

фона, регистрация, временная классификация). В настоящее время e-СИМБИОС применяется для обработки и анализа изображений паттернов экспрессии генов мушки дрозофилы, полученных с помощью сканирующего конфокального микроскопа.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *A. Pisarev, M. Blagov, E. Poustelnikova, E. Myasnikova, M. Samsonova.* A system for on-line processing and analysis of images of gene expression patterns (2005). *Pattern Recognition and Image Analysis: Advances in Mathematical Theory and Applications.* – Vol. 15, – №2, – P. 432–435.
2. *A. Pisarev, E. Poustelnikova.* Laboratory information management system for on-line processing and analysis of images of gene expression patterns (2006). *Proceedings of the Saint-Petersburg International Workshop on NanoBiotechnologies, November 27-29, 2006, Saint-Petersburg, Russia,* P. 97–98.
3. *A. Pisarev, E. Poustelnikova, M. Samsonova, P. Baumann.* Mooshka: a system for management of multidimensional gene expression data in situ (2003). *Information Systems.* – Vol. 28. – № 4. – P. 269–285.
4. *E. Poustelnikova, A. Pisarev, M. Blagov, M. Samsonova, J. Reinitz* (2004). A database for management of gene expression data in situ. *Bioinformatics,* 20: 2212–2221.
5. *T. Gavrilova, V. Horoshevsky.* Knowledge bases of intellectual systems (2000). – SPb.: Piter, – 2000, – 384 p.
6. *S. Russell, P. Norvig.* Artificial Intelligence: A Modern Approach (2006). Prentice Hall – 2006, – 1057 p.

УДК 539.1:[577.127.4:543.42]

Р.С. Насибуллин, Р.Р. Шарафутдинова

ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПЛЕКСА КВЕРЦЕТИН-ФОСФАТИДИЛХОЛИН

Флавоноиды являются биоактивными соединениями растительного происхождения, обладающими широким спектром активности. В настоящее время выделено и идентифицировано свыше 8000 молекул этого класса и это количество непрерывно увеличивается [1–3]. Они проявляют противомикробную, противоаллергическую, противовирусную и другие виды активности [4–6]. Они также способны нейтрализовывать гидроксильные радикалы. [7].

Исследователи отметили свыше 40 видов биологической активности флавоноидов. Тем не менее, в литературе содержится мало сведений о молекулярном механизме действия этой группы соединений на клеточные мембраны, а место их локализации является предметом дискуссии.

В предыдущих работах было показано, что сопряженные системы, какими являются и флавоноиды, образуют комплексы с клеточными фосфолипидами посредством системы π -электронов [8, 9]. Такой механизм комплексообразования дает возможность объяснить сохранение биологической активности при значительных изменениях заместителей, когда возникают стерические препятствия для сближения активных центров на расстояние, необходимое для образования водородной связи. В данной работе приводятся результаты, касающиеся комплекса, образующегося за счет взаимодействия π - системы электронов ароматических циклов 3,5,7,3',4'- пентаоксифлавонола (кверцетин) с холиновой группой клеточного фосфатидилхолина (ФХ) (рис. 1).

Материалы и методы. Исследование взаимодействия кверцетина с лецитином проводилось методами квантовой химии и ЯМР-спектроскопии на ядрах ^{13}C и ^1H .

Квантово-химические расчеты проводились многократно с целью установления структуры комплексов при начальных конфигурациях расположения центров молекул, составляющих взаимодействующую систему, по сетке с последующей оптимизацией геометрии.

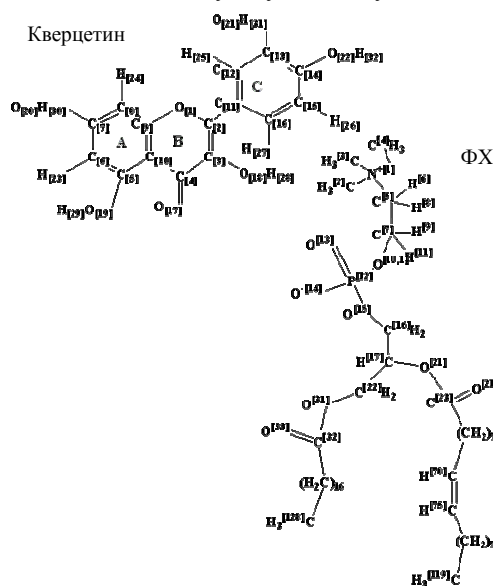


Рис. 1. Комплекс кверцетин-ФХ

Предварительные расчