¹⁴	150	-
Липидсодержащая фракция	1,2	1,9	10 ⁷ , 10 ⁸ , 10 ⁹	147	-

Методом электрофореза в SDS-ПААГ было показано, что в лиофилизованном супернатанте сыворотки крови содержится высокомолекулярный белок с кажущейся молекулярной массой 66 кДа, соответствующей молекулярной массе сывороточного альбумина (рис.1А). Анализ результатов триптического гидролиза данного белка показал, что он является членом семейства сывороточных альбуминов. Это соответствует раннее

полученным результатам о том, что в состав МГТБ сыворотки крови входит сывороточный альбумин, представляющий одну из его изоформ [3]. Окраска геля суданом черным после электрофореза хлороформ-метанольной вытяжки показала, что в ней присутствуют липиды (рис.1Б).

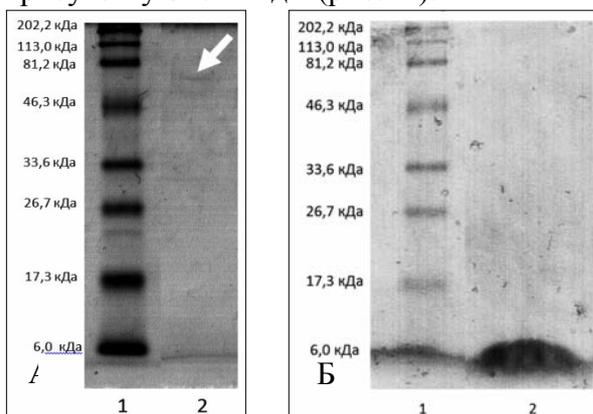


Рис.1. А - Электрофорез в ПААГ фракции лиофилизованного супернатанта сыворотки крови после обработки смесью хлороформ-метанола Б - Электрофорез в ПААГ фракции хлороформ-метанольной вытяжки (окраска суданом черным). 1 – маркерные белки; 2 – изучаемая фракция.

Полученные результаты показали, что супернатант сыворотки до экстракции проявлял характерную для МГТБ мембранотропную активность и сохранял ее после экстракции смесью хлороформ-метанол (Рис.2).

Липидная фракция также проявляла мембранотропную активность, причем дозовая зависимость не имела полимодального характера (Рис 2в).

Возможно, липиды, обладая сродством к плазматическим мембранам могут оказывать влияние на их свойства. Полученные данные позволяют предположить, что липиды не влияют на проявление биорегулятором из сыворотки крови мембранотропной активности.

Методом лазерного динамического светорассеяния было показано, что во фракции супернатанта сыворотки крови КРС присутствуют наноразмерные частицы (табл.1). После процедуры лиофилизации и экстракции липидов наночастицы не были обнаружены ни в белковой, ни в липидсодержащей фракциях. Таким образом, можно заключить, что на образование наночастиц могла повлиять как лиофилизация, так и экстракция липидов.

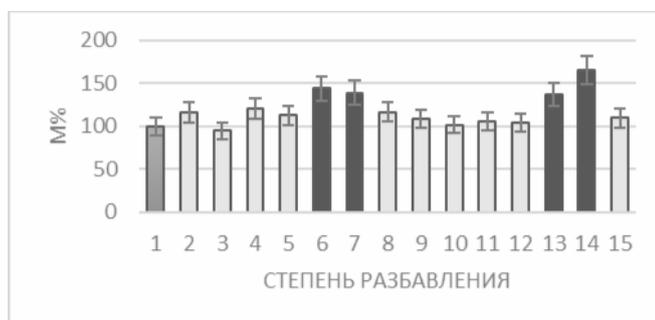


Рис. 2а Определение мембранотропной активности супернатанта сыворотки крови КРС, на органотипической культуре печени мыши *in vitro*.

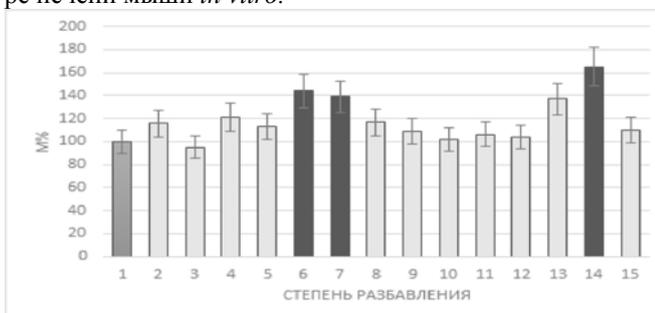


Рис. 2б Определение мембранотропной активности супернатанта сыворотки крови КРС после экстракции смесью хлороформ-метанол

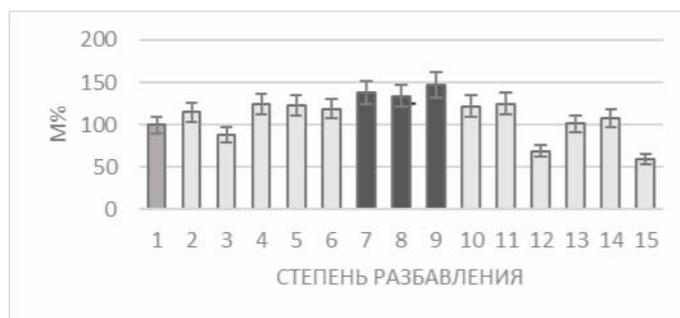


Рис.2в Определение мембранотропной активности липидсодержащей фракции, полученной в ходе экстракции лиофилизованного супернатанта смесью хлороформ-метанола.

По оси абсцисс - степень последовательного десятикратного разбавления данной фракции (исходная концентрация 0,045 мг/мл). По оси ординат – величина мембранотропного эффекта, Ма,%; 1 – контроль; столбцы – воздействие фракции в разбавлении 10^x , где x – показатель степени десятикратного разбавления изучаемого препарата Цветом отмечены столбцы, соответствующие разведениям фракций, в которых была обнаружена мембранотропная активность ($p < 0,05$).

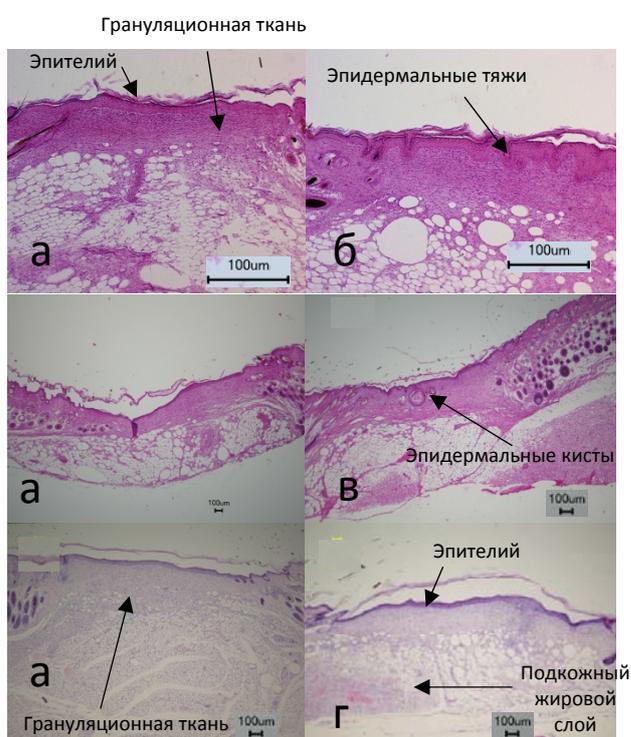


Рис.7. Ранозаживление на модели кожи мыши. а – контроль, б – опытная группа - супернатант в – опытная группа (белковая фракция после лиофилизации и экстракции липидов) г – опытная группа (липидсодержащая фракция после лиофилизации)

На модели лоскутной раны кожи мыши *in vivo* было изучено биологическое действие МГТБ сыворотки крови до и после лиофилизации и экстракции липидов, а также липидсодержащей фракции. На 13 день эксперимента в группе К наблюдали образование фиброзного рубца и полную реэпителизацию раны. Восстановления структур кожи (волосные фолликулы, потовые, сальные железы) не наблюдали.

В опытной группе О1 помимо полной реэпителизации наблюдали образование

эпителиальных тяжей, которые являются начальной стадией образования волосных фолликулов [8], что согласуется с ранее полученными данными о специфической деятельности МГТБ сыворотки крови [3]. В группе О2 наблюдали образование эпидермальных кист, которые могут являться нарушением развития волосного фолликула [9]. В группе О3 не наблюдали никаких отличий от контрольной группы. Из полученных данных можно предположить, что для проявления специфической активности МГТБ сыворотки крови необходимо поддержание наноразмерной структуры молекулярного комплекса. Таким образом, в данной работе было показано, что липиды входящие в состав фракции, содержащей МГТБ сыворотки крови не оказывают влияния на проявление биорегулятором мембранотропной активности, но влияют на результаты специфической активности – процессы ранозаживления.

Список литературы

1. Ямскова В.П., Резникова М.М. // Журн. общей биол. – 1991. - Т. 52, № 2. - С. 181-191.

2. Ямскова В.П. Наноразмерные биорегуляторы тканей глаза млекопитающих как основа для фармакологических препаратов нового поколения / В.П. Ямскова, М.С. Краснов, И.А. Ямсков – М.: МАКС Пресс, 2009. – 84 С.
3. Ямскова В.П. Новые экспериментальные и теоретические аспекты в биорегуляции. Механизм действия мембранотропных гомеостатических тканеспецифических биорегуляторов / В.П. Ямскова, М.С. Краснов, И.А. Ямсков И.А. – Saarbrücken: Lambert Academic Publishing, 2012. – 136 Р.
4. Гундорова Р.А., Хорошилова-Маслова И.П., Ченцова Е.В., Илатовская Л.В., Ямскова В.П., Романова И.Ю. Применение адгелона в лечении проникающих ранений роговицы в эксперименте // Вопросы офтальмологии. 1997. Т. 113. №2. С. 12-15.
5. Yamskova V.P., Rybakova E.Yu., Vecherkin V.V., Berezin B.B., Filatova A.G., Blagodatskikh I.V., Yamskov I.A. Analysis of Regulatory Proteins from Bovine Blood Serum that Display Biological Activity at Ultra Low Doses: 1. Isolation, Purification and Physicochemical Properties // In the book “Biochemical Physics Frontal Research”. Ed. by S.D. Varfolomeev, E.B. Burlakova, A.A. Popov and G.E. Zaikov. Hauppauge NY. Nova Science Publishers Inc. 2007. P. 61-70.
6. Andrade M.A., Chacon P., Merelo J.J., Moran F. Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichromism spectra using an unsupervised learning neural network. // Prot. Eng. – 1993. – V.6(4). – P.383-390.
7. Ogata A.M., Muramatsu T., Kobata A. // Arch. Biochem. Biophys. – 1977. – V.181. – P.353-358.
8. Paus R, Muller-Rover S, Van Der Veen C, Maurer M, Eichmuller S, Ling G, Hofmann U, Foitzik K, Mecklenburg L, Handjiski B. A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. // J Invest Dermatol. – 1999. - 113(4). – P.523-532.
9. Peckham J.C. Skin and subcutis /J.C. Peckham, K. Heider // Pathology of the Mouse: Reference and Atlas, Ed. by R.R. Maronpot, G.A. Boorman, B.W. Gaul.– Vienna IL: Cache River Press, 1999.– P.555–612.

Melting and crystallization behavior of poly(3-hydroxybutyrate) in PHB-based fiber material



**Jużków J.^a, Solovova Yu. V.^b, Shibryaeva L. S.^b, Olkhov A. A.^c,
Popov A. A.^b**

^a Poznan University of Technology, Plac Marii Skłodowskiej-Curie 5,
60-965 Poznań, Poland

^b Emanuel Institute of Biochemical Physics RAS 119334, Kosygin str, 4,
Moscow, Russia

^c Plekhanov Russian University of Economics 115093, Stremyanny
per., 36, Moscow, Russia

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) is well recognized as a biodegradable and biocompatible thermoplastic polyester with the melting point of 173°C. This fibrous material produced by electrospinning technique is nowadays considered as an eco-friendly alternative for several applications, among them medicine, agriculture industry and food packaging. As a medical material PHB has potential to be applied in adsorbable surgical sutures, matrices for drug delivery systems and as biodegradable moulded plastics. Physical properties of PHB are often compared to polypropylene, because they have similar melting point and crystallinity. Compared to traditional methods of preparing polymer fibers, the electrospinning method makes possible to produce microfibers with thickness less than a micrometer. However, the high cost of production still prevents application of this material in a wider scale. Moreover, PHB is brittle and thermally

unstable. To overcome these disadvantages, PHB can be modified, e.g. by blending with other polymers, allowing for improving its mechanical and thermal properties.

In the presented research investigations of influence of the second component of PHB blends on the melting and crystallization behavior were conducted using differential scanning calorimetry (DSC). Three materials of different composition were analyzed: pure PHB fiber (100% PHB), PHB blend with silicone rubber (SR) (70% PHB, 30% SR) and PHB blend with nitrile rubber (NBR) (70% PHB, 30% NBR). The results were gathered in Table 1. and 2.

Table 1. Melting temperatures, overall crystallinity (blend) and crystallinity of PHB phase (PHB).

Sample	$T_{\text{melt}} (^{\circ}\text{C})$		X_c (blend) (%)	X_c (PHB) (%)
PHB (100)	1 st	176.9	55.1	55.1
	2 nd	169.5+158.9		
PHB/SR (70/30)	1 st	165.9+160.3	38.4	54.8
	2 nd	167.8+156.6		
PHB/NBR (70/30)	1 st	172.2+174.6	36.1	51.6
	2 nd	170.8		

Table 2. Crystallization temperatures and crystallite size distribution (ΔW).

Sample	$T_{\text{cryst}} (^{\circ}\text{C})$	ΔW
PHB (100)	55.3	19.5
PHB/SR (70/30)	66.5	31.5
PHB/NBR (70/30)	71.8	29.1

The values of crystallinity were calculated using following formulas:

$$X_c(\text{blend}) = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_f^0} \cdot 100$$

$$X_c(\text{PHB}) = \frac{X_c(\text{blend})}{W_{\text{PHB}}} \cdot 100$$

where ΔH_f^0 is the thermodynamic enthalpy of fusion per gram of PHB and ΔH_f is the apparent enthalpy.

The DCS thermograms for melting of PHB and its blends were presented in the Fig. 1.

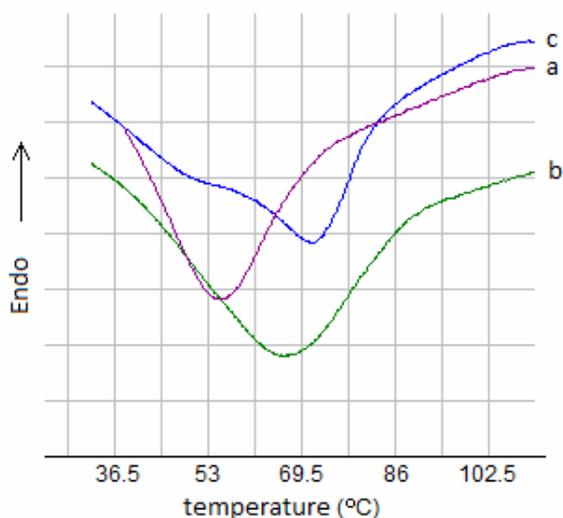


Fig. 1. DSC thermogram of PHB (a) and PHB/SR (b) and PHB/NBR (c) blends. Investigations of the melting and crystallization behavior of PHB and PHB blends showed, that introduction of the second component to the PHB material resulted in decrease of crystallinity of the blend and PHB fraction. An increase of crystallization temperature and decrease of melting temperature was noticed. The modification of PHB material caused also raise in crystallite size distribution.

Исследование прочностных характеристик съедобной упаковки на основе яблочного пюре с добавкой пластификатора карбоксиметицеллюлозы



А.В. Демидова, Н.В. Макарова, Д.Е. Быков, В.В. Бахарев, Н.Б. Еремеева, Т.О. Быкова, А.А. Гибштейн, В.А. Кирюшина

ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет», Самара

Среди различных типов биовозобновляемой биоразлагаемой упаковки съедобные пленки составляют объект нового направления исследований и привлекают пристальное внимание как ученых и производителей, так и потребителей. Съедобные пленки можно определить как первичную упаковку, изготовленную из съедобных компонентов, которая может быть съедена вместе с пищей. Съедобные покрытия и пленки как бы моделируют природные защитные оболочки продуктов питания растительного происхождения (ягод, семян). Они могут выполнять роль барьера или мембраны по отношению к воде и её парам, газам (диоксид углерода, кислород, этилен), имеют необходимую прочность, обеспечивают защиту от микробов, удобство применения, придают привлекательный внешний вид, сохраняют вкус, увеличивают срок хранения различных продуктов и т.п. В настоящее время основными пленкообразующими компонентами в составе съедобной упаковки являются: высокомолекулярные углеводы (производные крахмала, эфиры целлюлозы, хитозан, декстрины, альгинаты, каррагинаны, пектины), белки (коллаген, желатин, зеин, глютен, соевые изоляты, казеин), жиры (ацетоглицериды, глицериды, жирные кислоты) и их композиции. [1]

Применение карбоксиметилцеллюлозы в качестве пластификатора для образования пленочных покрытий может позволить решить актуальную задачу разработки технологии экологически чистых природных съедобных защитных покрытий пищевых продуктов.

КМЦ - одна из самых распространенных пищевых добавок целлюлозной природы. Традиционно эту добавку используют в технологиях хлебобулочных и кондитерских изделий, молочных и обезжиренных эмульсионных продуктов, безалкогольных напитков, где она выступает в качестве эмульгатора и стабилизатора многокомпонентных дисперсных систем, суспензий и эмульсий, обеспечивают необходимые консистенцию и вкусовые свойства [2].

Карбоксиметилцеллюлоза растворяется как в горячей, так и в холодной воде с образованием растворов различной вязкости, которая зависит от степени замещения гидроксильных групп в молекуле целлюлозы.

Для пищевых целей обычно применяют карбоксиметилцеллюлозу (КМЦ) со степенью замещения 0,65-0,95, образующую растворы высокой и средней вязкости. Как и в случае других производных, вязкость растворов КМЦ уменьшается с повышением температуры. Другая отличительная особенность раствора КМЦ - зависимость вязкости растворов КМЦ от pH. В интервале 5-9 вязкость практически не зависит от pH, при pH ниже 3 может возрастать, а при pH выше 10 может уменьшаться. Смеси карбоксиметилцеллюлозы и гидроксипропилцеллюлозы обладают синергическим эффектом, который проявляется в повышении вязкости их раствора по сравнению с вязкостью растворов индивидуальных добавок [3]. В настоящее время в пищевой промышленности весьма интенсивно ведутся разработки нетоксичных, легко утилизируемых съедобных пищевых пленок, полученных из природных биополимеров на основе целлюлозы.

Для пленок из метилцеллюлозы предложено использовать липидный защитный слой из белого пчелиного воска. С помощью электронного микроскопа и рентгеновских лучей изучена структура пленки. Именно восковой слой обеспечивает влагоизоляцию пленки [4].

В пленку из метилцеллюлозы и парафина добавляли ПАВ – гидрофобные (глицеринмоностеараты, глицеринмоностеаратацетат, сорбитмоностеарат) и гидрофильные (Твин 80, глицеринмоностеаратцитрат). Для этих пленок изучена прочность и паропроницаемость. Наивысшую прочность и меньшую паропроницаемость имеют пленки с глицеринмоностеаратом [5].

В пленку из оксипропилметилцеллюлозы вводили добавки из микрокристаллической целлюлозы. Для этих пленок исследована прочность на разрыв, растяжимость, проницаемость для водяного пара. Чем крупнее кристаллы целлюлозы и чем больше величина добавки, тем выше прочностные характеристики [6].

Обобщая результаты исследований пленочных материалов, изготовленных на основе метилцеллюлозы и карбоксиметилцеллюлозы, можно сделать вывод, что пленочные материалы на основе целлюлозы имеют невысокие прочностные характеристики и низкую влагоизоляцию без добавки дополнительных пластификаторов и защитного слоя.

Исходя из вышесказанного, было решено использовать для основы съедобных пленок продукт переработки яблок - яблочное пюре. В структуре яблок содержится протопектин, который может придать пластичность съедобной упаковке.

Целью данной работы является оценка прочностных характеристик для съедобных пленок, полученных на основе яблочного пюре и карбоксиметилцеллюлозы.

Материалы и методы исследования

В качестве основного компонента пленочных материалов используют яблочное пюре. В качестве пластификатора использовали суспензию КМЦ обработанную тепловым методом.

Для получения яблочного пюре яблоки подвергают предварительной подготовке, предусматривающей инспекцию, сортировку, калибровку и мойку, удаляют несъедобные части: плодоножку, семенную камеру и кожуру, нарезают и измельчают до пюреобразного состояния. Пюре протирают.

К полученной массе добавляют пластификатор КМЦ в концентрациях 1 %, 2 %, 3 %, которые вносят в процентном соотношении от общей массы яблочного пюре, подвергают гомогенизации. Формование пленочных материалов проводят методом прокатывания массы через вальцы с образованием съедобной пленки. Готовую пленку охлаждают до комнатной температуры.

Были изготовлены 3 образца пленки с различными видами и содержанием пластификаторов. Для полученных образцов пленки изучены прочностные свойства.

Испытание на растяжение пленочных материалов проводили на лабораторном испытательном комплексе, включающем разрывную машину INSTRON-5988 со скоростью приложения нагрузки в больших пределах от 0,001 мм/мин до 508 мм 0,001 мм/мин. Испытывались образцы шириной 10 мм при расстоянии между зажимами 150 мм. Определение деформационных свойств материалов с получением графика зависимости «нагрузка-перемещение», «напряжение-перемещение» и математическую обработку результатов проводили по программному обеспечению Bluehill 3. Исследования прочностных характеристик и толщины были проведены по ГОСТ Р 53226-2008.

В ходе экспериментов были получены данные о пределе прочности при разрыве для пленок. Результаты измерения были сравнены между собой, изменения механических характеристик приведены на рис. 3., анализ которого показывает, что увеличение содержания КМЦ в составе яблочного может способствовать увеличению механической прочности пленок.

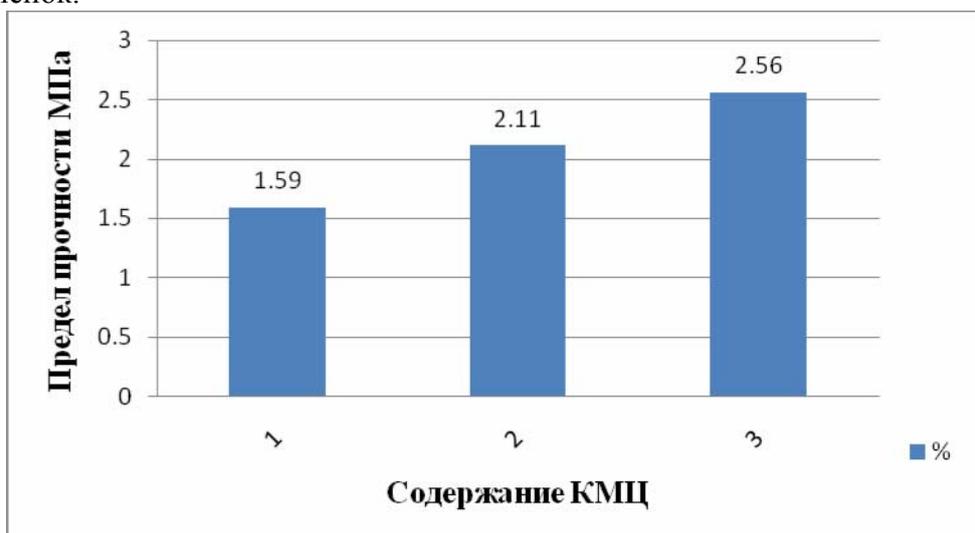


Рис. 3. Влияние КМЦ на физико-механические свойства пленочных материалов

На рис. 3 показано, что при использовании КМЦ в составе яблочного пюре прочность плёнки увеличивается незначительно. В целом логично констатировать, что повышение содержания КМЦ в состав пленок ухудшает пережевываемость пленок, при этом увеличение прочности не является значительным.

Выводы

Прочность съедобной пленки хотя и зависит от содержания КМЦ, но в целом зависит незначительно от роли КМЦ. Перспективность работ в области создания съедобных пленок очевидна, но очевидно, что для обеспечения съедобных пленок на основе яблочного пюре необходимыми прочностными характеристиками необходимо продолжить работы и сочетать КМЦ с другими пластификаторами.

Список литературы

1. Савицкая Т.А., Готина Л.А. Съедобные пленки - будущее упаковки пищевых продуктов. // Пищевая промышленность: наука и технологии. 2015. № 4. С. 87-94
2. Шаталов И.С., Шаталова А.С., Шлейкин А.Г. Влияние диальдегида крахмала на прочность и растяжение желатиновой плёнки. // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». – 2014. – № 3. С. 172-176

3. Просеков А.Ю., Равнюшкин С.А., Курбанова М.Г. Исследование параметров гидролиза молочно-белкового концентрата для капсулирования продуктов питания //Техника и технология пищевых производств. – 2009. – № 2. С. 56-60
4. Любешкина Е.Г. Полимерные материалы для упаковки пищевых продуктов: требования и принципы выбора. // Полимерные материалы. – 2009. – № 4. – С. 4-10
5. Kester J.J., Fennema O. An edible film of lipids and cellulose ethers: barrier properties to moisture vapor transmission and structural evaluation. // J. Food Sci. 1989. Vol. 54. N 6. P. 1383-1389
6. Dogan N., McHugh T.H. Effects of microcrystalline cellulose on functional properties of hydroxy propyl methyl cellulose microcomposite films. // J. Food Sci. 2007. Vol. 72. N 1. P. E016-E022.

Протеиновые напитки в питании студентов-спортсменов



Акимова Н.А., Страхова В.В., Бутко А.А., Владимирова С.Ф.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский экономический университет имени Г. В. Плеханова», Москва

Нормальное функционирование органов и систем организма человека - это вопрос, интересующий все слои населения без исключения. Поэтому в настоящее время проблемы здорового и качественного питания приобретают все большую актуальность и значимость. Ведь только с правильной и полноценной пищей мы получаем все необходимые питательные вещества: белки, жиры, углеводы, витамины, микро- и макроэлементы. [3]

Каждый вид деятельности человека предъявляет свои специфические требования к рациону питания. Для одной категории людей необходима высокая калорийность пищи, а для другой - высокое содержание белков.

В условиях быстрого развития научно-технического прогресса, изменений социально-культурной ситуации в образовательной среде происходит снижение физической нагрузки, но увеличивается нервное напряжение.

На сегодняшний день многие ВУЗы России стали уделять большое внимание созданию спортивных центров и клубов, расширяющие возможности активного досуга студентов. Занятия спортом улучшают самочувствие, снимают нервное напряжение, снижают усталость и повышают настроение. Успехи молодежи в учебе и занятиях спортом складываются на основе трех основных составляющих: тренировки, питание, отдых.

Существует большой ассортимент продукции для спортивного питания, включающий протеины, гейнеры, жиросжигатели, аминокислоты, предтренировочные комплексы, послетренировочные комплексы, питание для укрепления суставов и связок, протеиновые добавки.

Как показали исследования, которые проводились студентами ФГБОУ ВО «РЭУ им. Г.В. Плеханова» на кафедре химии и физики, далеко не все представленные на рынке продукты спортивного питания удовлетворяют заявленным характеристикам, в том числе зафиксированным на упаковке. Поэтому мы сочли актуальным проведение исследования, связанного с разработкой рецептуры и технологии приготовления протеинового напитка на кисло-молочной основе для спортивного питания. [1,2]

Данная работа выполнялась в соответствии с научной тематикой кафедры Ресторанного бизнеса, где в течение длительного периода времени проводятся работы по созданию нового ассортимента продукции для предприятий питания и изучению ее

качества. Объектом исследования было решено использовать добавку белковую сушеную «Быть Добру». Изготовитель: ООО «БД», Россия, г. Тула, ул. Макаренко, д.13, корп.6. (далее Добавка).

Целью данной научно-исследовательской работы являлась разработка рецептуры и технологии приготовления функционального напитка на кисло-молочной основе для спортивного питания с применением протеиновой Добавки и сенсорных характеристик напитка.

Из заявленной характеристики производителя следует, что Добавка может быть использована для улучшения практически любого рациона, так как она содержит белок и незаменимые аминокислоты (35 г в 100 г продукта), витамины группы В и углеводы. Последние входят в состав Добавки в малом количестве, что обеспечивает ее невысокую калорийность (385 ккал на 100 г).

Суточная потребность в белке для студентов-спортсменов составляет примерно 10-40г. Потребление разработанного напитка компенсирует суточную потребность в 3-4 приема.

Необходимо отметить, что напиток не подлежит хранению, в связи с чем, спортсмену следует его готовить непосредственно перед употреблением.

Данный напиток рекомендуется для систематического употребления спортивной молодежью в составе пищевых рационов, имеет профилактическую направленность.

В результате проведенной научно-исследовательской работы был разработан продукт с высокими технологическими, питательными и, что немаловажно, вкусовыми характеристиками на основе йогурта, включающего полноценный белок, углеводы и витамины группы В. Опыты с использованием добавки белковой сушеной «Быть Добру» будут продолжены. На основе полученных данных будет доработана рецептура, схема применения и дозировка данного продукта в спортивном питании.

Список литературы

1. Биохимическая физика: труды XV Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. Москва, 23-25 ноября 2015г. – Москва: РУДН, 2016. – 221с.
2. Журнал «Товаровед продовольственных товаров» № 2 / 2016 / Под ред. Ю.А. Щекина. – М.:Изд-во «Индустрия гостеприимства и торговли» Издательского Дома «ПАНОРАМА» совместно с Академией торговли и внешнеэкономических связей и Академией общественно-экономических наук и предпринимательской деятельности. 2016. – 64с.
3. НОВАЯ НАУКА: ОПЫТ, ТРАДИЦИИ, ИННОВАЦИИ: Международное научное периодическое издание по итогам Международной научно-практической конференции (12 сентября 2016 г., г. Омск). – Стерлитамак: АМИ, 2016. – 166с.

Качественный анализ белковой добавки сушеной на наличие незаменимых аминокислот, углеводов и витаминов группы В



Владимирова С.Ф., Страхова В.В., Бутко А.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский экономический университет имени Г. В. Плеханова», Москва

Полноценное питание – это основа жизнедеятельности организма человека. Его состояние напрямую зависит от состава и качества потребляемой пищи. Одной из важнейших проблем человека на сегодняшний день является проблема здорового и качественного питания. Белки, жиры и углеводы, витамины, микро- и макроэлементы должны поступать с пищей в организм в достаточном количестве.

Белок – необходимая составная часть пищевых продуктов. Определение аминокислотного состава белков имеет большое значение для понимания их структуры и характера биологического действия. [1,2]

Углеводы, поступающие в организм человека с пищей, играют огромную роль в энергетических процессах, так как основная часть энергии, необходимая клетке, освобождается именно при их расщеплении, служат запасным материалом и выполняют важную структурную функцию. [4]

Некоторые витамины, как и незаменимые аминокислоты, не синтезируются в организме человека, поэтому их важно получать с пищей. Дефицит витаминов приводит к нарушениям обмена веществ и другим серьезным последствиям. [3]

Сегодня правильное питание является более важным, чем когда-либо, поскольку процент генно-модифицированных и искусственно синтезированных продуктов питания постоянно растет. По крайней мере, 4 из 10 ведущих причин смерти – болезнь сердца, рак, инсульт и диабет – непосредственно связаны с тем, как и что мы едим.

В современном мире большая часть людей, особенно молодежь, часто употребляет различные добавочные продукты в качестве полноценного питания, в частности протеиновое питание. Это питание является абсолютно безопасным, если его использовать правильно, то есть в качестве дополнения к основному питанию. Достоинство протеинового питания в том, что его усваивание происходит с затратой гораздо меньшего количества времени и энергии.

В ФГБОУ ВО «РЭУ им. Г.В. Плеханова» на кафедре химии и физики студентами проводились научные исследования протеинового питания. Результаты показали, что данные продукты не могут полностью заменить натуральные, поскольку, если и содержит все незаменимые аминокислоты, то в недостаточном количестве.

В лаборатории биохимии было решено продолжить и расширить научно-исследовательскую работу студентов, и в качестве образца для исследования использовать добавку белковую сушеную «Быть Добру» отечественного производства, купленную в розничной сети. Поскольку по указу Президента импортозамещение является одной из основных задач экономики с 2014 года, было решено провести сравнительный анализ данного продукта с западными образцами.

Производитель заявляет, что в добавке содержатся белок, включающий все незаменимые аминокислоты, витамины группы В и моносахариды. Данный продукт вырабатывается из деактивированных дрожжей хлебопекарных при помощи оригинальной технологии, без добавления в конечный продукт каких-либо активных, питательных веществ, витаминов и т.д.

Также производителем заявлено, что применение белковой добавки сушеной, обусловлено ее составом, аналогичным содержимому белков клетки организма человека и, как следствие, способностью обеспечивать любые ткани организма всем необходимым питанием, если клетки по тем, или иным причинам его не получают. Это способствует восстановлению функций организма и резко повышает эффективность лечения.

В связи с этим складывается мнение, что исследуемая белковая добавка может служить альтернативой натуральному питанию.

Целью данной научно-исследовательской работы было:

- качественно определить наличие протеинов и незаменимых аминокислот в белковой добавке сушеной «Быть Добру» в сравнении с белковыми напитками других фирм;
- наличие углеводов и витаминов группы В,
- по результатам исследований ответить на вопрос: может ли данный продукт использоваться в качестве дополнения основного питания и стать альтернативной заменой аналогичных продуктов западного производства?

В качестве объектов исследования использовались следующие образцы:

1. «Быть Добру» – добавка белковая сушеная. Производитель: ООО «БД», Россия, г. Тула, ул. Макаренко, д. 13, корп.6. Масса нетто: 100 г.

2. [Mutant Whey – специализированный белковый пищевой продукт. Производитель: “Fit Foods Ltd”, 114-1553 Broadway Street, Port Coquitlam, BC, Canada V3C 6N9. Newt 4,54kg.](#)
3. Изолят соевого белка – соевый изолят, содержащий 90% белка. Производитель: ООО «ПЕРВЫЙ ДИЕТИЧЕСКИЙ», 109382 РФ, г. Москва, ул. Люблинская, д.72. Россия. Масса нетто: 300 г.
4. Energy diet – смесь сухая для приготовления коктейлей «КРАСНЫЕ ФРУКТЫ» (дополнительный источник белка). Производитель: LABORATOIRES SVM, 109, rue de la Gore, 67130, Muhibach sure Bruche, Франция. Масса нетто: 450 г.
5. Контрольный образец – белок куриного яйца.

На маркировке всех упаковок указан состав, в котором заявлено содержание яичного альбумина, сухого яичного белка, изолятов белков и других веществ, подтверждающих наличие полноценного белка в продукте. Некоторые производители указывают конкретный перечень содержащихся незаменимых и заменимых аминокислот.

Для быстрого и качественного определения содержания незаменимых аминокислот в протеиновом питании и белковых напитках различных марок были использованы стандартные методики качественных цветных реакций, а именно: биуретовая реакция (реакция Пиотровского), ксантопротеиновая реакция (реакция Мульдера) и реакция Фоля.

Аминокислотный анализ включает в себя 2 основные стадии: гидролиз белка до аминокислот и их количественное определение. [1]

1. Биуретовая реакция обусловлена наличием в соединениях пептидной группировки (-CO-NH-). Эту цветную реакцию с солями меди в щелочной среде дают биурет, амиды и имиды кислот, пептиды, пептоны и белки. Образующиеся окрашенные соединения являются комплексами. [2]

К растворам исследуемых образцов добавляли равный объем 10%-ного раствора гидроксида натрия (NaOH) и 2 капли 0,5%-ного раствора медного купороса (CuSO₄). Отмечали окраску во всех пробирках. [2]

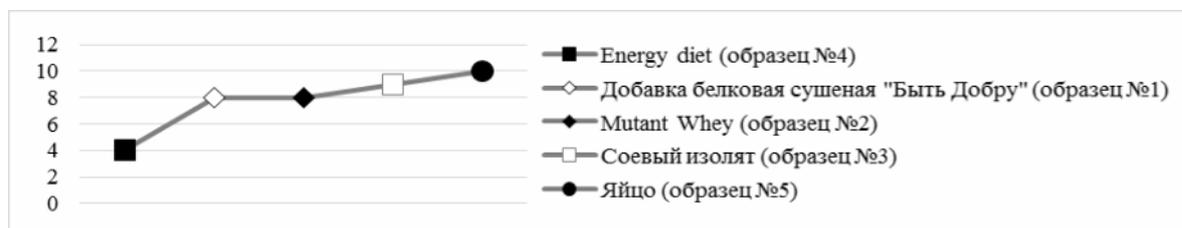


Рис.1 – Биуретовая реакция на наличие в соединениях пептидной группировки (-CO-NH-)

Результаты реакций были объективно оценены студентами учебной группы по десятибалльной шкале (учитывая, что оценка «10» - наивысшая, характерна для яичного белка, а «1» - наличие следов белка/аминокислоты, опыты с образцами проводились 6 раз) и наглядно представлены на графике.

Из графика видно, что качественная реакция на наличие в соединениях пептидной группировки (-CO-NH-) была максимально выражена в образце №5. В образце №3 наблюдалась чуть менее интенсивная окраска. В образцах №1 и №2 пептидная группировка также присутствовала. А в образце №4 окраска была выражена очень слабо. Таким образом, добавки «Быть Добру» и Mutant Whey по содержанию пептидной группировки почти не уступают натуральным продуктам питания: белку куриного яйца и соевому изоляту. А Energy diet содержит значительно меньше белка, хотя его количество, заявленное на упаковке, практически совпадает с количеством белка в «Быть Добру» (34,4 г и 35 г на 100 г соответственно).

2. Ксантопротеиновая реакция (реакция Мульдера) направлена на определение наличия циклических аминокислот, таких как фенилаланин, тирозин, триптофан и другие. Она обусловлена образованием нитропроизводных ароматических и некоторых гетероциклических радикалов. При взаимодействии белка с азотной кислотой происходит

нитрование ядра ароматических аминокислот, содержащихся в белке с образованием окрашенных соединений. [2]

К опытным образцам добавляли по 5 капель $\text{HNO}_{3\text{конц}}$. После образования осадка содержимое пробирок нагревали. Охладив смесь, осторожно по каплям добавляли избыток NH_4OH . Желтая окраска растворов становилась более интенсивной. Результаты представлены на рисунке 2.



Рис.2 – Ксантопротеиновая реакция на наличие ароматических и гетероциклических аминокислот

Из графика видно, что наиболее ярко выраженную желтую окраску имел образец №5, наименее выраженную – образец №4, то есть в образце №5 циклические аминокислоты содержатся в большем количестве, а в образце №4 почти отсутствуют. В образцах №1, №2 и №3 окраска была выражена слабее, но ароматические и гетероциклические аминокислоты в них также присутствуют в достаточном количестве.

3. Реакция Фоля определяет наличие серосодержащих аминокислот в белке, таких как цистин, цистеин и метионин. Белок, содержащий в своем составе серу, при нагревании с раствором щелочи гидролизует, сера отщепляется в виде сероводорода, который тут же превращается в сульфид натрия. Таким образом, для обнаружения серы в белках требуется разрушение белковой молекулы. Отщепляющуюся серу определяют с помощью уксуснокислого свинца, который реагирует с сульфидом, образуя черный осадок сернистого свинца. Если количество серы в белке незначительно, вместо осадка образуется коричневый раствор. [2]

К опытным образцам добавляли двойной объем 10%-ного раствора NaOH . Содержимое пробирок осторожно кипятили в течение 2 мин. Затем в каждую пробирку приливали по 1 мл $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ и вновь нагревали. Наблюдали изменение окраски в растворах. [2]

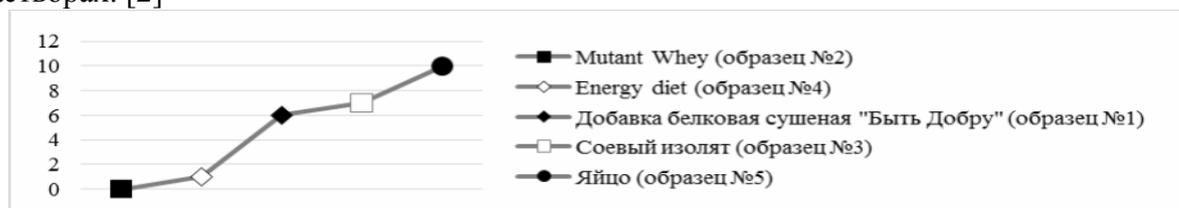


Рис.3 – Реакция Фоля на наличие алифатических серосодержащих аминокислот

Из графика видно, что наличие серосодержащих аминокислот максимально в образце №5. В образцах №1 и №3 они также содержатся в достаточном количестве. А в образцах №2 и №4 серосодержащие аминокислоты практически отсутствуют.

Для определения содержания углеводов (моносахаров) в добавке «Быть Добру» была проведена цветная **реакция Подобедова-Молиша** в сравнении с контрольными образцами: глюкозой и фруктозой.

В качестве объектов исследования использовались следующие образцы:

1. «Быть Добру» – добавка белковая сушеная. Производитель: ООО «БД», Россия, г. Тула, ул. Макаренко, д. 13, корп.6. Масса нетто: 100 г.
2. Глюкоза кристаллическая гидратная. Производитель: Россия. Масса нетто: 1,0 кг.
3. Фруктоза. Производитель: ЗАО «Диетпродукт» 143000, Россия, Московская обл., г. Одинцово, Транспортный проезд, д.1. Масса нетто: 300 г.

При проведении реакции Подобедова-Молиша в пробирки помещали растворы вышеуказанных образцов, приготовленных по стандартной методике, в каждую пробирку добавляли по 2 капли 10% спиртового раствора α -нафтола и осторожно, по стенке

пробирки приливали 3 мл $H_2SO_{4\text{конц.}}$, так, чтобы она не смешивалась с жидкостью и опускалась на дно. Вскоре на границе двух жидкостей образовалось кольцо красно-фиолетового цвета. Фурфурол и 5-оксиметилфурфурол, образующиеся из углеводов под действием серной кислоты, конденсируясь с 2 моль сульфированного α -нафтола, дают триарилметановый хромоген, который окисляется серной кислотой в окрашенное хиноидное соединение. [4]

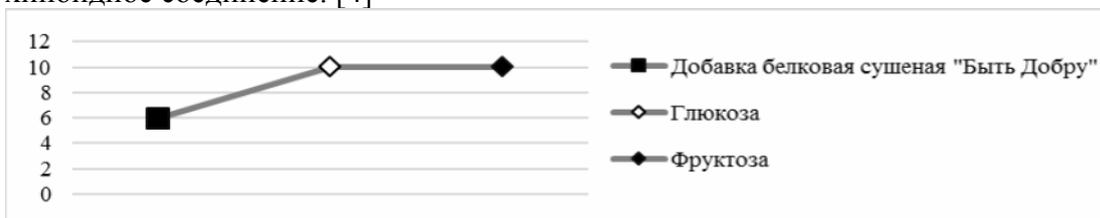
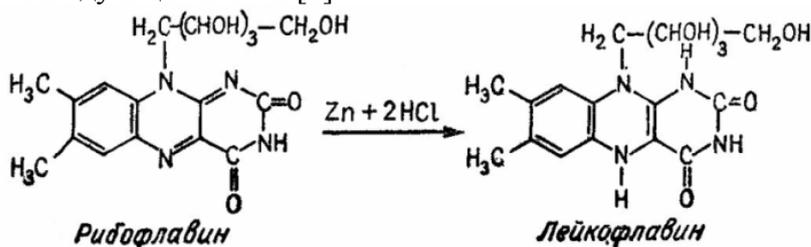


Рис.4 – Реакция Подобедова-Молиша на наличие моносахаров

Из графика видно, что максимальное количество углеводов (моносахаров) наблюдалось в образцах №2 и №3. В образце №1 углеводы также присутствуют, но в значительно меньшей степени.

Для быстрого и качественного определения витаминов группы В были проведены качественные реакции на выявление витаминов B_2 и B_6 .

1. Реакция обнаружения витамина B_2 (рибофлавина) обусловлена восстановлением рибофлавина, выделяющимся моноводородом сначала в родофлавин (красное окрашивание), а затем в лейкоформу бесцветную. Реакция протекает последующей схеме. [3]



В качестве объектов исследования использовались образцы:

- 1.«Быть Добру» – добавка белковая сушеная. Производитель: ООО «БД», Россия, г. Тула, ул. Макаренко, д. 13, корп.6. Масса нетто: 100 г.
- 2.Контрольный образец –витамин B_2 (рибофлавин). Производитель: ОАО «ФармстандартУфаВита» 450077, Россия, г. Уфа, ул. Худайбердина, 28.Масса нетто: 10 мл (10 ампул по 1 мл).

К 5 каплям исследуемого образца добавляли 5 капель $HCl_{\text{конц.}}$, после чего в них помещали кусочек металлического цинка и наблюдали изменение окраски. [3]

В образце №2 наблюдалось интенсивное окрашивание. В образце №1 окрашивание не наблюдалось, что не свидетельствует об отсутствии витамина. Не исключается выбор неправильной методики определения витамина в данном продукте. Возможно, необходим количественный метод определения, но качественный анализ наличие витамин B_2 не подтвердил.

2. Обнаружение витамина B_6 (пиридоксин) обусловлено взаимодействием витамина с раствором хлорного железа при последующем образовании комплексной соли, типа фенолята железа, красного цвета. [3]

В качестве образцов были использованы:

1. «Быть Добру» – добавка белковая сушеная. Производитель: ООО «БД», Россия, г. Тула, ул. Макаренко, д. 13, корп.6. Масса нетто: 100 г.
2. Контрольный образец - витамин B_6 (пиридоксин). Производитель: ОАО «БОРИСОВСКИЙ ЗАВОД МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ» Республика Беларусь, г. Борисов, ул. Чапаева, 64/27.Масса нетто: 10 мл (10 ампул по 1 мл).

К 5 каплям растворов исследуемых образцов добавляли равное количество 1%-ного раствора хлорного железа. После встряхивания содержимого появлялось красное окрашивание. [3]

В образце №2 наблюдалась яркая красная окраска. В образце №1 окрашивание было менее интенсивным, то есть витамин В₆ присутствовал, но в значительно меньшей степени.

Результаты исследований показали:

- 1) ароматические и гетероциклические аминокислоты (фенилаланин, тирозин, триптофан) присутствуют во всех исследуемых образцах в большей или меньшей степени, а алифатические серосодержащие (метионин, цистеин, цистин) присутствуют только в образцах №1, №3 и отсутствуют в образцах №2, №4;
- 2) моносахариды содержатся в исследуемом образце в достаточном количестве;
- 3) витамин В₆ (пиридоксин) в добавке также присутствует, однако витамин В₂ (рибофлавин) не был обнаружен.

Исходя из результатов исследования, можно сделать вывод: качественный анализ в отличие от количественного, конечно, не дает 100%-ной точности определения содержания того или иного соединения в общей массе вещества, но очевидно одно: добавка белковая сушеная «Быть Добру» может использоваться в качестве дополнения к основному питанию. Поэтому данный образец представляет интерес для научно-исследовательской работы студентов, и опыты с ним будут продолжены на определение наличия водорастворимых витаминов.

Список литературы

1. Журнал «Товаровед продовольственных товаров» № 2/ 2016 / Под ред. Ю.А. Щекина. – М.:Изд-во «Индустрия гостеприимства и торговли» Издательского Дома «ПАНОРАМА» совместно с Академией торговли и внешнеэкономических связей и Академией общественно-экономических наук и предпринимательской деятельности. 2016. – 64с.
2. Руководство к выполнению лабораторных и самостоятельных работ по биохимии. Белки и аминокислоты / Сост. А.Т. Ширшов, Б.Н. Анисимов, С.Ф. Владимирова. – М.: Изд-во Рос. экон. акад., 2007. – 32 с.
3. Руководство к выполнению лабораторных и самостоятельных работ по биохимии. Витамины и гормоны / Сост. А.Т. Ширшов, Б.Н. Анисимов, С.Ф. Владимирова. – М.: Изд-во Рос.экон. акад., 2007. – 31 с.
4. Руководство к выполнению лабораторных и самостоятельных работ по биохимии. Углеводы, липиды и ферменты / Сост. А.Т. Ширшов, Б.Н. Анисимов, С.Ф. Владимирова. – М.: Изд-во Рос.экон. акад., 2007. – 36 с.

Популяционно-геронтологический подход к решению вопроса о характере взаимоотношений между старением и болезнями,зависящими от возраста.



Т.А. Коновалова, В.Б. Мамаев

Московский Государственный Университет имени М. В. Ломоносова

Московский Физико-Технический институт (Физ-Тех), ФОПФ, кафедра биофизики;

Институт биохимической физики им. акад. Н.М. Эмануэля РАН; Москва, ул. Косыгина, 4.

vbmamaev999@mail.ru, konovalova777333@mail.ru

В настоящее время в геронтологии происходит смена приоритетов. Если вчера – главным был поиск и исследование биологических механизмов старения, то сегодня на первый план выходят медицинские проблемы практического применения полученных

знаний для целевого замедления старения человека. Очевидно, что для решения новых задач без взаимопонимания биологов и медиков не обойтись. Поэтому первую проблему, которую для этого надо решить, это выработать общий взгляд на взаимоотношения между старением и болезнями, зависящими от возраста. А это основные болезни, которые определяют жизнь людей в настоящее время (болезни системы кровообращения, злокачественные новообразования и т.п.). Так, например, в апреле 2016 года в Санкт-Петербурге на Международной конференции «Биомедицинские инновации для здорового долголетия», которая и так была посвящена подобным проблемам, было организовано специальное заседание «Classifying Aging as a Disease in context of ICD-11» [1]. Уместно заметить, что этому предшествовала многолетняя дискуссия на страницах научных журналов. В частности, в журнале «Journal of Gerontology Biological Sciences / Medical Sciences» опубликовали свои взгляды по этому вопросу мировые лидеры геронтологии [2, 3].

Высказывались самые разноречивые толкования связи старения и болезней, ассоциированных с возрастом. От крайнего взгляда, что все возраст-зависимые болезни суть проявления старения. До альтернативного утверждения, что никакой связи между возраст-зависимыми болезнями и старением нет. Просто одновременно и независимо они развиваются во времени, поэтому создается иллюзия, что между ними существует связь [4]. При этом приводят «расчеты», например, что ликвидация всех злокачественных новообразований увеличит продолжительность жизни только на два года. А климакс, от которого страдают все женщины после 50 лет, никак не проявляется на возрастной зависимости смертности.

Было высказано предположение, что существенную помощь для решения этих проблемы может оказать информация о механизмах экспериментального замедления старения, например, замедления старения мышей путем ограничения калорийности питания [5]. Наш взгляд, значительно эффективнее анализировать взаимоотношения между увеличением продолжительности жизни людей и развитием болезней, зависящих от возраста, в странах, в которых уже зафиксировано замедление старения [6].

Как известно, в 50-ые и 60-ые годы прошлого века в Финляндии была самая короткая для стран Западной Европы продолжительность жизни мужчин. В 70-ые и 80-ые годы были начаты профилактические мероприятия, направленные на оздоровление населения, такие как: борьба с курением и коррекция артериального давления, добавление селена в почву, а также в корм скоту. В результате к настоящему времени увеличилась не только средняя продолжительность жизни, но и продолжительность жизни во всех возрастных группах, что свидетельствует о замедлении старения населения [6].

В данном докладе мы представили анализ взаимоотношений смертности от основных болезней, зависящих от возраста. Что во многом проясняет проблему связи старения и ассоциированных с возрастом болезней.

Материалы и методы

1. В этой работе так как в работе [7] мы использовали данные ВОЗ [8] по смертности населения Финляндии с разбиением по полу, причинам смерти и возрастам за 1952 — 2011 годы. Возрастная смертность в этих базах данных представлена по пятилетним возрастным интервалам: 15-19 (17 лет), 20-24 (22 года), 25-29 (27 лет), 30-34 (32 года), 35-39 (37 лет), 40-44 (42 года), 45-49 (47 лет), 50-54 (52 года), 55-59 (57 лет), 60-64 (62 года), 65-69 (67 лет), 70-74 (72 года), 75-79 (77 лет), 80-84 (82 года), 85-89 (87 лет), 90-94 (92 года), 95 и более лет, которые далее мы обозначали, как возрастные группы: 17-летние, 22-летние, 27-летние и т.д.

2. Причины смерти в этих базах указаны в соответствии с международной статистической классификацией болезней [9] соответствующих пересмотров.

3. Для количественной оценки календарных (исторических) изменений смертности изучаемый период календарного времени разбили на 12 пятилеток и вычисляли средние значения за пятилетку для каждой возрастной группы. Таким образом, с одной стороны,

сглаживались ежегодные колебания демографических показателей, с другой стороны, появилась возможность легко проследить движение когорт, так как пятилетнее деление календарной шкалы совпадает с пятилетним делением возрастной шкалы.

Результаты

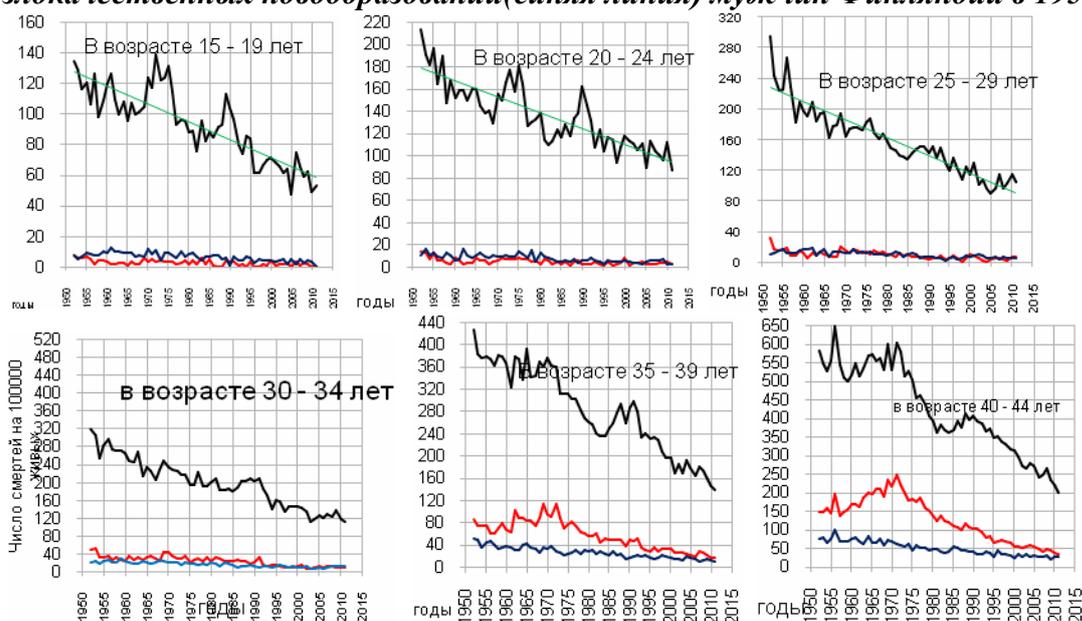
1. Мы убедились, что процесс замедления старения населения Финляндии продолжал развиваться и до 2011 года. В отличие от работы [6] появилась возможность исследовать это явление на более длительном историческом интервале. В трудах XV ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН ВУЗы [7] были приведены зависимости натурального логарифма смертности от возраста за весь исторический период с 1952 по 2011 годы, хорошо виден параллельный сдвиг возрастной смертности, что также дает возможность измерить эффект замедления старения мужчин Финляндии с 1970 по 2011 годы. Этот сдвиг равен 15 годам.

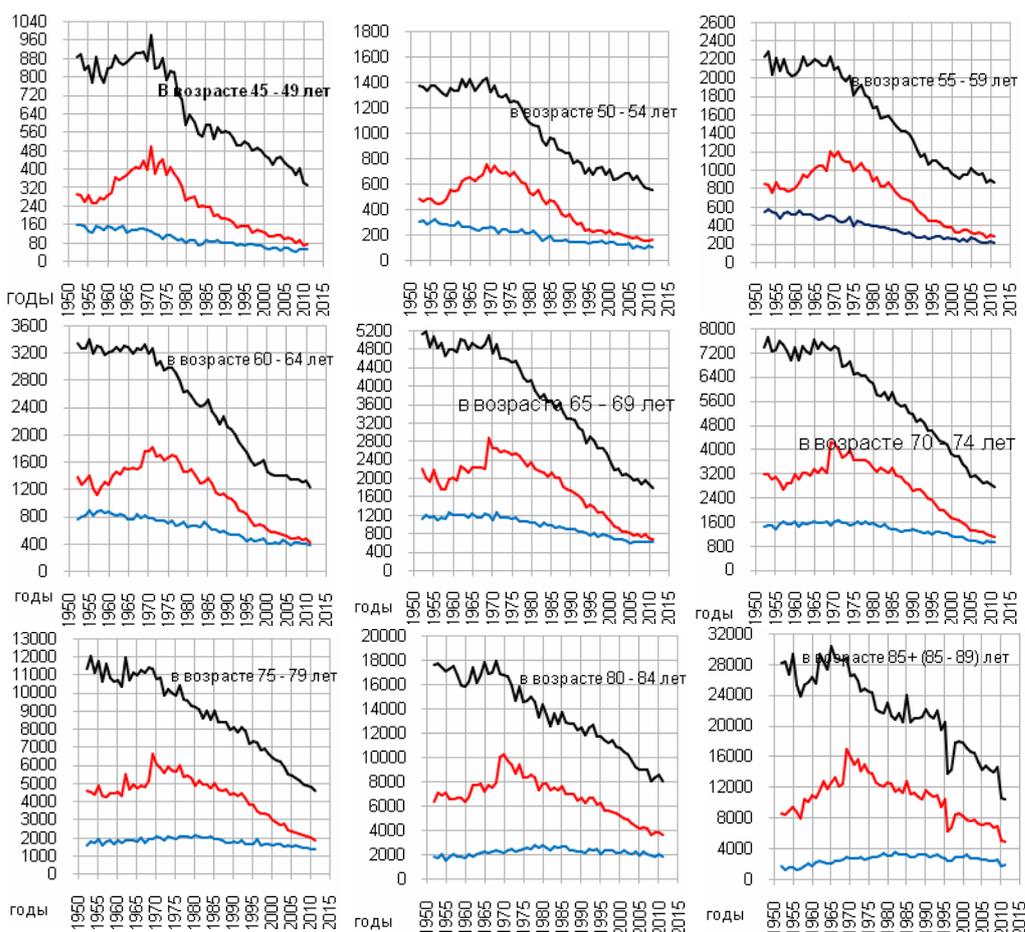
2. Для анализа механизмов замедления старения по изменению возрастной смертности населения Финляндии мы последовательно сопоставляли смертность от всех причин (общую смертность) со смертностью от важнейших классов болезней, установленных Международной статистической классификацией болезней [9]. Исторические динамики смертности мужчин Финляндии от **всех причин (ВП)**, **болезней системы кровообращения (БСК)** и **злокачественных новообразований (ЗН)** в пятнадцати возрастных группах собраны на рисунке 1. Во всех возрастных интервалах смертность населения Финляндии от всех стабильно снижалась с 1970 по 2011 годы.

Смертность же от злокачественных новообразований (ЗН) в возрастных интервалах 40-44, 45-49, 50-54, 55-59, 60-64 года линейно и постепенно снижалась. Для возрастных интервалов старше 65 лет на исторической динамике смертности от злокачественных новообразований появляются два отрезка линейной кинетики: на начальном отрезке колебания около одного и того же уровня или небольшое повышение, на втором - небольшое снижение.

Стоит отметить, что в класс **болезней систем кровообращения (БСК)** входят такие заболевания как: активный ревматизм; острая ревматическая лихорадка; хронические ревматические болезни сердца; гипертоническая болезнь; **ишемическая болезнь**

Рис. 1. Историческая динамика смертности на 100 000 человек от всех причин (черная линия), болезней системы кровообращения (красная линия) и злокачественных новообразований (синяя линия) мужчин Финляндии в 1952-2011 годы.





сердца (ИБС); нарушения легочного кровообращения; другие болезни сердца; цереброваскулярные болезни; болезни артерий, артериол и капилляров; болезни вен; болезни лимфатических сосудов и другие болезни системы кровообращения.

В работе, представленной ранее [7], было показано, что смертность от всех причин максимально снизилась с 1967-1971 гг. по 2007-2011 гг. в 2,5 раза в возрастном интервале 65-74 года. Смертность от БСК в этот период максимально снизилась в 5,3 раза в возрастном интервале 40-44 года. Смертность от ишемической болезни сердца в этом же возрастном интервале (40-44 года) максимально снизилась в 12,8 раза.

Сопоставляя степень уменьшения смертности от ишемической болезни сердца с аналогичным параметром для класса болезней системы кровообращения [7], можно отметить, что для младших и средних возрастных интервалов от 20 до 74 лет степень снижения больше для ИБС, тогда как для мужчин старше 75 лет степень уменьшения смертности для всего класса болезней системы кровообращения больше, чем для группы «ИБС» (таблица 1). Вероятно, в класс «БСК» входит такая группа болезней, кроме группы «ИБС», снижение смертности в которой в этот календарный период было больше чем во всем классе БСК. Что и влечет за собой наблюдаемый эффект.

Таблица 1. Разность степеней уменьшения смертности от ишемической болезни сердца с аналогичным параметром для класса болезней системы кровообращения.

Возрастной интервал	Разность степеней уменьшения смертности между ИБС и БСК
15-19	-3
20-24	3
25-29	3
30-34	4.3

35-39	4.9
40-44	7.5
45-49	3.7
50-54	2.2
55-59	0.8
60-64	0.8
65-69	0.4
70-74	0.1
75-79	-0.3
80-84	-0.4
85-89	-0.7

Анализируя таблицу 1, мы сделали вывод, что в класс «БСК» входит такая группа болезней, кроме группы «ИБС», снижение смертности в которой в период 75-89 лет было больше чем во всем классе БСК.

Рассматривая блок схему старения, можно выделить:

Блок №1 – оптимальное состояние организма;

Блок №2 – возрастные изменения показателей, имеющие физиологический смысл Факторов риска (показатели гемодинамики, уровень гликирования, холестерина и триглицеридов и т.п.)

Блок №3 состояния с ишемической болезнью сердца

Блок №5 инфаркты миокарда в р-те развития ИБС

Блок №4 состояния связанные с приходящими нарушениями мозгового кровообращения

Блок №6 инсульты связанные с нарушениями мозгового кровообращения.

Длинная стрелка к блоку №6 стрелка отражает больший отрезок времени, для того чтобы нарушить стройную систему мозгового кровообращения.



Проанализировав блок схему и учтя, что на приобретение инсульта нужен более долгий промежуток времени, можно сделать вывод, что именно увеличение больных с инсультом привело к результатам наблюдаемым в 4 таблице.

Сейчас перед врачами стоит сложная задача: «Как определить, когда идет воздействие на старение, а когда только на саму болезнь, не затрагивая процесс увеличения жизни?»

Ведь, когда изменяется только один патологический процесс, к примеру смертность от ИБС, то другие патологические процессы делают это изменение практически незаметным для демографической картины (увеличении продолжительности жизни), а когда мы видим, что воздействие приводит ко многим изменениям, это означает, что воздействие было на более фундаментальные механизмы, чем развитие одного патологического процесса, именно такое воздействие и ведет к замедлению старения и увеличения продолжительности жизни.

На примере Финляндии видно, что профилактические воздействия оказывали влияние как на коронарные сосуды сердца, так и на сосудистую систему мозга. Следовательно, можно сделать вывод, что действие было оказано на группу людей еще не имеющих определенной болезни, а лишь находящихся в состоянии «фактор риска». Вероятно, именно поэтому в Финляндии смогли увеличить жизнь населения на 15 лет.

Список литературы:

- [1] *Международная конференция «Биомедицинские инновации для здорового долголетия»*. Санкт-Петербург, 25 апреля – 28 апреля 2016 года:Круглый стол «Classifying Aging as a Disease in the context of ICD-11».
- [2] *Анисимов В.Н.* Молекулярные и физиологические механизмы старения. В 2 т.2/И. Спб.:Наука, 2008. Т.1. 468 с.
- [3] *Blumenthal H.T.* The aging-disease dichotomy: true or false? // *J. Gerontol. Biol. Sci.*, 2003. Vol.58A. P. 138-145.
- Butler R.N., Warner H.R., Williams T/F. et al.* The aging factor in health and disease: the promise of basic research on aging. // *Aging Clin. Exp. Res.*, 2004. Vol. 16. P. 104-111.
- Hayflick L.* «Anti-aging» is an oxymoron. // *J. Gerontol. Biol. Sci.*, 2004. Vol. 59A. P. 573-578.
- Holliday R.* The closer relationship between biological aging and age-associated pathologies in humans. // *J. Gerontol. Biol. Sci.* 2004. Vol. 59A. P. 543-546.
- [4] *Peto J.* Cancer epidemiology in the last century and the next decade. // *Nature*. 2001. Vol. 411. P. 390-395.
- [5] *Анисимов В.Н.* Молекулярные и физиологические механизмы старения. В 2 т.2/И. Спб.: Наука, 2008. Т.2. 434 с.:14.3. *Влияние ограничения калорийности питания на развитие возрастной патологии. С. 116-118.*
- [6] *Мамаев В.Б., Царин А.А., Миненкова Е.А.* Историческая динамика возрастной смертности: 1. Эволюция видовой продолжительности жизни населения Финляндии. // *Успехи геронтологии*, 2004. Вып. 15. С. 23-29.
- [7] *Коновалова Т.А., Мамаев В.Б., Кузнецов Л.В., Голубкина Н.А.* Развитие антиоксидантной концепции старения человека. // *Биохимическая физика: труды XV ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН – ВУЗы*. Москва 23-25 ноября 2015 г. – М.: РУДН, 2016. С. 70-76.
- [8] <http://www.who.int/en/>
- [9] *Руководство по международной классификации болезней, травм и причин смерти*. ВОЗ. Женева: 1980. 757 с.

Структурные факторы, определяющие защитные способности комплексных частиц на основе казеината натрия по отношению к окислению инкапсулированных в них ПНЖК.

Смотрова Н.В.¹, Чеботарёв С.А.¹, Воробьёва Н.С.², Theissen Saskia³ (trainee), Babejová Patrícia⁴ (trainee), Kittl Thomas⁵ (trainee), Антипова А.С.²

1 Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, г. Москва, РФ

2 Учреждение Российской академии наук Институт Биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, г. Москва, РФ

3 RWTH Aachen University, Germany

4 Slovak University of Technology of Chemical and Food Technology

5 Technical University of Munich, Arcisstraße 21, 80333 Munich, Germany

Современные данные нутрициологии и доказательной медицины свидетельствуют о недостаточном микронутриентном статусе населения во многих странах и в нашей стране по некоторым нутрицевтикам (от 40 до 80% населения). К таким нутрицевтикам относятся незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты (омега-3 и омега-6 ПНЖК), а также фосфолипиды, содержащие эти ПНЖК. Поэтому на сегодняшний день во всём мире актуальны разработка и выпуск функциональных продуктов питания, где главным направлением является молекулярный дизайн пищевых ингредиентов как систем доставки нутрицевтиков. Необходимость молекулярного дизайна таких систем доставки обусловлена тем, что, во-первых, многие нутрицевтики плохо растворимы в водной среде и в биологических жидкостях организма, что затрудняет их введение в широкий ассортимент пищевых продуктов на водной основе, а также может уменьшить их биодоступность в организме человека. И, во-вторых, многие нутрицевтики, как, в частности, омега-3 и омега-6 полиненасыщенные жирные кислоты, требуют дополнительной защиты от окисления кислородом воздуха и деградации. Системой доставки могут служить наноразмерные и супрамолекулярные комплексы нутрицевтиков с пищевыми биополимерами, например, белками [1]. Дополнительная защита и стабилизация ПНЖК также может быть обеспечена за счет введения растительных антиоксидантов [2].

Таким образом, цель данного исследования заключалась в выяснении ключевых структурных факторов, ответственных за защитные способности по отношению к окислению ПНЖК, супрамолекулярных комплексов на основе казеината натрия, включающих липосомы фосфатидилхолина (ФХ), наполненные омега-3 докозагексаеновой (ДГК) жирной кислотой в отсутствие и в присутствии растительных антиоксидантов (эфирного масла гвоздики и экстракта имбиря).

Материалы и методы.

В работе использовались следующие материалы:

- казеинат натрия (С8654, Sigma, New Zealand);
- соевый фосфатидилхолин (ФХ) (98% чистоты) (LipoidS 100; Lipoid GmbH, Germany): 3–7 % (омега-3) линоленовой кислоты, 59–70% (омега-6) линолевой кислоты);
- дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ) (Sigma (USA), P-5911, 99% чистоты);
- докозагексаеновая полиненасыщенная жирная кислота омега-3 (22:6) (ДГК) (D2534, Sigma, ≥ 98 % чистоты);
- 16-доксилстеариновая кислота (16-DSA, Sigma);
- Фосфатный буфер, приготовленный, с использованием NaH_2PO_4 и Na_2HPO_4 (Лаверна, Россия) (99.9% чистоты). Буфер обеспыливали через мембранный фильтр Millipore (размер пор 0.2 μm), pH буфера регулировался HCl/NaOH ;

- Эфирное масло из бутонов цветов гвоздичного дерева (ЭМГ) было предоставлено компанией “PlantLipidsLtd”, Индия, и добавлялось в количестве 4 % вес/вес к общему количеству липидов;
- Экстракт корня имбиря (*Zingiber officinale* L.) (ЭИ) был предоставлен компанией “Plant Lipids Ltd.”, Индия и добавлялся в количестве 4 % вес/вес к общему количеству липидов;
- Азид натрия (99.9% чистоты) (Лаверна, Россия) был добавлен к буферу (0.02 вес/объем %), использовался в качестве антимикробного агента;

Все исследуемые растворы готовились на бидистиллированной воде.

Приготовление растворов казеината натрия.

Казеинат натрия растворяли в фосфатном буфере (pH 7.0, I = 0.001 M, азид натрия 0.02%), перемешивая с помощью магнитной мешалки до полного растворения. Далее растворы центрифугировали (30 мин, 1800 g = 4000 об/мин, 20°C) для удаления оставшейся нерастворимой части образца белка. Концентрацию белка в растворе определили методом дифференциальной рефрактометрии (Shimadzu, Япония) по известному значению инкремента показателя преломления ($\nu = 0.20 \times 10^{-3} \text{ м}^3/\text{кг}$) белка. Готовые растворы белка хранили в холодильной камере при температуре 7 °C.

Приготовление чистых и смешанных липосом ФХ/ДПФХ, а также их комплексов с белком.

Для приготовления чистых и смешанных липосом ФХ/ДПФХ (0.1% вес/объем по ФХ/ДПФХ и для достижения соотношения $\omega\text{-3} : \omega\text{-6} = 1 : 1$ по весу) смешивали заданные количества фосфолипида, докозагексаеновой кислоты с фосфатным буфером (pH 7.0, I = 0.001 M, азид натрия 0.02%). Проводили механическую гомогенизацию полученной смеси при помощи гомогенизатора (Heidolph, Германия) – 2 мин при 20000 об/мин (один раз). В опытах с растительным антиоксидантом в процессе гомогенизации смеси добавляли эфирное масло гвоздики или экстракт имбиря (предварительно растворенные в этиловом спирте). Механически гомогенизированный раствор диспергировали далее при помощи ультразвукового гомогенизатора VCX-130, (Sonic&Materials, США) в течение 5 min (40% мощность сигнала) (соотношение времени озвучивания к времени охлаждения: 30 сек к 30 сек, 3 - 5 раз). Пропускали полученную дисперсию через мембранный фильтр с диаметром пор 100 нм, используя экструдер (AVANTI PolarLipid, США), – 19 раз. Полученный раствор чистых или смешанных липосом ФХ/ДПФХ сливали из 19 шприца, чтобы в раствор не попали большие по размеру липосомы.

Приготовленные липосомы использовали для приготовления комплексов с белком (0.1% вес/объем белка + 0.01% вес/объем по ФХ/ДПФХ в чистых и смешанных липосомах). Прогревали растворы чистых и наполненных липосом, а также комплексов белка с ними в течение 1 часа при 40°C в шейкере (GFL 3032, Германия).

Статическое и динамическое рассеяние света.

Параметры, которые были получены методом статического светорассеяния (прибор многоугольного лазерного светорассеяния ЛС-01, «Научные приборы», Санкт-Петербург):

средневесовое значение молярной массы (M_w), среднеквадратичный радиус инерции рассеивающей частицы (R_G), а также рассчитанная на их основе плотность (d). Ошибка метода при определении R_G составляла $\pm 5\%$, ошибка определения M_w составляла $\pm 10\%$.

Значение эффективного гидродинамического радиуса (R_h) рассеивающих частиц определяли в водных растворах методом динамического лазерного светорассеяния. Ошибка метода определения R_h составляла $\pm 10\%$.

Электронно-парамагнитный резонанс (ЭПР).

В основе метода лежит анализ по спектрам электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) вращательной подвижности стабильных нитроксильных радикалов. В качестве зонда использовалась гидрофобная 16-доксилстеариновая кислота, которая способна внедряться в липидный бислой мембраны [3]. Концентрация зонда в пробе обычно не превышала $6 \cdot 10^{-5}$ М. Регистрация спектров ЭПР осуществлялась с помощью спектрометра Bruker EMX (Германия). Микровязкость глуболежащих областей ($\sim 20-22$ Å) липосом характеризовалось временем вращательной корреляции τ_c зонда C_{16} , которое рассчитывалось по формуле для быстрого анизотропного вращения радикала [4].

Дифференциально-сканирующая калориметрия (ДСК).

Методом ДСК с помощью дифференциально-сканирующего калориметра ДАСМ-4М (Пушино, Россия) были получены термограммы базовой линии и исследуемых образцов (фосфатный буфер в температурном диапазоне от 20 °С до 50 °С, давление в 2.5 атм.). Сканирование по температуре для изучаемых образцов проводили со скоростью 0.5 °С/мин. Термодинамические параметры (t_{tr} , h_{peak}) и энтальпия (ΔH_{tr}) фазового перехода были определены из полученных термограмм с использованием программного обеспечения ДАСМ-4, а также программы OriginPro 8.0. Величина погрешности эксперимента не превышала 10% .

Результаты и обсуждение.

Для объяснения защитных способностей супрамолекулярных комплексных частиц по отношению к окислению смешанных липосом, которые были обнаружены нами ранее [5], методами статического и динамического светорассеяния была охарактеризована общая структура полученных комплексов.

Из данных представленных в таблице (Таблица 1) видно, что формирование комплексов во всех случаях приводило к значительной ассоциации белка, при этом самая высокая степень ассоциации (возрастание M_w в 46.4 раза) наблюдалась для комплекса казеината натрия с наполненными ДГК липосомами ФХ в присутствии эфирного масла гвоздики.

Таблица 1. Структурные параметры, полученные с помощью методов статического и динамического рассеяния.

Образец	$M_w \times 10^{-6}$ (Да)	R_G (нм)	R_h (нм)
Казеинат-Na	11.9	159	105
Казеинат-Na + [ФХ+ДГК]	134.2	224.1	97.8
Казеинат -Na + [ФХ+ДГК+ЭМ]	551.9	260.5	90.2
Казеинат -Na + [ФХ+ДГК+ЭИ]	314.6	200.2	85.3

При этом такая ярко выраженная ассоциация сопровождалась намного меньшим увеличением (только в 1.6 раза) размера комплексных частиц, что приводило к резкому возрастанию их плотности (Рис. 1). Такой рост плотности, вероятно, приводил к затруднению диффузии кислорода воздуха вглубь комплексных части, что наряду с антиоксидантным действием ЭМГ, обеспечивало найденную наиболее длительную защиту от окисления полиненасыщенных жирных кислот в таких комплексных частицах [5].

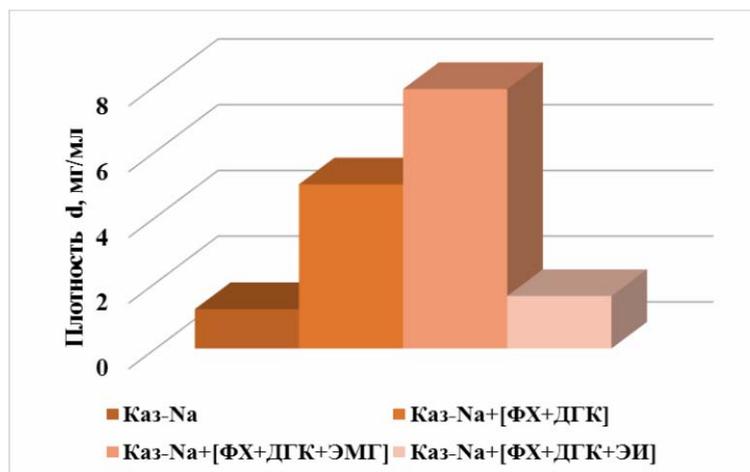


Рис. 1. Данные по плотности белка и комплексных частиц, полученных с помощью динамического и статического светорассеяния.

Для характеристики локальной структуры комплексных частиц был использован метод электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР), с помощью которого была проведена оценка состояния бислоя наполненных липосом ФХ в изучаемых комплексах с белком. Так, было установлено, что наполнение ДГК липосом ФХ приводило к незначительному уменьшению микровязкости ($\tau_c \times 10^{10} = 9.3 \text{ c}^{-1}$) бислоя липосом, в то время как присутствие растительных антиоксидантов немного повышало микровязкость ($\tau_c \times 10^{10} = 9.9 \text{ c}^{-1}$) бислоя. Также было отмечено, что добавление белка ко всем видам наполненных липосом ФХ приводило к существенному возрастанию микровязкости бислоя. При этом наибольшее возрастание микровязкости наблюдалось в случае комплекса белка в присутствии эфирного масла гвоздики ($\tau_c \times 10^{10} = 13 \text{ c}^{-1}$ по сравнению с контролем (без белка) $\tau_c \times 10^{10} = 9.9 \text{ c}^{-1}$). Данное повышение микровязкости могло быть связано со значительным уплотнением бислоя липосом ФХ за счет встраивания отдельных участков белковой молекулы, что в свою очередь также могло замедлять диффузию кислорода к углеводородным цепочкам ПНЖК и тем самым способствовать их долговременной защите от окисления.

Для выяснения природы влияния ДГК, растительных антиоксидантов и белка на состояние бислоев фосфатидилхолина в их комплексах мы также провели дополнительное исследование с применением дифференциально-сканирующей калориметрии (ДСК), с помощью которой были получены данные о термодинамических параметрах и энтальпии фазового перехода из гелевого состояния в жидкокристаллическое бислоя липосом модельного дипальмитоилфосфатидилхолина (ДПФХ). Было установлено, что как комплексы белка, так и растительные антиоксиданты с чистыми липосомами ДПФХ показывали рост энтальпии фазового перехода ($\Delta H_{tr} = 23.3 \text{ кДЖ/моль}$ и $\Delta H_{tr} = 20.1 \text{ кДЖ/моль}$ (ЭМГ), $\Delta H_{tr} = 19.4 \text{ кДЖ/моль}$ (ЭИ), соответственно) по сравнению с чистыми липосомами ДПФХ ($\Delta H_{tr} = 17.4 \text{ кДЖ/моль}$). Полученный результат, наиболее вероятно, свидетельствовал, либо о формировании дополнительных связей между встраиваемыми молекулами и углеводородными цепочками молекул ДПФХ в бислое, либо о более высокой энергетике взаимодействия углеводородных цепочек молекул ДПФХ между собой, приводящей к их более плотной упаковке, в результате встраивания молекул белка и растительных антиоксидантов. Эти данные хорошо согласуются с данными ЭПР. Однако, важно отметить, что при добавлении ДГК бислою ДПФХ уже при комнатной температуре переходил в жидкокристаллическое состояние, причем добавление растительных антиоксидантов и белка в рамках чувствительности метода ДСК значимо не изменяло фазовое состояние бислоя.

Заключение.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что ключевыми структурными факторами, обеспечивающими обнаруженную высокую защиту наполненных ДГК липосом ФХ в их комплексе с белком в отсутствие и в присутствии растительных антиоксидантов, являются высокая плотность полученных комплексных частиц, а также более плотная упаковка бислоев инкапсулированных липосом. При этом, оказалось, что растительные антиоксиданты, наряду со своей антиоксидантной функцией, обладают также значительными структурообразующими способностями, активно участвуя в формировании, как локальной, так и общей структуры изученных комплексных частиц.

Список литературы.

1. Semenova M.G., Antipova A.S., Zelikina D.V., Martirosova E.I., Plashchina I.G., Palma N.P., Binyukov V.I., Bogdanova N.G., Kasparov V.V., Shumilina E.A., Ozerova N.S. Biopolymer nanovehicles for essential polyunsaturated fatty acids: Structure–functionality relationships. // Food Reserch International. – 2016. – V. 88. – P. 70 – 78.

2. Semenova M.G., Antipova A.S., Misharina T.A., Alinkina E.S., Zelikina D.V., Martirosova E.I., Palma N.P., Binyukov V.I., Maltseva E.L., Kasparov V.V., Ozerova N.S., Shumilina E.A., Baeva K.A., Bogdanova N.G. Role of the covalent conjugate (sodium caseinate + maltodextrin) and a plant antioxidant in the protection against oxidation of the composite food ingredients, containing the equimass amount of ω -3 and ω -6 polyunsaturated fatty acids. // Gums and Stabilisers for the Food Industry 18: Hydrocolloid Functionality for Affordable and Sustainable Global Food Solutions. Editor(s): Peter A Williams, Glyn Phillipsthe. Cambridge: The Royal Society of Chemistry – 2016, P. 182 – 189.

3. Кузнецов А.Н. Метод спинового зонда. – М.: Наука, 1976. – 178 с.

4. Buttefield D.A., Whisnant C.C., Chesnut D.B. On the use of the spin labeling technique in the study of erythrocyte membranes. // Biochemica et biophysica acta. – 1976. – V. 426(4). – P. 697-702.

5. Воробьева Н.С., Смотрова Н.В., Kratzner С. (стажер), Антипова А.С., Мишарина Т.А., Воробьева А.К., Семенова М.Г. Защитные способности наноконтейнеров на основе пищевых биополимеров по отношению к окислению инкапсулированных в них ω -3 и ω -6 полиненасыщенных жирных кислот. // Биохимическая физика: Труды XV Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. Москва, 23-25 ноября 2015 г. Москва: РУДН, – 2016, С. 25-29.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда научных исследований, грант № 14-16-00102.

Thomas Kittl, Theissen Saskia, Babejová Patrícia были финансово поддержаны международной организацией по обмену студентами (IAESTE).

Выражаем благодарность центру коллективного пользования ИБХФ РАН под руководством А. Л. Коварского, где были проведены измерения методом ЭПР.

Исследование адсорбции и радикального сшивания белков на наночастицах



**Лопухова М.В., Бычкова А.В., Милютина А.Н., Данилова Т.А.,
Акинфиев В.С., Чикунова А.П., Пронкин П.Г., Розенфельд
М.А.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля
Российской Академии наук. Москва*

Магнитные наночастицы (МНЧ) имеют широкий спектр перспектив применения в медицине и биологии: в иммунологических исследованиях для очистки биологических жидкостей, для гипертермии, доставки лекарств и генов, а также для клеточной и молекулярной сепарации, тканевой инженерии. Большое преимущество магнитных наночастиц выражается в их магнитоуправляемости, что обеспечивает таргетную доставку действующего вещества. Созданное на поверхности МНЧ покрытие в дальнейшем определяет характер взаимодействия синтетических дисперсий и биологических жидкостей. Сами по себе наносистемы должны быть нетоксичны, биосовместимы, они должны обеспечивать свою локализацию в определенных тканях, органах, клетках. От природы покрытия зависит скорость выведения частиц, продолжительность циркуляции наносистем, распределение по тканям/органам, скорость диффузии наносистем и препаратов в тканях. Важно, чтобы покрытие обеспечивало стабильность наносистемы.

Покрытия на поверхности МНЧ могут быть функционально дополнены биовекторами (антителами/ферментами/нуклеотидами), лекарствами или генами. Для векторной доставки действующего вещества к биологической системе традиционно покрытия из белков закрепляют с помощью бифункциональных сшивателей (глутарового альдегида, карбодиимида) однако такие покрытия обладают рядом недостатков: образование полидисперсного ансамбля частиц в результате сшивания нескольких типов МНЧ; десорбция (срывание) белка из-за его непрочного закрепления, неконтролируемое сшивание макромолекул в растворе.

Методу бифункциональных сшивателей авторы данной работы противопоставляют радикальный подход, основанный на свойстве белков вступать в реакции свободнорадикального окисления и образовывать межмолекулярные сшивки в присутствии свободных радикалов [1, 2, 3, 4].

Цели и задачи: Исследовать влияния факторов температуры, соотношения компонентов, ионной силы буфера, pH и др. на адсорбцию и сшивание макромолекул белков на МНЧ методами спектрофотометрии и динамического светорассеяния. Провести оценку эффективной концентрации белка в составе устойчивого покрытия на поверхности МНЧ (с применением метода спектрофлуориметрии).

Материалы и методы:

В ходе работы были изучены магнитные наночастицы (МНЧ) размерных классов: 100 нм, 40 нм и 25 нм. Для оценки активности МНЧ использовали акриламидный тест.

Для получения белковых покрытий на поверхности МНЧ были использованы белки: бычий сывороточный альбумин (БСА), ЧСА (человечий сывороточный альбумин) и иммуноглобулин G (IgG). Работы проводились в 0,05 М фосфатном буфере с pH 5,8-7,4 в наличии и отсутствии 0,15 М NaCl. С помощью фибриногена (ФГ) проводили проверку прочности сформировавшегося покрытия на поверхности МНЧ [5, 6].

ФГ обладает высокой адсорбционной способностью за счет большого количества неполярных аминокислотных остатков в этом белке и электростатического взаимодействия отрицательно заряженных групп аминокислотных остатков белка с положительно заряженными наночастицами, в результате чего ФГ взаимодействует с поверхностью МНЧ с образованием кластеров микронных размеров. Благодаря вышеперечисленным свойствам ФГ возможно осуществить проверку прочности сформировавшегося покрытия на поверхности МНЧ (Рис. 1).

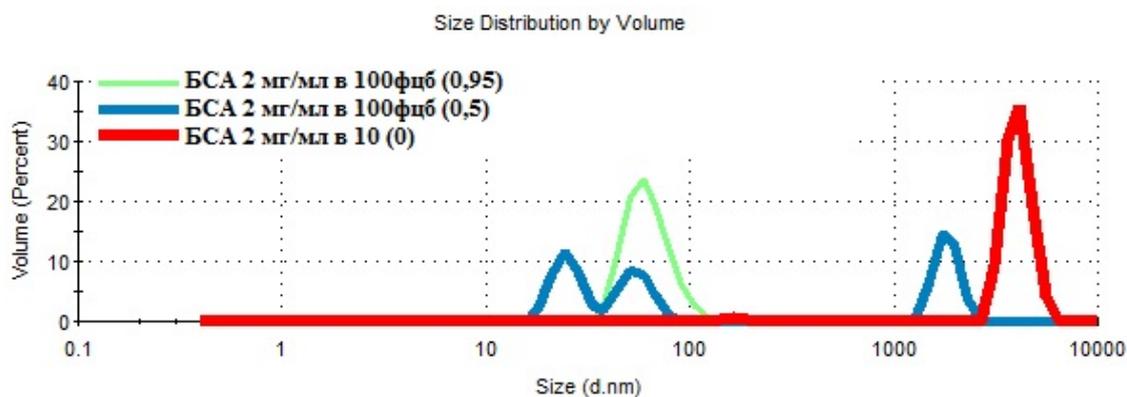


Рис. 1. Результаты ФГ теста для МНЧ с покрытием из БСА, концентрацией 2 мг/мл. В скобках указаны коэффициенты стойкости белкового покрытия: 1 – устойчивое покрытие; 0,5 — частичное покрытие; 0 — покрытие не сформировалось. Данные коэффициенты были в дальнейшем использованы для статистической обработки результатов в программе Origin v 6.1

Размерное распределение фиксировали с помощью динамического светорассеивания (ДСР) на приборе Zetasizer Nano-S (Malvern, Англия). Генерацию АФК отслеживали при помощи спектрофотометра СФ-2000 («Спектр», Россия).

Для оценки генерации $\text{OH}\cdot$ на поверхности МНЧ был использован о-фенилендиамин, взаимодействующий с данными радикалами с образованием продукта, имеющего максимум поглощения на 420-455 нм (Рис. 2.).



Рис. 2. Образование продуктов окисления ФДА.

Результаты и обсуждения:

В данной работе авторами были получены белковые покрытия путем адсорбции белка иммуноглобулина G (IgG) на поверхности магнитных наночастиц. Также были получены сшитые покрытия с бычьим сывороточным альбумином (БСА), человеческим сывороточным альбумином (ЧСА) путем генерации свободных радикалов на поверхности МНЧ магнетита. На основании полученных данных обнаружена зависимость устойчивости покрытий из сывороточного альбумина (БСА, ЧСА) от продолжительности инкубации; соотношения белок/наночастицы (Рис. 3.); влияния температуры (в диапазоне 10-32°C) (Рис. 4.); Для IgG показано, что эффект кластеризации МНЧ в белковом покрытии уменьшается с ростом значения pH (Рис. 5.) и растет с увеличением ионной силы (Рис. 6.).

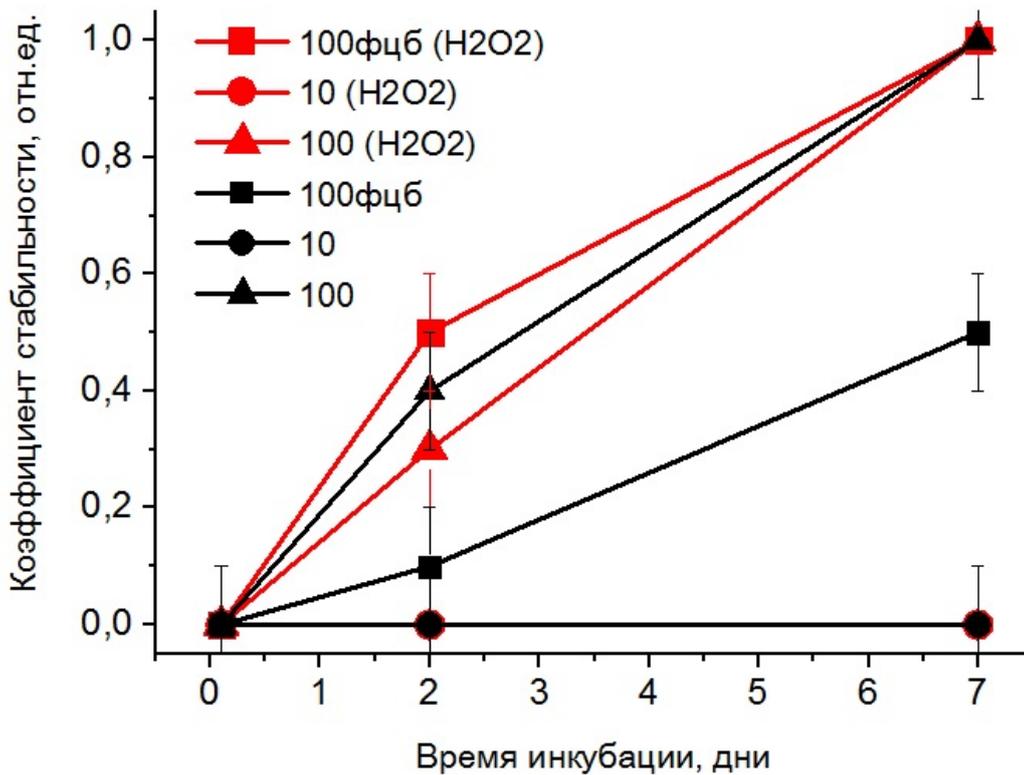


Рис. 3. Анализ устойчивости покрытия из БСА (2 мг/мл) на МНЧ 100 нм в фосфатном буфере pH 5,8 0 NaCl с различным разбавлением магнитной жидкости (результаты ФГ-теста).

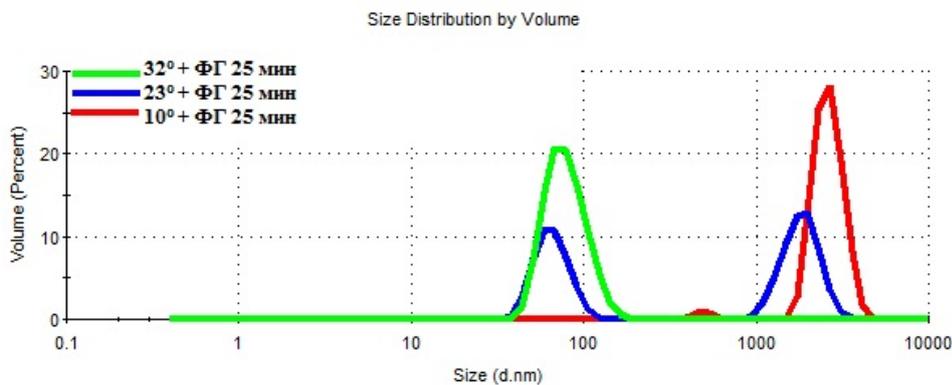


Рис. 4. Анализ устойчивости покрытия из БСА (6,4 мг/мл) на МНЧ 40 нм в фосфатном буфере pH 5,8 0 NaCl (результаты 30-минутного ФГ-теста).

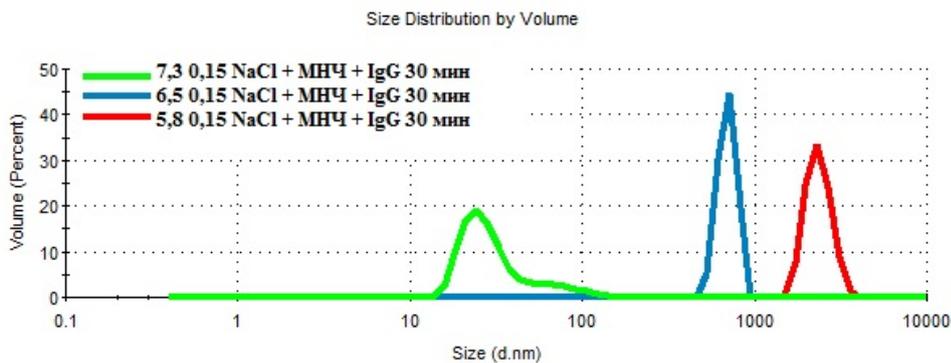


Рис. 5. Взаимодействие IgG (2 мг/мл) с МНЧ 25 нм. Инкубация 30 мин.

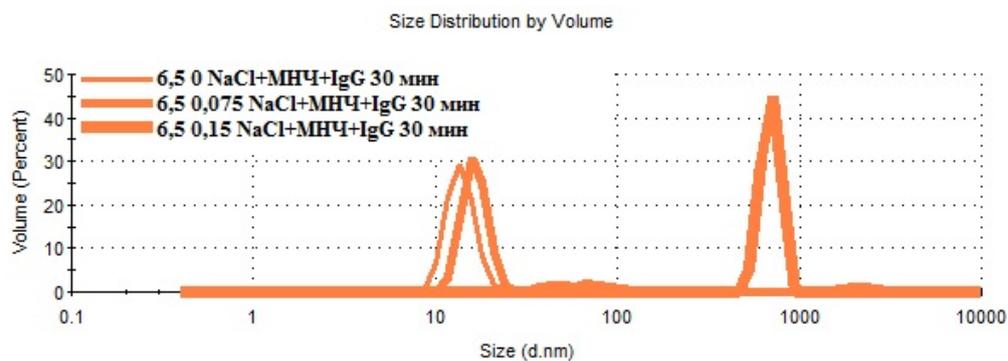


Рис. 6. Взаимодействие IgG (2 мг/мл) с МНЧ 25 нм. Инкубация 30 мин.

Для оценки свойств альбумина в системах МНЧ-белок использовали флуоресцентные зонды ТКБ (3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-4,5,4',5'-дibenзо-9-этилтиакарбоцианин-бетаин) и ОКБ (3,3'-ди-(γ -сульфопропил)-5,5'-дифенил-9-этилоксакарбоцианин-бетаин). ОКБ и ТКБ образуют устойчивые комплексы с альбумином, получены данные о высоких эффективных концентрациях альбумина на поверхности наночастиц (Рис. 7.).

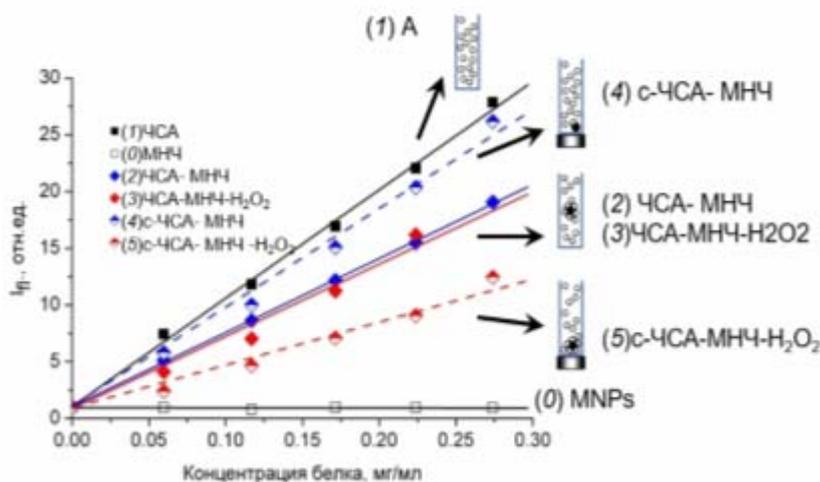


Рис. 7. Показатель эффективной концентрации альбумина (I_f) в растворе ЧСА 2,63 мг/мл (Контроль 1), МНЧ с концентрацией 0,1 об.% (Контроль 2), растворе МНЧ и ЧСА (Образец 1), растворе МНЧ и ЧСА, обработанном H_2O_2 (Образец 2), надосадочных растворах, отобранных из последних двух систем в процессе магнитной сепарации (Образцы 3 и 4). Использован краситель ТКБ.

Литература

1. Бычкова А. В., Сорокина О. Н., Розенфельд М. А. и др. Многофункциональные биосовместимые покрытия на магнитных наночастицах // Успехи химии. 2012. 81 (11). С. 1026–1050.
2. Stadtman E.R., Levine R. L. Free radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins // Amino Acids. 2003. V. 25. P.207-218.
3. Бычкова А. В., Розенфельд М. А., Леонова В. Б. и др. Свободнорадикальное сшивание молекул сывороточного альбумина на поверхности наночастиц магнетита в водной дисперсии // Коллоидный журнал. 2013. Том 75. № 1. С. 9–16.
4. Патент РФ на изобретение № 2484178 от 10.06.2013. Заявка на Патент РФ № 2011136972, приоритет от 08.09.2011. Розенфельд М.А., Бычкова А.В., Сорокина О.Н., Коварский А.Л., Леонова В.Б., Ломакин С.М., Макаров Г.Г. Способ получения белковых покрытий на поверхности твердых тел, содержащих ионы металлов переменной валентности.

5. Бычкова А. В., Сорокина О. Н., Коварский А. Л. и др. Взаимодействие белков плазмы крови с наночастицами магнетита // Коллоидный журнал. 2010. Том 72. № 5. С. 694–700.
6. Бычкова А. В., Пронкин П. Г., Сорокина О. Н. и др. Исследование сшитых по свободнорадикальному механизму белковых покрытий на магнитных наночастицах методом спектрально-флуоресцентных зондов // Коллоидный журнал. 2014. Том 76. № 4. С. 420–428.

Работы по созданию функциональных белковых покрытий из альбумина и иммуноглобулина G на магнитных наночастицах, разработка подходов к контролю генерации свободных радикалов системой Фентона в растворе и на поверхности магнитных наночастиц выполняются при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 15-33-70019 «мол_а_мос». Исследование структурной и химической модификации белков крови при окислении в растворе и на поверхности нанообъектов выполняется при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60244 мол_а_дк. Спектрально-флуоресцентные измерения проводятся при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-03-00735.

Роль аминокислотных остатков активного центра ферментативного комплекса Ras-GAP в электростатической стабилизации переходного состояния реакции и количественные оценки этой стабилизации



Лычко Леонора Алексеевна, Анучин Николай Михайлович

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Химический факультет, лаборатория Химической кибернетики,
Москва*

Белок Ras относится к семейству малых ГТФаз и отвечает за передачу сигналов в клетке, участвуя в регуляции процессов роста и деления клеток. Свою сигнальную активность данный фермент проявляет только когда связан с молекулой ГТФ (гуанозинтрифосфата), и теряет способность к передаче сигналов после гидролиза ГТФ до ГДФ. Сам по себе гидролиз гуанозинтрифосфата протекает в белке Ras крайне медленно, но ускоряется на много порядков при участии так называемых ГТФаза-активирующих белков (GAP). В данной работе рассматривался вопрос о том, каким образом белок GAP участвует в реакции гидролиза ГТФ и как аминокислотные остатки активного центра участвуют в перераспределении зарядов на атомах в ходе реакции.

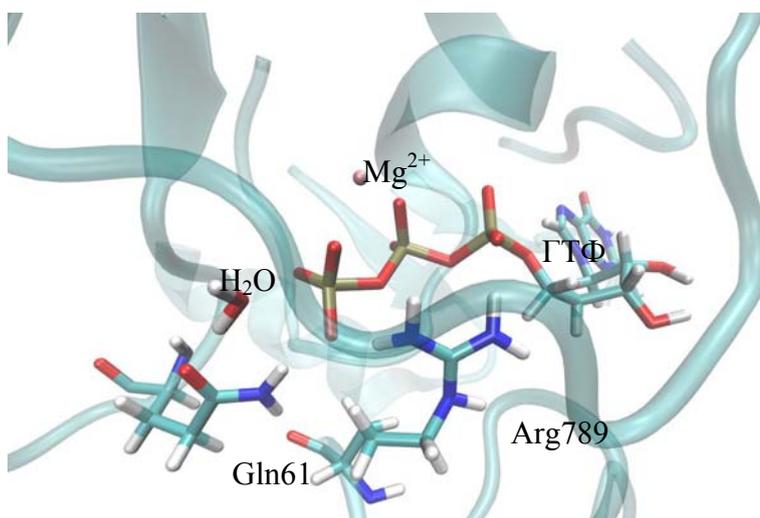


Рисунок 1. Геометрия активного центра комплекса Ras-GAP в ГТФ-связанном состоянии
 На первом этапе работы были рассчитаны профили потенциальной энергии для данной реакции, соответствующие различным конфигурациям активного центра (рисунок 2). Расчёт проводился в программе CP2K методом комбинированной квантовой механики и молекулярной механики, квантово-химический расчёт проводился согласно теории функционала плотности с функционалом BLYP в базе плоских волн с использованием псевдопотенциалов. Согласно результатам расчётов, вид профилей потенциальной энергии сильно зависит от того, какое положение занимает боковая цепь аминокислотного остатка аргинина-789 белка GAP по отношению к гуанозинтрифосфату, и от вида сетки водородных связей в активном центре.

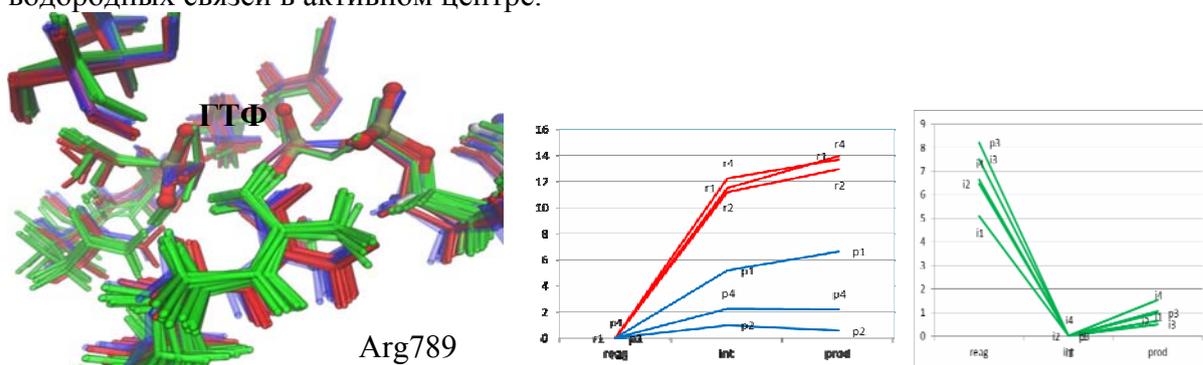
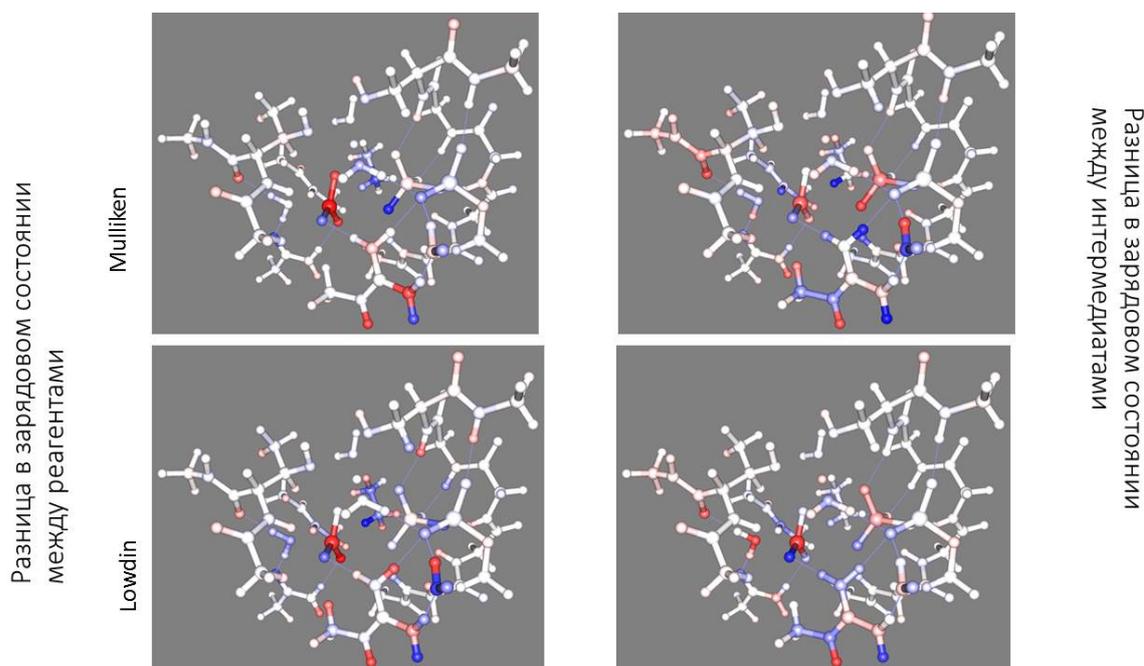


Рисунок 2. Положение стационарных точек (минимумов) на профилях потенциальной энергии зависит от геометрии активного центра.

Далее для выяснения механизма влияния остатка аргинина-789 и других аминокислотных остатков был проведён анализ перераспределения зарядов на атомах активного центра. Несмотря на то, что разные схемы оценки зарядов дают количественно различные результаты, качественно результаты совпадают: видно, что в тех случаях, когда с атомами кислорода образованы наиболее стабильные водородные связи заряженной группой аргинина, *изменение* заряда на атоме γ -P в ходе реакции минимально, и изменение зарядов на атомах водорода и азота больше, чем на атомах – непосредственных участниках химической реакции. В случае же недостаточного взаимодействия между окружающими аминокислотными остатками и лигандом изменение зарядов на атомах ГТФ существенно, что ведёт к недостаточной стабилизации интермедиата в ходе реакции.



Итак, проведённые расчёты для реакции ферментативного гидролиза ГТФ показали, что при определённых конформациях активного центра белка переходное состояние лучше стабилизировано, чем при других. Был проведён анализ электронной плотности и зарядов на атомах субстрата и активного центра фермента и найдены закономерности перераспределения зарядов, объясняющие такую разницу в электростатической стабилизации.

Лиганд-зависимые элементы булевой логики на основе наночастиц и ДНК-интерфейсов



А.В. Васильева¹, В.Р. Черкасов¹, М.П. Никитин^{1,2}

¹Московский Физико-Технический Институт (государственный университет)

²Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук

Адресная доставка лекарств – важное направление для современной медицины. Создание «умных» носителей для лекарственных препаратов даёт большое количество преимуществ, основные из которых – увеличение специфичности действия препарата, защита от преждевременного выведения из организма, регуляция кинетики высвобождения действующего вещества и улучшение его биодоступности. Большой интерес для терапии широкого класса заболеваний представляет использование биокомпьютинга, то есть создание молекулярных систем, реагирующих не на один внешний фактор для высвобождения лекарства, а на их логическую комбинацию [1].

Недавно коллективом нашей лаборатории был предложен принципиально новый подход к конструированию носителей для активной доставки лекарств. Метод заключается в создании комплексов из наночастиц, способных к специфичной разборке под воздействием сложной комбинации аналитов. В частности, была продемонстрирована реализация полного набора логических функций на основе белковых интерфейсов [2].

Целью представленной работы была разработка таких конструкций на основе ДНК-интерфейсов. Эффективность ДНК-конструкций для сложной обработки сигналов и доставки лекарств уже была показана на примере гибридизационных каскадов [3] и так называемого «ДНК-оригами» [4]. Более того, ДНК-аптамеры позволяют анализировать как олигонуклеотиды, так и белки или малые молекулы, что делает систему ещё более универсальной [5].

В данной работе была создана модельная система, которая представляет из себя комплекс из микро- и наночастиц, самособирающийся за счёт специфичных ДНК-взаимодействий. В основе конструкции находится «центральная частица» - магнитная микросфера, на поверхности которой иммобилизованы биотин (модель лекарственного средства) и олигонуклеотиды интерфейса. Биотин стерически экранируется золотыми наночастицами, взаимодействующими с системой с помощью ДНК-интерфейса. В случае наличия в растворе специфической комбинации входных веществ, взаимодействующих с интерфейсом, золотые частицы диссоциируют, и биотин становится доступным для взаимодействия с частицами-мишенями. В свою очередь, частицы-мишени способны сигнализировать о своём присутствии на поверхности центральных частиц за счёт ферментативной реакции, продукт которой регистрируется как выходной сигнал системы.

Для первичного подбора условий конъюгаций и работы с комплексами была исследована описанная система с простейшим вариантом ДНК-интерфейса логической функции ДА. Также, с целью доказательства универсальности системы по отношению к типу детектируемых молекул, простейший интерфейс был выполнен с помощью аптамеров и была показана его эффективность для реализации логической функции ДА с низкомолекулярным входным сигналом – молекулой аденозинтрифосфата.

Были теоретически разработаны и исследованы несколько различных вариантов ДНК-интерфейса для функции ДА, продемонстрировавших разную эффективность. На основе данных о работе этих систем сделаны выводы о применимости теоретического моделирования олигонуклеотидных интерфейсов для наночастиц. Изучено влияние нуклеотидного состава олигонуклеотида на эффективность конъюгации с частицами.

Продемонстрирована возможность создания других логических функций на основе более сложных ДНК-интерфейсов. В частности, созданы первичные прототипы для логических функций И и ИЛИ, ведётся работа по оптимизации данных конструкций и созданию рабочих систем для полного набора логических функций.

Литература

- [1] *Evans A.C. [et al.] Biocomputing nanoplatfoms as therapeutics and diagnostics // J Control Release. 2016. V. 240. P. 387–393.*
- [2] *Nikitin M.P. [et al.] Biocomputing based on particle disassembly // Nat. Nanotechnol. 2014. V. 9. P. 716–722.*
- [3] *Srinivas N. [et al.] On the biophysics and kinetics of toehold-mediated DNA strand displacement // Nucleic Acids Res. 2013. V. 41(22). P. 10641-58.*
- [4] *Douglas S.M. [et al.] A Logic-Gated Nanorobot for Targeted Transport of Molecular Payloads // Science. 2012. V. 335(6070). P. 831-4.*
- [5] *Song S. [et al.] Aptamer-based biosensors // TrAC. 2008. V. 27. P. 108-117.*

Исследование влияния активаторов теломеразы на пролиферативный потенциал нормальных диплоидных клеток человека

Насонов М.М., Мамаев В.Б.

Московский физико-технический институт (государственный университет), кафедра биофизики, г. Долгопрудный

Нормальные диплоидные клетки человека проходят ограниченное количество делений, то есть имеют ограниченный пролиферативный потенциал. Это явление обусловлено укорочением ДНК-белковых структур – теломер, расположенных на концах хромосом. Они защищают линейные концы хромосом эукариот от деградации и слияния, поддерживают стабильность генома. Аппарат репликации клетки не в состоянии

обеспечить полную репликацию концов хромосом, кроме того теломеры подвергаются воздействию нуклеаз и других деструктивных факторов. В результате при каждом делении клетки теломеры укорачиваются (рис. 1). У большинства организмов основным механизмом поддержания длины теломер служит достраивание теломерных повторов ДНК ферментом теломеразой. Этот фермент удлиняет 3'-конец хромосомы, тогда как комплементарная цепь достраивается ДНК-полимеразами.

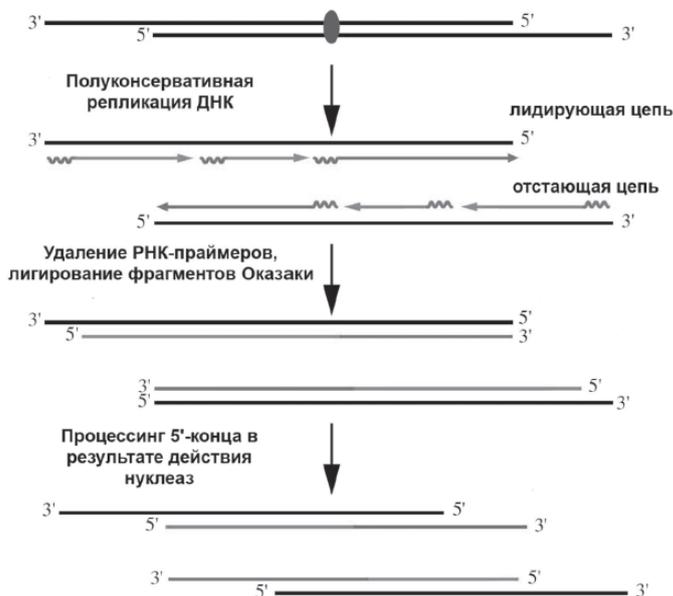


Рис. 1. Укорочение теломер в результате «недорепликации».

Но этот фермент постоянно активен только в половых и стволовых клетках, поэтому все прочие (соматические) клетки имеют ограниченный пролиферативный потенциал приблизительно в 50 делений. Явление ограниченности количества делений известно также как «репликативное старение», которое с момента открытия и до сих пор считается одним из важнейших факторов обуславливающих старение многоклеточных организмов.

Активность теломеразы, ее взаимодействие с теломерами и его регуляция продолжают активно исследоваться в ведущих институтах. Огромный интерес представляет возможность активации теломеразы в соматических клетках. Работ в этом направлении сделано уже много, но в подавляющем большинстве из них активация теломеразы выполнена при помощи различных искусственных экспрессионных конструкций, таких как плазмиды или вирусы. Такие манипуляции законодательно запрещены для применения на людях в большинстве развитых стран. Однако в последнее время был открыт класс веществ естественного происхождения способный увеличивать теломеразную активность на несколько порядков. Важно, что эти вещества уже прошли клинические испытания и могут применяться на людях. Однако, несмотря на определенное количество работ, убедительных данных об увеличении этими веществами пролиферативного потенциала соматических клеток еще не имеется. Поэтому главная цель этой работы – определить возможности этих веществ влиять на пролиферативный потенциал соматических клеток при различных условиях. Данные полученные нами могут уже в ближайшее время быть полезными для развития методов регенеративной медицины, так как многие из них подразумевают культивирование клеток пациента *in vitro*, и репликативная проблема мешает наработать клетки в нужном количестве или провести с ними нужные процедуры. Помимо этого применение подобных препаратов должно стать важной частью методик борьбы со старением человека.

В этом случае большой интерес представляет открытие новых веществ влияющих на активность теломеразы, с этой целью в процессе имперического скрининга биологически активных веществ, проводимого компанией GERON в 2004 году, был выделен класс соединений из экстракта растения *Astragalus membranaceus*. *Astragalus membranaceus* известен своим широким применением в народной китайской медицине, чем и привлек к

себе внимание. В процессе исследования его экстракта было открыто семейство веществ, получившее название астрагалозиды (см. рис 2). Показано, что некоторые астрагалозиды способны активировать теломеразу в соматических клетках человека (см. рис 3).

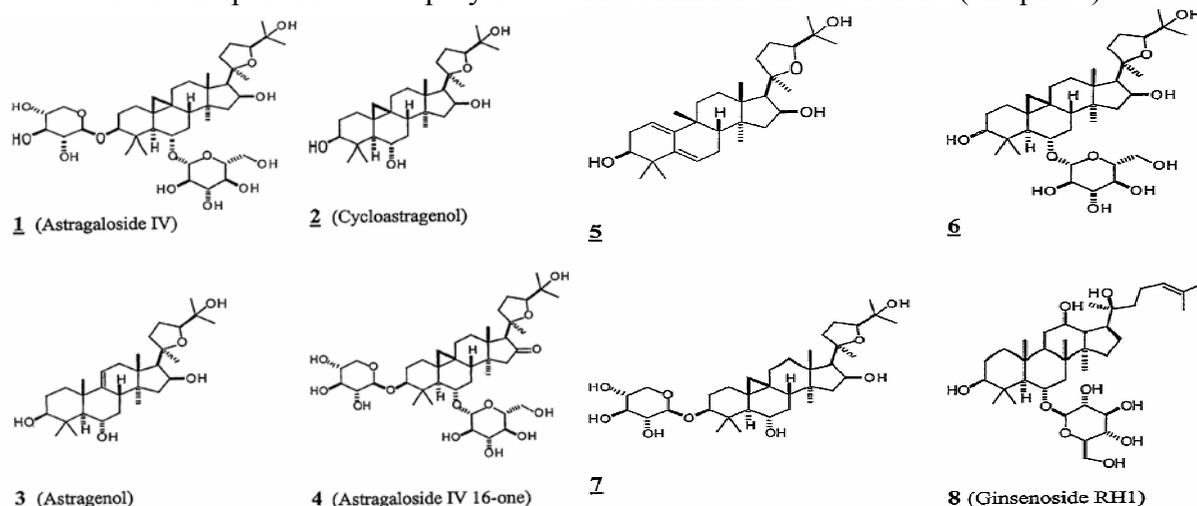


Рис. 2. Структурные формулы веществ семейства астрагалозидов.

Важно отметить, что несколько из этих веществ уже прошли клинические испытания и выпускаются в качестве биологически активных добавок, а именно, циклоастратегенол является действующим веществом препарата TAT2, а астрагалозид-4 – препарата TA65. Оба эти препарата способны существенно улучшать пролиферативные характеристики, а так же оказывать различные положительные эффекты *in vivo*. Имеются основания полагать, что активация теломеразы происходит о MAPK/ERK регуляторному пути, т.к. данные вещества не оказывали действия на теломеразную активность в присутствии ингибиторов MEK1 и ERK киназ (см. рис 4). Пока не известно, что именно является первичной мишенью для TAT2 и TA65, но уже ясно, что они запускает экспрессию hTERT непрямым образом, а значит он может оказывать еще дополнительные эффекты помимо вызванных экспрессией hTERT, чем может объясняться такое комплексное воздействие на организм и клетки.

Designation	Name	MEC, μM
1	astragaloside IV	0.01
2	cycloastragenol	0.01
3	astragenol	0.03
4	astragaloside IV 16-one	0.03
5	20R,24S-epoxy-3 β ,16 β ,25-trihydroxy-9 β -methyl-19-norlanost-1,5-diene	0.10
6	cycloastragenol 6- β -D-glucopyranoside	3.2
7	cycloastragenol 3- β -D-xylopyranoside	3.2
8	ginsenoside RH1	10

Рис. 3. Минимальные концентрации астрагалозидов (см. рис 2), увеличивающие активность теломеразы в 2 раза по сравнению с контролем. Активность теломеразы измерялась путем TRAP.

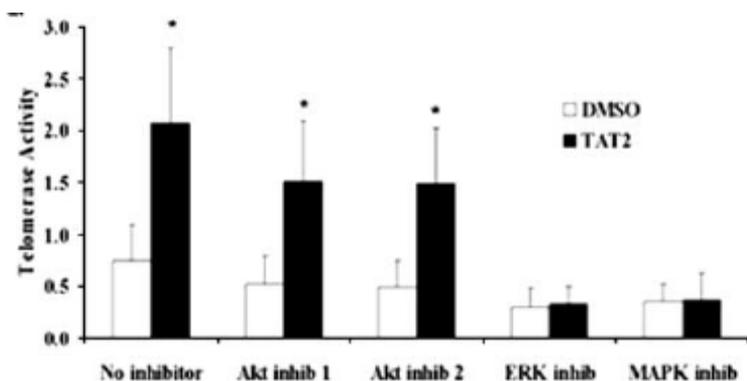


Рис. 4. Активность теломеразы в Т-клетках в присутствии ингибиторов Akt, Erk и MEK1 (МАРК) киназ.

Несмотря на активные исследования свойств астрагалозидов, пока отсутствуют убедительные данные о их способности расширять пролиферативный потенциал. Большинство авторов ограничивались констатацией того что ТАТ2 способен увеличивать теломеразную активность, но достоверные данные о его влиянии на пролиферативный потенциал отсутствуют. Хотя именно расширение пролиферативного потенциала лучше всего говорило бы о возможных геропротекторных свойствах этих веществ и возможности применения в регенеративной медицине.

Таким образом, целью нашей работы стало исследование влияния ТАТ2 (циклоастренола) на пролиферативную кинетику нормальных клеток и на их пролиферативный потенциал.

В работе использовались нормальные диплоидные фибробласты человека (штамм 94-27), полученные путем биопсии от взрослого мужчины. Для клеток 94-27 был определен пролиферативный потенциал равный 27 удвоений клеточной популяции (УКП), а также скорости пролиферации, насыщающий плотности монослоев и построены ростовые кривые при контрольных условиях. Для определения влияния

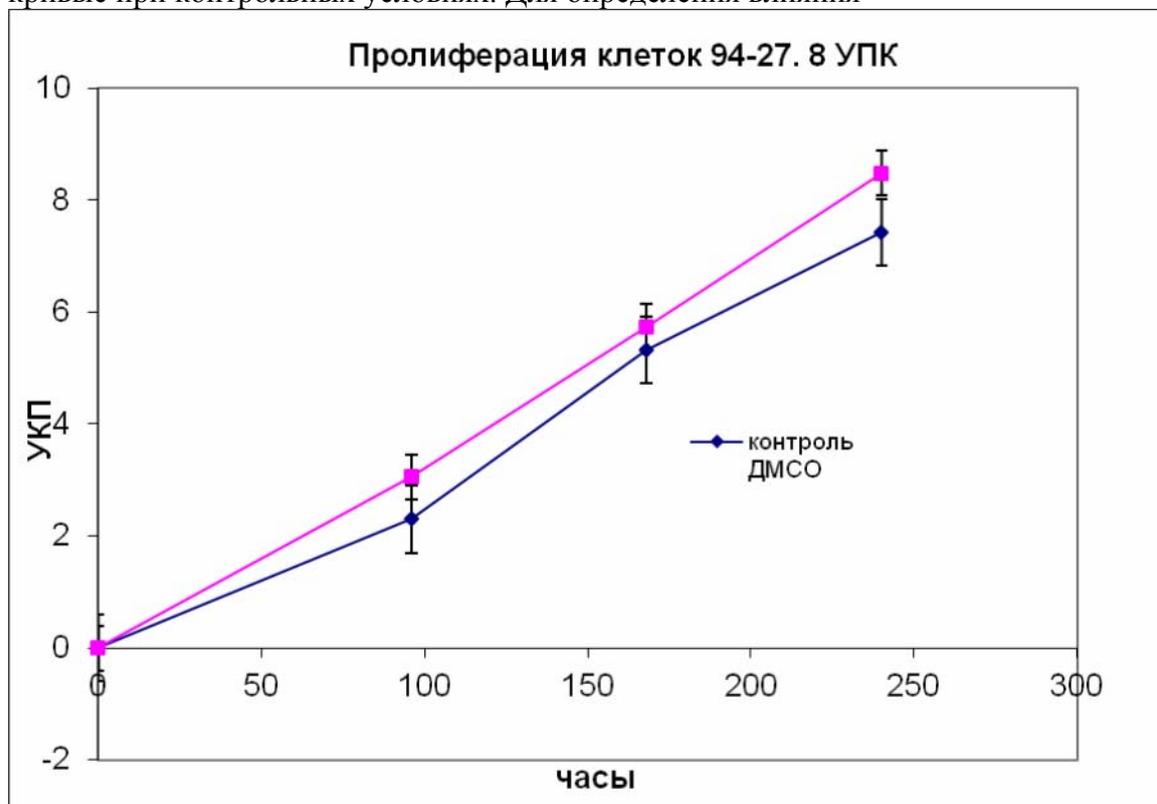


Рис. 5. Пролиферация клеток 94-27 на 8 УКП. Контроль – 0.2% ДМСО, ТАТ2 – 4 мкМ ТАТ2 + 0.2% ДМСО. Флаконы пересеивались в конце Log-фазы. В каждой точке

подсчитывались клетки в двух флаконах дважды в камере Горяева. Для последних точек $P = 0.873$.

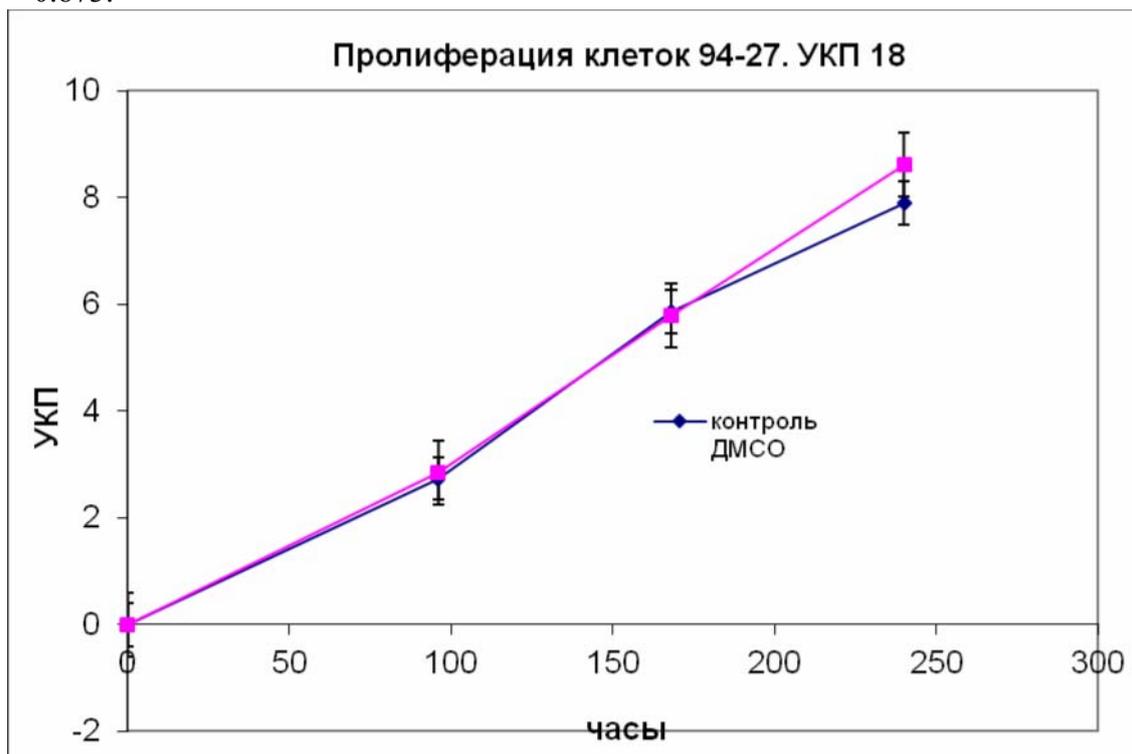


Рис. 6. Пролиферация клеток 94-27 на 19 УКП. Контроль – 0.2% ДМСО, ТАТ2 – 4 мкМ ТАТ2 + 0.2% ДМСО. Флаконы пересевались в конце Log-фазы. В каждой точке подсчитывались клетки в двух флаконах дважды в камере Горяева. Для последних точек $P = 0.473$.

ТАТ2 на пролиферативный потенциал клеток были параллельно засеяны контрольные и опытные группы культуральных флаконов, в ростовой среде которых содержалось 4 мкМ препарата. Следует отметить, что ТАТ2 плохо растворим в воде, и поэтому использовался ДМСО и в опытной, и в контрольной группах. Опыт проводился для клеток прошедших 8 (см. рис. 5) и 19 (см. рис. 6) УКП. Клетки были засеяны в культуральные флаконы, и когда состояние культуры приближалось к монослою флаконы пересевались 1/2 при этом производился подсчет клеток и прочие измерения. Достоверно показать расширение пролиферативного потенциала пока не получилось (см. рис. 6), так как различия между контролем и опытом не достоверны, но перед тем как деление остановилось клетки выглядели существенно по разному (см. рис. 7), что все равно позволяет хотя бы о качественном различии между опытом контролем.



Рис. 7. Фотография клеток в культуре при остановке деления в контрольной группе – слева и в опытной группе – справа.

В итоге, для клеток 94-27 были успешно определены основные кинетические показатели пролиферации и пролиферативный потенциал, а также проявление ими сенесцентного фенотипа на поздних пассажах. Все это говорит о пригодности клеток 94-27 для исследования на них репликативного клеточного старения и позволит более точно планировать и проводить дальнейшие опыты. Было установлено положительное влияние исследуемого активатора теломеразы TAT2 на скорость пролиферации клеток 94-27, имеющих различные УКП, что является положительным результатом и говорит о верности выбранного направления наших исследований.

Изучение кинетических характеристик термического разложения керогена баженовской свиты



Митюрев Н.А., Спасенных М.Ю., Козлова Е.В., Николаев Е.Н.

Сколтех, Москва

В последнее время, в связи с резким сокращением традиционных запасов углеводородов, все больший интерес представляют керогенонасыщенные породы с высоким нефтегенерационным потенциалом. Среди таких нетрадиционных ресурсов в России можно назвать баженовскую свиту Западной Сибири, доминикиты Волго-Уральского и Тимано-Печорского бассейна, майкопскую серию Предкавказья. Исследование этих отложений чрезвычайно важно как для моделирования процессов генерации углеводородов в осадочном разрезе в перечисленных регионах, так и для оценки углеводородной ресурсной базы нашей страны.

Данная работа посвящена экспериментам по кинетике термодеструкции органического вещества пород баженовской свиты. Были исследованы образцы пород баженовской свиты Западно-Сибирского нефтегазоносного бассейна из скважин разных районов Широтного Приобья. Анализы проводились на приборе НАWK фирмы Wildcat technology и обрабатывались в программе Kinetics2015.

Пробоподготовка включала дебитуминизирование предварительно раздробленной породы для исключения влияния битумоида (растворимой части органического вещества) на результаты анализа. Часть дебитуминизированных образцов подверглось кислотной обработке для удаления минеральной матрицы и получения чистого керогена. Выполнены эксперименты по разрезу баженовской свиты одной из скважин (22 образца). Проведено сравнение образцов из разных скважин с разной степенью катагенеза (зрелости органического вещества).

Для анализа кинетических свойств проводились исследования влияния термического воздействия со скоростями нагрева 2, 5 и 10 °C/мин на разложение образцов породы и керогена. Выделяющиеся в ходе процесса термодеструкции газы детектировались с помощью пламенно-ионизационного детектора.

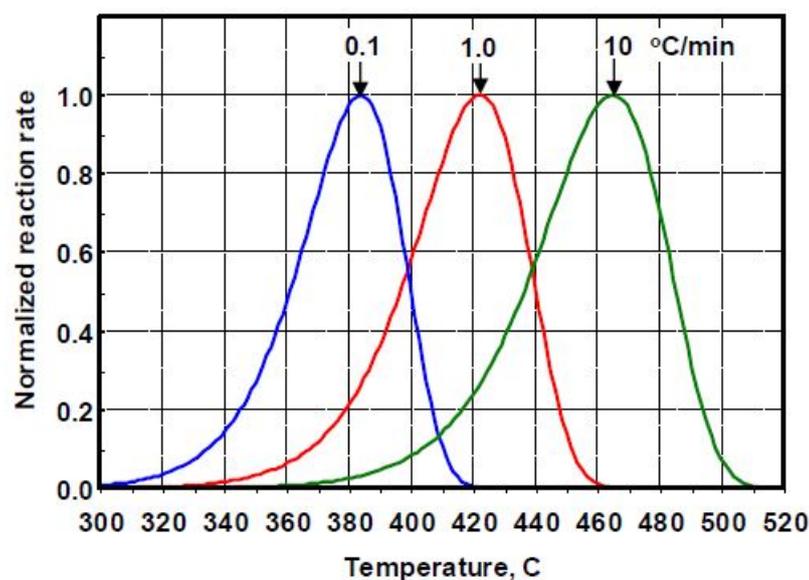


Рис. 1 Кривые зависимости скорости реакции от температуры при разных скоростях нагрева

Полученные зависимости загружались в компьютерную программу, рассчитывающую коэффициенты уравнения Аррениуса и использующую метод деконволюции с получением гистограммы энергий активации.

В ходе экспериментов было обнаружено, что по разрезу скважины кинетические свойства керогена меняются незначительно и могут быть приведены к некоему среднему значению.

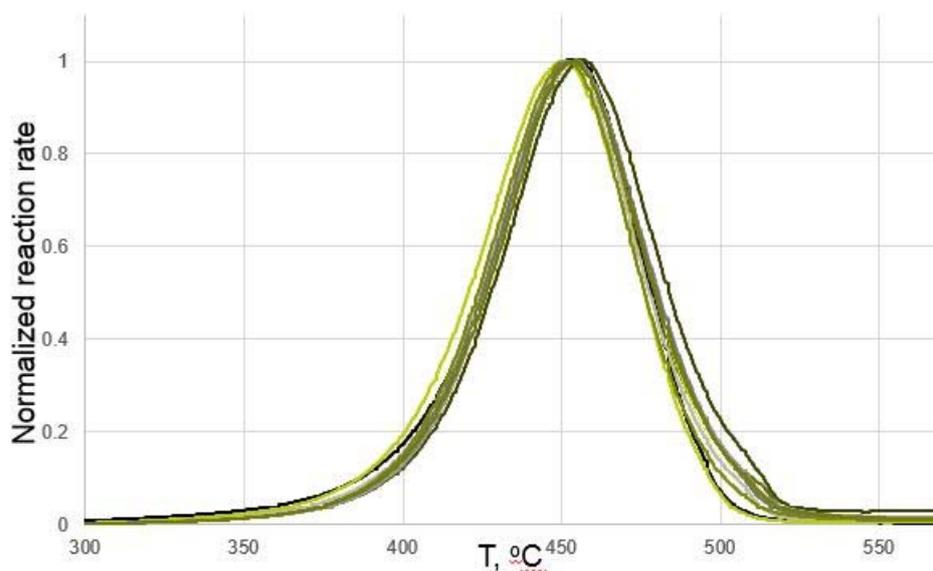


Рис. 2 Сравнение кинетических пирограмм по разрезу скважины

При сравнении образцов разной степени катагенеза с увеличением степени зрелости было зафиксировано смещение пирограмм вправо по температурному интервалу, что влечет за собой смещение спектра энергии активации в сторону больших значений.

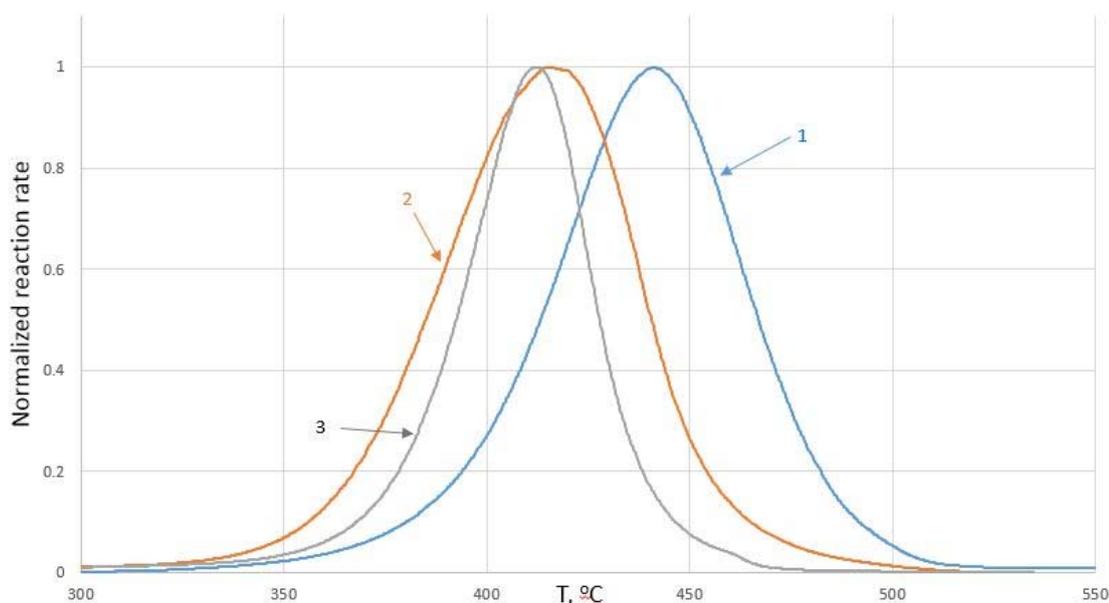


Рис. 3 Сравнение кинетических пирограмм образцов керогена разной степени катагенеза с характеристиками, приведенными ниже в таблице 1.

Табл. 1 Сравнительные характеристики трех образцов

№	T_{\max}	HI	TOC
1	441	446	9.25
2	415	715	14.01
3	412	748	4.93

В таблице 1 представлены такие характеристики образцов, как температура, при которой происходит пик генерации углеводородов (T_{\max}), отношение количества $OB S_2$ к общему содержанию органического углерода TOC (мг УВ/кг TOC) (HI), общее содержание органического углерода (TOC).

На основании этих данных была получена зависимость кинетических характеристик от степени зрелости керогена конкретно для исследуемых пород. Полученные данные позволяют оценить остаточный нефтегенерационный потенциал органического вещества породы подсчитать количество уже сгенерированных углеводородов.

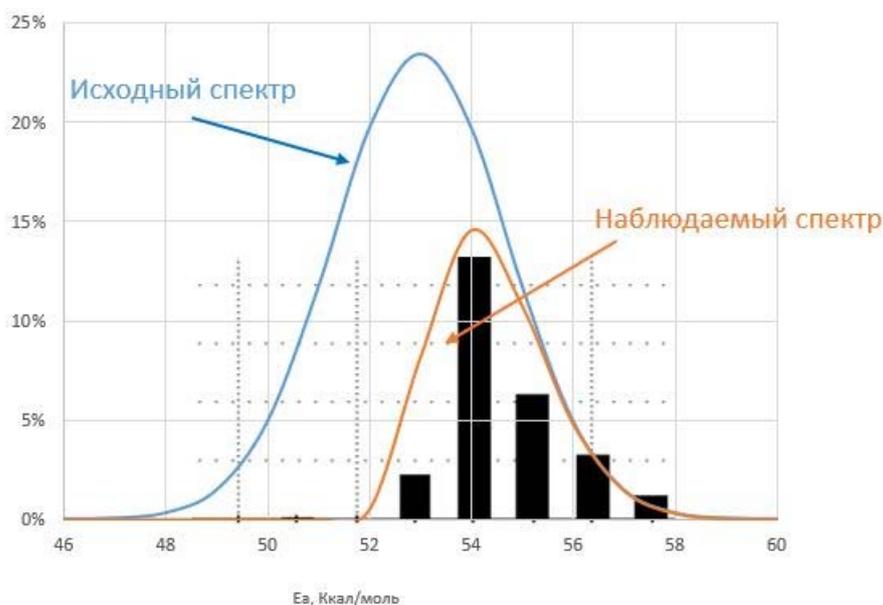


Рис. 4 Сравнение исходного и наблюдаемого спектров энергий активации

Используя данные пиролитических изотопных, химико-битуминологических и кинетических исследований, можно точно устанавливать степень зрелости керогена конкретных скважин, восстанавливать кинетические спектры до исходных для понимания масштабов нефтегенерации и оценки остаточного потенциала керогеносыщенных отложений.

Хиральная лестница во внутримолекулярных структурах белков



Малышко Е.В., Твердислов В.А.

*Московский государственный университет имени М.В.
Ломоносова,
физический факультет, кафедра биофизики,
ул. Ленинские горы, д.1, кор.2, г. Москва, Россия, 119991*

Одним из важнейших принципов формирования земных форм жизни является структурно-функциональная иерархичность биологических систем всех уровней. Биологические иерархии сопрягают разномасштабные в пространстве и времени функции живых систем. В белках и нуклеиновых кислотах выделяют первичные, вторичные и т.д. структуры, однако в молекулярной биологии не существует универсального физического критерия, описывающего общий принцип подобной стратификации.

Нами предложен и разрабатывается новый подход к решению этой проблемы, основанный на представлениях о хиральности отдельных субмолекулярных и надмолекулярных структур, составленных молекулярными блоками, включающими асимметричный углерод, или же спиральными и суперспиральными образованиями [1-3].

Впервые в макромолекулярных системах нами были выделены знакопеременные уровни иерархии хиральных объектов в последовательности от «нижнего» асимметричного атома углерода до суперспиралей и надмолекулярных структур [1, 3]. Отмечено закономерное чередование знака хиральности D-L-D-L при переходе на более высокий уровень структурно-функциональной организации ДНК [2]. Так, соединенные фосфодиэфирными связями молекулы дезоксирибозы, являются правыми изомерами. Включающие их нуклеотиды находятся преимущественно в левой гош-форме [4], позволяющей за счет их

комплементарного соединения водородными связями образовывать правую двойную спираль ДНК – следующий уровень организации. Свойственная полугибким полимерным цепям ДНК последующая сверхспирализация проявляется в левой укладке правых двойных спиралей, как, например, у прокариот. Последовательность смены знака хиральности в структурно-функциональной иерархии белковых структур подобна той, что мы наблюдали для ДНК: L-D-L-D (см. рисунок 1).

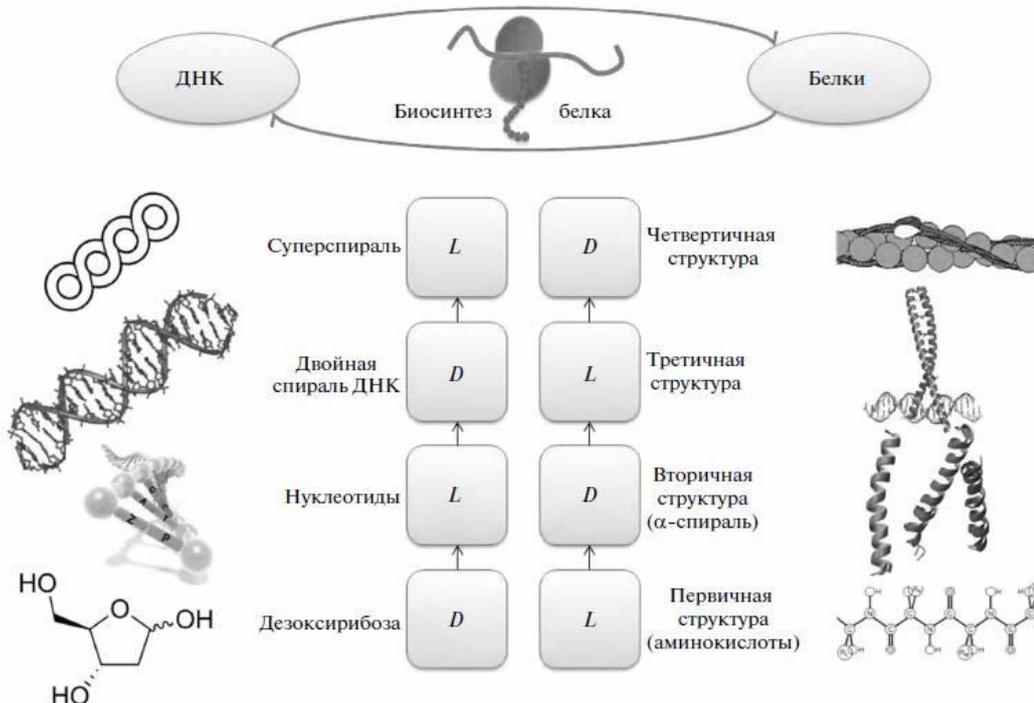


Рис.1. Периодическая система знакопеременных иерархий хиральных (спиральных) структур от первичной до четвертичной для ДНК (левая колонка) и белков (правая колонка): L – левая конфигурация энантиомера или спирали, D – правая [3].

Первичная структура белка представляет собой последовательность остатков L-аминокислот. Полипептидная цепь укладывается в спираль или в складчатый слой. Как правило, α-спираль является правым энантиомером - правая α-спираль стабильнее левой [5]. Взаимодействующие правые α-спирали стремятся образовать левую суперспираль. Четвертичная структура белков представлена надмолекулярными структурами, сформированными при правой укладке левых суперспиралей.

Знакопеременные уровни в более сложных конструкциях третичной и четвертичной структуры не кажутся такими однозначными, как в случаях первичной и вторичной структур. Образование несколькими α-спиралями непростых конструкций заинтересовало исследователей вскоре после появления модели α-спирали Л. Полинга. В начале 1950-х годов Крик отметил, что две α-спирали, скрученные друг относительно друга под углом около 20°, взаимодействуют друг с другом, причем это взаимодействие характеризуется периодом в 7 аминокислотных остатков, или 2 поворота α-спирали (см. [6]). Он назвал такой пучок из α-спиралей «coiled-coil», или суперспиралью, а подобный тип взаимодействия – «knobs into holes» (КИН) - «выступы во впадину» (можно привести привычную для нас аналогию «ключ-замок»).

Позже предположения Крика подтвердились: типичная последовательность суперспирали состоит из гептадов – повторяющихся 7 аминокислотных остатков (см. [7]). Позиции остатков в гептаде обычно обозначаются как *a-b-c-d-e-f-g*. Обычно в позициях *a* и *d* находятся гидрофобные остатки (наиболее часто - Leu, Ile и Val), в позициях *e* и *g* – полярные аминокислотные остатки (наиболее часто - Lys и Glu). При взаимодействии *a* и *d* остатков формируется гидрофобное ядро, а между остатками *e* и *g* появляются ионные взаимодействия.

Авторы [8] ввели систематическую классификацию суперспиралей, составив «периодическую таблицу». Белковые структуры были разделены на две группы: классические (с одной суперспиралью и, следовательно, одним гидрофобным ядром) и комплексные/сложные (содержащие две и более классические суперспирали). Классические суперспирали из двух, трех, четырех или пяти спиралей занимают первый ряд таблицы и возглавляют каждый столбец, в то время как сложные суперспирали разделяются на классы и вертикально упорядочиваются в зависимости от того, на какой классической суперспирали они основываются. При помощи ресурса [9] можно рассмотреть отдельно каждый белок, содержащий суперспираль.

Для доказательства преобладания левой конфигурации суперспиралей всех типов мы проанализировали все доступные белковые структуры из «периодической таблицы» [8,10]. Практически во всех случаях, когда визуально наблюдалось внутримолекулярное перекрытие α -спиралей, выявлена тенденция их свивания в левую суперспираль. В результате анализа получены количественные оценки наличия мотива левого свивания для каждого выделенного в таблице из [8] класса. Отметим, что в простейшем случае – для суперспирали, состоящей из двух α -спиралей, - характерна левая укладка почти что во всех структурах этого класса. С увеличением количества α -спиралей число структур с подобной тенденцией уменьшается, но в отдельных классах, представленных наиболее сложными суперспиралями из 5-9 α -спиралей, процентное содержание структур с тенденцией к левой укладке в данном классе резко увеличивается. На рис. 2 приведены примеры характерных спиральных комплексов разных классов в белках.



Рис. 2. Структуры белков, содержащих суперспирали, слева направо: 1AA0 (на основе трех α -спиралей), 1QU7 (на основе четырех α -спиралей) и 1MZ9 (на основе пяти α -спиралей) из [9].

Подчеркнем, что среди всего многообразия структур из [8] правое свивание было отмечено лишь в двух случаях: в тетрабрахионе термофилов *Staphylothermus marinus* (1FE6 в [9]) и в искусственно синтезированном тетрамере (1RN4 в [9]). В ряде случаев было сложно судить о свивании из-за нагромождений α -спиралей и β -листов в белках над суперспиралью. Иногда явную тенденцию было сложно проследить из-за слишком коротких фрагментов α -спиралей в составе суперспирали. К тому же, в некоторых случаях (особенно часто – в суперспирали на основе 4-х α -спиралей) отмечена почти параллельная укладка α -спиралей с совсем небольшим свиванием влево, и эти структуры мы не стали причислять к обладающим левым мотивом укладки («неполный критерий»).

Основываясь на этом, высказанное нами ранее утверждение о закономерной смене знака хиральности при переходе от вторичной к третичной структуре для α -спиралей можно считать убедительно обоснованным. Необходимо заметить, что и на уровне четвертичных структур белков можно проследить тенденцию смены знака хиральности [1].

Термодинамической основой структурообразования является вертикальная рацемизация, а весь эффект объясняет траектории фолдинга, укладки и функционирование молекулярных машин [2]. Практическое применение исследования может быть направлено на анализ межмолекулярных взаимодействий системы «хиральное лекарство – мишень», а так же для анализа влияния хиральных ксенобиотиков в экологии.

Список литературы

1. Твердислов В.А. Биофизика 58(1), 159 (2013).
2. Твердислов В. А., Сидорова А. Э., Яковенко Л. В. Биофизика 57 (1), 146 (2012).
3. Твердислов В.А., Малышко Е.В., Ильченко С.А. Известия РАН. Серия физическая, том 79, № 3, с. 1728-1732.
4. Чернавский □ Д. С.. Проблема происхождения жизни и мышления с точки зрения современной физики. Успехи физ. наук 170 (2), 157 (2000).
5. Финкельштейн А.В., Птицын О.Б. Физика белка: Курс лекций с цветными и стереоскопическими иллюстрациями и задачами. 3е изд., испр. и доп. (М.: КДУ, 2005).
6. Lupas A. and Gruber M. The structure of α -helical coiled coils. Adv Protein Chem. 2005;70:37-78.
7. Yu, Y.B., Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. Advanced Drug Delivery Reviews 54 (2002) 1113–1129.
8. Moutevelis E. and Woolfson D. A Periodic Table of Coiled-Coil Protein Structures. J. Mol. Biol. (2009) 385, 726–732.
9. <http://www.rcsb.org/>; H.M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, P.E. Bourne (2000) The Protein Data Bank. Nucleic Acids Research, 28: 235-242.
10. OD Testa, E Moutevelis, and DN Woolfson. CC+: a relational database of coiled-coil structures. Nucleic Acids Res. 37, D315-D322 (2009).

Исследование свободнорадикального окисления фибриногена методом масс-спектрометрии



**Л.В. Юрина¹, А.Д. Васильева¹, А.В. Бычкова¹, А.Е. Бугрова¹,
М.И. Индейкина¹, А.С. Кононихин^{1,2}, Е.Н. Николаев^{1,2}, М.А.
Розенфельд¹**

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

²Институт энергетических проблем химической физики имени
В.Л. Тальрозе Российской академии наук, Москва

³Московский физико-технический институт (государственный
университет), Долгопрудный, Московская область, Россия

Фибриноген – растворимый белок плазмы крови, основной функцией которого является образование нерастворимого фибринового геля под воздействием тромбина. Молекула фибриногена состоит из двух одинаковых субъединиц, которые образованы тремя разными полипептидными цепями $A\alpha$, $B\beta$ и γ , с молекулярным весом 67.5, 55, и 46.5 кДа, соответственно [1]. NH_2 -концевые участки всех шести полипептидных цепей формируют E область в центре молекулы, соединенную тройной суперспиральной структурой с двумя периферийными D областями, которые образованы $COOH$ -терминальными участками $B\beta$ и γ цепей. В $A\alpha$ полипептидной цепи $COOH$ -концевые участки формируют αC область, состоящую из глобулярного αC -домена, присоединенного к основной части молекулы гибким αC -коннектором. При протеолитической деградации молекулы фибриногена αC область отщепляется на начальном этапе. Аналогично, у $B\beta$ цепи первым при протеолизе отщепляется NH_2 -концевой участок, называемый $B\beta N$ областью.

На NH_2 -концевых участках $A\alpha$ и $B\beta$ полипептидных цепей находятся фибринопептиды А (FpA) и В (FpB), соответственно, которые, отщепляясь под воздействием тромбина, образуют мономер фибрина (desAB). В первую очередь от молекулы фибрина отщепляется FpA, открывая участок полимеризации knobs 'A', комплементарный участку

holes 'a', расположенному на γ модуле. В результате взаимодействия конец-к-середине образуются двухцепочечные протофибриллы. В процессе образования протофибрилл, под воздействием тромбина отщепляются FpB, открывая участок полимеризации knobs 'B', который связывается с участком β модуля holes 'b', что усиливает латеральную агрегацию протофибрилл [2]. Образующиеся в процессе латеральной агрегации волокна являются основой для пространственной структуры фибринового сгустка. Воздействие активной формы FXIIIa приводит к образованию ковалентных сшивок между γ и α цепями фибрина, формируя γ - γ -димеры и α -полимеры и стабилизируя структуру геля [3].

Белки, циркулирующие в крови, являются одними из основных мишеней для активных форм кислорода (АФК). Фибриноген (4% от общего количества белков плазмы) намного более чувствителен к воздействию окислителей, чем другие основные белки плазмы (альбумин, иммуноглобулины, трансферрин, церулоплазмин) [4].

Целью данной работы является исследование методом масс-спектрометрии влияния индуцированного озоном свободнорадикального окисления на структуру фибриногена. Фибриноген был выделен из цитратной плазмы крови человека. Свободнорадикальное окисление фибриногена инициировали озоном по методу, описанному ранее [5]. Количество окислителя составляло $2.5 \cdot 10^{-7}$ моль/мг белка. При подготовке проб для масс-спектрометрического анализа образцы обрабатывались дитиотреитолом (DTT) для восстановления дисульфидных связей с последующим алкилированием йодоацетоамидом и гидролизом трипсином (Promega, USA).

Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-МС/МС) проводился на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США) и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия). Масс-спектрометрический анализ фракций пептидов осуществлялся при помощи программы Xcalibur (Thermo Electron, Бремен, Германия) в двухстадийном режиме автоматического измерения спектров. Список из точных масс пептидов и масс их фрагментов использовался для поиска и идентификации белков по базе данных Swissprot при помощи программ Mascot Daemon (Matrix Science, version 2.2.2) и Peaks Studio (Bioinformatics Solutions Inc., version 7.5).

С помощью метода масс-спектрометрии были получены данные об окислительных модификациях аминокислотных остатков полипептидных цепей фибриногена (Рис. 1). Покрyтия аминокислотных последовательностей A α , B β и γ цепей фибриногена составили 77%, 84%, 83%, соответственно. Общее количество обнаруженных окислительных сайтов в каждой из цепей белка составило: 3,1%, 3,0% и 2,3% относительно покрyтия. При окислении A α цепи в большей степени модифицирована α C-область (3,6% окисленных аминокислотных остатков). B β цепь окислена практически во всех структурных элементах цепи с максимальным окислением в β -модуле. γ цепи в меньшей степени подвержены действию окислителя по сравнению с A α , B β цепями.

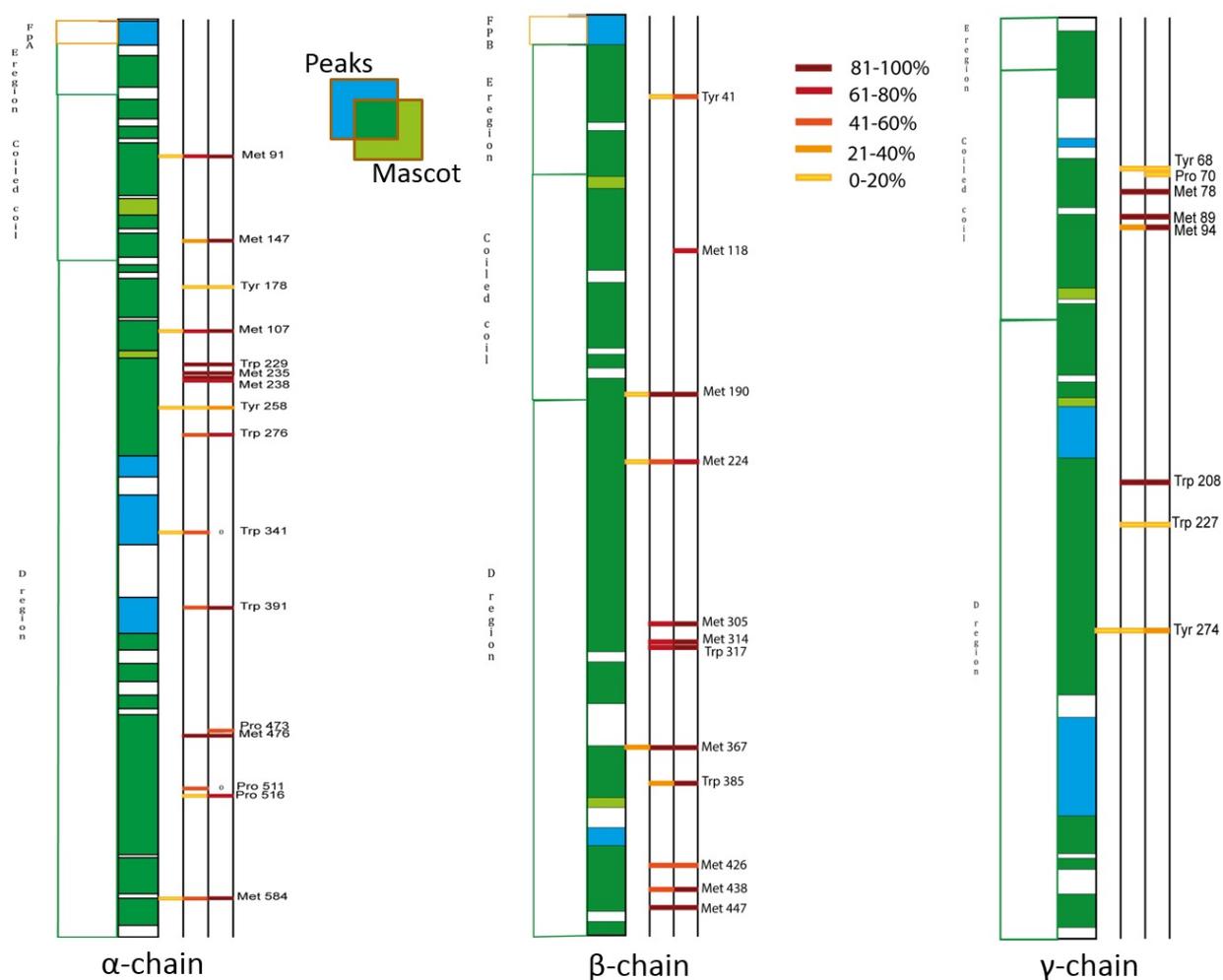


Рис. 1. Покрyтия и окислительные сайты α , β и γ цепей фибриногена, полученные с помощью программ Mascot Daemon и Peaks Studio.

Были идентифицированы модификации ряда функционально важных аминокислотных остатков. Например, окисление остатка Met476 вместе с другими выявленными окисленными остатками Pro471, Pro516, Met586, расположенными в α C-домене, может препятствовать латеральной агрегации протофибрилл. Окисление остатка β Met367, в центре полимеризации – hole ‘b’, в комплексе с другими модифицированными остатками COOH-концевой области β цепи могут влиять на межмолекулярные взаимодействия knob ‘B’: hole ‘b’, также ингибируя процесс латеральной агрегации. Окисление остатков α Met476 и β Met367 было описано в литературе ранее [6].

Выводы:

- Наблюдается более низкая степень окисления γ цепи фибриногена по сравнению с α и β цепями.
- В окислительную модификацию не вовлекаются центры самосборки, ответственные за взаимодействия knob ‘A’: hole ‘a’.
- Обнаруженные многочисленные окислительные сайты, главным образом, отвечают за ингибирование латеральной агрегации протофибрилл.
- Ряд легко окисляемых аминокислотных остатков и, в первую очередь, остатков метионина, входящих в структуру фибриногена, могут выполнять антиоксидантную функцию, перехватывая молекулы АФК и защищая тем самым от окислительного повреждения другие ключевые в функциональном отношении аминокислотные остатки белка.
- α C область, вероятно, является структурой, экранирующей функционально важные части молекулы от воздействия активных форм кислорода.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60244 мол_а_дк. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского Научного фонда, № 14-24-00114.

Литература

1. Blombäck, B. Fibrinogen and fibrin—proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis. *Thromb. Res.* 83:1–75; 1996.
2. Medved, L.; Weisel, J. Recommendations for nomenclature on fibrinogen and fibrin. *J. Thromb. Haemost.* 7:355–359; 2009.
3. M.A. Rosenfeld, V.B. Leonova, A.N. Shchegolikhin, A.V. Bychkova, E.A. Kostanova, and M.I. Biryukova. Covalent Structure of Single-Stranded Fibrin Oligomers Cross-Linked by FXIIIa. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 461: 408–412; 2015.
4. Shacter, E.; Williams, J. A.; Lim, M. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Radic. Biol. Med.* 17:429–436; 1994.
5. Rosenfeld, M.A.; Shchegolikhin, A.N.; Bychkova, A.V.; Leonova, V.B.; Biryukova, M.I.; Kostanova, E.A. Ozone-Induced Oxidative Modification of Fibrinogen: Role of the D Regions. *Free Radical Biology and Medicine.* 77:106-120; 2014.
6. Martinez M., Weisel J. W., Ischiropoulos, H. Functional impact of oxidative post-translational modifications on fibrinogen and fibrin clots. *Free Radic. Biol. Med.* 65:411–418; 2013.

Взаимодействие природных тиолов с активными формами кислорода



**Зинатуллина К. М.¹, Касаикина О. Т.² В.В.Каспаров,¹
А.Л.Коварский¹, В.А. Кузьмин¹, Храмеева Н. П.¹**

¹*ИБХФ РАН, 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул.
Косыгина, д. 4*

²*ИХФ РАН, 119334, Российская Федерация, г. Москва, ул.
Косыгина, д. 4*

Серосодержащие (тио-)соединения давно известны как разрушители пероксидов. Их традиционно используют в антиокислительных композициях для стабилизации масел [1]. Природные тиолы (глутатион, цистеин, гомоцистеин) относятся к биоантиоксидантам, синтезируемым непосредственно в живых организмах. Тиолы взаимодействуют с гидроксильными радикалами, восстанавливают пероксид водорода, гидропероксиды, дисульфидные связи –S-S- и предотвращают окисление протеинов [2- 8].

Глутатион является самым распространенным цитозольным тиолом и играет важную роль в неферментативной системе антиоксидантной защиты. В работе [9] квантово-механическим методом проанализированы реакции глутатиона с радикалами различной природы в водном растворе. Было выявлено, что константы скорости могут варьироваться от $2.02 \times 10^4 \text{ (M}\cdot\text{s)}^{-1}$ вплоть до практически диффузионных значений $7.68 \times 10^9 \text{ (M}\cdot\text{s)}^{-1}$. Глутатион реагирует с пероксильными радикалами по реакции отрыва атома водорода с образованием S-центрированных тиольных радикалов. Исключение составляют активные гидроксильные радикалы •ОН, реакции с которыми объясняют образование C-центрированных радикалов. Цистеин в отличие от глутатиона быстро окисляется при попадании в кровь и другие системы, поэтому в организме присутствуют, в основном, его метаболиты [10].

В данной работе проведена экспериментальная оценка констант скоростей реакций природных тиолов (цистеин, гомоцистеин, глутатион) с пероксильными и нитроксильными радикалами в водном растворе при физиологической температуре 37°C, исследовано взаимодействие тиолов с пероксидом водорода и впервые определен выход радикалов в этой реакции.

Материалы и методы

Природные тиолы глутатион (GSH), гомоцистеин (HSH) и цистеин (CSH) («Sigma-Aldrich»), пероксид водорода («Усольхимпром»), азо-инициатор ААРН (2,2'-азо-бис-(2-метилпропионамидин дигидрохлорид, «Fluka»), нитроксильные радикалы ТЕМРО (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-ил)оксил) и ТЕМПОЛ (4-гидрокси-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1- оксил) («Sigma-Aldrich») использовали без предварительной очистки.

В качестве растворителей использовали дистиллированную воду и этанол («Медхимпром»).

Концентрацию H_2O_2 и тиолов определяли йодометрическим методом, концентрацию нитроксильных радикалов - методом ЭПР, скорость образования радикалов определяли методом ингибиторов. В качестве акцептора свободных радикалов был использован полиметиновый краситель 4151 (А) (пиридиновая соль 3,3'-ди-γ-сульфопропил-9-метилтиакарбо-цианинбетаина) [11], концентрацию которого регистрировали спектрофотометрически.

Все реакции проводили при физиологической температуре 37°C непосредственно в термостатируемых кюветах спектрофотометра «Ultraspec 1100 Pro» (l = 1 см) и ЭПР спектрометра «EMX BRUKER» ЦКП ИБХФ РАН (плоская кювета).

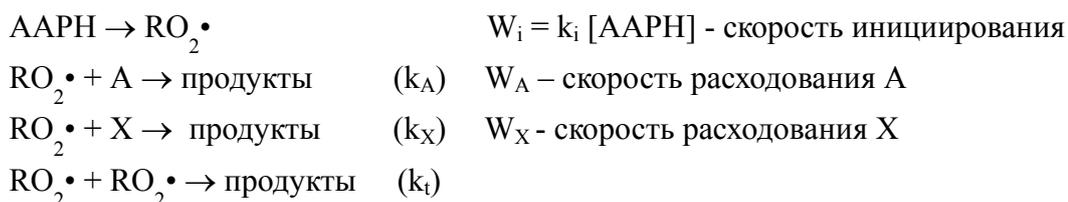
Погрешность определения кинетических характеристик реакции тиолов с пероксидом водорода не превышает 10%.

Результаты и обсуждение

Проведенное нами исследование взаимодействия ряда водорастворимых полиметиновых красителей с радикалами и пероксидами выявило, что краситель А активно и стехиометрически реагирует с пероксильными радикалами и относительно инертный по отношению к пероксиду водорода [12]. Константа скорости реакции красителя А с пероксильными радикалами, образующимися при распаде ААРН в водных растворах, равна $k_A = 5,4 \times 10^4 \text{ (M}\cdot\text{c)}^{-1}$ при 37°C. Стехиометрический коэффициент $f = 1$ в воде и $f = 2$ в натрий-фосфатном буферном растворе (PBS), pH 7,4. Это позволяет применять А для определения антирадикальной активности тиолов методом конкурирующих реакций.

Кинетическая схема расходования двух конкурирующих акцепторов радикалов А и тиолов (X), реагирующих с пероксильными радикалами, образующимися при распаде инициатора ААРН, имеет вид:

Схема 1



При достаточных концентрациях акцепторов имеет место равенство $W_i = W_A + W_X$, из которого следует, что $[\text{RO}_2\cdot] = W_i / \{k_A[\text{A}] + k_X[\text{X}]\}$. Скорость расходования А равна: $W_A = k[\text{A}][\text{RO}_2\cdot]$. С учетом выражения для концентрации $\text{RO}_2\cdot$, получаем уравнение (1), которое описывает зависимость скорости расходования красителя от скорости иницирования и концентрации реагентов (А, X).

$$= \frac{1 + \frac{k_X}{k_A} + \frac{[\text{X}]}{[\text{A}]}}{W_i} \quad (1)$$

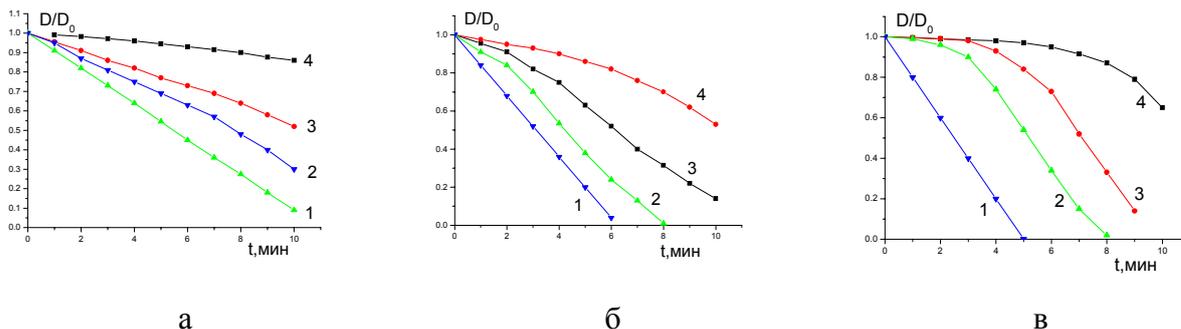


Рисунок 1. Влияние добавок глутатиона (а), гомоцистеина (б) и цистеина (в) на кинетику расходования красителя А при взаимодействии с радикалами, образующимися при распаде 15 мМ ААРН в водной среде, 37° С; [А] = 0,01 мМ.; а) [GSH] мМ: 1- 0,004; 2 – 0,01; 3 – 0,02; 4 – 0,04; б) [HSH] мМ: 1- 0,004; 2 – 0,003; 3 – 0,002; 4 – 0,01; в) [CSH] мМ: 1- 0,004; 2 – 0,003; 3 – 0,002; 4 – 0,01.

На рис. 1 (а,б,в) показано, что добавки тиолов замедляют расходование А в реакциях с пероксильными радикалами, а из рис.2 видно, что уменьшение скорости расходования А в присутствии тиолов согласуется с уравнением (1).

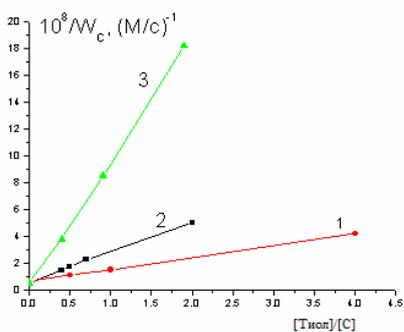


Рисунок 2. Зависимость скорости расходования красителя А (W_A) от концентрации GSH (1), HSH (2) и CSH (3) в координатах уравнения 1 в системе: 15 мМ ААРН в водной среде, 37° С; [А] = 0,01 мМ.

Таблица 1. Константы скорости реакции тиолов с пероксильными радикалами, образующимися при распаде ААРН в воде при 37°С

Тиол	$k_x, M^{-1} \cdot c^{-1}$
CSH	$4,4 \cdot 10^5$
HSH	$2,16 \cdot 10^5$
GSH	$0,84 \cdot 10^5$

Из наклона линейных зависимостей, представленных на рис.2 ($tg\varphi =$) рассчитаны константы скоростей для реакции тиолов с пероксильными радикалами $k_x = tg\varphi \times k_A \times W_i$, которые характеризуют антирадикальную активность тиолов как достаточно сильных ингибиторов [13,14]. Наиболее высокую активность в ряду тиолов проявляет цистеин. Величина константы скорости k_x для глутатиона по порядку величины согласуется с теоретически рассчитанным значением в работе [9].

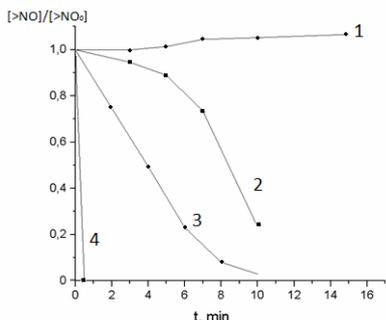


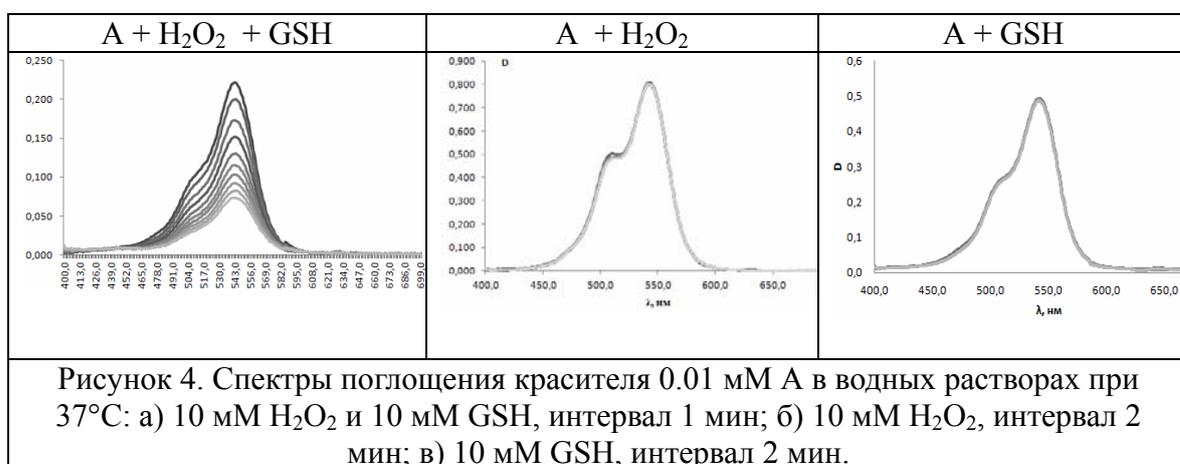
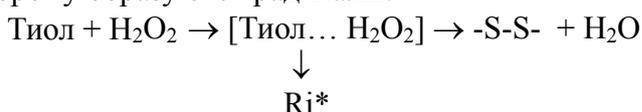
Рисунок 3. Кинетические кривые расходования 0,14мМ нитроксидов в присутствии 5мМ GSH: 1- TEMPOL+ GSH в этаноле; 2- TEMPOL + GSH в водной среде; 3- TEMPO+ GSH в этаноле; 4 - TEMPO+ GSH в водной среде, 37°С

Нитроксильные радикалы TEMPO и TEMPOL плохо растворяются в воде, поэтому их базовые растворы готовили в этаноле и микрошприцом вводили в водный или водно-этанольный раствор глутатиона. Расходование нитроксильных регистрировали методом ЭПР. На рис.3 представлены кинетические кривые расходования нитроксильных в реакции с глутатионом в водной и спиртовой среде. Видно, что глутатион быстро восстанавливает нитроксильные в водном растворе; в воде расходование обоих нитроксильных происходит быстрее, чем в спирте, и при равных начальных условиях скорость расходования TEMPO больше, чем TEMPOL.

В оптическом УФ спектре поглощения TEMPO имеет характерную полосу поглощения $\lambda_{\max} = 243\text{нм}$, $\epsilon = 1,205 \times 10^3 \text{ л}/(\text{моль} \cdot \text{см})$. Это позволило методом кинетической УФ-спектрометрии оценить константу скорости взаимодействия TEMPO + GSH. Анализ скоростей расходования TEMPO при разных концентрациях GSH показал, что эффективная константа скорости достаточно высокая:

в воде $k_{\text{эф}} = (-d[>\text{NO}_1]/dt) / ([>\text{NO}_1][\text{GSH}]) \cong 90 \text{ л}/(\text{М} \cdot \text{с})^{-1}$; в спирте (по данным ЭПР) $k_{\text{эф}} \sim 0,3 \text{ л}/(\text{М} \cdot \text{с})^{-1}$.

При исследовании взаимодействия глутатиона с пероксидом водорода оказалось, что краситель А, инертный по отношению к GSH и H_2O_2 расходуется при их совместном присутствии (рис.4). Аналогичная ситуация имеет место и в случае цистеина и гомоцистеина. Это означает, что в реакции тиолов с пероксидом водорода существует канал, по которому образуются радикалы:



Скорость расходования А линейно возрастает с ростом концентрации H_2O_2 (рис.5). Из наклона этих линейных зависимостей можно оценить удельную скорость образования радикалов ϖ_i , полагая, что $-d[\text{A}]/dt = w_i$:

$$\varpi_i = (w_i) / ([\text{H}_2\text{O}_2] \cdot [\text{тиол}]_s),$$

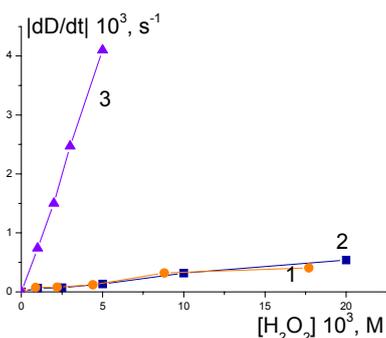


Рисунок 5. Зависимость скорости расхождения А от концентрации H_2O_2 в присутствии 5 мМ тиолов: 1 – GSH; 2 – HSH; 3 – CSH: $[A] = 1 \cdot 10^{-5} M$ водный раствор, $37^\circ C$

Таблица 2. Удельные скорости образования радикалов в реакции природных тиолов с H_2O_2

Тиол	$\omega \cdot 10^3, (M \cdot c)^{-1}$
Цистеин	2.1
Гомоцистеин	0.07
Глутатион	0.07

Из рис.5 и табл.2 следует, что при одинаковых концентрациях реагентов – тиола и H_2O_2 - цистеин генерирует радикалы при взаимодействии с пероксидом водорода на порядок активнее в сравнении с глутатионом и гомоцистеином.

Заключение

Природные тиолы проявляют высокую активность в водной среде по отношению к пероксильным радикалам; антирадикальная активность тиолов увеличивается в ряду: GSH < HSH < CSH.

Было установлено, что при взаимодействии тиолов с пероксидом водорода образуются свободные радикалы; определены кинетические характеристики этого процесса в водной среде.

Показано, что глутатион является эффективным восстановителем нитроксильных радикалов (TEMPO и TEMPOL), причем скорость взаимодействия GSH с TEMPO выше, чем с TEMPOL, а в водной среде скорость реакции с обоими нитроксилами на порядок выше, чем в этаноле.

Литература

1. Makarov S.V.//Russian Chemical Reviews(2001),70(10):885
2. Raj, K., Rolston, George Perry, Xiongwei Zhu, Rudy, J., Castellani, Barney, E., Dwyer, Nyoung-gon Lee, Robert, B., Petersen, and Mark, A.// Agro Food Ind Hi Tech. 2009, 19(6), 33–36.
3. Halliwell, B.; Gutteridge, J.C.// Free Radic Biol Med. 1995, 18, 125–6.
4. Young, I. S., and Woodside, J. V.//J. Clin. Pathol. 2001, 54, 176-186.
5. Aruoma, O. I.// J. Am. Oil Chem. Soc. 1998, 75, 199-212.
6. Wang, Y., Qiao, M., Mieyal, J. J., Asmis, L. M., Asmis, R.// Free Radic. Biol. Med. 2006, 41, 775–785.
7. Nagano N, Ota M, Nishikawa K.// FEBS Lett.1999, 458 (1), 69–71.
8. Morris, M.S.// Lancet neurology. 2003, 2 (7), 425–8.
9. Annia Galano, J. Raúl Alvarez-Idaboy // RSC Adv., 2011,1, 1763-1771; DOI: 10.1039/C1RA00474C
10. Parris K. Kidd //Alt. Med.Rev/ 1997, V.2, N 3, 155-176.
11. Shapiro B.I.//RUSS CHEM REV, 2006, 75 (5), 433–456
12. Зинатуллина К.М., Касаикина О.Т., Кузьмин В.А., Храмева Н.П., Шапиро Б.И. // Изв. . Серия Химическая. 2016, 12.
13. Emanuel N.M., Denisov E.T., Mayzus Z.K.//Moscow, Science, 1965, 375p.
14. Roginsky V.A. //Arch.Biochem. Biophys. 2003, 414, 261-270.

Исследование пространственной модификации альбумина под действием системы Фентона



Акинфиев В.С.¹, Горобец М.Г.¹, Бычкова А.В.¹, Мисин В.М.¹

*¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334
г. Москва, Россия*

E-mail: doommer@mail.ru

Альбумин является давно известным и, вероятно, одним из наиболее изученных белков. В организме человека он выполняет различные функции, в том числе поддержание осмотического давления крови, транспорт жиров и низкомолекулярных соединений, восстановление активных форм кислорода [1]. Подобно многим другим белкам, альбумины могут подвергаться окислительной модификации под действием активных форм кислорода, вызывающих нарушение его структуры, что позволяет формировать ковалентно сшитые образования на различных поверхностях [2].

Твёрдые белковые структуры применяются в различных областях: биоразлагаемые и съедобные плёнки и покрытия [3], медицина, аналитические приложения [4] и многие другие. Во многих случаях используется ковалентная сшивка молекул белка и поверхности, что, однако, подразумевает использование токсичных и дорогих сшивающих агентов. Было показано, что свободнорадикальное окисление белка способно вызвать его иммобилизацию на поверхности наночастиц с сохранением им функциональных свойств [5,6]. Возможность формирования белковых покрытий на макроскопических поверхностях открывает возможность создания дешёвых, экологичных и биологически совместимых функциональных поверхностей.

Целью данной работы было выявление закономерностей образования нерастворимых форм альбумина при различных условиях свободнорадикального окисления под действием системы Фентона.

В работе были использованы FeSO₄*7H₂O, хч, ГОСТ 4148-78 п.78, изг 14.01.2016, «Химмед», H₂O₂, 30%, осч, изг. 03.02.2016, «Химмед», бычий и человеческий сывороточный альбумины Sigma-Aldrich A2153-10G (2006, оBSA), Reanal 79102509 (1981, оHSA), Sigma-Aldrich A2153-10G, (2016, nBSA), Sigma-Aldrich A1653-10G (2016, nSHSA). Используемая во всех опытах концентрация белка — 2 мг/мл (0,03 ммоль/мл). Измерения и наблюдения за образцами проводились для различных экспериментов не менее 15 и не более 30 дней. Для анализа модификаций были использованы следующие методы: динамическое светорассеяние, спектрофотометрия и органолептический анализ.

Было показано различие в структуре образующегося осадка при разной концентрации окислителя (табл. 1).

Табл.1. Зависимость формы осадка БСА от концентраций компонентов системы Фентона.

lg([Fe ²⁺])	lg([H ₂ O ₂])			
	-3,58	-4,58	-5,58	-6,58
-4,54	хлопья	хлопья	нет	муть
-5,54	нет	нет	-	лоскуты
-5,69	нет	нет	нет	лоскуты
Без Fe ²⁺	хлопья	нет	нет	лоскуты

Показана большая устойчивость к формированию осадка при окислении человеческого альбумина по сравнению с бычьим (см. табл. 2).

Табл. 2. Зависимость наличия осадка от концентрации ионов железа 2+ с 10% H₂O₂.

lg([Fe ²⁺])	2 дня				4 дня			
	oBSA	oHSA	nBSA	nHSA	oBSA	oHSA	nBSA	nHSA
-3,44	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да	Да
-4,44		Да		Да	Да	Да	Да	Да
-5,44						Да		Да
-6,44								

При изучении взаимодействия ионов железа с альбумином доказано, что двухвалентное железо практически не влияет на гидродинамический радиус молекул (рис. 1), в то время как ионы трёхвалентного железа при значительных концентрациях провоцируют агрегацию альбумина.

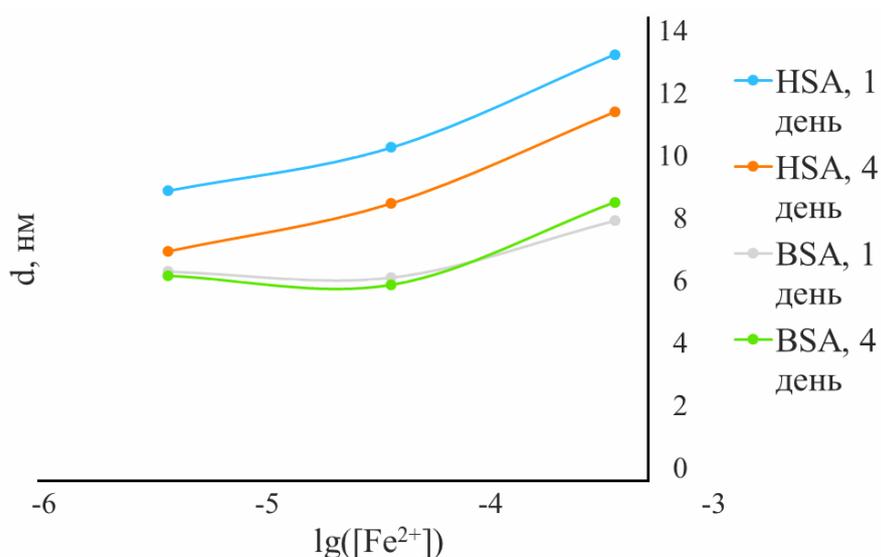


Рис.1. Гидродинамический радиус молекул альбумина в зависимости от концентрации железа 2+

Наиболее активно подвергается окислению -SH группа Cys34 остатка, сначала окисляясь до дисульфидной -S-S- связи, а затем до сульфоновой -SO₃H группы [7]. Также сшивки возможны благодаря образованию битирозиновых связей Туг-Туг. Известно, что значительная часть альбумина, растворённого из кристаллизованного порошка, димеризована благодаря дисульфидной связи Cys34 остатка [1]. Таким образом, было показано, что при окислении образуется как минимум три различных формы альбумина, две из которых нерастворимы (см. табл.1). Результаты экспериментов с низкими концентрациями пероксида водорода (соотношение молярных концентраций, при условии 100% вовлечения в реакции перекиси водорода, соответствует соотношению с альбумином приблизительно 1 к 100), могут быть обусловлены различными механизмами. Например, окислением тирозина с образованием сшивок между димеризованными молекулами альбумина. Подобное поведение системы может иметь место в случае локализации перекиси водорода или железа 2+ недалеко от тирозиновых остатков. В пользу этой модели говорит формирование лоскутообразного осадка только в случае со сравнительно низкими концентрациями железа. При более высоких концентрациях железа, генерация свободных радикалов происходит значительно быстрее (см. рис. 2), что приводит к неупорядоченному окислению различных аминокислотных остатков. Вторая, растворимая форма альбумина, вероятно, является более неупорядоченно окисленной, чем первая, в то время как последняя, нерастворимая, также неупорядоченно окислена, но в

большей степени, что приводит к полному нарушению третичной структуры белка и агрегации вследствие нескомпенсированных гидрофобных взаимодействий.

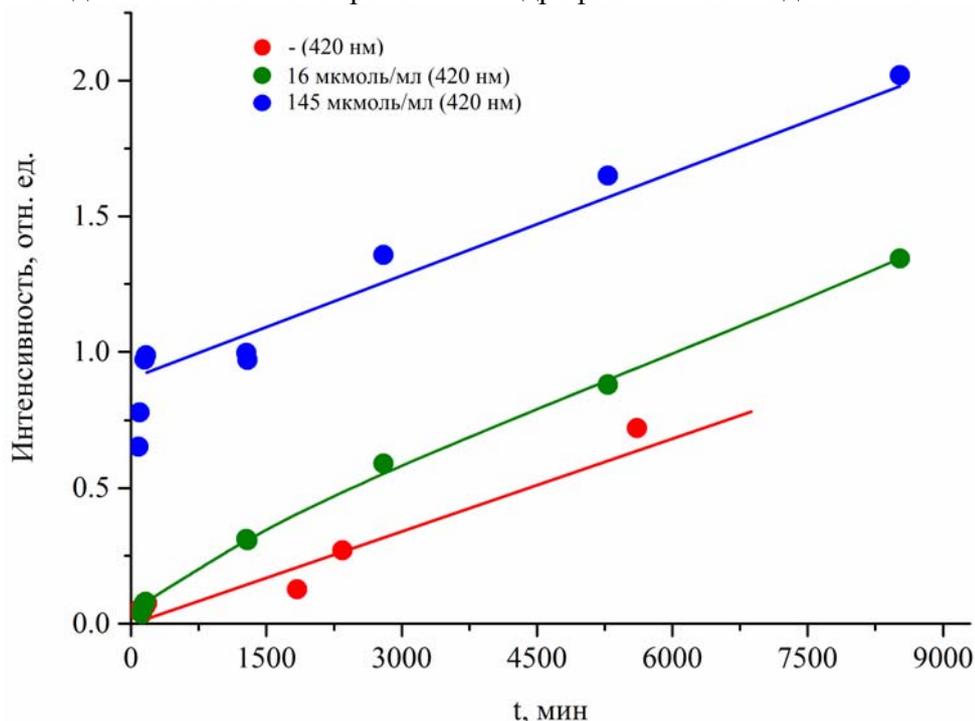


Рис. 2. Интегральная концентрация свободных радикалов, полученная при различных концентрациях железа 2+.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60244 мол_а_дк.

Литература:

1) Theodore Peters Jr., All About Albumin, Biochemistry, Genetics, and Medical Applications-Academic Press (1995)

2) Патент РФ на изобретение № 2484178 от 10.06.2013. Заявка на Патент РФ № 2011136972, приоритет от 08.09.2011. Розенфельд М.А., Бычкова А.В., Сорокина О.Н., Коварский А.Л., Леонова В.Б., Ломакин С.М., Макаров Г.Г. Способ получения белковых покрытий на поверхности твердых тел, содержащих ионы металлов переменной валентности.

3) Aristippos Gennadios, Protein-based films and coatings, CRC press. (2002)

4) Susanne K. Wiedmer, Tao Bo, Marja-Liisa Riekkola, Phospholipid-protein coatings for chiral capillary electrochromatography, Analytical Biochemistry, volume 373, P. 26–33 (2008)

5) Бычкова А.В., Леонова В.Б., Розенфельд М.А., Коварский А.Л. Устойчивые белковые покрытия на основе ферментов на поверхности магнитных наночастиц. Нанотехнологии и охрана здоровья, Т. IV, № 3 (12), С. 46-51. (2012)

6) Бычкова А.В., Пронкин П.Г., Сорокина О.Н., Татиколов А.С., Розенфельд М.А. Исследование сшитых по свободнорадикальному механизму белковых покрытий на магнитных наночастицах методом спектрально-флуоресцентных зондов. Коллоидный журнал, Т. 76, № 4, с. 420–428. (2014)

7) Karl Oetl and Gunther Marsche, Methods in Enzymology, volume 474, P. 181-195. (2010)

Новые Вi-содержащие слоистые соединения со структурой, производной от фаз Ауривиллиуса: направленный синтез и кристаллохимический анализ.



Акинфиев В.С.¹, Чаркин Д.О.¹

*¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
E-mail: doommer@mail.ru*

Слоистые флюориты и перовскиты широко исследуются вследствие широкого набора прикладных свойств и богатых возможностей структурной химии, что делает этот класс особенно перспективным при поиске новых свойств и их сочетаний. Особый интерес вызывают фазы Ауривиллиуса, структуры которых представляют собой чередующиеся перовскитные и флюоритные слои. В частности, вольфрамат висмута Bi_2WO_6 является перспективным сегнетоэлектриком, а близкий по структуре ванадат $\text{Bi}_2\text{VO}_5.5$ обладает суперионной оксидной проводимостью. В то время как Bi_2WO_6 образует многочисленные структуры срастания среди оксогалогенидов, которые наследуют сегнетоэлектрические свойства, для ванадата висмута такие производные не были описаны. Цель работы – поиск таких соединений, исследование особенностей их синтеза и химического состава, а также влияния модификации структуры на свойства. Нами впервые получены соединения со структурой срастания на основе $\text{Bi}_2\text{VO}_{5.5-\delta}$. Удалось синтезировать три оксогалогенида $\text{PbBi}_3\text{VO}_{7.5-\delta}\text{X}$ для $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{I}$. Примечательно, что такие структуры не образуются на основе полностью окисленной формы $\text{Bi}_2\text{VO}_{5.5-\delta}$ и для их стабилизации необходимо легирование VIV и некоторыми другими катионами, в частности TiIV, но не PbII. Соединения, содержащие VV и VIV, образуются при отжиге образцов в вакууме, только VV – при отжиге под высоким давлением O_2 . Индексирование рентгенограмм полученных соединений приводит к метрически тетрагональным ячейкам, что также указывает на структурообразующую роль структуры именно γ -фазы. Структурные аналогии между $\text{PbBi}_3\text{WO}_8\text{Cl}$ и $\text{PbBi}_3\text{VO}_{7.5-\delta}\text{Cl}$ проявляются в образовании непрерывного ряда твёрдых растворов. В случае $\delta = 0$ твёрдый раствор образуется только со стороны $\text{PbBi}_3\text{WO}_8\text{Cl}$ (степень замещения W на V не превышает 40%). Таким образом, при переходе от ауривиллиусовской структуры к структуре срастания на ее основе существенно изменяются возможности замещения в ванадий-кислородных слоях, что, очевидно, должно привести к изменению ионпроводящих свойств.

Поиск наиболее вероятного пути и оценка скорости выхода фосфата из активного центра ферментативного комплекса Ras-GAP



Анучин Н.М., Лычко Л.А.

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

Белки семейства Ras являются малыми ГТФ-фазами, отвечающими за передачу межклеточных сигналов и проявляющими сигнальную активность только в комплексе с молекулой гуанозинтрифосфата (ГТФ). Инактивация белка Ras осуществляется в результате гидролиза молекулы ГТФ до молекулы гуанозиндифосфата, ГДФ, протекающего медленно в отсутствие ферментативного комплекса с ГТФаза-активирующими белками (GAP). Скорость гидролиза в комплексе с белками GAP возрастает на несколько порядков. Потеря белком Ras ферментативной активности может приводить к неконтролируемому делению клеток и к онкологическим заболеваниям, что и обуславливает интерес к нему. Целью данной работы являлся поиск наиболее вероятного пути и оценка скорости выхода фосфата из активного центра ферментативного комплекса Ras-GAP после гидролиза ГТФ.

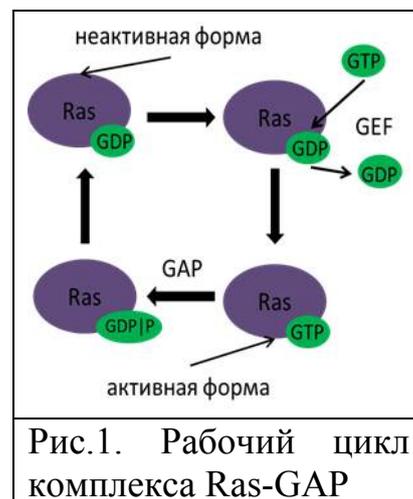


Рис.1. Рабочий цикл комплекса Ras-GAP

В данной работе с помощью методов молекулярной динамики был найден предполагаемый механизм пути выхода продукта гидролиза из активного центра ферментативного и комплекса и проведена оценка энергетических барьеров.

Программный пакет:	NAMD 2.10
Силовое поле:	Charmm36
Шаг моделирования:	0.5 фс
Число шагов:	3 000 000
Температурные параметры:	300 К, термостат Ланжевена
Параметры давления:	1 атм, баростат Ланжевена

Первой стадией работы являлось моделирование системы методом направленной молекулярной динамики. Моделирование показало, что путь протекает в 2 этапа. В результате проведения 12 молекулярно-динамических расчетов произошел выход фосфата из координационной сферы магния и замещение вакантной позиции фрагментом гуанозиндифосфата на первом этапе. На втором происходит выход продукта гидролиза в раствор.

На второй стадии нашей работы проводилось моделирование методом адаптивной направляющей силы. Первым этапом являлось моделирование и расчет энергетических характеристик замещения фосфата в координационной среде магния (рис.2) кислородом β-фосфата. На втором этапе шло моделирование выхода фосфата из активного сайта в раствор (рис.3).

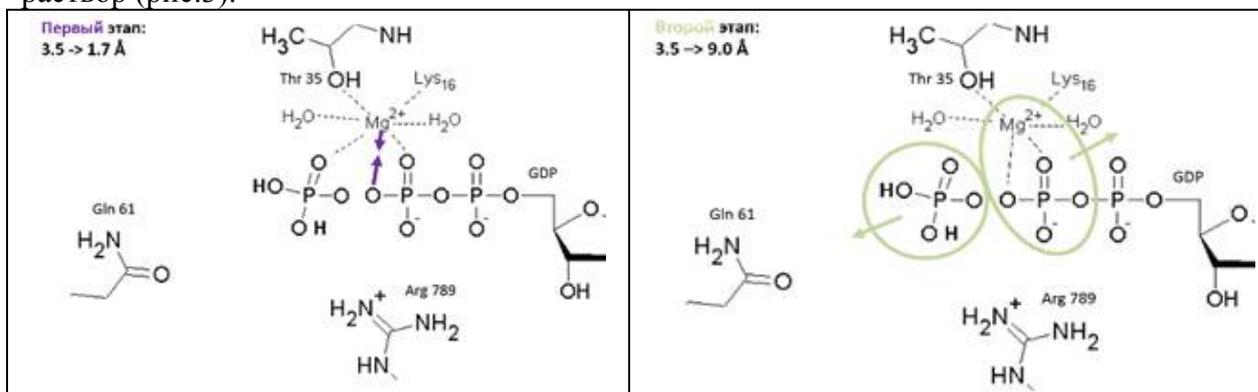


Рис. 2. Первая стадия моделирования.

Рис. 3. Вторая стадия моделирования.

В результате был получен энергетический профиль замещения фосфата в координационной сфере магния. Как видно из графика, энергия замещения фосфат вторым кислородом β -фосфата в координационной сфере магния хоть составляет порядка 8 ккал/моль.

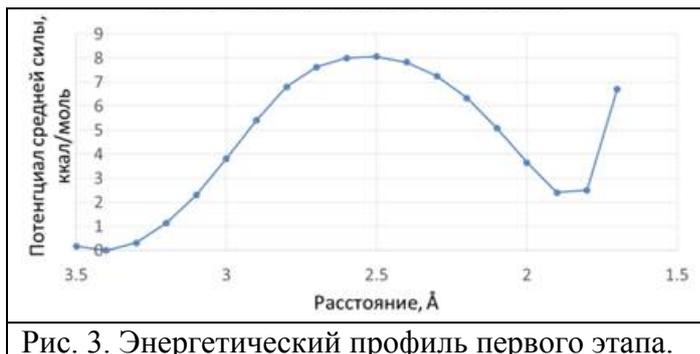


Рис. 3. Энергетический профиль первого этапа.

Влияние термо- и фотоокисления на структуру и свойства композиций на основе полилактида и вторичного полиэтилена



Подзорова М.В.^{2,3}, Тертышная Ю.В.^{1,3}, Монахова Т.В.¹, Попов А.А.^{1,2}

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

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский экономический университет имени Г.В. Плеханова», г. Москва

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ», г. Москва

На сегодняшний день особое внимание уделяется биополимерам, таким как полилактид, натуральный каучук, хитин-хитозан, полигидроксиалканоаты, но использование биodeградируемых полимеров – не единственное решение вопроса полимерных отходов [1-3].

Необходимо использовать вторсырье, которое вполне пригодно для изготовления предметов быта. Если в качестве полимерной матрицы, содержащей ПЛА, использовать экологически чистый, доступный, дешевый и технологичный ПЭНП, то окажется возможным получить относительно недорогие композиционные материалы, предназначенные для использования в качестве саморазрушающихся пленок для упаковки, сельского хозяйства и др.

Научная новизна работы состоит в получении и исследовании композиционных материалов на основе биоразлагаемого полимера – полилактида и вторичного полиэтилена, который в больших количествах накапливается в окружающей среде и плохо утилизируется. Данная работа посвящена исследованию композиций из ПЭНП, ПЛА и окисленного ПЭНП, как модели вторичного полимера.

Цель исследования – установить степень влияния термического окисления и УФ-излучения на структуру и свойства биоразлагаемых композиционных материалов на основе полилактида (ПЛА) и полиэтилена низкой плотности (ПЭНП) с добавлением вторичного полиэтилена.

В качестве образцов биоразлагаемых полимерных материалов были изготовлены пленки на основе полиэтилена низкой плотности (ПЭНП) марки 15803-020 производства ОАО «НефтеХимСэфилен» с полилактидом (ПЛА) марки 4032D производства компании NatureWorks. Количество ПЛА в смеси 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 мас.%. Количество ПЭ_{окисл} в композиции с 30 мас. % ПЛА равно 10, 20, 30 мас.%.

В работе используются различные методы и оборудование. Для получения образцов применялся роторный лабораторный смеситель типа Брабендер и гидравлический пресс ПРГ-10. А также применяются дифференциальная сканирующая калориметрия, инфракрасная спектроскопия, метод термического окисления, метод фотоокисления.

С помощью дифференциального сканирующего калориметра ДСМ-10М и NETZSCH POLYMA 214 было проведено исследование тепло - и термодинамических параметров изучаемых образцов биоленок.

Полученные величины температур и теплот плавления, степени кристалличности компонентов смеси представлены в табл.1, 2.

Таблица 1.

Результаты исследования теплофизических параметров образцов.

Соотношение ПЛА/ПЭНП, мас. %	T плавления, °С (ПЛА/ПЭНП)	ΔH , Дж/г (ПЛА/ПЭНП)	$\chi_{кр}$, % (ПЛА/ПЭНП)
100/0	165	42	45
90/10	163/104	36/43	38/15
80/20	164/104	37/49	40/17
70/30	163/104	37/36	39/12
60/40	164/104	40/51	44/18
50/50	164/104	54/57	58/19
40/60	163/104	50/44	54/14
30/70	164/105	49/46	52/16
20/80	163/104	37/54	40/18
10/90	163/105	46/48	50/16
0/100	103	61	21

Из таблицы видно, что температура плавления полиэтилена и полилактида в смесях изменяется незначительно. В основном изменяются энтальпия плавления и, следовательно, степень кристалличности ($\chi_{кр}$) компонентов.

Таблица 2

Теплофизические характеристики композиций с окисленным ПЭНП.

Соотношение ПЛА/ПЭНП/ПЭ _{окисл} , мас. %	T плавления, °С (ПЛА/ПЭНП)	ΔH , Дж/г (ПЛА/ПЭНП)	$\chi_{кр}$, % (ПЛА/ПЭНП)
30/60/10окисл	165/104	47/40	50/14
30/60/20окисл	165/104	44/41	47/14
30/40/30окисл	165/104	41/47	45/16

Из таблицы 2 заметно, что наличие окисленного ПЭНП практически не влияет на $T_{пл}$ полилактида и полиэтилена. При увеличении содержания окисленного ПЭНП степень кристалличности полиэтилена снижается на 5–7 % относительно 100 % ПЭНП. Величина $\chi_{кр}$ ПЛА несколько увеличивается при наличии 10 мас. % окисленной фракции полиэтилена, которая, возможно, выступает в роли пластификатора, но при добавлении 20, 30 мас. % ПЭ_{окисл} данного эффекта не наблюдается и $\chi_{кр}$ стремится к величине чистого ПЛА.

Теплофизические характеристики подтверждают, тот факт, что введение в матрицу до 30 мас.% вторичного полимера не оказывает отрицательного влияния на структуру полимерного материала.

В процессе изучения кинетики термического окисления полимеров при 110 °С и давлении кислорода 300 мм рт ст было выявлено, что ПЛА имеет низкую степень

поглощения кислорода по сравнению с чистым ПЭНП (рис.1). Видно, что ПЭНП окисляется в этих условиях значительно быстрее, чем ПЛА.

Также были проведены эксперименты по изучению тройных композиций с окисленным ПЭ (рис. 2). Из рис. 2 видно, видно, что аналог вторичного ПЭ значительно ускоряет начало реакции окисления. Так в исходной смеси 30ПЛА:70ПЭНП для поглощения 0,125 моль/кг кислорода понадобилось 1260 минут, при добавлении в композицию 10 мас. % ПЭокисл смесь поглощает 0,125 моль/кг за 700 мин, а при 30 мас. % ПЭокисл время поглощения до той же глубины сокращается до 570 минут. Это может положительно сказаться на утилизации композиций, в которых используется вторичный полиэтилен.

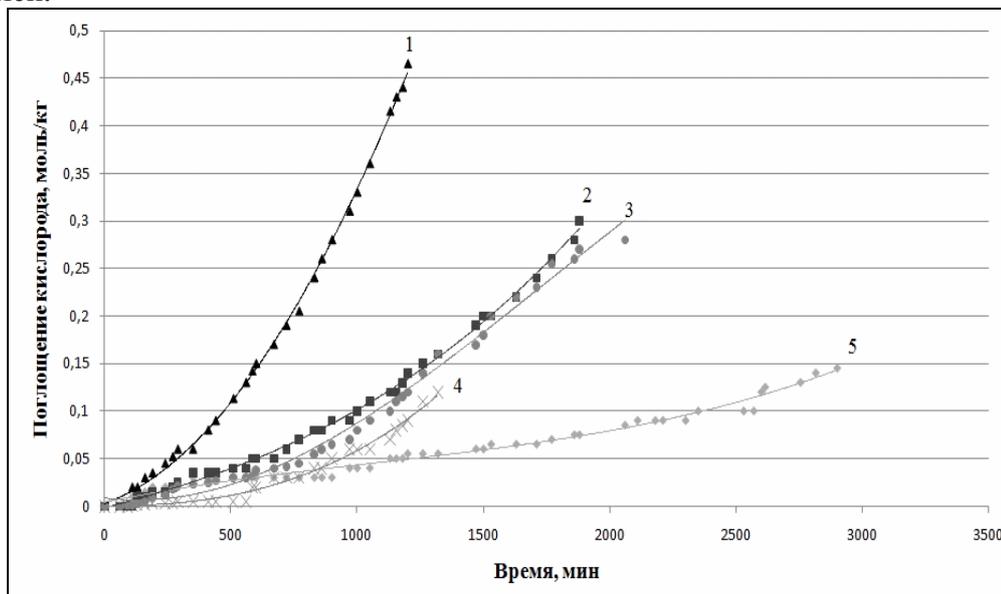


Рис. 1 Кинетические кривые окисления композиций ПЛА-ПЭНП (1 - ПЭНП, 2 - 30ПЛА:70ПЭНП, 3 - 50ПЛА:50ПЭНП, 4 - 70ПЛА:30ПЭНП, 5 - ПЛА) при температуре 110 °С и давлении кислорода 300 мм рт.ст.

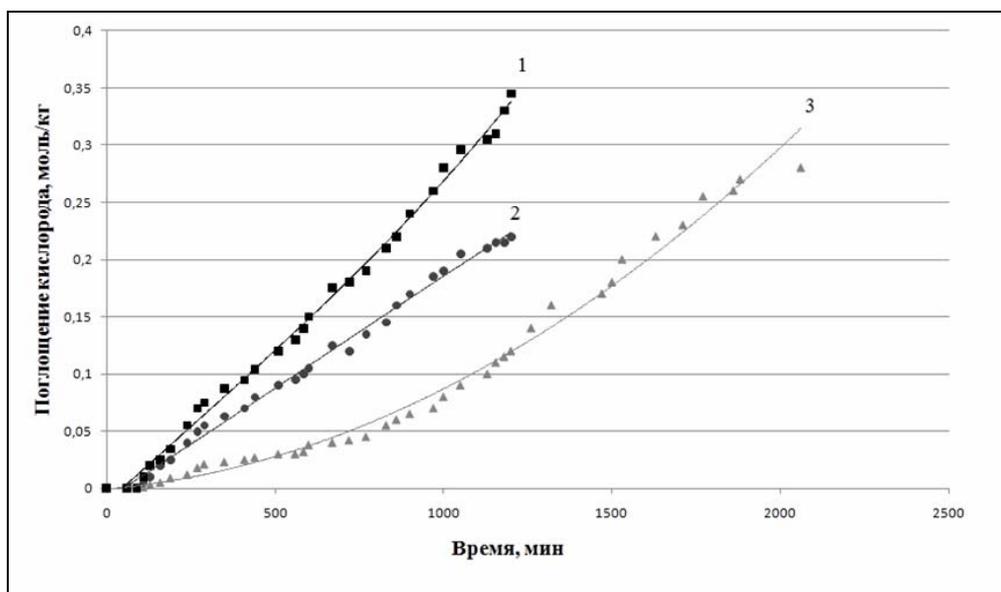


Рис. 2 Кинетические кривые окисления композиций ПЛА-ПЭНП с ПЭ_{окисл} (1 – 30ПЛА:40ПЭНП:30ПЭ_{окисл}, 2 - 30ПЛА:60ПЭНП:10ПЭ_{окисл}, 3 - 30ПЛА:70ПЭНП) при температуре 110 °С и давлении кислорода 300 мм рт. ст.

При фотоокислении отмечается растрескивание образцов, особенно с преобладанием содержания ПЛА-компонента. Происходит изменение температуры плавления и степени кристалличности ПЛА (рис. 3)

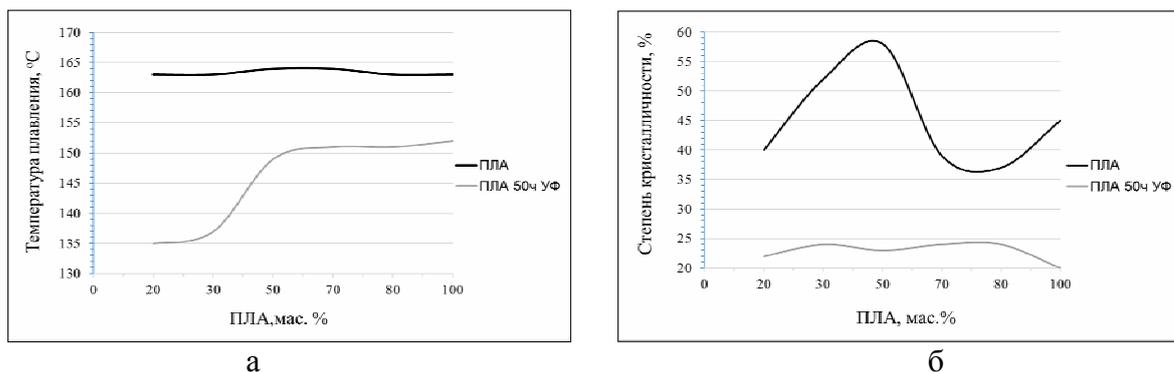


Рис. 3 Изменение ПЛА: температуры плавления (а) и изменение степени кристалличности (б) до (черный) и после (серый) воздействия 50 часов УФ.

В процессе исследования происходит изменение температуры плавления ПЛА, при воздействии 50 часов УФ-излучения с длиной волны 254 нм, снижается с 163 °С до 152 °С, а в некоторых композиция содержащих 10-30 мас.% ПЛА до 140-135 °С. Степень кристалличности ПЛА после воздействия 50 часов УФ резко уменьшилась с 45 до 20%. В композициях это значение варьируется в промежутке 22-24%.

Выводы:

В связи с экологической ситуацией использование биоразлагаемых материалов и вторичных полимеров актуально на сегодняшний день.

В результате исследования было выявлено, что ПЛА имеет низкую степень поглощения кислорода по сравнению с чистым ПЭНП, а добавление в композиции окисленного ПЭ не оказывает отрицательного влияния на структуру полимерного материала, но при этом ускоряет процесс окисления композиций, что в дальнейшем может положительно сказаться на разрушении композиций в окружающей среде.

При фотоокислении в течение 50 часов (УФ-излучение с $\lambda=254$ нм) отмечается растрескивание образцов, особенно с преобладанием содержания ПЛА-компонента, происходит резкое снижение температуры плавления ПЛА (с 163 до 152 °С) и степени кристалличности ПЛА (с 45 до 20 %).

Таким образом, можно заключить, что использование композиций на основе полимера из возобновляемого сырья (ПЛА) и вторично переработанного полиэтилена позволит сократить потребление нефти и уменьшить негативное влияние полимерных отходов на экологическую обстановку. Данные материалы хорошо подвергаются воздействию термического окисления и фотоокисления.

Список литературы:

1. Lee S.H., Kim I.Y., Song W.S. Biodegradation of polylactic acid (PLA) fibers using different enzymes // *Macromolecular Research*. – 2014. – Vol. 22. – P. 657-663.
2. Podzorova M.V., Popov A.A., Tertyshnaya Yu.V. Environmentally friendly films based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(lactic acid): a review // *Russian Journal of Physical Chemistry B*. – 2014. – Vol. 8. – № 5. – P. 726-732.
3. Tertyshnaya Yu.V., Shibryaeva L.S. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and its blends during treatment with uv light and water // *Polymer Science. Series B*. – 2013. – Vol. 55. – № 3-4. – P. 164-168.

Нановолокнистые материалы на основе полигидроксибутирата и железо(III)-порфиринов медицинского назначения



П. М. Тюбаева^{1,3}, А. А. Ольхов^{1,2}, О. В. Староверова², А. В. Лобанов²

¹ФГБОУ ВО Российский экономический университет им. Г. В. Плеханова, Москва, E-mail: aolkhov@yandex.ru

²ФГБУ Институт химической физики им. Н. Н. Семенова Российской академии наук, Москва, E-mail: avlobanov@mail.ru

³ФГБУ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля Российской Академии наук, Москва, E-mail: tyubaeva-polina@yandex.ru

К настоящему времени значительное число промышленных полимеров в частности наноструктурированных полимерных материалов прошло всестороннюю санитарно-гигиеническую проверку и ряд из них разрешен для использования в изделиях медицинской техники. Актуальной проблемой является непригодность многих современных материалов для медицинского назначения и невозможность их использования в изделиях, прямо или даже косвенно контактирующих с тканями организма, пищевыми и лекарственными средствами. Особенно жестким санитарно-гигиеническим требованиям должны удовлетворять полимерные материалы, предназначенные для введения в организм и контакта с жидкими средами.

В результате экспериментального изучения биополимерных материалов наряду с установлением широких возможностей их использования была выявлена потребность в создании специальных материалов прежде всего специфической структуры.

Разработанный в ходе исследования концептуальный подход к решению данной проблемы базируется на введении в состав полимерного материала, получаемого методом волокнообразования в электростатическом поле из расплава природного биополимера - поли-3-гидроксибутирата (ПГБ), с введением бактерицидного агента - комплекса порфирина (Fe-3-Cl-ТФП) обладающего антимикробной и микробиологической активностью. Сущность подхода состоит в получении таких специфических наноструктурированных материалов медицинского назначения, которые могут обеспечить максимальную поверхностную плотность при минимальной площади контакта с тканями организма, соответствующих требованиям физико-механических показателей и санитарно-гигиенических норм.

В зависимости от характеристик формовочного раствора биополимера и содержания дополнительных компонентов возможно варьирование технологических параметров процесса электроформования, за счет чего на практике удастся подтвердить потенциальную возможность производства нетканых полотен медицинского назначения с заданными свойствами: благодаря существованию зависимостей между характеристиками материалоемкости: толщины, массы, отношения волокнистой массы к воздушному пространству материала, и характеристиками волокон нано- или микроразмеров (в зависимости от задаваемых параметров процесса и показателей электропроводности, вязкости и концентрации формовочного раствора ПГБ в растворителе - хлороформе). Так волокнистая структура в зависимости от значений поверхностной и объемной плотности материала описывается через ориентацию волокон, разнотолщинность, плотность укладки, угол наклона.

Причем полученные волокна с различным диаметром, плотностью и геометрией пространственного положения определяли свойства материала: механические, химико-физические, даже термические и фазовое распределение в макромолекулярной структуре. Определение и анализ данных характеристик позволил обосновать возможность формирования набора характеристик в интервалах значений с учетом предъявляемых к

медицинскому материалу требований. Результаты испытаний данных материалов приведены в Таблице 1, что наглядно демонстрирует принцип изменения показателей различных свойств материала в зависимости от компонентного состава формовочного раствора.

Таблица 1. Влияние концентрации раствора ПГБ и технологической добавки на характеристики строения материала.

наименование образца: %, концентрация в р-ре ХФМ	средний диаметр волокон D, мкм	среднее значение толщины		индекс ориентаци и волокон,	удельная плотность структуры, %	заполнение материала M, г/м
		волокна B, мкм	материала, мкм			
5% ПГБ	0,6-0,7	32,9	81	0,49	74	48,89
7% ПГБ	2,0-2,5	18,6	172	0,26	94	37,7
9% ПГБ	3,0-3,5	32,8	239	0,69	89	45,2
7% ПГБ	2,5-3,0	1% FeCl ₂ ФП	27,8	128	0,34	26,6
		3% FeCl ₂ ФП	18,9	179	0,72	36
		5% FeCl ₂ ФП	32,8	233	0,67	32

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин Б.Д. Координационные соединения порфиринов и фталцианина. М.: Наука. 1978. – 280 с.
2. Лобанов А.В., Неврова О.В., Илатовский В.А., Синько Г.В., Комиссаров Г.Г. Координационные и фотокаталитические свойства металлпорфиринов в разложении пероксида водорода // Макрогетероциклы. 2011. Т. 4. №2. С. 132-134
3. Филатов Ю.Н. Электроформование волокнистых материалов (ЭФВ-процесс) – М.: Нефть и газ, 1997. – 298 с.
4. Карпова С.Г., Ольхов А.А., Иорданский А.Л., Ломакин С.Ш., Шилкина Н.С., Попов А.А., Гумаргалиева К.З., Берлин А.А. Нетканые смесевые композиции на основе ультратонких волокон поли(3-гидрокси)бутирата с хитозаном, полученные электроформованием // высокомолекулярные соединения. Серия А 2016. Т. 58. №1. С. 61-72.

Исследование качества сокодержущих продуктов



Нагиева Сунай, Табуридзе Димитрий, Трофимова Т.В.

Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение г.Москвы «Школа» №1400

Соки – важная составляющая рациона человека. Как правило, это источник глюкозы, фруктозы и минеральных веществ. К сожалению, на сегодняшний день достаточно сложно найти в продаже натуральный, а значит полезный сок. Это связано и со сроком хранения данного продукта и с дороговизной сырья. Поэтому производители идут на хитрость: в качестве «натурального» представляют восстановленные из порошков соки, заменяют дорогостоящее сырье более доступным и дешевым – яблочным соком, насыщая его целым комплексом ароматизаторов и красителей.

Целью данной работы является определение содержания натурального сока и витамина С в различных видах соков из красных ягод и фруктов.

Задачи:

1. изучить, какие сокосодержащие продукты продаются в магазинах нашего города;
2. исследовать выбранные образцы соков по органолептическим показателям; на наличие в составе натурального сока; уровень кислотности и содержание аскорбиновой кислоты (витамина С);
3. проанализировать полученные результаты;
4. выбрать сок, который по показателям будет наиболее качественный.

Бесспорно, в современном мире при всем многообразии продуктов питания человек испытывает дефицит качественных, натуральных продуктов. В связи с этим организм недополучает необходимые для нормального функционирования вещества.

Большое влияние на состояние организма оказывают витамины и антиоксиданты, которые содержатся в натуральных ягодах, фруктах и овощах.

Организм человека и некоторых приматов в процессе эволюции утратил способность вырабатывать витамин С, хотя у многих животных эта особенность сохранилась. Витамин С играет большую роль в регулировании свертываемости крови, способствует регенерации тканей, повышает устойчивость организма к инфекционным заболеваниям [1].

Антиоксиданты – это соединения, защищающие клетки от вредных эффектов или реакций, которые могут вызвать избыточное окисление в организме [2]. Они должны поступать в достаточном для человеческого организма количествах, поскольку они замедляют процессы старения клеток.

В данной работе для исследования взяты пакетированные соки марок «J-7» (вишня), «Фруктовый сад» (вишневый компот), «Северная ягода» (морс малина и клюква), «Моя семья» (нектар фруктово-ягодный), в качестве контрольного образца использовался сок свежемороженой вишни.

В ходе органолептического исследования образцы оценивались по таким показателям, как цвет, прозрачность, запах, вкус.

В результате, большая часть представленных пакетированных соков значительно отличается от натурального сока – имеют неестественно яркий цвет и слишком выраженный запах и вкус. Наиболее близок по представленным показателям образец №1 марки «J-7».

Для определения наличия натурального сока красных ягод в изучаемых образцах был проведен эксперимент. Красное окрашивание плодов обуславливается наличием натуральных пигментов – антоцианов. Антоцианы – индикаторы, которые меняют свой цвет в зависимости от уровня кислотности pH. Так, в щелочной среде красный цвет становится синим.

На фильтровальную бумагу мы нанесли по несколько капель сока. Для индикации был приготовлен водный раствор пищевой соды, который имеет щелочную среду. Нанеся несколько капель раствора соды к исследуемым образцам, наблюдаем за изменением цвета.

В результате, натуральный сок вишни приобрел яркое сине-фиолетовое окрашивание. Пакетированные соки незначительно изменили цвет. В образце сока марки «Северная ягода» (морс) изменение цвета практически не заметно. Из представленных образцов наиболее заметное изменение окраски отмечено в образце марки «J-7».

Уровень кислотности был определен при помощи цифровой лаборатории Архимед и pH датчика. В ходе измерений были получены следующие результаты.

Минимальное значение pH у образца марки «Северная ягода» (морс). Такое значение также характерно для столового уксуса.

Водородный показатель сока «Моя семья» равен 3, что соответствует значению рН яблочного сока.

Табличные значения рН для сырой вишни 3,2-4,5, что совпадает с полученными данными для остальных образцов.

Для определения содержания аскорбиновой кислоты использовался метод йодометрии [3]. Для исследования был приготовлен раствор йода с концентрацией 5 миллимоль на литр и раствор крахмала.

Суть метода заключается в следующем. Йод легко окисляет аскорбиновую кислоту, при этом йод обесцвечивается. При добавлении избыточного количества йода, раствор, содержащий крахмал – синеет. Соответственно, тот образец, который обеспечивает большее количество раствора йода, содержит большее количество аскорбиновой кислоты.

Для приготовления раствора йода использовалась 5% аптечная настойка йода. Чтобы определить необходимый объем настойки йода для приготовления 1 литра пяти миллимолярного раствора мы воспользовались формулой

$$V_{\text{настойки}} = 100 \cdot m_{\text{J}_2} / (w_{\text{настойки}} \cdot \rho_{\text{настойки}})$$

где m_{J_2} – масса йода, необходимая для приготовления раствора (1,269 гр)

$w_{\text{настойки}}$ – концентрация йода в настойке, % масс. (5%)

$\rho_{\text{настойки}}$ – плотность йодной настойки, г/мл (1г/мл)

Соответственно, для приготовления 1 л раствора потребуется 25,4 мл настойки йода, а для 100 мл – 2,54мл.

Отмеряем необходимое количество настойки, доводим до объема 100мл.

Для приготовления раствора крахмала 1г крахмала был разведен в небольшом количестве воды, затем полученная суспензия медленно выливается в 200 мл кипятка.

Отмеряем объем сока – 10 мл, добавляем 0,5мл раствора крахмала и по каплям приливаем раствор йода до появления устойчивого синего окрашивания.

Расчёт концентрации витамина С в пробах сока проводили по формуле:

$$C_{\text{вит.С}} = C_{\text{J}_2} \cdot V_{\text{J}_2} / V_{\text{сок}} = 0,005 \cdot V_{\text{J}_2} / V_{\text{сок}}$$

где $C_{\text{вит.С}}$ – концентрация витамина С,

V_{J_2} – объем раствора йода, который пошел на титрование,

C_{J_2} – концентрация раствора йода,

$V_{\text{сок}}$ – объем пробы сока

Далее мы произвели расчёт содержания витамина С в соке (мг/100 мл сока) по формуле:

$$m_{\text{вит.С}} = C_{\text{вит.С}} \cdot 0,1 \cdot M_{\text{С6Н8О6}} \cdot 1000 = 17612 \cdot C_{\text{вит.С}}$$

где $M_{\text{С6Н8О6}}$ – молярная масса витамина С, $m_{\text{вит.С}}$ – масса витамина С, мг/100 мл сока.

Полученные данные сведены в таблицу.

Образец	Концентрация витамина С, ммоль/л	Масса витамина С, мг/100мл
«J-7»	1,6	28
«Фруктовый сад»	1,7	30
«Северная ягода»	1,8	32
«Моя семья»	1,5	26
Натуральный сок вишни	16	106

Таким образом, все пакетированные соки содержат (приблизительно) витамин С в пределах 20-30 мг/100мл, что характерно для яблочного сока.

Содержание витамина С в натуральном соке вишни в 3-4 раза больше, чем в пакетированных соках.

Уровень рН достигается содержанием регуляторов кислотности (лимонной кислоты).

На упаковках сока не указано содержание аскорбиновой кислоты, проверить полученные данные с данными производителя не представляется возможным.

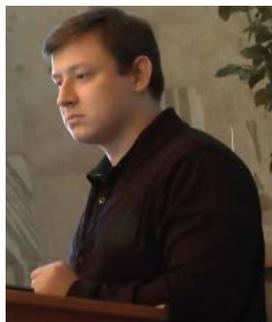
Таким образом, можно сделать выводы по работе:

1. Натуральные соки красных ягод и фруктов богаты антиоксидантами – аскорбиновой кислотой и антоцианами
2. Пакетированные красные соки содержат минимальное количество сока красных ягод, а вкус, цвет и аромат достигается использованием ароматизаторов, вкусовых добавок и красителей
3. В качестве основного компонента соков используется более дешевый яблочный сок
4. Уровень кислотности рН достигается введением в ходе технологического процесса регуляторов кислотности (лимонной кислоты), что позволяет хранить соки более длительное время
5. Содержание витамина С в пакетированных соках в 3-4 раза меньше, чем в натуральных соках

Список литературы:

1. Журнал «Индустрия напитков» № 3 2013 DavidBerryman Limited (Кенсуорт, Великобритания)
2. Википедия
3. Химия и химики №9 (2009) Определение содержания витамина С в цитрусовых Н.К.Фролова

Локализация нарушений упорядоченности структуры транс-1,4- звеньев бутадиена в междефектных областях матрицы бутадие-нитрильных эластомеров



**Михайлов И.А.¹, Сухарева К.В.¹, Ливанова Н.М.²,
Карпова С.Г.², Андриян Ю.О.², Попов А.А.^{1,2},
Турлачева Т.С.³**

1 - Российский Экономический Университет им. Г.В. Плеханова, Москва

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

3 - Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий), Москва

В работе рассмотрен вопрос о локализации разупорядоченных сегментов цепей транс-1,4-полибутадиена в сополимерах бутадиена с акрилонитрилом (БНК). Показано, что причиной нарушения упорядоченности в расположении участков цепей является непосредственная близость к структурным дефектам БНК.

В работах [1, 2] установлена структура дефектных микрообластей статистических и микроблочных БНК различной полярности, в которых происходит абсорбция низкомолекулярных соединений. Выявлено сочетание структурных единиц, образующих дефект.

Показано, что центрами сорбции являются дефекты структуры, образованные акрило-нитрильными звеньями (АН) и цис-1,4- и 1,2-звеньями бутадиена (табл.1). Показана идентичность центров сорбции в каучуках и резинах на их основе, что свидетельствует о стабильности структуры дефектов.

Табл. 1. Изомерный состав бутадиеновых звеньев в БНК, определенный методом ИК спектроскопии.

Марка БНК	Содержание звеньев в %		
	<i>транс</i> -1,4	1,2	<i>цис</i> -1,4
БНКС-18	82.0	8.2	9.8
БНКС-28	76.4	14.4	9.2
БНКС-40	93.0	4.4	2.6

От структуры дефектов, величины свободного объема в них и их относительного количества зависит распределение зондов и других низкомолекулярных веществ в полимерной матрице [2].

Доля свободного объема в дефектах рассчитана по индивидуальному вкладу каждой структурной единицы [2, 3].

Используя правило Бойера-Симхи ($\alpha_{ж} - \alpha_c$) $T_c \approx 0,113$, $\alpha_{ж} - \alpha_c \approx 5 \cdot 10^{-4} \text{ см}^3/\text{К}^{-1}$, $\alpha_{ж} T_c \approx 0,16$, по величине температурного коэффициента объемного расширения $\alpha_{ж}$ в высокоэластическом состоянии и температуре стеклования T_c оценена доля свободного объема при комнатной температуре:

$$f_c = 0,025 + \alpha_{ж} (294 - T_c).$$

В БНК она составляет [2, 3]:

$$\text{БНКС-18 } \alpha_{ж} \approx 7,11 \cdot 10^{-4}, T_c = 225 \text{ К}, f_c^{\text{БНК}} = 0,0741$$

$$\text{БНКС-28 } \alpha_{ж} \approx 6,9 \cdot 10^{-4}, T_c = 241 \text{ К}, f_c^{\text{БНК}} = 0,0601.$$

$$\text{БНКС-40 } \alpha_{ж} \approx 7,2 \cdot 10^{-4}, T_c = 246 \text{ К}, f_c^{\text{БНК}} = 0,0562;$$

в полибутадиенах:

$$\text{цис-ПБ } \alpha_{ж} \approx 9,5 \cdot 10^{-4}, T_c = 168 \text{ К}, f_c = 0,1447;$$

$$1,2 - \text{ПБ } \alpha_{ж} \approx 5,9 \cdot 10^{-4}, T_c = 269 \text{ К}, f_c = 0,03975.$$

$$\text{транс-ПБ } \alpha_{ж} \approx 6,2 \cdot 10^{-4}, T_c = 258 \text{ К}, f_c = 0,04732;$$

На основании данных по изомерному составу бутадиеновых звеньев в БНК (табл. 1) и свободному объему *цис*-1,4-, *транс*-1,4- и 1,2-ПБ рассчитана доля свободного объема f_c^A АН звеньев в БНК:

$$f_c^A c^A + 0,1447 c^{\text{цис}} + 0,04732 c^{\text{транс}} + 0,03975 c^{1,2} = f_c$$

$$\text{В БНКС-18 } f_c^A = 0,099; \text{ БНКС-28 } f_c^A = 0,0174; \text{ БНКС-40 } f_c^A = 0,0167$$

Доля свободного объема в дефектах структуры составляет:

$$\text{в БНКС-18 I. (АТАВС)} \cdot 0,082 = 0,0352; \text{ II. (АТАСС)} \cdot 0,008 = 0,0043; \Sigma = 0,0395$$

$$\text{в БНКС-28 I. (АТАВС)} \cdot 0,092 = 0,0245; \text{ II. (АТАВТАТАВ)} \cdot 0,026 = 0,007567; \Sigma = 0,0321$$

$$\text{в БНКС-40 I. (АТАТАТАТАТАТАТАТАВС)} \cdot 0,026 = 0,0185;$$

$$\text{II. (АТАТАТАТАТАТАТАТАВ)} \cdot 0,018 = 0,01024; \Sigma = 0,0288,$$

где А – АН звенья, Т – *транс*-1,4-, С – *цис*-1,4- и V – 1,2- звенья бутадиена.

По разности величины свободного объема в БНК $f_c^{\text{БНК}}$, рассчитанной на основании экспериментальных данных ($\alpha_{ж}$ и T_c), и суммарной доли свободного объема во всех дефектных структурах сополимеров определена доля свободного объема всех *транс*-1,4- звеньев бутадиена в междефектных областях матрицы БНК $f_c^{\text{транс}}$:

$$\text{в БНКС-18 } 0,0741 - 0,0395 = 0,0346;$$

$$\text{в БНКС-28 } 0,0601 - 0,0321 = 0,0280;$$

$$\text{в БНКС-40 } 0,0562 - 0,0288 = 0,0274.$$

Далее оценено количество *транс*-1,4-звеньев бутадиена, входящих в упорядоченные структуры, и находящихся в неструктурированных областях с целью определения локализации последних.

Предположили, что основной причиной невозможности участия *транс*-1,4-звеньев в процессе структурирования является непосредственная близость дефектных структур, образованных звеньями иной природы (АН звеньями) и иного изомерного состава: *цис*-1,4- и 1,2- звеньями бутадиена (табл. 1).

Принимая, что неупорядоченные (проходные) сегменты цепей полибутадиена в *транс*-1,4-конфигурации находятся в непосредственной близости от дефектных структур

сополимеров, произведен расчет их процентного содержания. Из приведенного ранее расчета f_c в дефектах структуры следует, что суммарное содержание дефектов в БНКС-18 составляет 8.8%, БНКС-28 – 11.8, БНКС-40 – 4.4%. По доле свободного объема в *транс*-ПБ и содержанию дефектов рассчитана доля свободного объема в неупорядоченных участках цепей: в БНКС-18 – 0.00426, БНКС-28 – 0.00558, БНКС-40 – 0.00208.

Тогда доля свободного объема в упорядоченных структурах равна разности $f_c^{\text{транс}}$ (всех *транс*-1,4-звеньев в междефектных областях) и f_c в неупорядоченных зонах матрицы: в БНКС-18 – 0.03044, БНКС-28 – 0.02242, БНКС-40 – 0.02532.

Таблица 2. Аррениусовские параметры вращения зонда ТЕМПО в БНК и τ_c при 24.5°C [4].

Каучук	$\tau_c \times 10^{-10}$, с	Эффективная энергия активации, кДж/моль		Предэкспоненциальный множитель, с		Температура перехода, К
		E_1	E_2	τ_0^1	τ_0^2	
БНКС-18	7.4	33.8	56.2	9.25×10^{-16}	1.45×10^{-19}	311
БНКС-28	17.8	14.4	65.2	5.55×10^{-12}	1.18×10^{-20}	306
БНКС-40	23.4	20.1	76.4	7.83×10^{-13}	3.84×10^{-22}	317

В работе [4] по температурным зависимостям вращательной подвижности нитроксильного радикала – зонда ТЕМПО (2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил), характеризуемой временем корреляции τ_c , установлено наличие λ -релаксационного перехода в каучуках, обусловленного распадом упорядоченных структур *транс*-1,4-звеньев бутадиена, и рассчитана эффективная энергия активации вращательной подвижности зонда до E_1 и после перехода E_2 по формуле

$$\tau = \tau_0 \exp(E/RT)$$

где τ_0 – предэкспоненциальный множитель [4] (табл. 2).

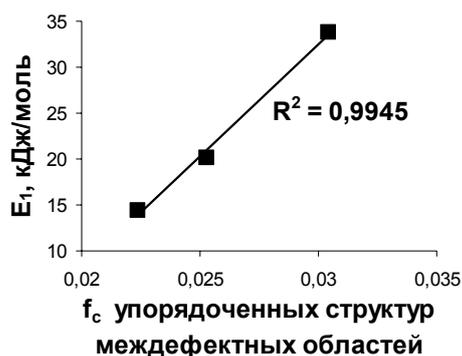


Рис. 1

На рис. 1 приведена зависимость величины эффективной энергии активации на участке до перехода E_1 от доли свободного объема в упорядоченных структурах БНК, рассчитанных выше, которая зависит от их размера и плотности упаковки цепей. Поскольку природа упорядоченных структур одна и та же во всех БНК, можно предположить, что усредненный по всему объему надмолекулярных образований коэффициент термического расширения в них близок (в пределах ошибки эксперимента – 10%) и величина E_1 определяется, в основном, размером структур. Из рис. 1 следует, что чем больше размер упорядоченных образований, тем выше E_1 . На рисунке R^2 – величина достоверности аппроксимации.

По соотношению f_c в неупорядоченных участках цепей и общей f_c^{trans} в междефектных областях оценено содержание *транс*-1,4-звеньев бутадиена, не включенных в упорядоченные структуры: в БНКС-18 – 12.31%, БНКС-28 – 19.93%, БНКС-40 – 7.59%. По разности количества *транс*-1,4-звеньев в междефектных областях матрицы (f_c^{trans}) и находящихся вблизи дефектов (не входящих в надмолекулярные образования) получено количество *транс*-1,4-звеньев в упорядоченных структурах в %: в БНКС-18 $73.20 - 12.31 = 60.89$; БНКС-28 $59.20 - 19.93 = 39.27$; БНКС-40 $57.90 - 7.59 = 50.31$.

На рис. 2 приведена зависимость величины E_1 от содержания *транс*-1,4-звеньев бутадиена в упорядоченных структурах. Приведенная зависимость подтверждает вывод о том, что с ростом размера упорядоченных структур увеличивается эффективная энергия активации E_1 на участке до λ -релаксационного перехода, обусловленного их распадом.

Представленные на рис. 1 и 2 корреляционные зависимости подтверждают правильность положенных в основу расчета предположений, в том числе, о локализации неупорядоченных сегментов цепей в непосредственной близости от структурных дефектов БНК.

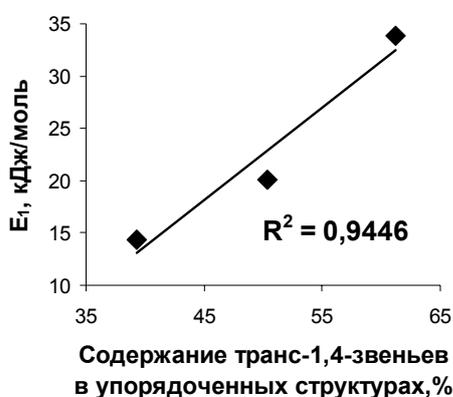


Рис. 2

Литература.

1. Ливанова Н.М., Попов А.А. // . Polymer Sci A 2016.V.. 58. № 2. Р.. 130.
2. Ливанова Н.М., Попов А.А. // . Polymer Sci A 2016.V.. 58. № 4. Р.. 525.
3. К.В. Сухарева, Н.М. Ливанова, Ю.О. Андриасян, И.А. Михайлов, А.А. Попов. Труды XV Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН – ВУЗы «Биохимическая физика». Москва 23-25 ноября 2015 г. Москва 2016. С. 155.
4. Livanova N M., Karpova S G., Popov A A. // Polymer Science., A. 2011. V. 53. №. 12. P. 1128.

Влияние громоздких звеньев и паракристаллических структур в этиленпропилендиеновых эластомерах на совмещение с бутадиеннитрильными каучуками



Сухарева К.В.¹, Михайлов И.А.¹, Ливанова Н.М.², Андриасян Ю.О.², Попов А.А.^{1,2}, Русакова Н.В.³

1 - Российский Экономический Университет им. Г.В. Плеханова, Москва

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

3 - Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий), Москва

В работах [1, 2] установлена структура дефектных микрообластей в статистических и микроблочных сополимерах бутадиена с акрилонитрилом (БНК) различной полярности, в которых происходит абсорбция низкомолекулярных соединений. Показано, что центрами сорбции являются дефекты структуры, образованные акрилонитрильными звеньями (АН) и цис-1,4- и 1,2-звеньями бутадиена (табл.1). Показана идентичность центров сорбции в каучуках и резинах на их основе, что свидетельствует о стабильности структуры дефектов.

В табл. 1 приведен изомерный состав бутадиеновых звеньев в БНК, определенный методом ИК спектроскопии.

Марка БНК	Содержание звеньев в %		
	<i>транс</i> -1,4	1,2	<i>цис</i> -1,4
БНКС-18	82.0	8.2	9.8
БНКС-28	76.4	14.4	9.2
БНКС-40	93.0	4.4	2.6

В работе [3] установлено участие дефектных структур в формировании межфазного слоя в совулканизатах БНК и этиленпропилендиеновых эластомеров (СКЭПТ) различных марок: “Royalen” фирмы “Uniroyal”, “DSM” и отечественных. Сомономерный состав, степень изотактичности пропиленовых звеньев, содержание диена и звеньев бутена-1 и полибутена-1 в растворе с гелем СКЭПТ зарубежных марок (кроме R505 и 714) и в растворе отечественных СКЭПТ и вязкость по Муни приведены в таблице 2.

Объем и плотность областей межфазного взаимодействия охарактеризована величиной отклонения равновесной степени набухания Q_p в селективном растворителе *n*-гептане (метод Заппа [4]) от аддитивных значений $-\alpha$:

$$-\alpha = [(Q_{ад} - Q_p) / (Q_{ад} - Q_2)] \cdot 100\%,$$

где $Q_{ад}$ – аддитивная величина набухания в данном растворителе, вычисленная по равновесной степени набухания вулканизатов каждого из каучуков; Q_2 – доля набухания БНК.

Установлена корреляция величины $-\alpha$ с долей свободного объема в дефектах структуры БНК (рис. 1) [3]. Доля свободного объема в дефектах рассчитана по индивидуальному вкладу каждой структурной единицы [2, 3].

Используя правило Бойера-Симхи ($\alpha_{ж} - \alpha_c$) $T_c \approx 0,113$, $\alpha_{ж} - \alpha_c \approx 5 \cdot 10^{-4} \text{ см}^3/\text{K}^{-1}$, $\alpha_{ж} T_c \approx 0,16$, по величине температурного коэффициента объемного расширения $\alpha_{ж}$ в высокоэластическом состоянии и температуре стеклования T_c оценена доля свободного объема при комнатной температуре:

$$f_c = 0,025 + \alpha_{ж} (294 - T_c)$$

В БНК она составляет [2, 3]: БНКС-18 $\alpha_{ж} \approx 7,11 \cdot 10^{-4}$, $T_c = 225 \text{ K}$, $f_c = 0,0741$
 БНКС-28 $\alpha_{ж} \approx 6,9 \cdot 10^{-4}$, $T_c = 241 \text{ K}$, $f_c = 0,0601$. БНКС-40 $\alpha_{ж} \approx 7,2 \cdot 10^{-4}$, $T_c = 246 \text{ K}$,
 $f_c = 0,0562$;

в полибутадиенах:

цис-ПБ $\alpha_{ж} \approx 9,5 \cdot 10^{-4}$, $T_c = 168 \text{ K}$, $f_c = 0,1447$; 1,2 – ПБ $\alpha_{ж} \approx 5,9 \cdot 10^{-4}$, $T_c = 269 \text{ K}$, $f_c = 0,03975$.
транс-ПБ $\alpha_{ж} \approx 6,2 \cdot 10^{-4}$, $T_c = 258 \text{ K}$, $f_c = 0,04732$;

Таблица 2.

Марка СКЭПТ	Этилен/пропилен, мас.%	Степень Изотактичности, %	Бутен-1 (765 см ⁻¹)	Полибутен-1 (787 см ⁻¹)	Содержание диена, мас.%	Вязкость по Муни, у.е. при	
						100°C	125°C

R512	68/32	20	0.259.	0.349	4	80	57
	57/43	24	~0	~0	8	82	55
R505	52/48	22	0.055	0.048	5	45	29
R 521	65/35	13	0.208	0.256	4.5	-	63
	50/50	12	~0	~0	8	-	63
DSM 778	52/48	11	0.048	0.044	4.5	-	63
	70/30	29	~0	0.025	4	36-45	-
DSM 714	60/40	13	~0	~0	4	60	-
	74/26	9.5	~0	~0	5.4	67	-
DSM 712				~0			
	60/40	13	~0		6.7	62	-
СКЭПТ-40 СКЭПТ60(I) Эластокам 6305 СКЭПТ- 60(II)							

На основании данных по изомерному составу бутадиеновых звеньев в БНК (табл. 1) и свободному объему *цис*-1,4-, *транс*-1,4- и 1,2-ПБ рассчитана доля свободного объема АН звеньев в БНК:

$$f_c^A c^A + 0,1447 c^{цис} + 0,04732 c^{транс} + 0,03975 c^{1,2} = f_c$$

$$\text{В БНКС-18 } f_c^A = 0,099; \text{ БНКС-28 } f_c^A = 0,0174; \text{ БНКС-40 } f_c^A = 0,0167$$

Доля свободного объема в дефектах структуры составляет:

$$\text{в БНКС-18 I. (АТАВС)} \cdot 0,082 = 0,0352; \text{ II. (АТАСС)} \cdot 0,008 = 0,0043; \Sigma = 0,0395$$

$$\text{в БНКС-28 I. (АТАВС)} \cdot 0,092 = 0,0245; \text{ II. (АТАВТАТАВ)} \cdot 0,026 = 0,007567; \Sigma = 0,0321$$

$$\text{в БНКС-40 I. (АТАТАТАТАТАТАТАТАВС)} \cdot 0,026 = 0,0185;$$

$$\text{II. (АТАТАТАТАТАТАТАТАВ)} \cdot 0,018 = 0,01024; \Sigma = 0,0288$$

На рис. 1 представлена зависимость величины отклонения равновесной степени набухания совулканизатов БНК и СКЭПТ от аддитивных значений $-a$, а также $-\alpha^{100\%}$ (в пересчете на 100% содержания бутадиеновых звеньев) и $-\alpha^{цис+1,2}$ (с последующим пересчетом на 100% содержания *цис*-1,4- + 1,2-звеньев) от величины доли свободного объема в дефектах структуры БНК. R^2 – величина достоверности аппроксимации.

Увеличение доли свободного объема в дефектах способствует образованию более развитого межфазного слоя, плотность и объем которого зависит от интенсивности межфазного взаимодействия. На нее влияет содержание в СКЭПТ гибких этиленовых звеньев и степень изотактичности пропиленовых последовательностей (табл. 2). Таким образом, установлено участие дефектных структур БНК в формировании межфазного слоя в смесях с СКЭПТ [3].

Исключение составляют смеси БНК с СКЭПТ 778 и R 521, для которых пропорциональной зависимости в данных координатах не получено (рис. 1а).

Это объясняется влиянием микроструктуры цепей СКЭПТ, наличием таких громоздких включений, как бутен-1 и полибутен-1, и микрокристаллических структур, образованных этиленовыми и пропиленовыми последовательностями в изотактической конфигурации.

Вследствие особенностей структуры этих сополимеров, способность к совмещению с дефектами в БНК зависит от содержания в последних полярных АН звеньев и характера их распределения по цепи: преимущественно статистического в БНКС-18 и БНКС-28 или микроблочного в БНКС-40.



Рис. 1а. . Зависимость величины $-\alpha$ от доли свободного объема в дефектах структуры AVC в БНКС-18 и БНКС-28 и (AVC+AV) в БНКС-40 (1 – 4) и суммарной величины f_c (5) в совулканизатах со СКЭПТ фирмы DSM 778 (1), 714 (2), 712 (3) и марки “Royalen” R 505 (4); величины $-\alpha^{100\%}$ с R 512 (5) и величины $-\alpha^{\text{чис}+1,2}$ с R 521 (6).

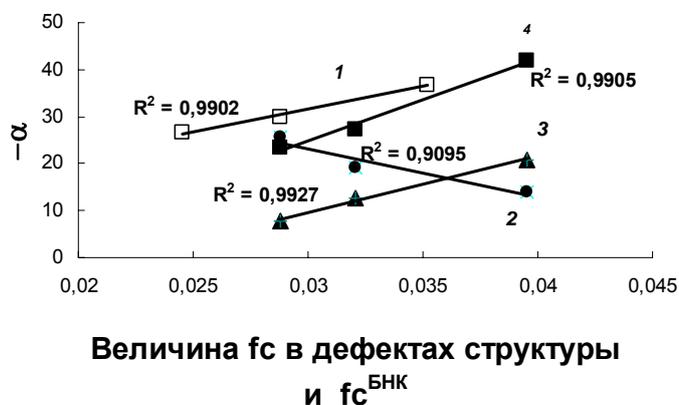
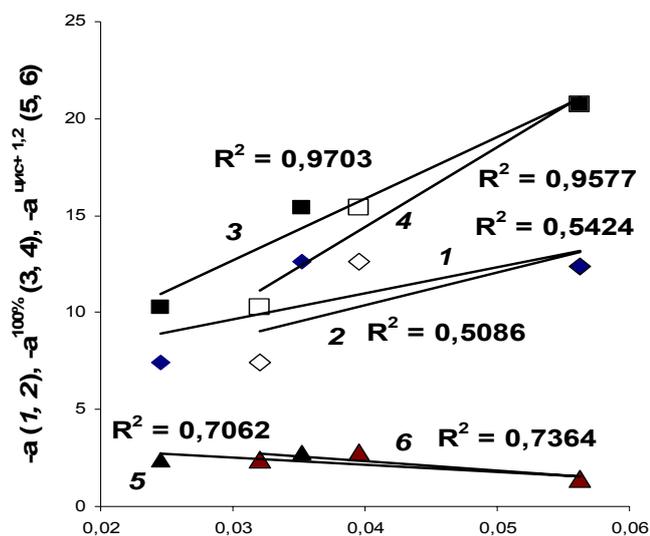


Рис. 1б. Зависимость величины $-\alpha$ от доли свободного объема в дефектах структуры AVC в БНКС-18 и БНКС-28 и (AVC+AV) в БНКС-40 в совулканизате с СКЭПТ-60 (I) (1) и суммарной величины f_c (2 – 4) с СКЭПТ-40 (2), СКЭПТ-60(II) (3) и Эластокам 6305 (4).

СКЭПТ 778 отличается от других сополимеров этой фирмы, помимо наличия упорядоченных структур этиленовых последовательностей, микроструктурой цепей – высоким содержанием в растворе и в геле громоздких звеньев бутена-1 и полибутена-1 (табл. 2). По данным ТМА [5] в СКЭПТ 778 содержится большое количество нарушений ближнего порядка в расположении цепей, которые характеризуются повышенной свернутостью и длиной в аморфных прослойках.

СКЭПТ R 521 содержит пропиленовые звенья в изотактической конфигурации, которые образуют паракристаллические структуры. Методом спинового зонда [6]. обнаружены переходы, обусловленные процессами λ -релаксации, связанными с распадом упорядоченных микрообластей, образованных звеньями этилена и изотактическими последовательностями пропиленовых звеньев. Эффективные энергии активации на участках температурной зависимости составляют 43 и 75 кДж/моль, соответствующие энергии активации вязкого течения ПЭ и энергии активации подвижности мелкомасштабных групп, составляющих звено полимерной цепи в кристаллической фазе изотактического ПП, в котором этот переход наблюдается при 44°C, а в СКЭПТ R 521 – при 44–50°C [6]. Имеется также высокотемпературный переход при 170°C. Таким образом, показано, что в СКЭПТ R 521 содержатся микрокристаллиты изотактического ПП.



f_c в дефектах AVC в БНКС-18 и БНКС-28 и (1, 3, 5) и f_c всех дефектов (2, 4, БНК) и f_c в БНКС-40

Рис. 3

Далее установлено, что при совмещении СКЭПТ 778 и R 521 с блочным сополимером БНКС-40 вклад дефектных структур нивелируется на фоне свободного объема всей фазы БНК.

Для СКЭПТ 778 пропорциональная зависимость получена только для величины $-\alpha^{100\%}$, т.е. при пересчете величины $-\alpha$ на 100% содержание бутадиена (рис. 3). Это подтверждает вывод, сделанный ранее, о том, что совмещение с полярными звеньями для сополимеров с низкой степенью изотактичности маловероятно [3].

Для СКЭПТ R 521 величины $-\alpha$, а также $-\alpha^{100\%}$ и $-\alpha^{100\%+1,2}$ пропорциональны доле свободного объема в дефектах AVC в БНКС-18 и БНКС-28 и $f_c^{\text{БНК}}$ в БНКС-40 (рис. 4). Можно сделать вывод, что R 521 с высокой степенью изотактичности пропиленовых звеньев совмещается с неполярными и полярными участками фазы БНК.

В смеси с блочным сополимером БНКС-40 с высоким содержанием АН звеньев вклад дефектных структур в совмещение снижается. С увеличением расстояния между цепями растет вклад доли свободного объема бутадиеновых звеньев в междефектных областях матрицы, находящихся в *транс*-1,4-конфигурации, но не входящих в упорядоченные структуры. Происходит более равномерное распределение СКЭПТ по всему свободному объему фазы БНК.

Таким образом, можно констатировать, что наличие в СКЭПТ значительного количества громоздких групп (бутен-1, полибутен-1), а также микрокристаллитов затрудняет проникновение участков цепей СКЭПТ в дефектные структуры более жесткого сополимера. Увеличивается вклад свободного объема в междефектных областях с нарушенной упорядоченностью *транс*-1,4-звеньев бутадиена.

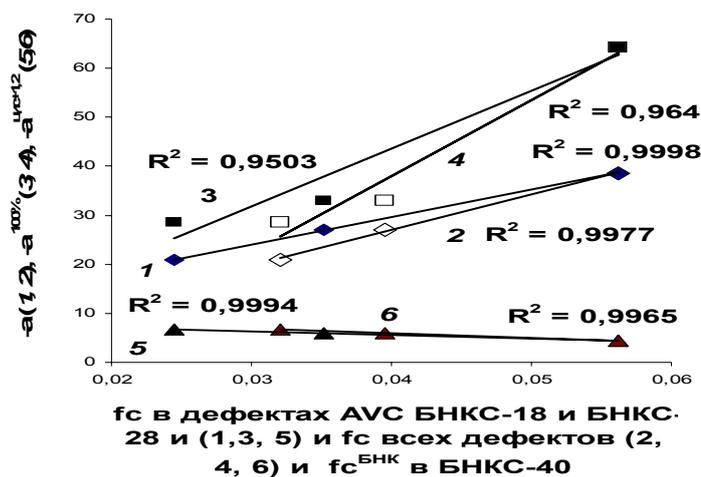


Рис. 4

Литература.

1. Ливанова Н.М., Попов А.А. // . Polymer Sci A 2016.V.. 58. № 2. P.. 130.
2. Ливанова Н.М., Попов А.А. // . Polymer Sci A 2016.V.. 58. № 4. P.. 525.
3. К.В. Сухарева, Н.М. Ливанова, Ю.О. Андриясян, И.А. Михайлов, А.А. Попов. Труды XV Ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН – ВУЗы «Биохимическая физика». Москва 23-25 ноября 2015 г. Москва 2016. С. 155.
4. Multicomponent Polymer Systems / Ed. by Gould R.F. Washington; Houston: Am. Chem. Sci., 1970.
5. Ливанова Н.М., Евреинов Ю.В., Попов А.А., Шершнев В.А. // Высокомолек. соед. А. 2003. Т.45. №6. С.903.
6. Ливанова Н.М., Карпова С.Г., Попов А.А. // Высокомолек.. соед. А. 2003. Т.45. №3. С. 417

Система Фентона и озон для генерации свободных радикалов в растворах белков



**Горобец М.Г., Бычкова А.В., Акинфиев В.С., Сультимова Н.Б.,
Константинова М.Л., Розенфельд М.А.**

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской
академии наук, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4.
E-mail: maria.g.gorobets@gmail.com*

Белки, циркулирующие в плазме крови, являются мишенями для активных форм кислорода (АФК) и могут выступать в качестве биологических маркеров патологического окислительного стресса.

Фибриноген является ключевым белком системы свертывания крови, основная его функция заключается в поддержании гемостаза путем формирования сшитого фибринового геля. Известно, что фибриноген в 20 раз более чувствителен к окислительной модификации, чем другие основные белки плазмы – альбумин, иммуноглобулины, трансферрин [1].

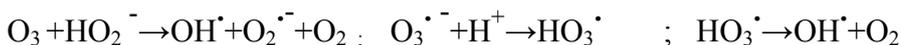
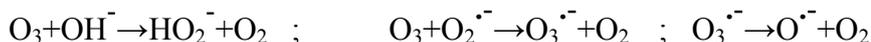
Альбумин является преобладающим по массе белком плазмы крови (около 60% от общего количества белков). Относительно альбумина известна его способность перехватывать около 80% АФК плазмы крови, что позволяет рассматривать альбумин как белковый антиоксидант и как биологический маркер окислительного стресса [2].

Целью данного исследования является изучение процессов генерации АФК в растворах бычьего сывороточного альбумина (БСА) и фибриногена (ФГ) под действием озона и системы Фентона (сФ).

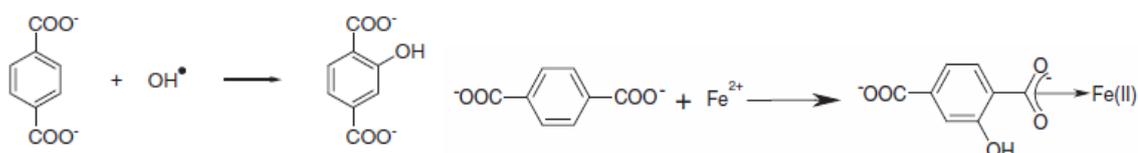
Озон и сФ использовались для генерации гидроксильных радикалов. Системой Фентона называют смесь Железа (II) и перекиси водорода.



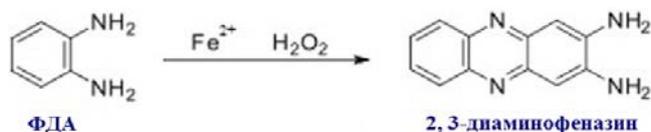
В воде озон неустойчив, он подвергается разложению на ряд АФК ($\text{O}_3^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^\bullet) [3].



Генерация гидроксильных радикалов тестировалась с помощью селективных ловушек - терефталевой кислоты (ТФК) и терефталевой соли (ТФС), образующих при взаимодействии с гидроксильными радикалами и феррильными ионами флуоресцирующие гидрокситерефталаты.



Также при оценке генерации гидроксильных радикалов использовался о-фенилендиамин (ФДА), взаимодействующий с ними с образованием продукта с максимумом поглощения при 420-455 нм.



Количественная оценка ионов двухвалентного железа проводилась при помощи феррозина (динатриевая соль 3-(2-пиридил)-5,6-бис-(4-сульфофенил)-1,2,4-триазина), образующего с ионами Fe (II) окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 560 нм.

Окисленные и неокисленные образцы (ТФК, ТФС, ФДА, БСА, ФГ, системы белок + ТФС / ТФК / ФДА) исследовались с применением методов: Спектрофлуориметрии, Флюорат-02-Панорама («Люмекс», Россия), Спектрофотометрии, СФ-2000 («Спектр», Россия), Динамического светорассеяния, Zetasizer Nano-S (Malvern, Англия), ИК-спектроскопии, Tenzor 27 (Bruker, Германия).

Было продемонстрировано тушение флуоресценции триптофана белков при добавлении сФ или озона (рис. 1). В случае сФ причиной тушения является связывание белков с ионами железа [4].

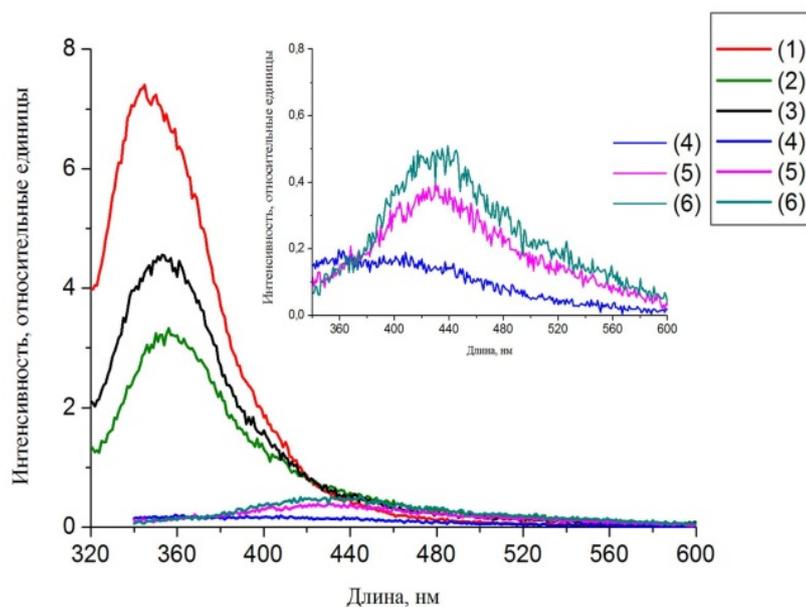


Рис. 1. Спектры флуоресценции, регистрируемые для образцов (волна возбуждения 310, 320 нм):
 1,2,3 – триптофаны ФГ (2,9 нМ), окисленного 0, $0,2 \cdot 10^{-7}$, $0,6 \cdot 10^{-7}$ молей O_3 соответственно;
 4,5,6 – битирозинов ФГ (2,9 нМ), окисленного теми же количествами O_3 .

При озонировании белка причиной падения флуоресценции триптофана является окисление молекулярным озоном. Также показано образование битирозиновых сшивков.

Изменение рН (с 7,3 до 6,7) не оказывает воздействия на модификацию триптофана белков под действием сФ, при окислении озоном - приводит к большей окислительной модификации, обусловленной различным количеством генерируемых АФК.

Методом ИК-спектроскопии изучено влияние присутствия перехватчика АФК - ТФК на окисление белка [5]. Показана способность ТФК и ТФС осуществлять перехват гидроксильного радикала в системах индуцированного окисления, содержащих белок (рис 2).

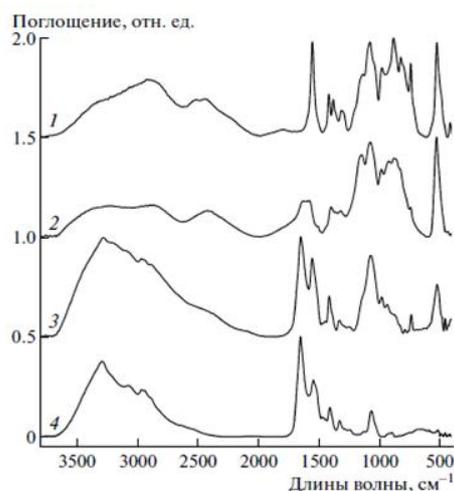


Рис. 2. ИК-спектры компонентов реакции: 1 -ТФК (1,9 мМ), 2 – окисленная ТФК (1,9 мМ);
 3, 4 – ФГ (0,56 мкМ), окисленный в присутствии и отсутствии ТФК, соответственно.

С использованием феррозина установлено, что реальная концентрация ионов $Fe(II)$ в 1,5 раза ниже концентрации растворенного сульфата железа (II) (рис. 3).

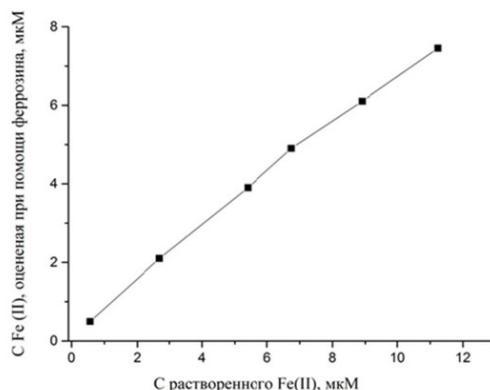


Рис. 3. Зависимость концентрации растворенного $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ от реальной концентрации Fe(II) .

Повышение количества железа (II) приводит к увеличению образования продукта окисления ФДА (рис. 4). Следует отметить, что при концентрации железа (II) примерно равной 0,1 мМ количество продукта стабилизируется. Предположительно это обусловлено взаимодействием ФДА и железа.

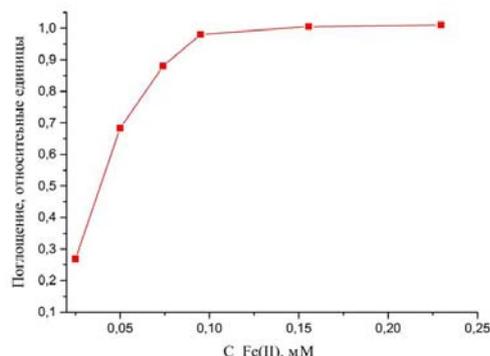


Рис. 4. Зависимость генерации продукта окисления ФДА под действием сФ от концентрации железа (II) в растворах следующего состава: ФДА (0,58 мМ) + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + H_2O_2 (0,2 мМ).

Показано изменение количества окисленного продукта ФДА при изменении концентрации компонентов сФ и ФДА, при сохранении их соотношения (рис. 5).

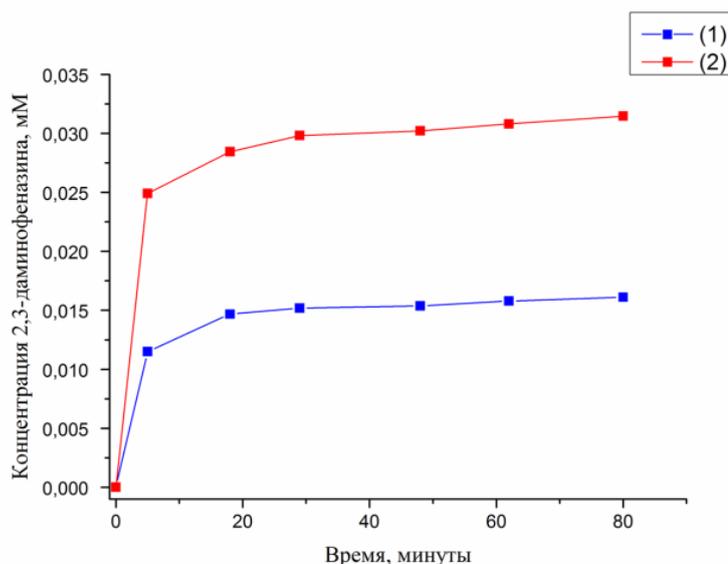


Рис.5. Зависимость кинетики генерации продукта окисления ФДА, под действием сФ от концентрации компонентов реакции: 1, 2 - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,02 и 0,04 мМ соответственно) + ФДА (0,58 и 1,16 мМ соответственно) + H_2O_2 (0,05 мМ и 0,1 мМ соответственно).

При данных концентрациях в течение первых 10 минут более 90% ионов железа (II)

вступает в реакцию, повышение концентрации сФ в два раза приводит к росту образования продукта окисления ФДА. При этом, одна молекула железа (II) оказывает воздействие на 1,7 молекул ФДА, способствуя их превращению в 2,3-диаминофеназин.

Увеличение концентрации пероксида водорода приводит к увеличению генерации окисленного ФДА.

Генерация продуктов окисления ФДА и ТФК наименее выражена в фосфатном буфере, наиболее - в воде (рис. 6).

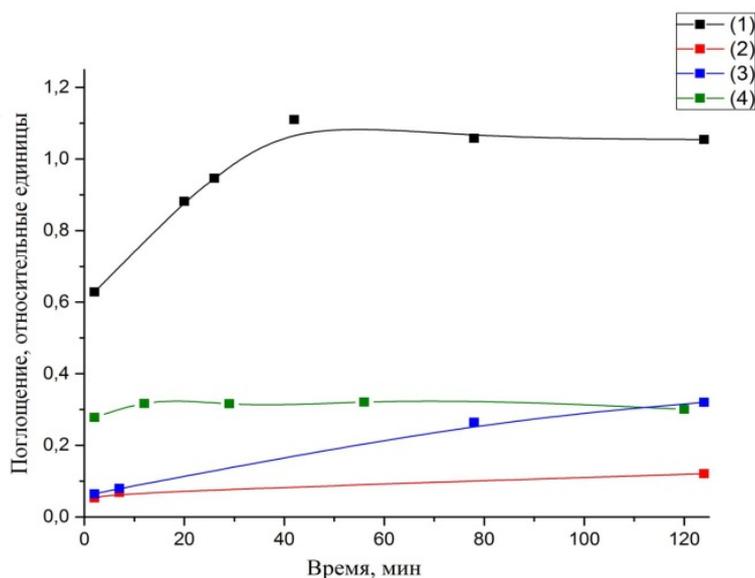


Рис. 6. Зависимость кинетики генерации продукта окисления ФДА под действием сФ - ФДА (0,58 мМ) + FeSO₄·7H₂O (0,1 мМ) + H₂O₂ (0,2 мМ) в различных растворителях: 1 - воде; 2, 3 - 50 и 0,1 мМ фосфатном буфере; 4 - 50 мМ Трис-НСI буфере соответственно.

Причиной пониженной генерации АФК в буферных растворах является нейтральный рН. Изменение рН фосфатного буфера (с 7,3 до 4,9) приводит к увеличению количества окисленного ФДА (рис. 7).

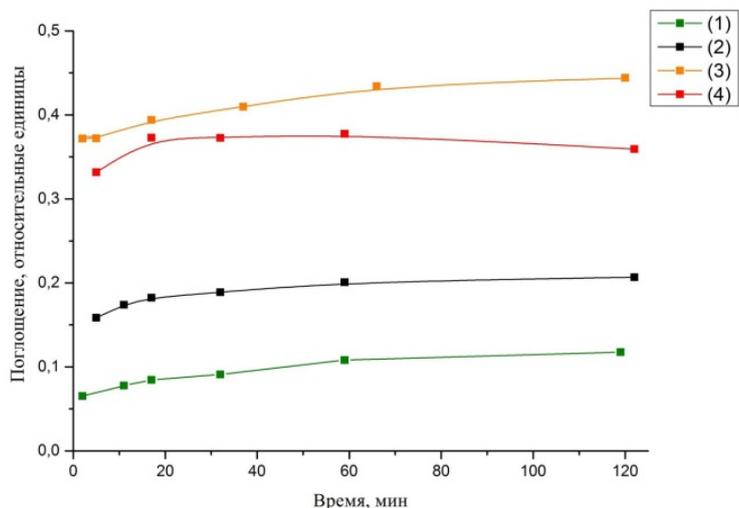


Рис. 7. Зависимость кинетики генерации продукта окисления ФДА под действием сФ - ФДА (0,58 мМ) + FeSO₄·7H₂O (0,1 мМ) + H₂O₂ (0,2 мМ) в фосфатном буфере: 1, 2, 3 - 50 мМ фосфатном буфере рН=7,3; 5,6 4,9 соответственно; 4 - 0,1 мМ фосфатном буфере рН=5,6.

Усиливает снижение генерации АФК в фосфатном буфере связывание железа (II) и фосфатов [6].

Выводы

1. С помощью ТФС, ТФК и ФДА показана генерация гидроксильных радикалов при окислении белков модельными системами - сФ и озоном.

2. При взаимодействии белков с озоном и сФ происходит тушение флуоресценции триптофанов БСА и ФГ рост флуоресценции битирозин, свидетельствующие о модификации триптофана и тирозин при окислении белков. ТФС и ТФК выполняют функцию перехватчиков свободных радикалов.

3. Показана зависимость кинетики генерации свободных радикалов от концентрации компонентов сФ, состава буфера и его кислотности.

Разработка подходов к контролю генерации свободных радикалов системой Фентона в растворе выполняется при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 15-33-70019 «мол_а_мос».

Исследование структурной модификации белков крови при окислении в растворе выполняется при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60244 мол_а_дк.

Литература.

1. Shacter E., Williams J.A., Lim M., Levine R.L. // Free Rad. Biol. Med. 1994 V. 17 P. 429–437.
2. Roche M., Rondeau P., Singh N.R., Tarnus E., Bourdon E. // FEBS Lett. 2008. V. 582. P. 1783-1787.
3. Sharma V.K., Graham J.D. // Ozone: Science & Engin. 2010. V. 32. P. 81-90.
4. Xu X., Zhang L., Shen D., Wu H., Liu Q. // J. Fluores. 2008. V. 18 (1). P. 193-201.
5. Розенфельд М.А., Разумовский С.Д., Щеголихин А.Н., Константинова М.Л., Сульtimoва Н.Б., Козаченко А.И., Наглер Л.Г., Бычкова А.В., Леонова В.Б. // ДАН. 2014. 461. №6. С. 1-4.
6. Grootveld M., Halliwell B. // Free Rad. Res. Commun., 1986. V. 1. №4. P. 243-250.

Исследование фибринстабилизирующего плазменного фактора свертывания крови методом масс-спектрометрии



А.Д. Васильева¹, А.В. Бычкова¹, А.Е. Бугрова¹, М.И. Индейкина^{1,3}, Л.В. Юрина¹, А.С. Кононихин^{1,2,3}, Е.Н. Николаев^{1,2,3}, М.А. Розенфельд¹.

¹*Институт Биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва*

²*Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе РАН, Москва*

³*Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Московская область*

Плазменный фибринстабилизирующий фактор рFXIII принадлежит к семейству трансглутаминаз (эндо-γ-глутамин:ε-лизин трансфераза, КФ. 2.3.2.13). Как и большинство факторов свертывания, рFXIII циркулирует в крови в виде неактивного профермента. Являясь гетеротетрамером, рFXIII состоит из двух потенциально активных каталитических субъединиц А (FXIII-A) и двух регуляторных субъединиц В (FXIII-B), удерживаемых вместе нековалентными связями, обуславливающими целостность всей структуры белка [1]. Физиологическая активация рFXIII происходит при совместном действии на белок тромбина и ионов Ca²⁺, вызывающая превращение рFXIII в активную форму фермента FXIIIa. FXIIIa является полифункциональным белком, основная и наиболее детально изученная функция которого заключается в ковалентном сшивании полипептидных γ- и α-цепей фибрина [2, 3].

FXIII-A состоит из 732 аминокислот, включая инициаторный метионин (<http://www.uniprot.org/uniprot/P00488>). Молекулярная масса FXIII-A составляет 83 кДа. В

ней содержится девять цистеиновых остатков, в том числе цистеин активного сайта (Cys314), ни один из которых не образует дисульфидных связей. FXIII-A состоит из четырех основных структурных доменов: β -сэндвича (Gly38-184Phe), центрального каталитического домена (Asn185-515Arg), β -цилиндра 1 (Ser516-628Thr), β -цилиндра 2 (Phe629-731Met), а также NH₂-концевого активационного пептида (AP-FXIII). Рентген-структурные исследования также показали, что расположение аминокислотных остатков, играющих ключевую роль в каталитическом процессе (Cys314, His373, Asp396) имеет сходство с каталитической триадой цистеиновых протеаз [4].

В неактивной форме каталитический остаток цистеина полностью перекрыт AP-FXIII. Сильное взаимодействие между Arg11 боковой цепи AP-FXIII, находящейся у соседней субъединицы, и Asp343 каталитического домена обеспечивает сохранение AP-FXIII в положении, которое делает Cys314 недоступным даже для молекул растворителя. Таким образом, удаление или смена положения AP-FXIII является необходимым условием активации. Водородная связь между атомом кислорода Tyr560 и атомом серы Cys314 остатка также препятствует проникновению молекул субстрата к активному центру. Tyr560 расположен на петле β -цилиндра 1. Удаление этой петли от активного центра также требуется для взаимодействия с субстратом.

FXIII-B представляет собой мозаичный белок, состоящий из 10 коротких тандемных повторов, называемых «суши» доменами, каждый из которых содержит около 60 аминокислот, которые удерживаются вместе с помощью дисульфидных связей. Методом электронной микроскопии установлено, что субъединица выглядит как тонкая, гибкая и перекручивающаяся нить [5]. Считается, что в кровотоке эти субъединицы являются носителями каталитических субъединиц FXIII-A, защищая их от возможной протеолитической деградаци и поддерживая тем самым необходимый уровень зимогена в кровотоке. Кроме того, они выполняют регуляторную функцию, контролируя процесс активации rFXIII тромбином [6].

Плазменный фибринстабилизирующий фактор, как и многие другие белки системы свертывания крови, является мишенью для окислителей [7, 8]. Ранее было показано, что индуцированная озоном окислительная модификация rFXIII сопровождается изменениями в его химической структуре и снижением активности фермента, образованного из окисленного rFXIII [8]. Результаты этого исследования предполагают наличие антиоксидантной функции у регуляторных субъединиц FXIII-B.

В данной работе предпринята попытка картирования модифицированных аминокислотных остатков FXIII-A на разных стадиях активации. Данные результаты могут дать необходимую информацию для понимания механизма повреждения rFXIII и снижения ферментативной активности при окислении, а также обеспечат некоторыми сведениями о пространственной доступности аминокислотных остатков FXIII для активных форм кислорода (АФК) на разных стадиях его активации.

Фибринстабилизирующий фактор был получен из человеческой плазмы крови методом дробного осаждения сульфатом аммония с последующей ионообменной хроматографией на DEAE Toyopearl M650 (Япония).

При подготовке проб в целях улучшения детекции аминокислотных остатков, группы образцов подвергались гидролизу ферментами (Promega, USA) Glu-C, термолизином, трипсином, и последовательному гидролизу бромцианом (SIGMA) и трипсином, Glu-C и трипсином.

Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ-МС/МС) проводился на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США) и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия). Масс-спектрометрический анализ фракций пептидов осуществлялся при помощи программы Xcalibur (Thermo Electron, Бремен, Германия) в 2-х стадийном режиме автоматического измерения спектров. Список из точных масс пептидов и масс их фрагментов

использовался для поиска и идентификации белков по базе данных Uniprot-Swissprot при помощи программы PEAKS 8.0 (Bioinformatics Solutions Inc. Waterloo, ON Canada).

При использовании в процессе подготовки проб гидролиза образцов с помощью бромциана, детектируемая область молекулы FXIII-A составляла 40%; термолизином – 15%; Glu-C – 31,5%; трипсином – 50%; при последовательном гидролизе бромцианом и трипсином – 40%, Glu-C и трипсином – 61% (Рис 1).

Наложение результатов детектируемой области одного и того же образца с использованием различных ферментов при его пробоподготовке представляется наиболее эффективным с точки зрения увеличения покрытия. На данный момент наилучшим результатом стала совмещенная область детекции образцов, обработанных трипсином и последовательно обработанных Glu-C и трипсином – около 80% детектируемой области (Рис.2).

Были проанализированы детектируемые области FXIII-A на разных стадиях активации фермента (Рис. 3). По результатам эксперимента, наибольшими сходствами обладают профермент (pFXIII) и профермент, частично активированный с помощью кальция (FXIII-A2B2 + Ca²⁺), а также полностью активированный фермент (FXIIIa) и профермент, частично активированный тромбином (FXIII-A2'B2 + AP).

Данные, полученные в ходе эксперимента согласуются с результатами исследований, приведенных в литературе [4], согласно которым удаление активационного пептида влечет за собой полную активацию фермента с сопутствующим изменением конформации, в процессе которого экспонируются ранее растворителю сайты молекулы.

Можно предположить, что такая конформационная перестройка молекулы приводит к тому, что функционально важные сайты становятся доступны и окислителям, действие которых приводит, как уже это было показано ранее, к потере функциональной активности фермента.

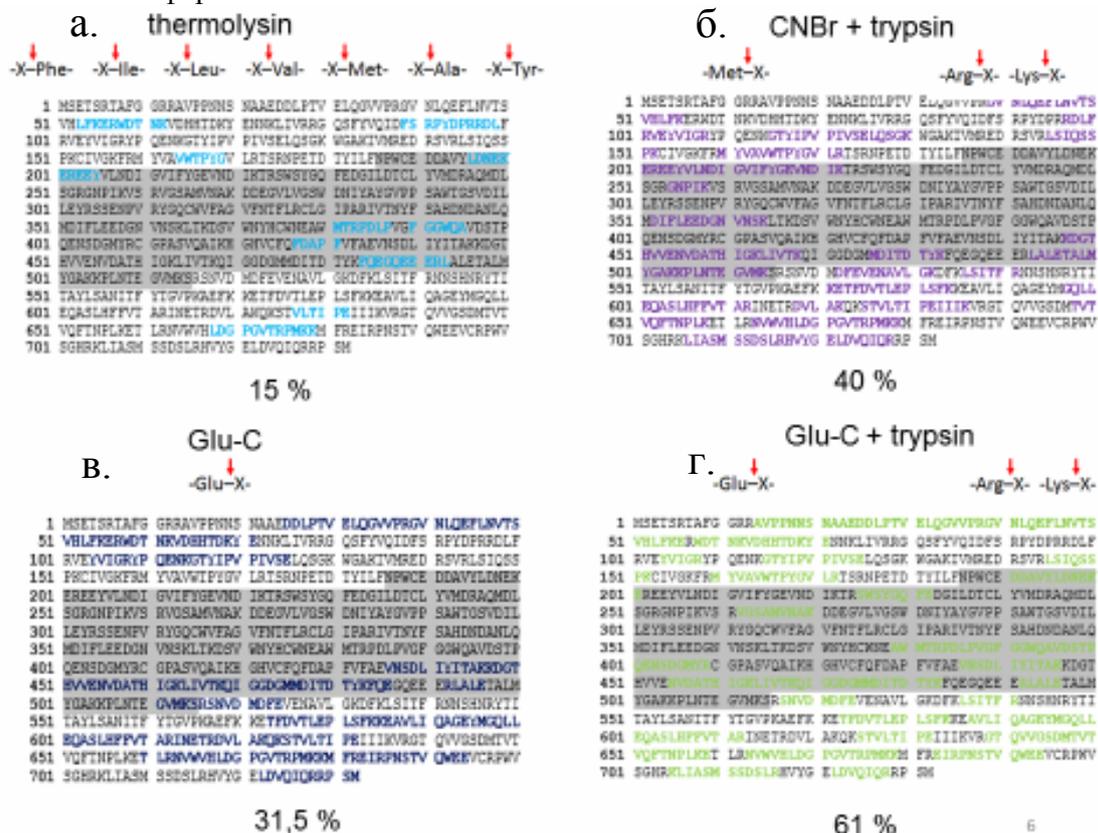


Рис.1 Графическое представление результатов использования различных способов гидролиза в процессе подготовки проб к анализу ВЭЖХ-МС/МС. Цветным ирифтом обозначены детектируемые области, черным - недетектируемые. а – использование для гидролиза фермента термолизин, б – использование последовательного гидролиза

цианбромом и трипсином, в- использование фермента Glu-C, г – использование последовательного гидролиза ферментами Glu-C и трипсином.

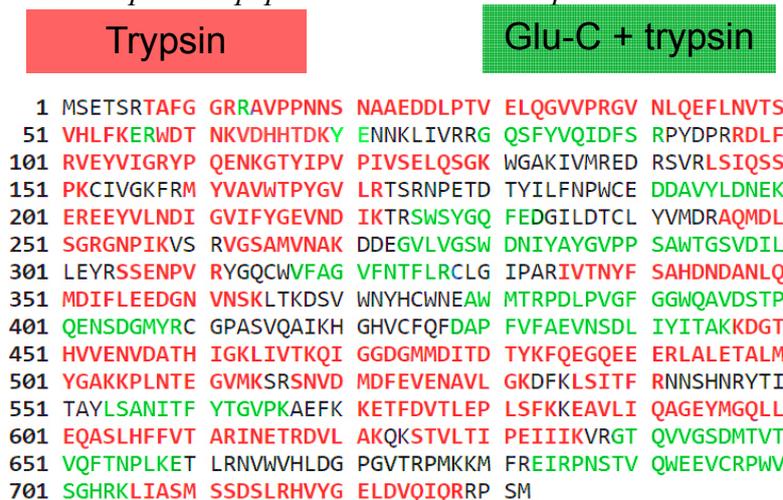


Рис.2 Графическое представление результата наложения детектируемых областей одного и того же образца с использованием разных способов гидролиза. Цветным шрифтом обозначены детектируемые области, черным - недетектируемые.

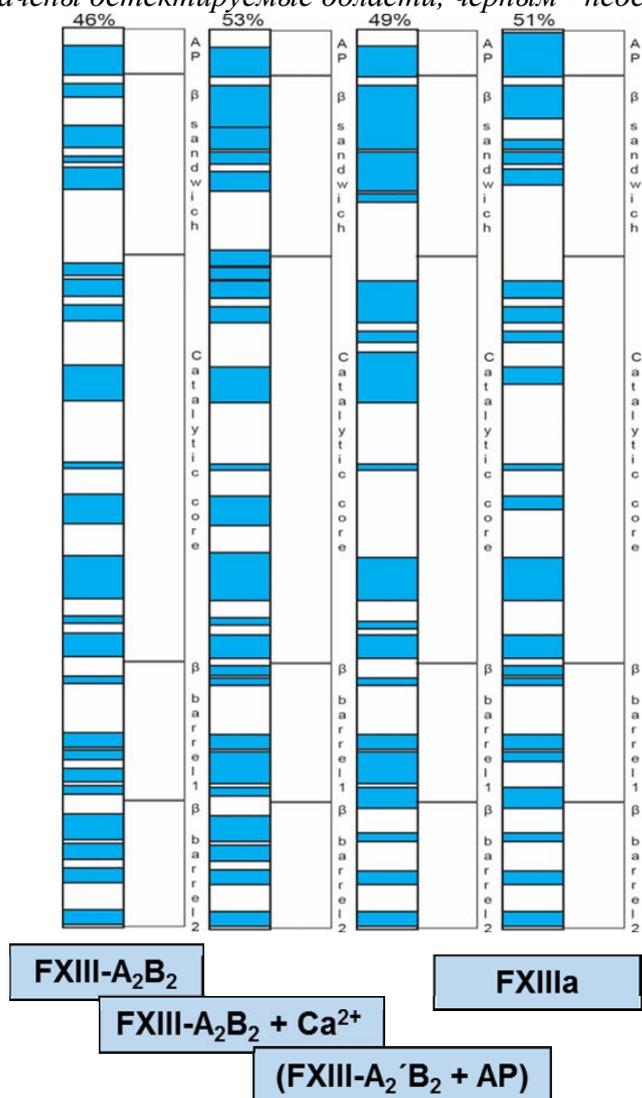


Рис. 3 Участки молекулы, детектируемые методом масс-спектрометрии на разных этапах активации фермента.

В образцах, подвергавшихся окислению после частичной активации тромбином и образцах, в которых фермент был активен полностью, были обнаружены модифицированные Tyr442 и Tyr481, находящиеся в области связывания кальция молекулой FXIII.

Присутствие окисленных аминокислот на таких функционально важных участках может приводить к частичной и полной потере ферментативной активности. При количественной оценке модификаций аминокислотных остатков было также отмечено общее увеличение их процентного содержания при индуцированном окислении белка на поздних стадиях активации.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 15-04-08188 а. Масс-спектрометрические данные получены при поддержке гранта Российского Научного фонда, № 14-24-00114.

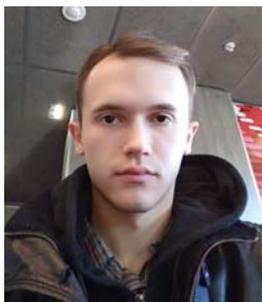
Выводы:

1. Использование различных способов гидролиза и их комбинаций при подготовке образцов фибринстабилизирующего фактора к анализу методом масс-спектрометрии позволяет получить более широкую область детекции, что необходимо для последующего анализа модификаций.
2. При работе со сложными белками, обладающими четвертичной структурой, к числу которых относится плазменный фибринстабилизирующий фактор, также необходимо учитывать их конформационное состояние. Эксперименты показали, что область детекции молекулы также изменяется в зависимости от стадии активации, на которой происходит гидролиз.
3. Сходство областей детекции в образцах, подвергавшихся гидролизу в состоянии профермента и частично активированного кальцием FXIII, а также фермента и FXIII, частично активированного тромбином, также свидетельствует о конформационных изменениях, происходящих в молекуле в процессе активации, что согласуется с литературными данными.
4. Активация FXIII делает функциональные участки молекулы более доступными для окислителя, что отражается на глубине окисления аминокислот. Были обнаружены окислительные модификации Tyr442, Tyr481 в субъединице А, расположенные рядом с кальций-связывающим сайтом, присутствие которых может приводить к потере ферментативной активности молекулы.

Литература.

1. Ashcroft A. E., Grant P. J., Ariëns R. A. S. // *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 2000. V. 14. P.1607-1611.
2. Chen R., Doolittle R. F. // *Biochemistry.* 1971. V. 10. P. 4486–4491.
3. McKee P. A., Mattock P., Hill R. L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1970. V. 66. P.738–744.
4. Muszbek L., Bereczky Z., Bagoly Z., Komáromi I., Katona E. // *Physiol. Rev.* 2011. V. 91. P.931–972.
5. Carrell N. A., Erickson H. P., McDonagh J. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 551–556.
6. Ariëns R. A., Lai T. S., Weisel J. W., Greenberg C. S., Grant P. J. // *Blood.* 2002. V. 100. P. 743–754.
7. Catani M.V., Bernassola F., Rossi A., Melino G. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998. V. 249. P. 275–278.
8. Rosenfeld M. A., Bychkova A. V., Shchegolikhin A. N., Leonova V. B., Biryukova M. I., Kostanova E. A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1834. P. 2470–2479.

Моделирование влияния растворителя на каталитические способности матричной металлопротеиназы MMP-2



Капуста Д. П., Хренова М. Г., Фирсов Д. А.

МГУ имени М. В. Ломоносова, химический факультет, кафедра физической химии, лаборатория химической кибернетики, Москва

Матричная металлопротеиназа MMP-2 играет важную роль в регуляции состава межклеточного матрикса, отвечает за расщепление коллагена IV типа. Нарушение ее работы приводит к изменению состава межклеточного вещества, что может вызывать патологии типа артрита или опухоли, поэтому в настоящее время реакции с её участием активно изучаются [1, 2]. Модель молекулы MMP-2 содержит 161 аминокислоту, 2 атома Zn, 3 атома кальция и субстрат, состоящий из 5 аминокислот. Её структура представлена на рис. 1, шариками и цилиндрами отмечен субстрат.

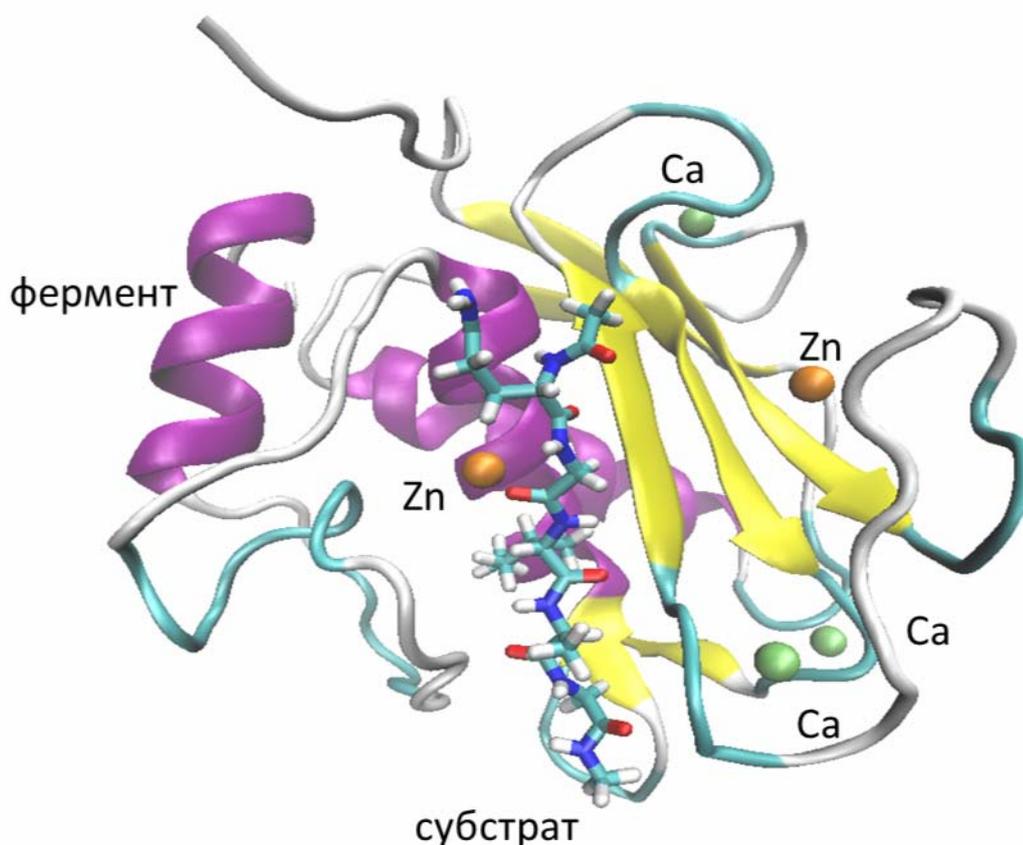


Рис. 1: Фермент-субстратный комплекс MMP-2 [1].

Целью настоящей работы было оценить, насколько значительным является влияние растворителя на реакции, какое количество растворителя нужно учитывать при моделировании подобных реакций и как подобрать наиболее адекватную модель сольватной оболочки для подобных расчётов.

Моделирование проводилось методом молекулярной динамики (МД) в программном пакете NAMD 2.0 [3] в силовом поле CHARMM36 [4]. Было построено 2 молекулярно-динамических траектории с различными граничными условиями. В одной использовались периодические граничные условия, в другой сферические с радиусом сферы 12Å, длина 5 нс, NPT – ансамбль, температура 298 К, шаг 1 фс, термостат Ланжевена [5], баростат Берендсена [6]. Визуализация исследуемых систем проводилась в программном пакете VMD 1.9.1 [7] и DS Studio 4.0 [8].

Влияние водного окружения на активный центр MMP-2 оценивалось по величине электростатического потенциала, создаваемого атомами растворителя на ряде атомов фермент-субстратного комплекса, как находящихся вблизи активного центра, так и в самом активном центре. Для этого нами был разработан скрипт, который позволял, используя закон Кулона рассчитывать электростатический потенциал на заданных атомах на основе МД-траектории. Во всех случаях мы принимали диэлектрическую проницаемость $\epsilon=1$.

В работе были рассмотрены различные модели водного окружения: 1) равномерный слой молекул воды, 2) сфера, центрированная в активном центре фермента, 3) сфера, центрированная в центре масс фермента, (рис 2). Построены зависимости электростатического потенциала от толщины сольватной оболочки.

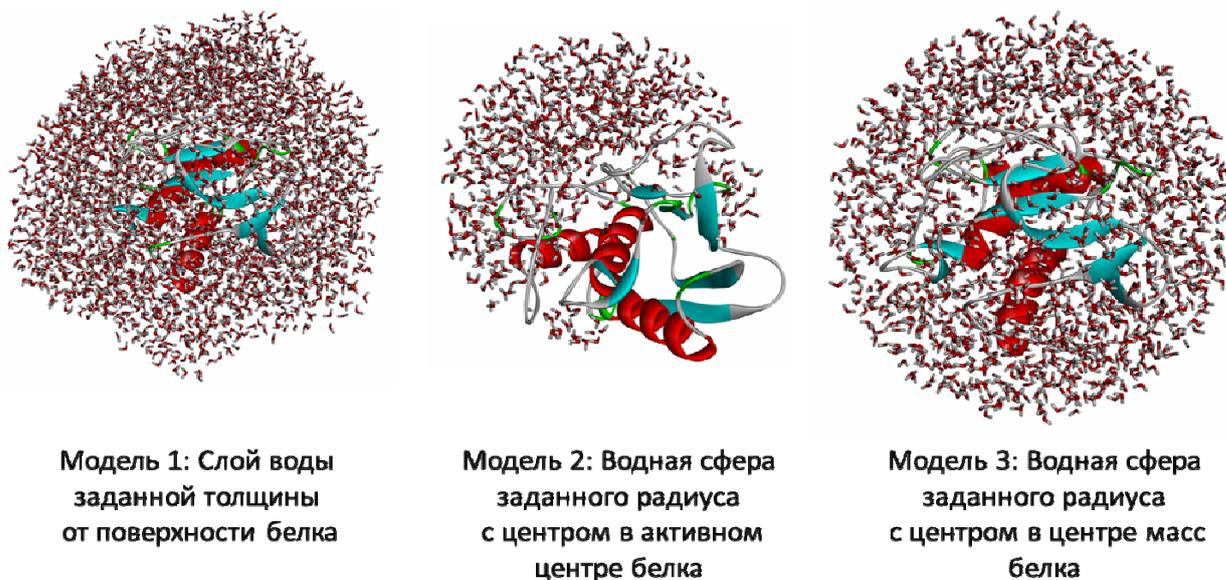


Рис. 2: Модели водного окружения, использованные в работе.

Нами было показано, что наиболее адекватной является модель 3, потому что сферическая формы системы удобна для компьютерного моделирования в силу удобства задания граничных условий, а также поскольку при центрировании водной сферы в центре масс белка необходимо меньшее количество молекул воды, чтобы покрыть всю поверхность белка. В дальнейших расчётах использовалась эта модель.

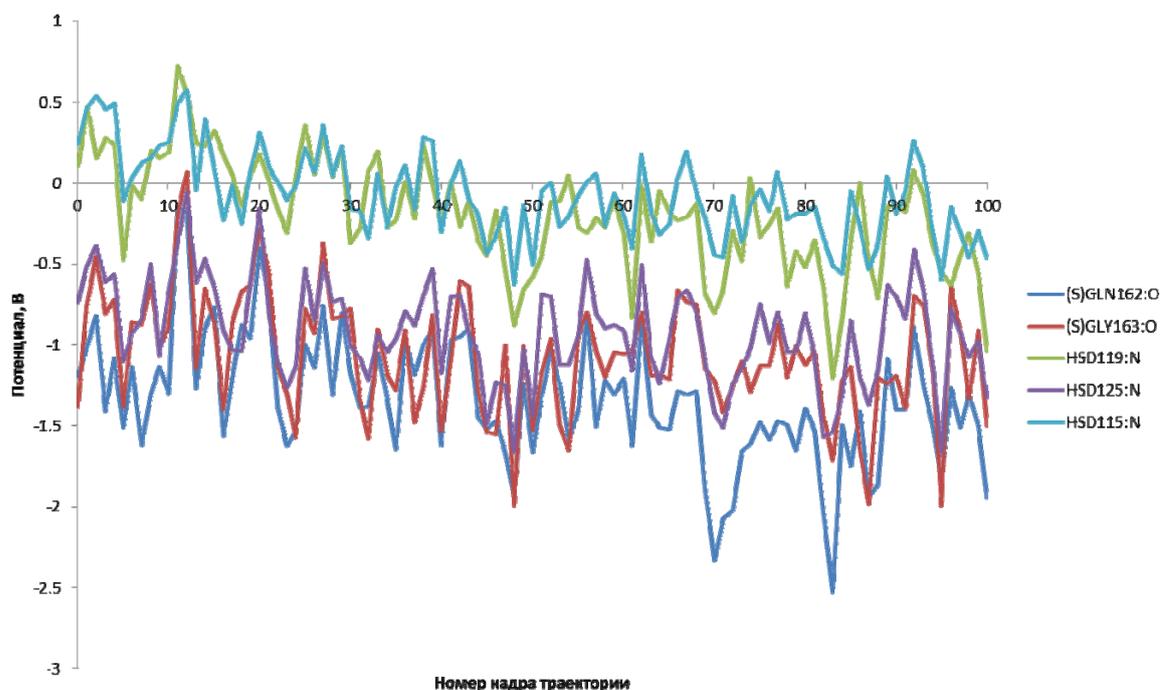


Рис. 3: Расчет потенциала на атомах активного центра для различных кадров МД-траектории.

На рис. 3 показано изменение значений электростатического потенциала на отдельных атомах на протяжении МД-траектории. Видно, что разброс значений достаточно велик, то есть использование мгновенных конфигураций, пусть даже и оптимизированных не позволяет получить корректные значения потенциала и необходимо использовать усреднение по большому числу конфигураций, например, по траектории.

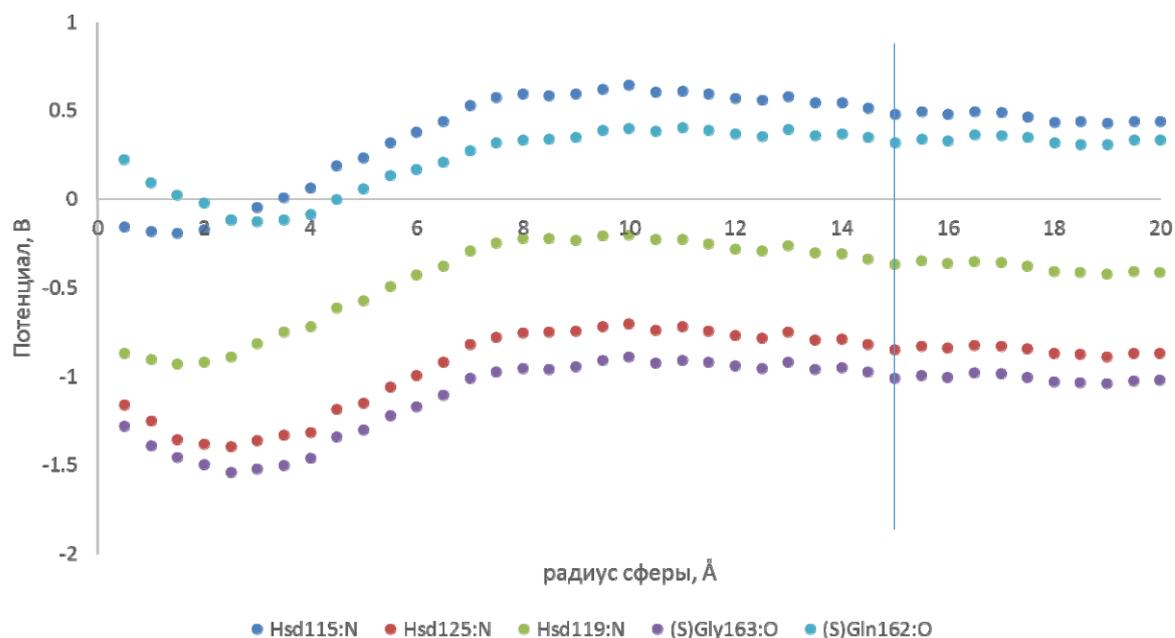


Рис. 4: Расчет значений потенциала на атомах активного центра, усредненных по 10 кадрам МД траектории.

На рис. 4 показана зависимость потенциала на атомах от радиуса сферы, усреднённая по МД-траектории. Видно, что для корректного описания влияния растворителя необходимо учитывать слой воды толщиной не менее 15 Å (на рис. 4 обозначено синей вертикальной линией).

В настоящей работе мы не исследовали такие важные вопросы, как влияние выбранной модели растворителя на значения потенциала, однако мы полагаем, что приведённый подход для анализа влияния растворителя и полученные результаты являются достаточно универсальными и могут быть использованы при дальнейшем моделировании собственно каталитических реакций с участием подобных ферментов.

Литература:

1. Tatiana Vasilevskaya, Maria G. Khrenova, Alexander V. Nemukhin, and Walter Thiel. Methodological aspects of QM/MM calculations: A case study on matrix metalloproteinase-2 //Journal of computational chemistry. – 2016.
2. Tatiana Vasilevskaya, Maria G. Khrenova, Alexander V. Nemukhin, and Walter Thiel. Mechanism of proteolysis in matrix metalloproteinase-2 revealed by QM/MM modeling //Journal of computational chemistry. – 2015. – Т. 36. – №. 21. – С. 1621-1630.
3. Phillips J. C. et al. NAMD: Biomolecular simulation on thousands of processors //Supercomputing, ACM/IEEE 2002 Conference. – IEEE, 2002. – С. 36-36.
4. Huang J., MacKerell A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data //Journal of computational chemistry. – 2013. – Т. 34. – №. 25. – С. 2135-2145.
5. Davidchack R. L., Handel R., Tretyakov M. V. Langevin thermostat for rigid body dynamics //The Journal of chemical physics. – 2009. – Т. 130. – №. 23. – С. 234101.
6. Berendsen H. J. C. et al. Molecular dynamics with coupling to an external bath //The Journal of chemical physics. – 1984. – Т. 81. – №. 8. – С. 3684-3690.
7. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics //Journal of molecular graphics. – 1996. – Т. 14. – №. 1. – С. 33-38.
8. Visualizer D. S. Release 4.0 //Accelrys Software Inc., San Diego, CA, USA. – 2013.

Функциональные напитки для питания студентов



Сывороткина И., Грибова Н.А., Беркетова Л.В., Акимова Н.А.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский экономический университет имени Г. В. Плеханова», Москва

Для нормальной жизнедеятельности организма необходимо сбалансированное поступление с пищей белков, жиров, углеводов, витаминов и микроэлементов. Вопрос о скорости и удобстве удовлетворения потребностей в полноценном питании особенно актуален среди студенческой молодежи.

Насыщенная студенческая пора отличается большим перенапряжением нервной системы. Нагрузка, особенно в период сессии, значительно увеличивается вплоть до 15-16 час в сутки. Хроническое недосыпание, нарушение режима дня и отдыха, интенсивная информационная нагрузка могут привести к нервно-психическому срыву. В компенсации этой негативной ситуации большое значение имеет правильно организованное рациональное питание. Необходимо отметить, что оно должно быть обогащено белками и витаминами.

Наличие белка в рационе питания всегда имело огромное значение, так как организм состоит из аминокислот, в том числе и незаменимых (валин, лейцин, изолейцин, треонин, метионин, лизин, фенилаланин, триптофан), которые не могут синтезироваться в человеческом организме так же, как и витамины. Поэтому восполнять их наличие возможно только с помощью пищи.

Белок – необходимая составная часть пищевых продуктов. Их аминокислотный состав представляет собой совокупность данных об относительном количественном содержании всех входящих в него аминокислот. Определение аминокислотного состава белков имеет большое значение для понимания их структуры и характера биологического действия.

Данная работа проводилась в соответствии с научной тематикой кафедры Ресторанного бизнеса, где в течение длительного периода времени проводятся работы по разработке нового ассортимента продукции для предприятий питания и исследованию ее качества.

В ходе проведенной научной работы были разработаны рецептура и технология приготовления функционального напитка для питания студентов на кисло-молочной основе. Были разработаны сенсорные характеристики напитка.

В данном напитке использовалась добавка белковая сушеная порошкообразная «Быть Добру», состав которой включает (35 г белка на 100 г продукта), в том числе заменимые и незаменимые аминокислоты, а также пептиды, которые находятся в комбинации: незаменимых аминокислот – гистидин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, триптофан, валин; и заменимых аминокислот (выборочно) – аланин, аргинин, аспарагин, карнитин, цистеин, глутамин, глицин, тирозин; пептидов, а также витамины группы В.

Потребление разработанного напитка компенсирует суточную потребность в белке в 3-4 приема.

Кроме того, в состав данного функционального напитка входят витамины группы В. Витамины являются незаменимыми пищевыми веществами, которые необходимы для осуществления нормального обмена веществ, роста и развития человека, его функционального обеспечения, защиты от болезней и вредных факторов внешней среды. Они должны поступать с пищей регулярно в полном объеме (качественном и количественном), соответствующем физиологической потребности человека.

Данный функциональный напиток рекомендуется для систематического употребления студентами в составе пищевых рационов, имеет профилактическую направленность. Он способствует снижению риска дефицита в полноценном белке и витаминов группы В.

Разработка термостойких композиционных материалов с заданными электрофизическими свойствами



**А.А.Мальцев¹, С.Б.Бибиков¹, А.Н.Щеголихин¹,
В.Н.Калиниченко²**

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

² *Институт химической физики им. Н.Н.Семенова РАН, г.
Москва*

E-mail: aam.0205@yandex.ru

Введение. В последнее время отмечается повышенный интерес к радиопоглощающим материалам, работающим в широком температурном интервале, что необходимо при эксплуатации изделий в космической, оборонной промышленности и т.д. В частности, востребованы гибкие и эластичные материалы, обладающие заданными

радиопоглощающими свойствами в широком температурном интервале (-70...+150°C). Под радиопоглощающими свойствами в данном случае подразумевается способность материала, в общем случае – слоисто-неоднородного, существенно (на 1...3 порядка и выше) снижать отраженную мощность падающего СВЧ-излучения, что важно для задач обеспечения электромагнитной совместимости, обеспечения эффективности функционирования радиоэлектронного оборудования, защиты информации от доступа по радиоканалу и т.п. Для создания подобных композиционных материалов используются известные решения, связанные как с применением электропроводящих включений в диэлектрической матрице, обеспечивающих диссипацию электромагнитной энергии за счёт резистивных потерь, так и с применением ферромагнитных материалов, обеспечивающих диссипацию за счёт магнитных потерь и согласование волновых сопротивлений.

Важным критерием при создании таких композиционных материалов является высокая степень их однородности и равномерное распределением электропроводящих и/или магнитных частиц в объеме. Как правило, для эффективной работы материала с резистивными потерями его толщина должна быть порядка т.н. эффективной длины волны, т.е. длины волны в среде материала с учётом его электрофизических параметров. Эффективная длина волны определяется соотношением

$$\lambda_{\text{эфф}} = \frac{\lambda_0(\nu)}{\sqrt{\varepsilon(\nu) \cdot \mu(\nu)}}, \quad (1)$$

где $\varepsilon(\nu)$ и $\mu(\nu)$ – модули комплексных диэлектрической и магнитной проницаемостей, зависящие от частоты ν , а λ_0 – длина волны в свободном пространстве. При характерных частотах порядка $\nu \sim 3$ ГГц длина волны $\lambda_0 \sim 10$ см, что нередко превышает допустимые толщины радиопоглощающих покрытий. В ряде случаев, увеличивая объемные параметры $\varepsilon(\nu)$ и $\mu(\nu)$ за счет внесения наполнителей с соответствующими значениями параметров, можно добиться уменьшения необходимой толщины материала при достаточных радиопоглощающих свойствах. К сожалению, варьировать ε и μ за счет изменения свойств матрицы композиционного материала (полимера) возможно лишь в очень узких пределах, причем только на этапе синтеза. На практике же в качестве наполнителей используют магнитные и/или электропроводящие частицы со средним размером, много меньшим $\lambda_{\text{эфф}}$. Исходя из вышесказанного, целью исследований в данной работе был поиск подходов к получению термостойкого электропроводящего композиционного материала с регулируемыми на стадии производства электрофизическими параметрами. Для этого использовали термостойкие полимеры в качестве связующего и мелкодисперсные электропроводящие термостойкие материалы в качестве наполнителя.

В настоящее время наиболее распространены следующие классы термостойких полимеров: полиимиды (пленочные высокопрочные малоэластичные материалы, устойчивые до +400°C) и кремнийорганические полимеры силиконы (эластичные объемные материалы с низкой прочностью на разрыв и работающие в температурном диапазоне -60...+300°C). Для достижения порога перколяции при малых объемных процентах наполнения нередко используют наполнители на основе квазиоднородных и нанодисперсных углеродных материалов, в частности: углеродные волокна, углеродные нанотрубки и производные оксида графита. Для обеспечения радиопоглощающих свойств композиционных материалов с ферромагнитными наполнителями необходимо использовать более значительные объемные наполнения магнитной фазы (20 – 50% об.) из-за необходимости повышения магнитной проницаемости материалов. При создании композитов такого типа важно не допустить появления электропроводности на постоянном токе (при бесконечно малой частоте), что переводит материал из разряда радиопоглощающих в разряд радиозранирующих (отражающих) материалов. В

настоящей работе рассматриваются исключительно материалы с углеродным немагнитным наполнителем.

В связи с этим, основной задачей являлась разработка объемного электропроводящего композиционного материала на основе кремнийорганического каучука СКТН-А и восстановленного оксида графита с минимально возможным содержанием углеродного наполнителя – оксида графита.

Оксид графита (ОГ) – нестехиометрическое соединение углерода, кислорода и водорода, хорошо диспергирующееся в полярных растворителях (вода, спирты, амиды карбоновых кислот и т.д.) и легко восстанавливающееся до малослойного (3-10 слоев) высокодефектного графита, называемого также графеном, по аналогии с двумерным монослоем графита^{1,2}. Его способность восстанавливаться до малослойного графита уже находит применение как в создании электропроводящих материалов с крайне низким наполнением (от 0.6% по массе³), так и в получении жидкостей с заданной вязкостью⁴. В данной работе восстановленный оксид графита (ВОГ) используется как электропроводящий наполнитель в объемных композиционных материалах, чувствительных к давлению. ОГ и ВОГ могут быть диспергированы при помощи ультразвука в различных растворителях, стабильность суспензий ОГ и ВОГ может существенно отличаться⁵.

Наполнение объемного материала при сохранении электропроводности можно снизить, если проводящий наполнитель будет не хаотично распределен в массиве полимера, а образовывать связную структуру³. В случае жидкого кремнийорганического полимера образование связной проводящей сетки представляется возможным на границе раздела фаз кремнийорганического полимера и эмульгированного в нем растворителя. Согласно литературным данным, полидиметилсилоксан плохо смешивается с большинством растворителей⁶, но образует стабильные эмульсии с многоатомными спиртами⁷. Была исследована совместимость кремнийорганического каучука СКТН (аналог полидиметилсилоксана), с различными растворителями. В этих же растворителях при помощи ультразвуковой ванны были диспергированы оксид графита и восстановленный оксид графита. Был проведен подбор растворителей, смешивающихся с СКТН, дающих стабильные суспензии оксида графита и лишь ограниченно совместимых с восстановленным оксидом графита. Эти условия обеспечивают вытеснение электропроводящей структуры ВОГ на границу раздела дисперсионной среды (СКТН) и дисперсной фазы (растворителя). Экспериментально установлено, что вышеперечисленным требованиям в наилучшей мере удовлетворяет смесь триэтаноламина с диметилформамидом в соотношении 1:1.

Синтез композиционного материала. Навеску оксида графита (полученного по методу Хаммерса⁸) массой 100-200 мг, вручную перетирали в ступке с навеской триэтаноламина (300-600 мг), затем добавляли навеску полиэтиленполиамина, действующего как кросс-линкер и восстановитель⁹. Смесь разбавляли изопропанолом до жидкого состояния (2-3 мл) и добавляли 500 мг диметилформамида. Смесь диспергировали в ультразвуковой ванне в течение 1 ч, затем добавляли неотвержденный каучук СКТН (18-20 масс. частей на одну часть оксида графита) и диспергировали еще в течение 1 ч, или до увеличения вязкости и прекращения расслоения смеси. Далее смесь перемешивали до однородности и восстанавливали на воздухе при 140°C в течение 3 ч до удаления из смеси диметилформамида. После восстановления смесь перемешивали с отвердителем до однородности и заливали в формы. Аналогично был синтезирован и материал на основе дисперсии коллоидного графита; количество коллоидного графита брали в пересчете 5-7% сухого вещества в массе всего композита.

Методы исследования и исследуемые свойства материалов. Химический состав полученных материалов исследовался методом спектроскопии комбинационного рассеяния; проводился также термогравиметрический анализ, показавший стабильность материалов до +350 °С в неокислительной атмосфере. Наблюдалась незначительная

потеря массы (10-15 %) при температуре свыше 200 °С, связанная, по-видимому, с выпотеванием на поверхность и испарением триэаноламина, особенно в материале, наполненном коллоидным графитом.

Удельное сопротивление материалов рассчитывалось из вольтамперных характеристик (ВАХ) образцов в форме прямоугольного параллелепипеда. Вольт-амперные характеристики материалов при различных внешних давлениях снимались методом циклической вольтамперометрии (диапазон напряжений 0 – 14 В, скорость развертки 0.5 В/с) при помощи потенциостата Р-8 фирмы Elins в двухэлектродной плоскопараллельной ячейке. Установлено практически линейное возрастание проводимости в зависимости от давления (на рис. 1 – для образца №1), что обусловлено пропорциональным увеличением количества контактов соседних проводящих участков. При увеличении давления в 8 раз (от 0.5 до 4 Н/см²) электропроводность возрастает вдвое (от 3·10⁻⁸ до 6·10⁻⁸ См/м).

Вольтамперные характеристики образца №2 с максимальной электропроводностью приведены на рис. 2. (Размер образца 30x20x3 мм. Удельная электропроводность 10-5 См/м.).

На всех образцах наблюдается более или менее выраженное отклонение от линейности – а именно, снижение сопротивления с увеличением напряжения. Такой ход кривой типичен для неоднородной структуры, в которой проводимость ограничена потенциальными барьерами между проводящими участками, высота которых уменьшается с ростом приложенного напряжения, например, при туннелировании.

Частотные зависимости электрофизических характеристик определялись в коаксиальном тракте в диапазоне частот 300 кГц...8 ГГц. Расчёт частотных дисперсий проницаемостей и электропроводности проводился по данным измерений интегральных радиофизических параметров образцов, встроенных в согласованный коаксиальный тракт. Естественно, что магнитная проницаемость во всём диапазоне частот равна 1 с точностью 1...3%. Интерес представляет мнимая часть диэлектрической проницаемости (электропроводность), отвечающая в данном случае за диссипацию электромагнитной энергии (рис.3). С увеличением частоты электромагнитного поля электропроводность увеличивается в несколько раз.

Аналогично зависимости ВАХ, такой ход кривой характерен для механизма прыжковой проводимости.

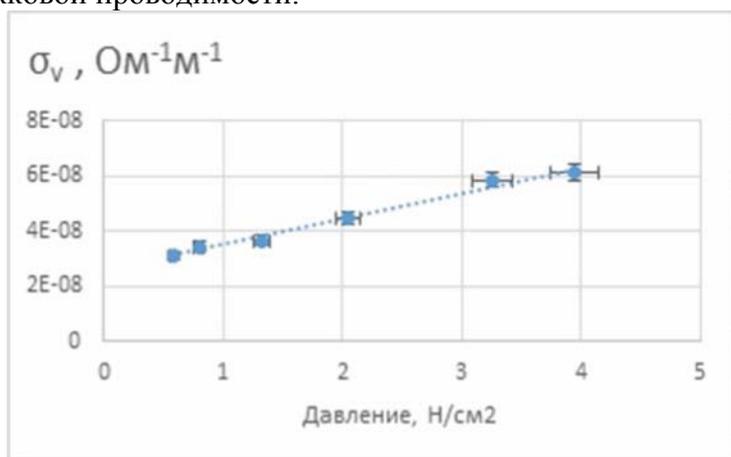


Рис. 1. Зависимость удельной электропроводности эмульсионного композиционного материала №1 от давления.

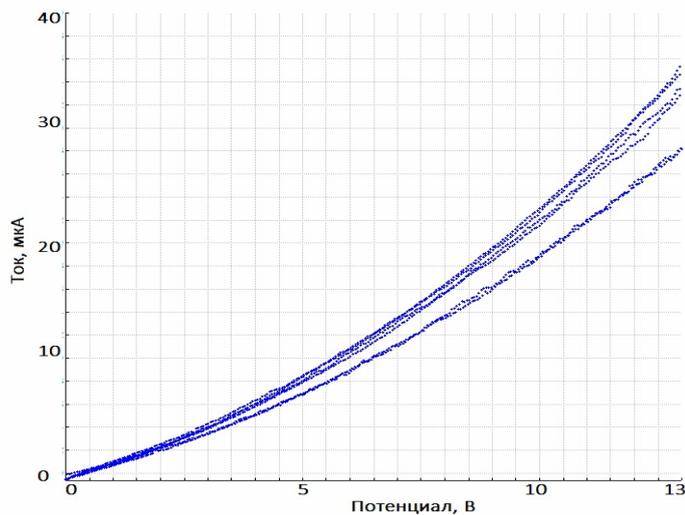


Рис. 2. Вольтамперная характеристика эмульсионного композиционного материала №2.

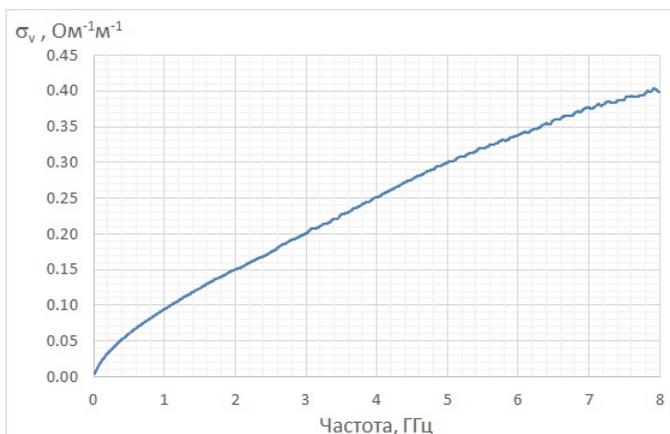


Рис. 3. Частотная характеристика (300 кГц – 8 ГГц) удельной электропроводности эмульсионного композиционного материала №2.

Выводы. В настоящей работе получены и исследованы композиционные материалы класса многофазных (эмульсионных) систем на основе кремнийорганического каучука. Данные материалы, в зависимости от состава, обладают удельной электропроводностью порядка $10^{-9} - 10^{-5}$ См/м, которая возрастает с увеличением внешнего давления.

Показано, что с увеличением частоты удельная электропроводность полученных материалов возрастает, что позволяет их использовать как элементы широкополосных радиопоглощающих материалов и конструкций (коэффициент отражения ≤ -5 дБ в диапазоне частот 6.3 – 8.3 ГГц при толщине слоя 4.9 мм). Для сравнения: материал на основе СКТН, наполненный графитом С-1, при аналогичном наполнении, обладает существенно меньшей электропроводностью и, соответственно, диэлектрическими потерями.

Полученный композиционный материал обладает хорошей термостойкостью и после дополнительной калибровки может служить основой для датчиков давления, работающих при высоких температурах (от комнатной и до 200 °С, что может быть актуально, например, в паропроводах и теплотехнических устройствах).

Список использованной литературы.

1. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov. 5696, 10/2004 г, Science, T. 306, стр. 666 - 669.

2. Capacitance of carbon-based electrical double-layer capacitors. Hengxing Ji, Xin Zhaow, Zhenhua Qiao, Jeil Jung, Yanwu Zhu, Yalin Lu, Li Li Zhang, Allan H. MacDonald & Rodney S. Ruoff. 5: 3317, 2014 г., Nature communications.
3. Electrically Conductive Nanocomposites with Segregated Structure Based on Poly(vinylidene fluoride-co-tetrafluoroethylene) and Reduced Graphene Oxide. M. V. Gudkov, N. G. Ryvkina, A. Ya. Gorenberg, V. P. Melnikov. Pleiades Publishing, Ltd., 2016 г, Doklady Physical Chemistry, T. 466, стр. 1 - 3.
4. Viscoelasticity of Graphite Oxide-Based Suspensions in PDMS. Aline Guimont, Emmanuel Beyou, Gregory Martin, Philippe Sonntag, Philippe Cassagnau: American Chemical Society, 29/4/2011 г. Macromolecules, T. 44, стр. 3893 - 3900.
5. Dispersion behaviour of graphene oxide and reduced graphene oxide. Dimitrios Konios, Minas M. Stylianakis, Emmanuel Stratakis, Emmanuel Kymakis. Elsevier, 2014 г. Journal of Colloid and Interface Science, T. 430, стр. 108 - 112.
6. Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. Jessamine Ng Lee, Cheolmin Park, George M. Whitesides. American Chemical Society, 1/12/2003 г. Analytical Chemistry, T. 75, стр. 6544 - 6554.
7. Green silicone elastomer obtained from a counterintuitively stable mixture of glycerol and PDMS. P. Mazurek, S. Hvilsted, A.L. Skov. Elsevier, 2016 г. Polymer, T. 87, стр. 1 - 7.
8. Preparation of Graphitic Oxide. William S. Hummers, Richard E. Offeman. 1958 г. Journal of American Chemical Society, T. 80, стр. 1339.
9. Intercalation and Stitching of Graphite Oxide with Diaminoalkanes. Margarita Herrera-Alonso, Ahmed A. Abdala, Michael J. McAllister, Ilhan A. Aksay, Robert K. Prud'homme. American Chemical Society, 7/6/2007 г., Langmuir, T. 23, стр. 10644 - 10649.

Получение и анализ биоконъюгатов на основе модифицированных частиц нанокремния.



А.А.Ищенко, Е.В.Смирнова, Шаронова Н.В.

*Московский технологический университет, Москва Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А.Овчинникова РАН, Москва*

Исследование биоконъюгатов на основе модифицированных частиц нанокремния и природных фотосенсибилизаторов проводилось в рамках такого направления исследований, как Гибридные (органо-неорганические) системы для конструирования функциональных фотонных структур, биосенсоров и бионаноконъюгатов. Данное исследование входит в задачу развития диагностических и терапевтических наноразмерных конструкций типа “ядро-оболочка” для избирательной (адресной, таргетной) доставки лекарственных препаратов в клетки – мишени.

Частицы нанокремния биотрансформируются организмом, превращаясь в ортокремниевую кислоту, в отличие от других наноматериалов и функциональных групп, которые используются в настоящее время для биологических применений и проявляют цитотоксичность и генную токсичность. Для проведения анализа были использованы частицы нанокремния, синтезированные термическим обжигом монооксида кремния при температуре 130-180 градусов. Для защиты поверхности нанокремния была использована термически активированная реакция гидросилилирования

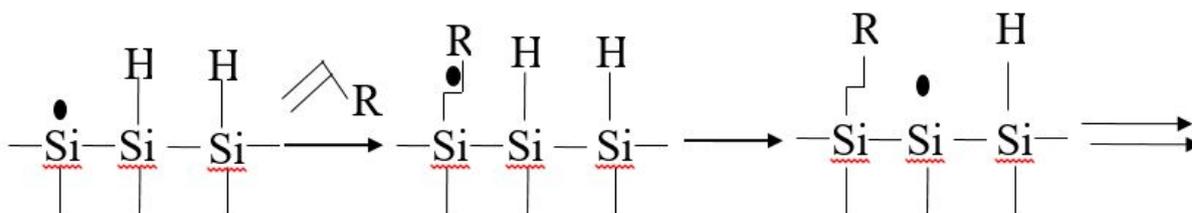
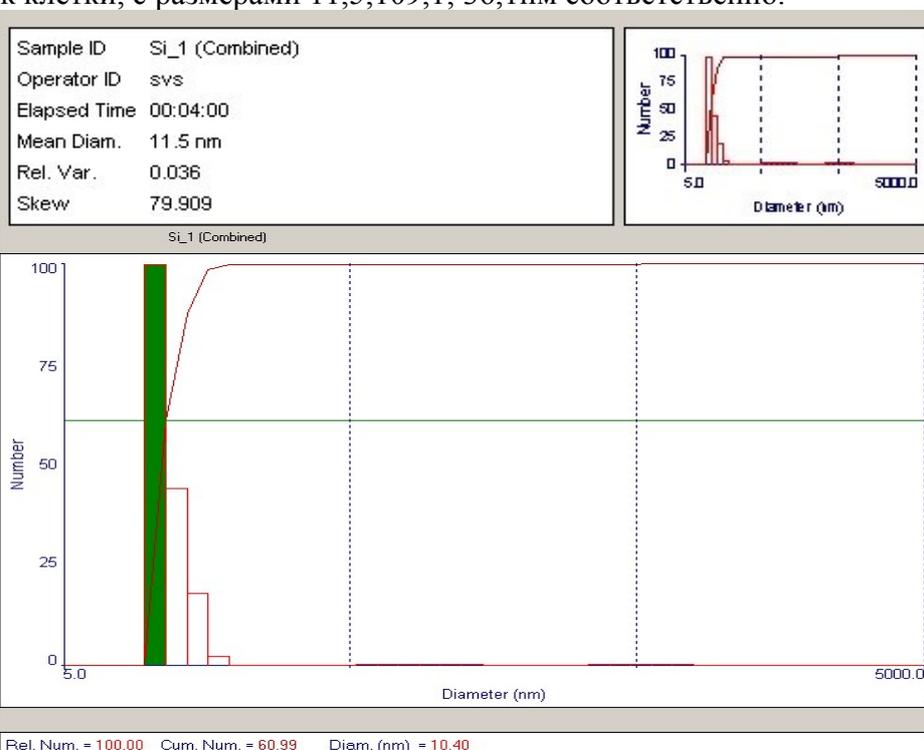


Схема реакции гидросилирования кремния активированная термическим путем.

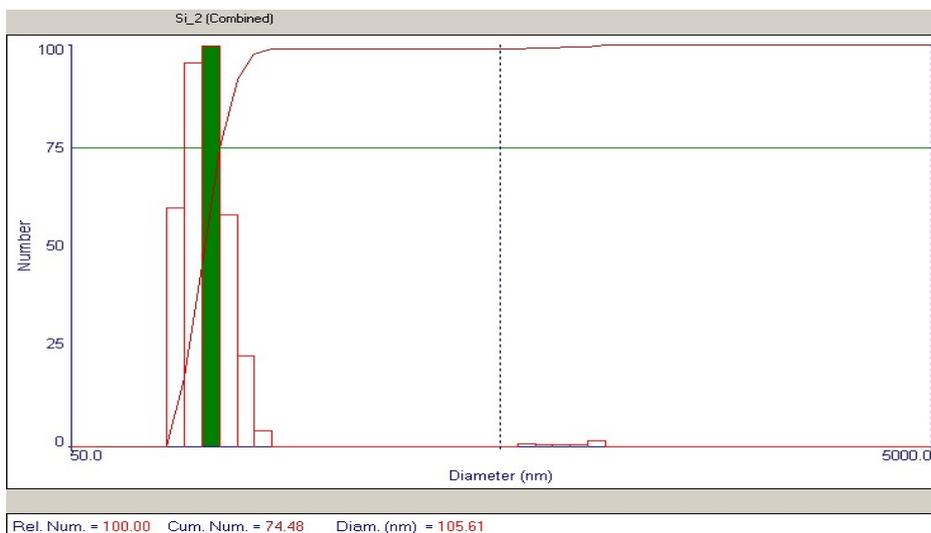
Методом малоуглового рентгеновского рассеивания получали данные функции распределения частиц по размеру в зависимости от температуры отжига. Максимальный размер частиц составил 3 нм, полученные частицы гидрофобны. Модификацию частиц нанокремния проводили путем гидрофилизации поверхности частиц кремнефтором (PEG-40 Hydrogenated Castor Oil), перемешивая раствор наночастиц кремния в гексане с расплавленным кремнефтором при 35°C, с периодическим озвучиванием в ультразвуковой ванне. Использовали разные соотношения $n\text{-Si/Cremophor}$: 1/2; 1/1; 1/1,5, для выявления лучшего варианта соотношений реагентов.

В результате были получены гидрофильные частицы нанокремния, способные проникать к клетке, с размерами 11,5; 109,1; 36,1 нм соответственно.

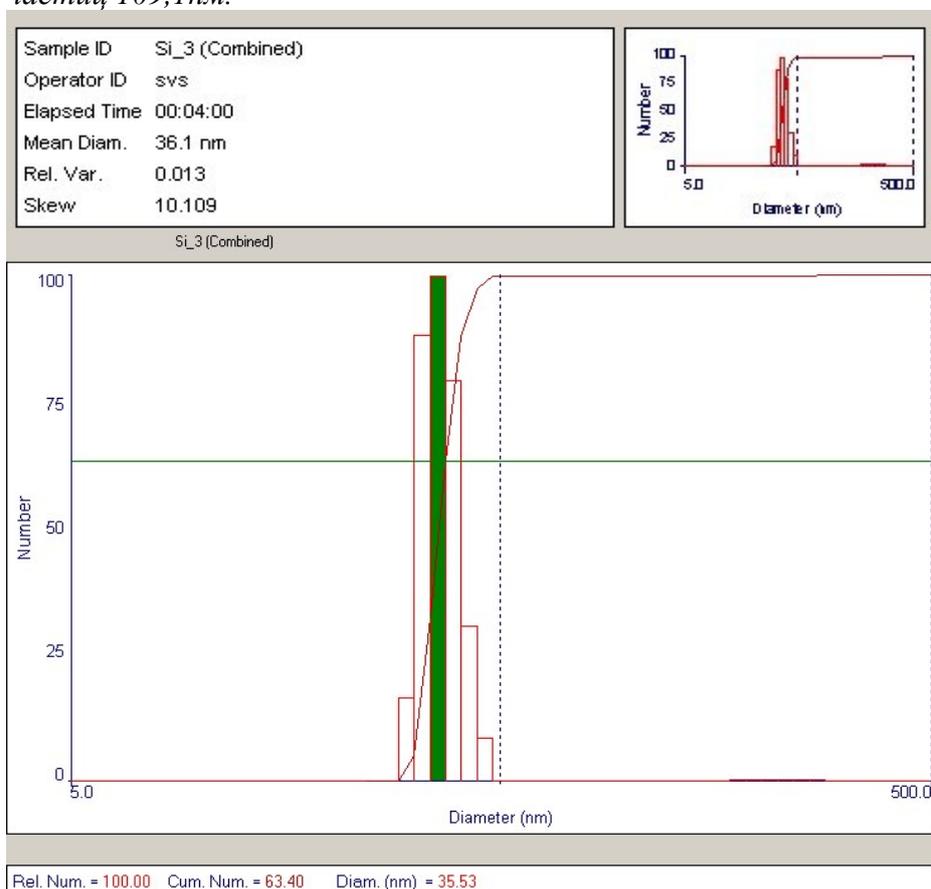


Данные измерений размера модифицированных частиц нанокремния путем гидрофилизации поверхности при соотношении $n\text{-Si/Cremophor}$: 1/2. Размер полученных частиц 11,5 нм.





Данные измерений размера модифицированных частиц нанокремния путем гидрофиллизации поверхности при соотношении $n\text{-Si/Cremophor}$: 1/1. Размер полученных частиц 109,1 нм.



Данные измерений размера модифицированных частиц нанокремния путем гидрофиллизации поверхности при соотношении $n\text{-Si/Cremophor}$: 1/1,5. Размер полученных частиц 36,1 нм.

Клеточные линии эритролейкоза K562 использовали для анализа 1-ого типа частиц нанокремния, из-за наименьшего размера. Используя МТТ-методику, оценивали выживаемость клеток. Время воздействия частиц на клетки составляло 48 часов.

В результате исследования получили биоконъюгаты на основе гидрофиллизованных частиц нанокремния с использованием моноклонизированных клеток эритролейкоза K562. Установили, что полученные модифицированные частицы нанокремния не обладают токсичностью. Определили оптимальные соотношения реагентов $n\text{-Si/Cremophor}$ для гидрофиллизации нанокремния и получения частиц необходимого размера.

Разработка метода масс-спектрометрического экспресс-анализа тканей



**Бормотов Д. С.^{1,2,3}, Жванский Е. С.^{2,3}, Кононихин А. С.^{1,2,3},
Попов И. А.^{1,2,3}, Николаев Е. Н.^{1,2,3}**

1. *Институт биохимической физики им. Н.М.Эмануэля РАН*
2. *Институт энергетических проблем химической физики РАН*
3. *Московский физико-технический институт*

Во время хирургических операций по удалению опухолей, особенно высокой степени злокачественности, определить границу их распространения является нетривиальной задачей, и от её решения зависит успех лечения. Применяемые в клинической практике интраоперационные методы, такие, как гистологический экспресс-анализ, интраоперационная магнитно-резонансная томография и другие, имеют существенные недостатки и ограничения, в частности, увеличение времени операции.

Одним из альтернативных подходов, сочетающих высокую скорость анализа и высокую специфичность и селективность на молекулярном уровне с простотой автоматизации анализа, является масс-спектрометрия. В последнее десятилетие развиваются методы так называемой прямой масс-спектрометрии[1], минимизирующей необходимую пробоподготовку и потому представляющей особый интерес для задач, связанных с ограничениями времени анализа.

В данной работе рассматривается применение разработанного авторами метода прямого спрея с ткани[2], совмещающего жидкостную экстракцию липидов из образца с одновременной ионизацией их в электроспрее. Схема установки приведена на рисунке 1.

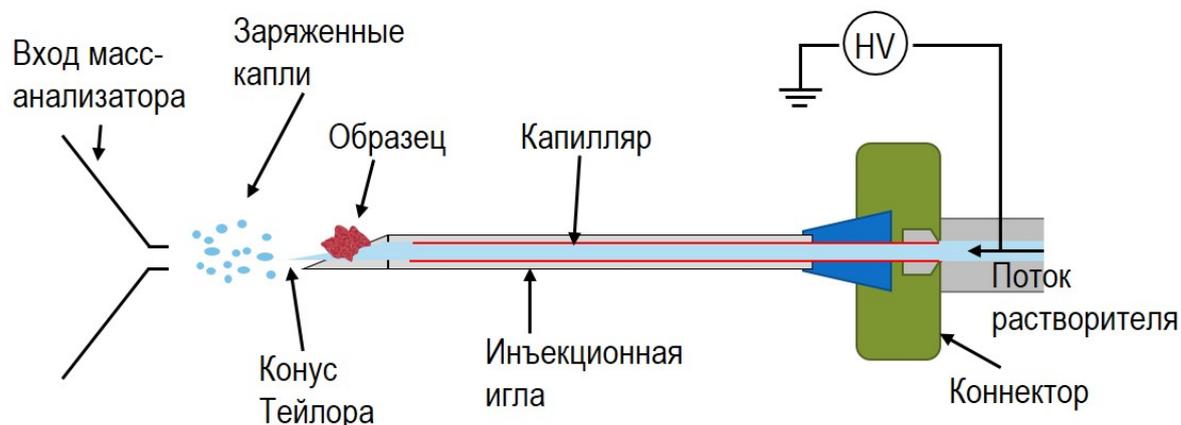


Рисунок 3. Схема экспериментальной установки, реализующей прямой спрей с ткани.

Для доказательства принципиальной применимости метода проведено сравнение (рассчитана корреляция) спектров различных отделов головного мозга мыши, а также ткани печени мыши, полученных вышеописанным методом.

Проведена оптимизация метода, в том числе подбор растворителя, и параметров электроспрея – напряжения между иглой и входным скиммером масс-спектрометра, и потока растворителя.

При помощи программного обеспечения LipidXplorer[3] проведена автоматизированная идентификация липидного состава по точной массе ионам и спектрам фрагментов, полученных путём столкновительной диссоциации. Идентифицировано 170 соединений.

На примере тканей астроцитомы различной степени злокачественности исследована зависимость молекулярного профиля образцов, получаемого разработанным методом, от времени.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 16-15-1043.

1. Rosana M. Alberici, Rosineide, Simas, Gustavo B. Sanvido, Wanderson Romão, Priscila M. Lalli, Mario Benassi, Ildenize B. S. Cunha, Marcos N. Eberlin. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. *Anal Bioanal Chem* (2010) 398:265–294.
2. Alexey Kononikhin, Evgeny Zhvansky, Vsevolod Shurkhay, Igor Popov, Denis Bormotov, Yury Kostyukevich, Sofiia Karchugina, Maria Indeykina, Anna Bugrova, Natalia Starodubtseva, Alexander Potapov, Eugene Nikolaev. A novel direct spray-from-tissue ionization method for mass spectrometric analysis of human brain tumors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, October 2015, Volume 407, Issue 25, pp 7797-7805.
3. R. Herzog, K. Schuhmann, D. Schwudke, J. L. Sampaio, S. R. Bornstein, M Schroeder, A. Shevchenko. LipidXplorer: A Software for Consensual Cross-Platform Lipidomics. *PLoS ONE* 7(1), 2012.

Особенности обмена дейтерия в организме млекопитающих

А.В. Косенков, М.В. Гуляев, В.И. Лобышев

*Московский Государственный Университет имени М.В.
Ломоносова, Москва*

Предпосылкой к исследованию кинетики дейтерия в организме млекопитающих стал ряд работ, показывающий сильные биологические эффекты D_2O как в здоровом организме, так и при наличии ряда патологий [1],[2]. Наибольший интерес в данном случае вызывает способность D_2O в нелетальных для организма концентрациях замедлять процесс развития образований онкологической природы [3]. Наилучшие терапевтические результаты показаны при совместном применении тяжелой воды и химио- и лучевой терапии [4]. Как действующее вещество D_2O качественно отличается от фармакологических препаратов своим быстрым и полным выведением из организма естественным путем. Предполагается разработать методику совместного применения D_2O и классических методов лечения онкологических заболеваний. Первым шагом в этой работе станет выяснение кинетики дейтерия в организме здорового млекопитающего на примере мыши.

Основным методом исследования избрана ЯМР спектроскопия. Она позволяет производить наблюдения *in vivo*, а разрешающая способность метода определяется размерами приемо-передающего контура томографа. В работе использовался прибор BioSpec 70/30 USR фирмы Bruker с постоянным магнитным полем 7 Тл, предназначенном для исследования лабораторных животных. Резонансная частота ядер дейтерия в этом поле составляет 46.17 МГц. Глубина сканирования объекта составляла 1.5 см.

Объектами исследования были три самки мыши линии BalbC одного возраста. Тело мыши было условно разделено на три отдела, голову, грудь и таз (Рис. 1А). В течение пяти недель животные пили 10% раствор D_2O , после был период выведения длительностью 7 недель. В конце каждой недели снимались ЯМР спектры от всех отделов каждого животного.

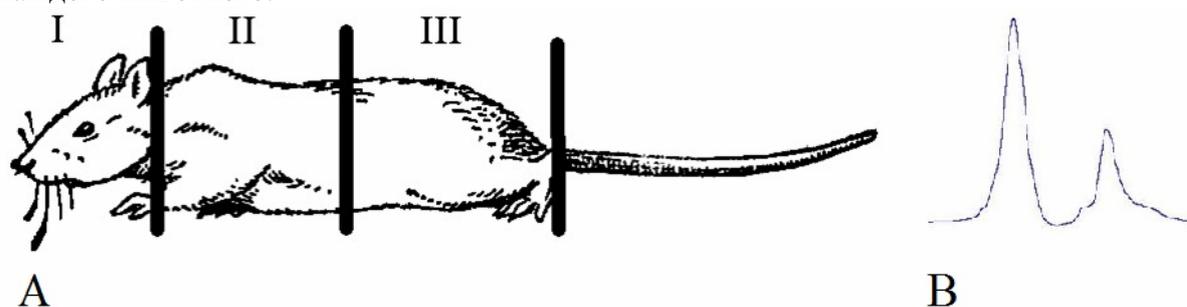


Рис. 4: А: Условные отделы тела мыши. I – голова; II – грудь; III – таз; В: 1H -ЯМР спектр

^1H -ЯМР спектр, как и таковой ^2H -ЯМР спектр для млекопитающего представляет собой две линии (Рис. 1В). Левая линия соответствует сигналу протонов (дейтронов) воды, а правая сигналу протонов (дейтронов) биополимеров. Обмен протонами в биополимерах идет существенно медленнее, чем в воде, поэтому нет возможности оценить динамику дейтерия в биополимерах на стадии насыщения. Это связано с тем, что сигнал от дейтерия биополимеров исчезает на фоне такого сигнала воды.

Процессы насыщения дейтерием и его выведения отражены на Рис. 2 и Рис. 3. Данные усреднены по всем объектам для каждого отдела. Зависимости насыщения и выведения хорошо аппроксимируются экспоненциальными функциями с положительным и отрицательным показателем экспоненты соответственно. Так были оценены показатели при экспоненте, характеризующие кинетику дейтерия (Табл. 1).

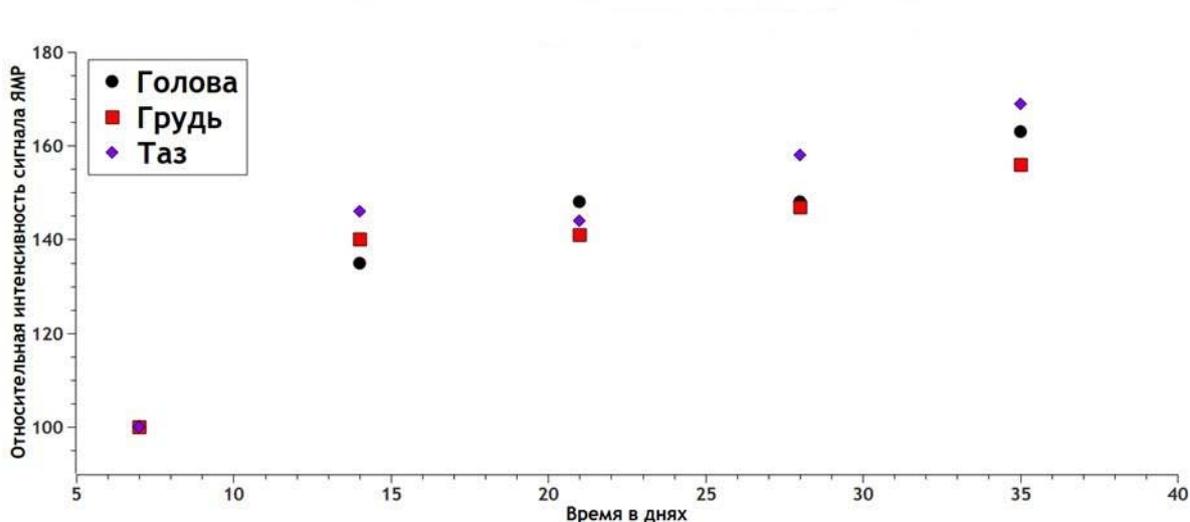


Рис. 5: Насыщением дейтерием тела мыши.

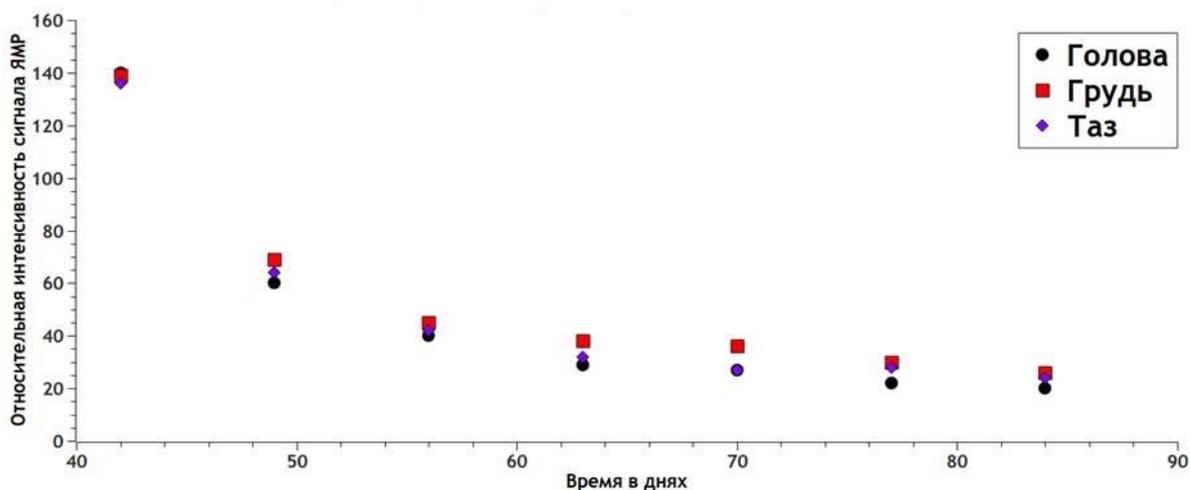


Рис. 6: Выведение дейтерия из тела мыши.

Отдел	T1/2[дни] Введение/вода	T1/2[дни] Выведение/вода	T1/2[дни] Выведение/биополимеры
Голова	9.1±3.5	4.2±0.7	28±7
Грудь	5.6±2.8	4.9±0.7	49±14
Таз	8.4±4.9	4.9±0.7	42±14

Табл. 1: Показатели при экспоненте в зависимости интенсивности ЯМР сигнала от времени. Показатели при экспоненте можно рассматривать как периоды полувыведения

и полунасыщения(через каждый период T интенсивность сигнала увеличится на величину в два раза меньшую приращению за предыдущий период).

Выводы. Получены кинетические характеристики обмена дейтерия воды и биополимеров в тканях мышцы.

[1] - Flaumenhaft E., Bose S., Crespi H. L., Katz J. J. Deuterium effects in cytology. - Int. Rev. Cyt., 1965, 18, 313-361.

[2] - Katz J., Crespi H. Isotope effects in biological systems. - In: Isotope effects in Chemical Reactions. C. J. Collins, N. S. Bowman (Eds). N. Y., Toronto, Cincinnati, London, Van Nostrand Reinhold Co., 1970, p. 286-363.

[3] - Fisher A. Wachstum von Gewebezellen in schwerem Wasser. - Protoplasma, 1936, 26, N 1, 51-55.

[4] - Finkel A.J., Czajka D.M., Katz J.J. Potentiation of chemotherapy of experimental tumors by deuterium oxide. - Acta, 1964, 20, N 1-2, 201-203.

Крупнозернистая модель молекулы ДНК.



Королева(Кикоть) И.П., Ковалева Н.А., Зубова Е.А., Мазо М.А.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской
академии наук, Москва.*

Молекула ДНК - одна из важнейших биологических молекул. Не удивительно, что ее исследованию уделяется такое большое внимание. В частности, важны конформационные переходы между различными формами молекулы ДНК, которые наблюдаются при ее функционировании. Основными состояниями молекулы являются А- и В-формы, отличающиеся как условиями существования, так и геометрическими параметрами двойной спирали. ДНК принимает А-форму в сильно концентрированных солевых или спиртовых растворах, и В-форму — в физиологическом растворе. Для понимания механизма перехода между этими формами необходимо выделить существенные для этого явления факторы: какие именно деформации молекулы позволяют осуществить соответствующее изменение геометрии молекулы? За счет чего начинается формирование новой формы? Что является движущим фактором? К сожалению, полноатомное моделирование не может дать ответы на эти вопросы по ряду причин. Конформационный переход даже на маленьком отрезке молекулы в 12 пар оснований требует значительных вычислительных ресурсов, так как это очень медленный процесс. Кроме того, учет всех степеней подвижности в полноатомном моделировании затрудняет выделение ключевых факторов. Для решения этих проблем используются крупнозернистые модели. В зависимости от поставленной задачи при крупнозернении учитываются те или иные виды подвижности скелета двойной спирали молекулы ДНК; ионы могут учитываться явно или не явно при неявно заданном растворе.

В нашей работе при построении крупнозернистой модели мы сосредоточились на тех факторах, которые могут быть ответственны за переход между А и В-формами молекулы ДНК. Необходимо было учесть подвижность сахарофосфатной цепи, две возможные конформации рибозных колец, и взаимодействие частичных зарядов на сахаро-фосфатной цепи и нуклеотидных основаниях с ионами раствора. Кроме того, выбор зерен и степень огрубления диктовались необходимостью четырех разных типов нуклеотидных оснований (Аденин, Гуанин, Тимин, Цитозин), различающихся взаимодействием между собой как в стекинге (упаковка оснований вдоль молекулы), так и

в водородных связях (связи между цепями двойной спирали). Кроме того, каждый тип основания имеет свое распределение зарядов и значение дипольного момента, и, следовательно, дает разный вклад во взаимодействие с ионами раствора и по-разному влияет на переход между А и В формами.

Для озвученных выше целей оказалось достаточно трех зерен на сахарофосфатной цепи (P, C3, C1) и трех зерен для описания нуклеотидного основания (B1, B2, B3) (рис. 1). На рисунке обозначены связи валентные взаимодействия между зернами. Кроме того между тремя зернами сахарофосфатной цепи имеется двухъямное взаимодействие между зернами P и C1 и корреляционный потенциал между двумя соседними фосфатными зернами и зерном C1 между ними, что позволяет описать две конформации сахарного кольца.

Влияние раствора на молекулу ДНК осуществляется за счет взаимодействия заряженных зерен (фосфатное зерно и зерна оснований (B1, B2, B3)) с ионами натрия и хлора в растворе. Для описания этого взаимодействия используются кулоновские потенциалы с поправками, описывающими сольватацию ионов. Растворитель, в данном случае вода, приносит во взаимодействие ионов сольватационные максимумы и минимумы (рис 2.).

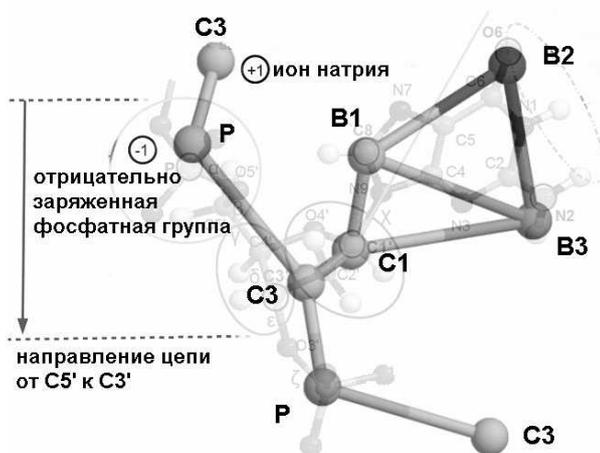


Рис.1 Фрагмент цепи молекулы ДНК в крупнозернистом представлении.

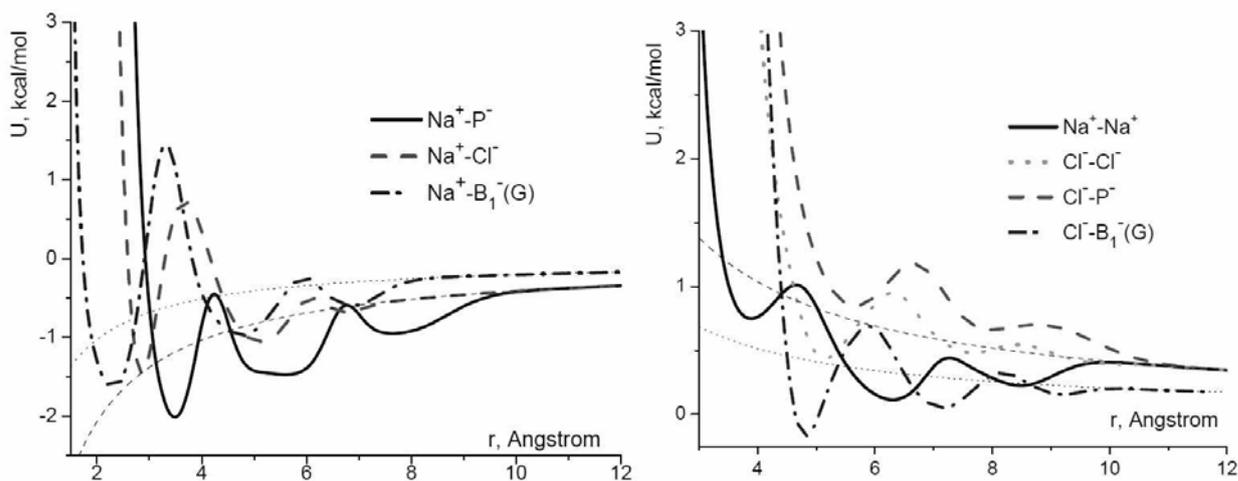


Рис.2 Потенциалы взаимодействия заряженных зерен с ионами раствора.

Построенная таким образом модель позволяет моделировать как А, так и В-форму молекулы ДНК в зависимости от концентрации соли (NaCl). Изменяя концентрацию соли, мы можем наблюдать переход между А и В-формами. Поскольку фазовый переход — это медленный-процесс, то мы сначала пронаблюдали его в невязком растворе, и затем с учетом реальной вязкости воды. При низкой концентрации соли молекула находится в В форме. При повышении концентрации молекула сначала кратковременно, а потом все чаще и чаще переходит в А форму. При больших концентрациях молекула уже устойчиво

находится в А-форме. Если измерять среднюю по времени ширину большой бороздки, можно получить концентрацию, при которой происходит переход из одной формы в другую. Для случая невязкой среды можно использовать значительно более короткие по времени траектории, поскольку в отсутствии трения молекула имеет возможность часто изменять форму, чему также способствует большая подвижность ионов. При учете реальной вязкости воды, подвижность и молекулы, и ионов понижается, и необходимо рассматривать значительно более длинные траектории. Однако на кривую перехода (рис.3) вязкость раствора не влияет. Мы можем наблюдать, что переход закончен при концентрациях соли 0.4 Моль, что согласуется с экспериментальными данными.

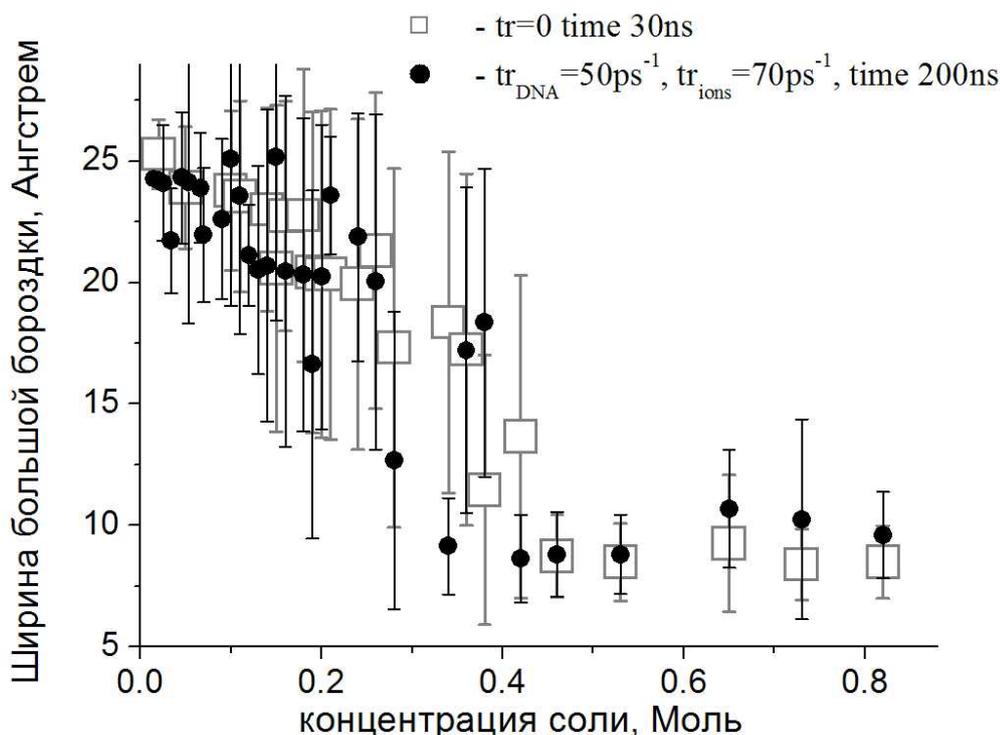


Рис.3 Зависимость средней по времени ширины бороздки двойной спирали молекулы ДНК при разной вязкости раствора от концентрации соли в растворе.

Таким образом, мы впервые построили адекватную крупнозернистую модель, позволяющую исследовать механизм перехода между А и В формами молекулы ДНК.

Работа выполнена в рамках проекта Российского Научного Фонда 16-13-10302. Расчеты выполнялись на базе Межведомственного Суперкомпьютерного Центра Российской Академии Наук.

Различие в строении ацетилхолинэстераз различных видов и влияние его на кинетику взаимодействия с ингибиторами



Новичкова Дана Александровна, Луцкина Софья Владимировна

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

Ацетилхолинэстераза – белок семейства гидролаз, отвечающий за гидролиз нейротрансмиттера ацетилхолина в синаптической щели. Доступны

кристаллографические структуры холинэстераз многих видов: *Homo sapience* (хАХЭ), *Mus musculus* (мАХЭ), *Torpeda californica* (рАХЭ), *Drosophila melanogaster* (дАХЭ).

У холинэстераз всех видов активный сайт находится на дне длинного канала, но, несмотря на это, скорости гидролиза ацетилхолина очень велики. Таким образом, изучение строения канала представляет особый интерес.

Также стоит отметить, что ацетилхолинэстеразы характеризуются высокой полярностью, высказано предположение, что именно за счёт градиента заряда происходит перемещение ацетилхолина по длинному и узкому каналу к активному сайту.

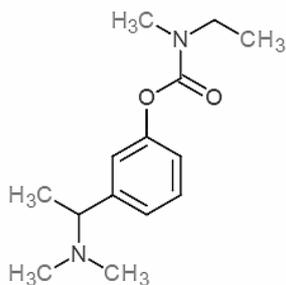


Рисунок 7. Строение молекулы ривастигмина

Известно также, что, хотя гидролиз ацетилхолина протекает одинаково быстро во всех известных холинэстеразах, существуют ингибиторы, селективные по отношению к холинэстеразам различных видов [1]. Так, константа ингибирования ривастигмином (рис. 1) рАХЭ на три порядка меньше, чем константа ингибирования хАХЭ.

Показано, что помимо различий в строении фермент-субстратного комплекса, на взаимодействие с ривастигмином оказывают влияние остатки, устилающие канал (рис. 2).

В работе продемонстрировано, что рАХЭ имеет более короткий канал, чем хАХЭ, а также не имеет дополнительного сужения у входа в канал, что может являться причиной различий в кинетике ингибирования.

Как было показано ранее [2], действительно, существует градиент заряда вдоль канала. В данной работе дополнительно обнаружено, что в случае мАХЭ и рАХЭ данный градиент больше, чем в случае рАХЭ, что также согласуется с различием в скорости ингибирования.

1. Bar-On, P., Millard, C.B., Harel, M., Dvir, H., Enz, A., Sussman, J.L. and Silman, I. Kinetic and Structural Studies on the Interaction of Cholinesterases with the Anti-Alzheimer Drug Rivastigmin// *Biochemistry*. 2002, 41. p. 3555-3564
2. 2014 Транспорт ацетилхолина в АХЭ различных видов. Новичкова Дана Александровна. Сборник тезисов XXI Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных по фундаментальным наукам «Ломоносов–2014», секция «Химия» (8 апреля 2014 г., Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова)

Модифицирующее действие ограниченного протеолиза папаином на структуру и свойства легуминов

Поляков А.В.

*Институт Биохимической Физики им. Н. М. Эмануэля,
Москва*

Введение

Перспективным решением обеспечения мирового населения полноценным пищевым белком является диверсификация источников пищевого белка. Запасные белки зернобобовых культур имеют высокую биологическую ценность вследствие сбалансированности по содержанию незаменимых аминокислот [1] и относительно невысокую стоимость производства. Ограниченность использования этих белков для пищевых целей связано с их недостаточно высокими функциональными (эмульгирующие и пенообразующие) свойствами, неполным перевариванием в желудочно-кишечном

тракте, наличием аллергенных фракций. Решить указанные недостатки удастся ограниченным [2].

Целью данной работы является сравнительное исследование параметров молекулярной структуры, термодинамической стабильности, пенообразующих свойств и атакуемости ферментами желудочно-кишечного тракта легуминов двух зернобобовых культур соевых бобов *Glycine max* и кормовых бобов *Vicia faba*, а также продуктов их ограниченно протеолиза папаином – глицинина-П и легумина-п, соответственно.

Материалы и методы

Интактные легумины выделяли из обезжиренной муки соевых бобов и кормовых бобов согласно [3, 4]. Модифицированные легумины получали согласно [3].

Для определения константы поступательной диффузии и эффективного гидродинамического размера интактного и модифицированного белков использовали метод динамического светорассеяния. Определение молекулярной массы и второго вириального коэффициента белков производили методом статического рассеяния света. Измерения динамического и статического светорассеяния выполняли на приборе Zeta Sizer Nano с 4 мВт He-Ne лазером (длина волны 633 нм). Анализ полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения Zetasizer Software 6.20. Protein Analysis с применением метода анализа CONTIN.

Для характеристики термодинамической стабильности белков использован метод адиабатной сканирующей микрокалориметрии на приборе ДАСМ-4М в диапазоне температур 10-110°C при скорости сканирования 2 град/мин и избыточном давлении 0,2 МПа.

Пенообразующую способность интактного и модифицированного глицинина оценивали путем измерения объема пены, образованной растворами белков в стандартных капиллярах путем одновременного встряхивания с заданной амплитудой. Для исследования стабильности пены пробирки хранили при комнатной температуре и определяли ее объем как функцию времени. За характеристику стабильности пены принимали время ее полураспада.

Атакуемость белков ферментами желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека исследовали в методе *in vitro*, заключающемся в действии пепсина в кислой среде на первой стадии и смеси трипсина и химотрипсина в нейтральной среде на второй стадии. В качестве критерия атакуемости белков ферментами желудочно-кишечного тракта использовали метод ТНБС (тринитробензолсульфоокислота, определение свободного аминного азота) [5].

Результаты и обсуждение

Согласно данным статического рассеяния света, ограниченный протеолиз легуминов сопровождается понижением молекулярной массы примерно на 70 кДа. Величины второго вириального коэффициента (B) для интактных и модифицированных белков в указанном растворителе имеют положительные значения, но принимая меньшие значения для модифицированных белков. Это указывает на то, что в результате модификации взаимодействия молекул белка и растворителя остаются термодинамически предпочтительными, но термодинамическое сродство белка к растворителю существенно снижается. Вероятно, это является результатом экспонирования к растворителю некоторых гидрофобных аминокислотных остатков в процессе модификации.

Ограниченный протеолиз сопровождается повышением коэффициентов диффузии (D^0) и понижением эффективного гидродинамического размера макромолекул белков (R_h), однако константа седиментации (s) не претерпевала существенных изменений после модификации.

Сочетание данных статического и динамического рассеяния света позволяет оценить форму молекулы белка с помощью величин фрикционных отношений (f/f_{min}). Согласно полученным данным, модифицированные легумины характеризуются более низкими

значениями f/f_{\min} , что указывает на меньшую степень асимметрии их молекул по сравнению с интактными.

Таблица 1. Молекулярные параметры интактных и модифицированных легуминов в растворе

Параметр/белок	Глицинин	Глицинин-П	Легумин <i>V.f.</i>	Легумин <i>V.f.</i> -П
M_w , кДа	331±16	264±15	327±16	258±14
B , 10^{-4} мл·моль/г ²	3,57±0,21	1,31±0,16	3,20±0,16	1,59±0,17
D° , 10^{-7} см ² /сек	3,36±0,13	4,19±0,12	3,41±0,12	4,17±0,13
R_h , нм	6,37±0,11	5,16±0,10	6,22±0,10	5,09±0,11
s , Св	10,8±0,2	10,6±0,2	10,9±0,2	10,7±0,2
f/f_{\min}	1,40±0,06	1,22±0,05	1,37±0,06	1,21±0,05

Определены термодинамические параметры термоденатурации интактных и модифицированных белков. Судя по полученным значениям температуры и энтальпии денатурации (табл.2) можно заключить, что процесс модификации сопровождается понижением термодинамической стабильности.

Таблица 2. Термодинамические параметры денатурации глицинина и глицинина-П. Условия: 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,6, 0,5 М NaCl, температура 25°C.

Белок	Температура денатурации, °С	Молярная Энтальпия денатурации, кДж/моль
Глицинин	96,7	8705
Глицинин-П	91,6	6257
Легумин	96,6	7890
Легумин-П	91,1	5986

На рисунке 1 представлены графики зависимости пенообразующей емкости от концентрации белка. Очевидно, что во всем исследуемом диапазоне концентраций модифицированные белки характеризуются бóльшим объемом сформированной пены по сравнению с интактными. Максимальный эффект составляют двукратное увеличение в случае легумина *V.f.* и четырехкратное в случае глицинина.

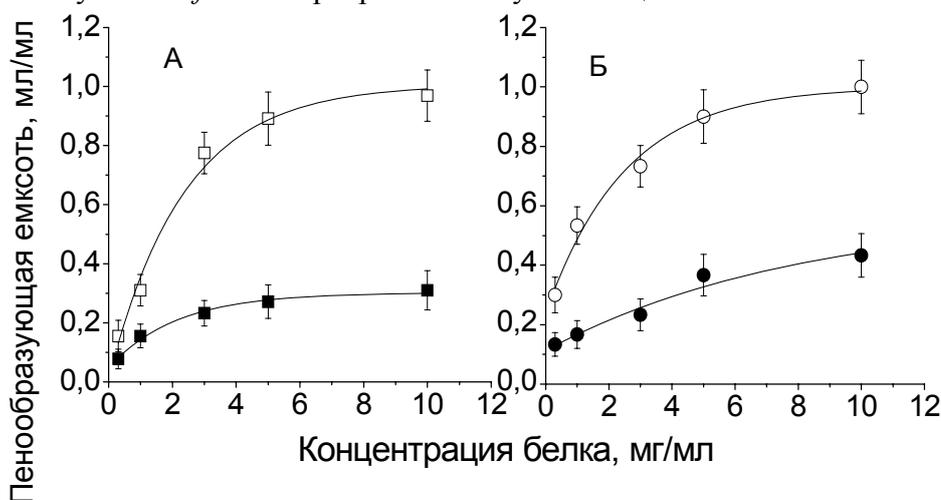


Рисунок 1. Зависимость пенообразующей емкости от концентрации интактных (■/●) и модифицированных (□/○) глицинина (А) и легумина *V.f.* (Б).

На рисунке 2 представлены зависимости высоты столба сформированной пены растворов глицинина и глицинина-П от времени старения. Время полураспада (двукратное сокращение высоты) пены, образованной интактным глицинином составляет 30 часов, глицинина-П – 72 часа. Времена полураспада пены легумина и легумина-П составили 40 часов и 96 часов, соответственно.

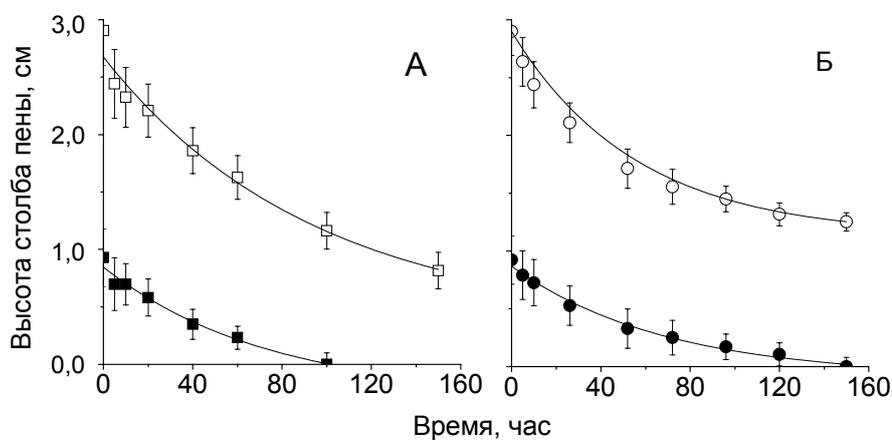


Рисунок 2. Стабильность пен растворов интактных (■/●) и модифицированных (□/○) глицинина (А) и легумина (Б). Концентрация белка – 10 мг/мл.

На рисунке 3 представлена зависимость от времени количества свободного аминного азота, образующегося в процессе гидролиза глицинина/глицинина-П и легумина V.f./легумина V.f.-П. Необходимо отметить, что в составе молекул белка свободный аминный азот присутствует в остатках лизина, чем и обусловлено отличное от нуля значение количества аминного азота до начала переваривания (момент времени = 0). Судя по количеству высвободившегося аминного азота, модифицированные белки подвергаются атакам ферментов ЖКТ в большей степени, по сравнению с интактными.

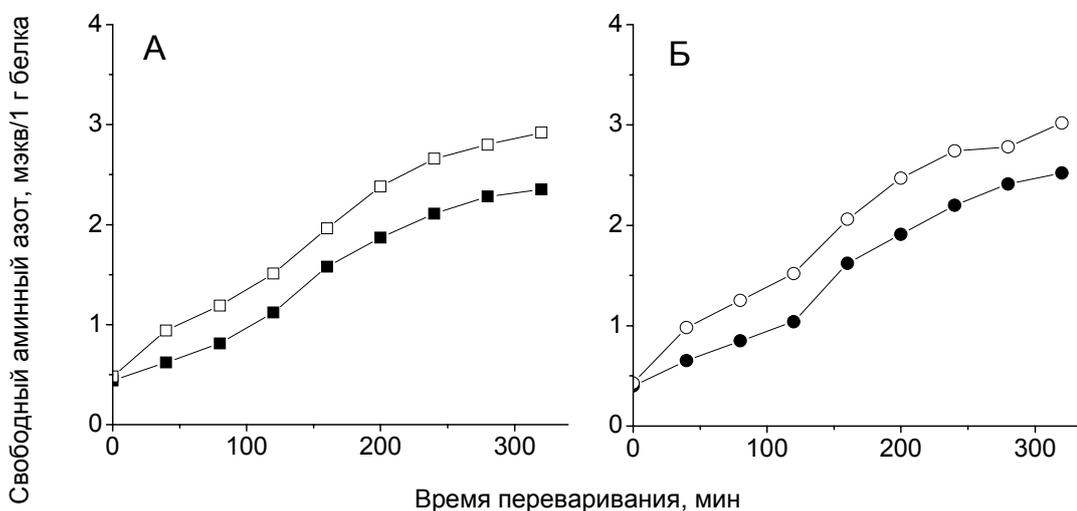


Рисунок 3. Кинетические кривые атакуемости интактных (■/●) и модифицированных (□/○) форм глицинина (А) и легумина V.f. (Б) (метод ТНБС).

Более высокая атакуемость ферментами ЖКТ модифицированных молекул, вероятно, объясняется отличиями в их структуре: после удаления в результате ограниченного протеолиза С-концевого участка кислых цепей субъединиц легуминов становятся более доступными протеолитическим ферментам скрытые ранее пептидные связи. Кроме того, более интенсивному гидролизу модифицированных легуминов ферментами ЖКТ способствует их более низкая конформационная стабильность.

Таким образом, модифицированные молекулы обладают более высокой пенообразующей способностью и стабильностью пен, а также большей степени подверженности атакам ферментам желудочно-кишечного тракта. Установленные эффекты обусловлены, по видимому, структурными и физико-химическими изменениями молекул легуминов в результате ограниченного протеолиза папаином.

Литература:

1. Павловская Н.Е., Шумилин П.И., Задорин А.Д., Правдюк З.А., Шалимова О.А. Белковый комплекс зернобобовых культур и пути повышения его качества// ОрелГАУ. 2003. с. 180 – 214.
2. Barać M. B., Stanojević S. P., Jovanović S. T., Pešić M. B. Soy protein modification – a review // APTEFF. 2004. V. 35. P. 3-16.
3. Shutov A., Rudakova A., Rudakov S., Kakhovskaya I., Schallau A., Maruyama N., Wilson K. Limited proteolysis regulates massive degradation of glycinin, storage 11S globulin from soybean seeds: an in vitro model // J Plant Physiol. 2012. V. 169(13). P. 1227-1233.
4. Popello I.A., Suchkov V.V., Grinberg V.Y., Tolstoguzov V.B. Liquid/liquid phase equilibrium in globulin/salt/water systems: legumin // J. Sci. Food Agric. – 1990. – V. 51 (3). – P. 345 – 353.
5. Adler-Nissen J. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid // J. Agric. Food Chem. – 1979. – V. 27 (6). – P. 1256-1262.

Изменение биологической активности иммобилизованных БАВ на хитозансодержащих матрицах в процессе получения и хранения.



Э.Э. Досадина, М.А. Бикинеева, А. Ю. Евдокименко, Е.Е. Савельева, Е.О. Медушева, Л.А. Павлова, Н.В. Пятигорская, А. А. Белов

*РХТУ им. Д.И.Менделеева, кафедра биотехнологии; НИИ фармации; НИИ текстильных материалов, г. Москва
E-mail: ABelov2004@yandex.ru*

В последние годы отмечается увеличение интереса к созданию ранозаживляющих препаратов. В комплексном лечении трофических язв венозного генеза большое значение имеет использование современных биологически активных раневых покрытий, которые комплексно воздействуют на язву, очищая ее от гнойно-некротических масс, стимулируют эпителизацию и начало рубцевания. Хирургическая операция, как правило, вызывает выраженный в той или иной степени вторичный иммунодефицит и зачастую в значительной степени может замедлить процесс выздоровления. Короткие сроки заживления и качество лечения ран остаются одними из самых актуальных проблем современной хирургии. Для очищения раневых поверхностей предложено большое количество различных форм иммобилизованных лекарственных средств: перевязочные материалы, гелевые повязки, присыпки, пленки и др. Однако наиболее удобными формами в терапии раневого процесса остаются мягкие лекарственные формы: мази и гели. Выбор оптимальной формы лекарственного средства для лечения, а также рациональный способ введения препарата в организм являются первостепенными показателями при успешном лечении. Последнее время в фармацевтике все больше производится средств, представляющих собой лекарственные препараты различных групп в виде мазей и суппозитория. Подобные лекарственные средства обладают бактерицидным, антиоксидантным, очищающим, обезболивающим действием, и в комплексе являются мощным средством в лечении ран. Поэтому создание медицинских мазей и суппозитория, обладающих антисептическим, очищающим, антиоксидантным и обезболивающим действием, является своевременным и перспективным.

Способность мазей и суппозиториев обеспечивать надлежащее высвобождение лекарственных веществ зависит от технологии изготовления, состава вспомогательных веществ (основообразующих компонентов, ПАВ и др.), которые в составе этих лекарственных форм зачастую занимают более 99% от массы лекарственной формы и определяют ее основные биофармацевтические свойства. Таким образом, актуальным является выбор оптимального состава мази и суппозиториев с необходимыми компонентами, включающих современные вспомогательные вещества, способные обеспечить высокую степень высвобождения и стабильность разработанных лекарственных препаратов. Разработка новых комбинированных составов лекарственных средств требует необходимость проведения широкомасштабных исследований совместимости ингредиентов, в первую очередь лекарственных субстанций во избежание образования новых соединений, которые могут исказить терапевтический эффект, либо привести к образованию токсического продукта. Отсутствие взаимодействия в фармацевтической композиции позволяет прогнозировать неизменность фармакологической активности каждого биологически активного соединения, введенного в состав этой композиции [1].

Таким образом в настоящее время остро стоит проблема разработки таких перевязочных средств, которые бы отвечали необходимым требованиям, а именно: (1) имели бы значительный срок хранения; (2) не являлись бы сложны в изготовлении; (3) являлись узконаправленными препаратами (бактерицидными, гемостатическими и др.); (4) имели достаточную газо- и водопроницаемость (пленочные покрытия). Однако все до сих пор разработанные средства не отвечают всем этим параметрам. Большинство промышленно выпускаемых полифункциональных ПС имеют высокую стоимость или вообще не представлены на фармацевтическом рынке в России. Необходимость решения данной проблемы заставляет искать другие подходы к созданию перевязочных препаратов нового поколения.

Мази являются одним из старейших видов форм, применяемых в медицине, которая не утратила своей актуальности и сегодня. В современной медицине такая лекарственная форма применяется в лечении не только дерматологических заболеваний, но и часто используется в других отраслях медицины, таких как офтальмология, хирургия, гинекология и др. Необходимо также отметить, что мази также применяются в качестве средств диагностики различных заболеваний. При этом мази являются одной из самых оптимальных форм лекарственного средства, в которой сочетаются вещества, различные по своим не только химической природе и биологической активности, но и имеющие разное агрегатное состояние. Это факт может объясняться тем, что в вязкой среде многие физико-химические процессы (гидролиз, окисление и др.) протекают в значительной степени медленнее.

Создание систем адресной доставки лекарственных средств к пораженному органу является в настоящее время одним из самых перспективных направлений разработки систем с контролируемым выделением активного вещества. Реализация постепенного дозирования лекарственного вещества происходит за счет различных факторов, а именно: 1) разрушение химической связи полимерный носитель - лекарственное вещество; 2) проникновение лекарственного средства за счет диффузии через слой полимера (как пример - трансдермальные средства); 3) выделение активного вещества при деградации полимерной системы (наночастицы, покрытия таблеток); 4) выход БАВ при набухании системы (гидрогелевые системы).

Среди основных методов лечения, которые на сегодняшний день позволяют быстро очищать раневую поверхность от некротизированных тканей и создать оптимальные условия для скорейшего заживления, выделяют хирургическую обработку раны, промывание ее растворами антисептиков (по возможности пульсирующей струей), дренирование раны и раннее ее закрытие оперативным путем. Необходимость проведения локального лечения делает закрытие раны оперативным путем невозможным и

непродуктивным подходом к лечению. Следует отметить, что хирургическое воздействие, местная и медикаментозная терапия раны являются конкурирующими или взаимозаменяемыми методами. Выбор способа очищения раны зависит от многих факторов, таких как размер, локализация, тип раны, необходимая эффективность и селективность некрэктомии, уровень болевых ощущений, количество экссудата, риск инфекции и стоимость лечения.

Ферментативное очищение ран — это высокоселективный метод, при котором используются природные протеолитические ферменты или протеазные комплексы, которые производятся сегодня фармацевтической индустрией непосредственно для лечения ран. Вносимые ферменты действуют в ране вместе с эндогенными ферментами организма. Применение протеолитических ферментов, а также ферментных комплексов способствует очищению раневой поверхности от детрита, экссудата и др. С этой целью могут применяться различные протеазы с разными свойствами и оптимальными условиями действия. Поэтому в лекарственные препараты вводят те или иные протеиназы, стабилизированные различными полимерами (чаще всего биodeградируемыми) для предотвращения инактивации фермента в процессе получения, хранения или использования [2].

На течение раневого процесса может влиять множество различных общих и местных факторов: высокая степень микробной контаминации в присутствии полирезистентной микрофлоры, нарушение оттока раневого отделяемого, а также наличие инородных тел в ране способствуют значительному ухудшению течения раневого процесса. При нарушении равновесия между микроорганизмами, загрязняющими рану, и защитными силами макроорганизма, в ране может развиваться инфекция с характерными признаками воспаления [2].

На сегодняшний день существует мнение, что на ранних стадиях раневого процесса в результате «респираторного взрыва» в полиморфно-ядерных лейкоцитах происходит неконтролируемое образование свободных радикалов. В ходе этого процесса в клетках образуются мощные биооксиданты — активные формы кислорода (АФК), как известно, обладающие значительной цитотоксической активностью по отношению к клеткам как прокариот, так и эукариот [3].

Предлагаемая нами медицинская композиция позволит не только существенно сократить сроки заживления, но и способствовать заживлению длительно незаживающих ран, таких как застарелые пролежни и хронические гнойные язвы, что возможно за счет действия как ферментов, так и антиоксидантов.

Было изучено влияние хитозана на ферментативную активность ПК (рис.1) и показано, что присутствие хитозана в системе не способствует снижению активности препарата, при термоинактивации в растворе наблюдается активация системы Хт-ПК.

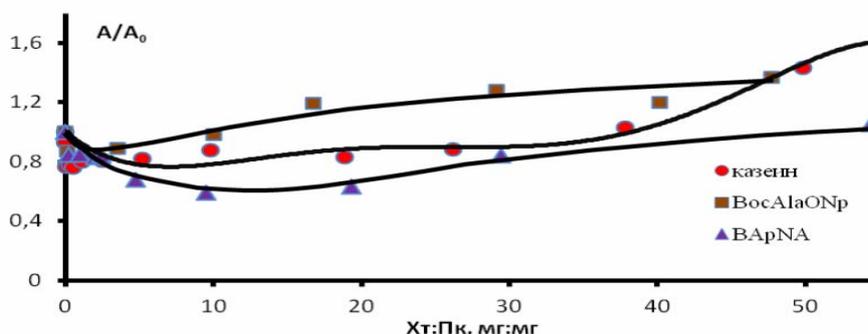


Рисунок 1. Изменение ферментативной активности (A) систем Хт-ПК по сравнению с активностью раствора нативного фермента (A₀) в зависимости от количественного соотношения хитозана и ПК в пробе (субстраты казеин, ВосAlaONp и ВApNA)

Результаты исследования кинетики инактивации нативного фермента (на примере ПК) (таблица 1) и системы фермент-хитозан при различных температурах показывают, что при высоких температурах хитозан способен стабилизировать фермент, о чем

свидетельствуют полученные значения эффективных констант скорости инактивации систем. Также установлено, что введение в систему глицерина в качестве пластификатора и агента для предотвращения испарения воды из лечебного геля оказывает стабилизирующий эффект на изученный фермент.

Таблица 1 - Величины эффективных констант скорости инактивации ($ч^{-1}$) исследуемых препаратов при разных температурах.

t, °C	25		37		45		55		65	100
Образец	k ₁	k ₂	k ₁	k ₁						
ПК	0	0,001	0,162	0,02	0,886	—	1,67	—	7,63	∞
ХТ-ПК	0,021	0,008	0,302	0,001	1,597	—	1,838	0,515	3,173	12,59
ХТ-ПК(Гл)	0,017	0,007	0,36	0,005	1,528	—	2,154	0,122	3,225	13,08

Последние исследования показывают [3], что ход раневого процесса сопровождается активацией свободнорадикальных реакций с образованием в том числе активных форм кислорода, отрицательно воздействующий на весь процесс заживления. Вводимые в раневые покрытия антиоксиданты помогают избежать развития воспаления, а также значительно снизить сроки выздоровления. Полученные данные (таблица 2) показывают, что разработанные нами системы на основе фермента бромелаина и цистеина в качестве его активатора обладают антиоксидантной активностью (измеренной с использованием ДФПГ) и не требуют введения дополнительных агентов, обеспечивая как очищение раневой поверхности за счет действия фермента, так и защиту от действия образующихся свободных радикалов.

Таблица 2 – Значения антиоксидантной активности исследуемых систем.

Препарат	АОА, мг	Препарат	АОА, мг
Бромелаин (вода)	3,00	ХТ-Цис	0,030
ПК (вода)	3,74	Бромелаин-Цис	0,029
ХТ(вода)	31,32	Бромелаин-ХТ	0,113
Цистеин (вода)	0,028	Бромелаин-ХТ-Цис	0,021

Были проведены микробиологические исследования, где в качестве опытной культуры был выбран *Staphylococcus aureus*, являющаяся преобладающей в микрофлоре инфицированной раневой поверхности. Было показано, что введение антимикробного агента (на примере раствора ампициллина) в хитозановый гель заданной концентрации не влияет на биологическую активность антибиотика. Полученные результаты показывают принципиальную возможность введения предлагаемые системы антибактериальных агентов с сохранением их свойств.

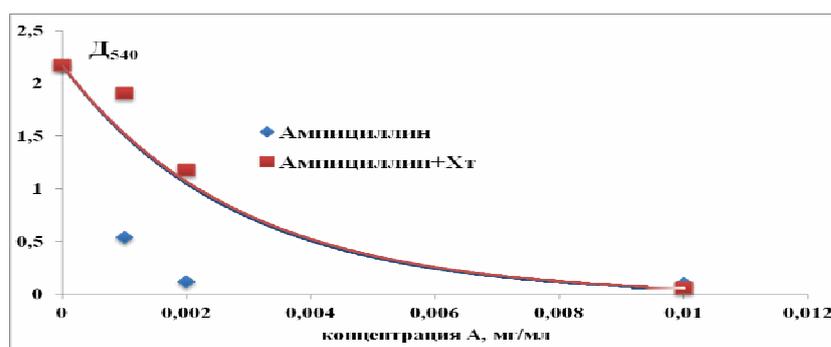


Рисунок 2. График зависимости роста *Staphylococcus aureus* (при длине волны 540 нм) от концентрации ампициллина в растворе

ЛИТЕРАТУРА

1. Мизина П.Г., Толкачев О.Н., Поляков Н.А. Совместимость компонентов лекарственной формы как показатель ее безопасности и терапевтической эффективности // Евразийский Союз Ученых (ЕСУ), Фармацевтические науки - 2014, № IV, С.91-94.
2. Белов А.А. Текстильные материалы, содержащие иммобилизованные гидролазы для медицинских и косметологических целей. Получение. Свойства. Применение. //LAP LAMBERT Acad. Pub., GmbH &Co. KG, Germany, 2012 г., 242 с.
3. C. Dunnill, T. Patton, J. Brennan [et al.] Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process // International Wound Journal. – Vol.12. - №6. - 2015. – pp.1-8.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (Гос. контракт № 14.N08.11.0113 от 30.09.2016)

Скрининговые методы исследования в радиационной безопасности мегаполиса

В.В. Зайцев, ²О.А. Ручьева

¹Московский гуманитарно экономический институт ²
Костромской СХИ

mosconfere@rambler.ru

Аннотация Разработка критериев определения первоочередности радиоэкологического обследования общественных и жилых зданий города Москвы является важным звеном в оценке индивидуальных эффективных доз, а в конечном итоге – в процессе оптимизации радиационной защиты населения.

Основное содержание

Развитие атомной промышленности и атомной энергетики сопровождалось научно-обоснованными концептуальными подходами, направленными на обеспечение радиационной безопасности персонала и населённых пунктов, где проживал обслуживающий персонал. Это позволило получить достаточно полную информацию о дозах облучения, сравнительные характеристики заболеваемости и рисков возникновения стохастических эффектов при малых дозах облучения (до 1 мЗв в год по данным Научного комитета ООН по действию атомной радиации – НКДАР). В последние годы исследуются эффекты влияния на население как природного, так и техногенного излучения. При этом учитываются как индивидуальные, так и коллективные дозы ионизирующего облучения значительных по численности групп людей с учётом длительности воздействия.

Однако усреднённая глобальная радиационная нагрузка не может быть применена к каждому индивидууму, поскольку нагрузка от каждого источника излучения имеет широкое индивидуальное распределение. Вследствие этого в каждом регионе эффективные дозы, получаемые населением, сочетаются в различных комбинациях в зависимости от концентраций радионуклидов в окружающей среде и в теле человека, широты и высоты местности и многих других факторов.

Так в условиях городской застройки значительную роль играет архитектурно-планировочное решение территории, используемые строительные материалы и количество организаций, использующих в своих технологических процессах источники ионизирующего излучения. Строительная конструкция зданий, их планировка и используемые системы вентиляции практически определяют содержание газа радона и его продуктов распада в помещениях. На продукты питания и питьевого водоснабжения основное влияние оказывают радионуклиды, содержащиеся в воздухе.

В Москве на протяжении многих лет функционирует система экологического мониторинга, способная получать необходимую информацию о формировании дозовых нагрузок у населения города. Кроме того, в мониторинг включено слежение за дозами облучения от медицинских исследований и процедур облучения населения от природного газа радона и дочерних продуктов распада в помещениях. На этой основе создана база данных о содержании радионуклидов в компонентах окружающей среды.

Выполненные расчёты по интегральной поглощённой дозе за год показывают, что индивидуальная эффективная доза за год составляет примерно 3,7 мЗв. Может быть отмечено значительное отличие вклада в интегральную дозу альфа-излучения по районам города Москвы.

В качестве модели введения альфа-излучателей в биологическую модель смеси лецитина (5 %) с водой было принято обычное уравнение для поглощённой дозы:

$$X_i D = \frac{\text{ЭРОА}_{(Rn+Tn)} \times T \times V \times 10^{-3} \times 6 \times 10^6 \times 1,6 \times 10^{-19}}{m}, \text{ где:}$$

X_i – ненаблюдаемая случайная величина (равна 1);

D – поглощенная доза, Гр;

$\text{ЭРОА}_{(Rn+Tn)}$ – эквивалентная равновесная объемная активность радона и торона в воздухе, Бк \times м³;

T – время барботации, сек;

V – объем радон-содержащей смеси, пропускаемый за время T , л;

6×10^{-6} – энергия излучения альфа-частиц, эВ;

m – вес пробы лецитина, кг;

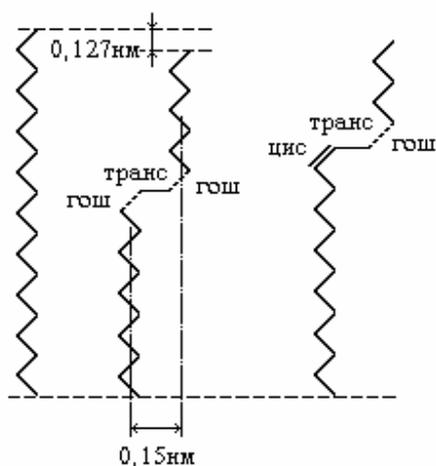
$1,6 \times 10^{-19}$ – коэффициент, учитывающий систему единиц.

Регистрация эффекта взаимодействия альфа излучения с биологическими молекулами осуществлялась методом поляризационной микроскопии, в основе которой находится целевой эксперимент с контролируемым значением энергии взаимодействия биокolloида с подложкой:

$$W_{s, \alpha} = [(\gamma_{s, p})^{0,5} - (\gamma_{\alpha, p})^{0,5}]^2 + [(\gamma_{s, d})^{0,5} - (\gamma_{\alpha, d})^{0,5}]^2,$$

где $\gamma_{s, p}$, $\gamma_{s, d}$ – вклады поляризационного и дисперсионного взаимодействий в поверхностное натяжение подложки. Являясь слабыми по сравнению с водородными связями эти вклады в Ван-дер-Ваальсовом взаимодействии имеют различные зависимости от расстояния и аргументом можно было ожидать в эксперименте различие во влиянии этих типов взаимодействий на ориентацию в биологическом коллоиде.

Под воздействием альфа излучения, наряду со структурными перестройками типа гель — жидкий кристалл, когда при переходе двух соседних трансконфигураций в гош-конформацию, образуется складка или кинк (пример такой перестройки представлен на схеме), могут быть зарегистрированы перестройки типа чисто механических в молекулах "без связи" катенантного типа, чтобы изменить характер регистрируемых текстур.



С диагностической точки зрения поверхностная энергия зависит от концентрации фосфолипидов и продуктов СПОЛ. Записав уравнение Гиббса для адсорбированного вещества (первого слоя амфифильных молекул в ячейке) Γ_2^1

$$\Gamma_2^1 = - (C / RT) \cdot (\partial\gamma / \partial C),$$

где C - концентрация адсорбированного вещества; RT - температура и универсальная газовая постоянная; γ - поверхностное натяжение, можно получить уравнение Шишковского для γ

$$\gamma = \gamma_0 + RT \cdot \Gamma_s \cdot \ln(1 + kC)$$

прямо связывающее количество адсорбированного вещества с его концентрацией и, следовательно, с составом смеси. При этом на фазовой границе образуется адсорбированный слой вещества. Совместное действие уравнений и анализируется методом поляризационной микроскопии.

Эксперимент

Работа установки позволяла регулировать вводимую дозу в соответствии с математической моделью.

Типичные псевдоизотропные текстуры с масляными бороздками лиотропных жидких кристаллов, ламеллярной фазы, описаны Брауном [1].

(Glenn H. Brown. Liquid Crystals and Biological Structures .NewYorkAcademypress 1979.- 198p).

Было установлено, что для поляризационной микроскопии лучший эффект дают подложки с соотношением поляризационного и дисперсионного вкладов в энергию поверхности 1:10. Для действия на молекулярную систему ионизирующего излучения были установлены маркёры в виде клеточно - везикулярных текстур, что подтверждает ведущую роль механизма СПОЛ и позволяет рекомендовать предложенный метод в качестве скрининга ионизирующего излучения. Смещение точки Крафта в биофизических исследованиях подтверждает данные поляризационной микроскопии.

Систематизация текстур позволила установить маркёры порога прямых столкновений. Пример таких текстур приведен на рисунке 1.



Рисунок 1 - Воздействие радона (альфа излучения) на смесь воды с лецитином:ЭРОА радона 30 Бк/м^3 , время экспозиции 2 часа - биологическая молекулярная система - 5 % лецитина в воде;

Заключение

В проведённых исследованиях установлены возможные типы маркёров взаимодействия альфа- и гамма излучений с модельными молекулярными

биологическими системами. Показано, что большое сечение взаимодействия альфа частиц с молекулами лецитина снижает величину поровых значений радиации альфа излучения. Полученные в скрининговом режиме результаты могут быть рекомендованы для опытно конструкторских работ по созданию интегрального радиометра альфа излучения.

Список печатных работ

1. Glenn H. Brown. Liquid Crystals and Biological Structures NewYorkAcademypress 1979.- 198p).

Зависимость деформационно-прочностных свойств смесей полиэтилена низкой плотности с натуральным каучуком от их состава.



И. А. Варьян^{1,2}, Н.Н.Колесникова¹, Е.Е.Масталыгина^{1,2}, С.А. Азизова³, А.А. Попов^{1,2}, Mariano Pracella⁴

¹ФГБУ Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля
Российской Академии наук, Москва, E-mail:

elena.mastalygina@gmail.com

²ФГБОУ ВО Российский экономический университет им. Г. В.
Плеханова, Москва, E-mail: ivetta.varyan@yandex.ru

³ФГБОУ ВО "Московский технологический университет", Москва

⁴Universita di Pisa, Department of Civil and Industrial Engineering,
Pisa, Italy

Полимерные материалы широко используются практически во всех областях науки и техники, в промышленности, строительстве, сельском хозяйстве и т.д.

В настоящее время до 90 % пластмассы, когда-либо произведенной в мире, до сих пор существует; из них 60-70 % твердых бытовых отходов – пластиковая упаковка. Значительная часть использованной тары и упаковки перерабатывается на мусоросжигательных заводах, что ведет к загрязнению воздуха мелкодисперсной пылью, оксидами серы и азота, фуранами и диоксинами. Радикальным решением проблемы полимерного мусора, по мнению ряда специалистов, является создание полимеров, способных при соответствующих условиях подвергаться биодegradации (биодegradация – свойство материалов или веществ изменять структуру или качество под влиянием биологических объектов) с образованием безвредных для живой и неживой природы веществ.

Сочетание синтетического полимера, характеризующегося относительной стойкостью к действиям различных факторов окружающей среды, и природного, наделенного способностью разлагаться под воздействием микроорганизмов почвы, придает материалу комплекс свойств, присущих обоим видам полимеров.

Лидирующее место среди индустриально выпускаемых крупнотоннажных полимеров принадлежит полиолефинам, и в первую очередь это полиэтилен и сополимеры на его основе, естественное разложение которых длится многие десятилетия. Следовательно, возникает необходимость модификации полимерной матрицы таким образом, чтобы по истечению срока эксплуатации полимерного изделия была возможна его ускоренная утилизация под воздействием микробиоты.

Одним из приоритетных путей решения задачи экологического характера является создание смесевых композиций на основе полиэтилена, в объем которого включен природный компонент, способный подвергаться биоразрушению.

Однако, как правило, смешение двух полимеров не приводит к простому сложению их свойств. Свойства многокомпонентных материалов очень сложно зависят от состава и условий их получения.

Полимеры в большинстве случаев несовместимы друг с другом из-за отсутствия каких-либо специфических взаимодействий между компонентами, различиями в их структуре, вязкости и полярности. Это означает, что полученные смеси являются

гетерогенными системами с развитой межфазной поверхностью. Из-за отсутствия адгезионного взаимодействия и различия в полярности двух фаз возникает межфазное натяжение, приводящее к разделению фаз.

Это относится и к смесям полиолефинов с каучуками. Смешение полиолефинов с каучуками приводит к образованию двухфазной системы, т.е. дисперсии одного полимера в матрице другого [1]. Известно, что чем больше различие в вязкости и высокоэластичности компонентов, тем сильнее влияние состава смеси на ее дисперсность [2]. Если вязкость и высокоэластичность компонента, количество которого недостаточно, значительно больше, чем основного компонента, то образуется грубодисперсная композиция; если, наоборот, меньший компонент хорошо распределяется в системе. Если вязкости компонентов близки, образуется высокодисперсная смесь независимо от того, какой компонент является дисперсной фазой, какой – дисперсионной средой.

Дисперсность, морфология и адгезия между фазами, в значительной мере зависящие от межфазных энергий, играют важную роль в формировании механических свойств двухфазных смесей полимеров [3,4].

В области больших деформаций наиболее важными свойствами полимерных смесей являются прочность и удлинение при разрыве. Эти свойства пластиков можно значительно изменять с помощью модификации, приводящей к возрастанию диссипации энергии в процессе деформации. Степень изменения зависит от концентрации каучука, размера частиц и их внутренней морфологии, адгезии между частицами и матрицей, полярностей фаз.

Для каждого типа материала существует свой оптимальный размер частиц для получения максимального упрочнения. Прочность значительно снижается, если средний диаметр частиц уменьшается ниже критического значения. Если размер частиц возрастает выше оптимального диаметра, то наблюдается более медленное падение сопротивления разрушению.

Если адгезия между каучуком и матрицей недостаточно сильная, тогда на поверхности раздела фаз образуется полость, которая обычно служит началом трещины. После того как трещина образуется, она будет распространяться от одной частицы каучука к следующей, не встречая своему продвижению какого-либо значительного сопротивления, так как частицы слабо скреплены с матрицей на пути движения трещины [5].

В настоящей работе в качестве добавки к полиэтилену низкой прочности использовали натуральный каучук – продукт растительного происхождения, достаточно быстро подвергающийся биологической деструкции в почве.

Объектами исследования являлись плёночные образцы на основе полиэтилена низкой плотности (ПЭНП) (марка 15803-020, ОАО «НефтеХимСэфилен», Казань) и натурального каучука (НК, марка SVR 3L, Вьетнам). Компаундирование полимеров осуществлялось на смесителе при температуре 140°C типа Брабендер (ИХФ РАН, Россия). Пленочные образцы получали прессованием при 140°C с последующим быстрым охлаждением до температуры 20±2°C. Были определены прочностные характеристики смесей ПЭ/НК составов 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 60/40 и 50/50 (масс.%).

Механические свойства композиций исследовали с использованием разрывной машины Devotrans model GPUG. Принцип ее работы состоит в растяжении пленочного образца, нижний конец которого через зажим связан с силоизмерителем. Верхний конец образца (закрепленный в зажиме) смещается вверх с постоянной скоростью (скорость растяжения составляла 100 мм/мин), ограниченной стандартом испытаний. Образец деформируется, и усилие, развиваемое при деформации, измеряется силоизмерителем.

Образцы вырезались из заранее приготовленных пленок. Их размеры 10×60 мм, толщина составляла 0,2 ± 0,07 мм, при этом длина рабочего участка образца составляла 40 мм. Причем образцы вырезались таким образом, чтобы они не имели заусенцев по краям и дефектов на поверхности.

Для каждой смеси исследовалось по 3 образца. На рисунках 1 и 2 приведены зависимости относительного удлинения и прочности при разрыве от содержания НК в смеси.

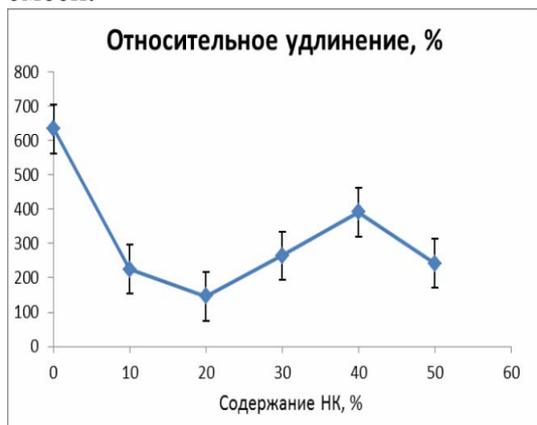


Рисунок 1. Зависимость относительного удлинения образцов ПЭ и ПЭ/НК от содержания НК в смеси.

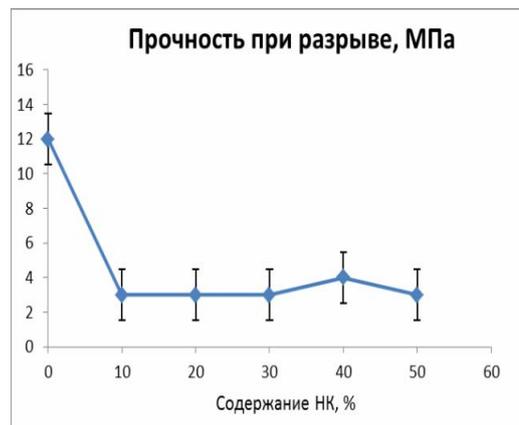


Рисунок 2. Зависимость прочности при разрыве образцов ПЭ и ПЭ/НК от содержания НК в смеси.

Как видно из приведенных результатов, при добавлении НК к полиэтилену наблюдается уменьшение относительного удлинения и прочности при разрыве смесей по сравнению с ПЭ без добавок НК. Причем, снижение значения параметров практически не зависит от количества НК в смеси. По-видимому, при выбранных условиях смешение компонентов смесей приводит к образованию довольно крупных агрегатов частиц каучука и грубодисперсным композициям. Тем не менее, показатели механических свойств композиций приемлемы для использования их в виде пленочных материалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полимерные смеси. Под редакцией Д. Пола и С. Ньюмена. «Мир», М.: 1981. Т2, 453с.
2. Липатов Ю.С. Физическая химия наполненных полимеров. Изд.Химия. 1977. 304с.
3. Масталыгина Е.Е., Варьян И.А., Колесникова Н.Н., Монахова Т.В., Карпова С.Г., Попов А.А. Роль наполнителя в формировании структуры и свойств полиолефиновых композитов // Структура и динамика молекулярных систем: сб. статей. – Москва: ИФХЭ РАН, 2016. – Вып. XXIII. – сс. 354-362.
4. Mastalygina E.E., Varyan I.A., Kolesnikova N.N., Popov A.A. Structural changes in the low-density polyethylene/natural rubber composites in the aqueous and soil media // AIP Conference Proceeding, 2016. – V. 1736, № 020097. – P. 1-4. – DOI: 10.1063/1.4949672.
5. Ванкревелен Д.В. Свойства и химическое строение полимеров // Под ред. А.Я. Малкина. М.: «Химия», 1976. – 414 с.

Water absorption capacity of biocomposites based on ethylene-octene copolymer (EOC) and wood flour in dependence to filler content

Zykova A.K.^{1,2}, Pantyukhov P.V.^{1,2}, Kolesnikova N.N.², Popov A.A.^{2,1}, C.C. Ramos³.

¹*Plekhanov Russian University of Economics, Russia, Moscow, 113054, Stremmyanny per., 36. E-mail: zykovaak@yandex.ru, pantyukhov@mail.ru*

²*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Russia, Moscow, 119334, Kosygyina st., 4.*

³*Laboratorio de materiales Industriales (LAMI), National University of Costa Rica, Heredia, 40101 Costa Rica.*

Polyolefin elastomers is a group of materials, which combine the properties of semicrystalline polyolefins and amorphous elastomers.

In current work the water absorption of ethylene-octene copolymer - wood flour biocomposites are considered in dependence to filler content. It is known, that water absorption capacity has an influence on biodegradation of biocomposites.

Diffent trademarks of ethylene-octene copolymer (Lucene 760, Lucene 670, Lucene 370) manufactured by LG Chem (South Korea) were used as polymer matrices. Wood flour produced according with GOST 16361-87 was chosen as a filler. The fraction of filler was 0-200 μm .

The mixing of polymers with fillers were made in ratios 30, 40,50, 60,70% wt. of EOC and 70, 60, 50, 40, 30% wt. of the filler. All composites were prepared by heating rolls UBL-617BL (China) at a temperature 160°C. The films were obtained by manual hydraulic press VNIR PRG1-10 (Russia) at temperature 140°C with following quick water cooling.

To investigate water absorption capacity, the samples of composites were put into test tubes and were aged at temperature 30°C. The experiment was carried out 30 days.

Addition of filler improves significantly the water absorption capacity of biocomposites from 2 % to 35% (Lucene 760), from 0% to 25% (Lucene 670), from 0% to 23% (Lucene 370).

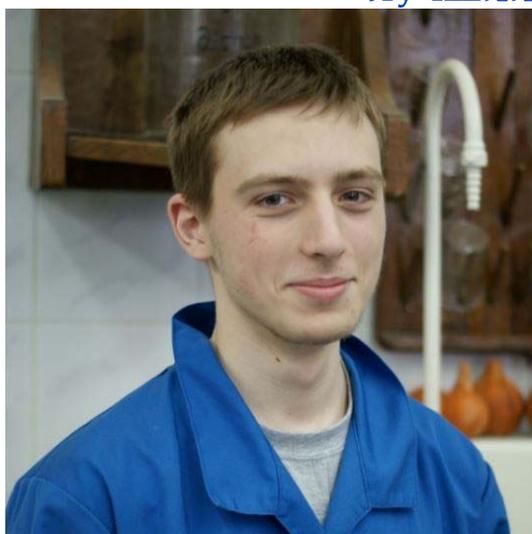
It was found, as filler content rises, the water absorption increases. It can be explained by filler swelling of wood fibers and damaged structure of composites, which led to emerged voids and cracks on the surface of biocomposites. These factors influenced on composites water penetration.



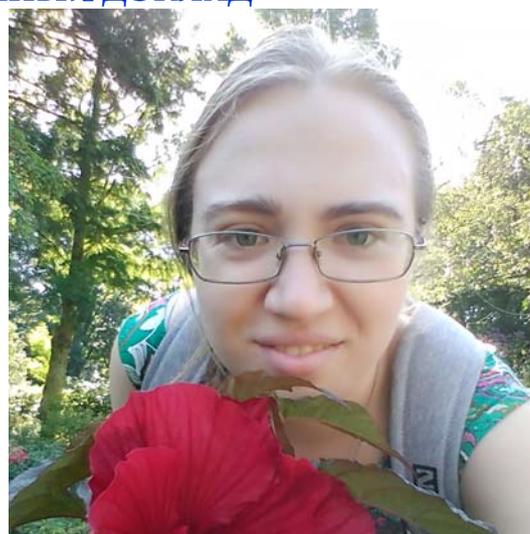
ЛАУРЕАТЫ

**XVI международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗЫ
"БИОХИМИЧЕСКАЯ ФИЗИКА"**

ЛУЧШИЙ НАУЧНЫЙ ДОКЛАД



**МИТЮРЕВ НИКОЛАЙ
АЛЕКСАНДРОВИЧ
ИБХФ
1 место**



**ГРЕХОВА АННА
КОНСТАНТИНОВНА
ИБХФ
2 место**



**ВАСИЛЬЕВА АЛЕКСАНДРА
ВЛАДИМИРОВНА
МФТИ
3 место**

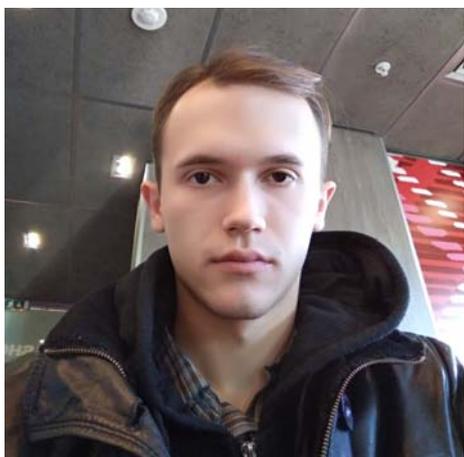


**БОГДАНОВ ВСЕВОЛОД
ВЛАДИМИРОВИЧ
ИНЭОС
4 место**

ЛУЧШИЙ СТЕНДОВЫЙ ДОКЛАД



ПУЧКОВ АЛЕКСАНДР АНАТОЛЬЕВИЧ
МГУ
1 место



КАПУСТА ДМИТРИЙ ПАВЛОВИЧ
МГУ
2 место



АКИНФИЕВ ВИКТОР СЕРГЕЕВИЧ
ИБХФ
2 место



БЕЛИКОВ НИКОЛАЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ
ИБХФ
3 место



JOANNA JUZKOW
Poznan University of Technology
Poland
3 место



ФОТОРЕПОРТАЖ



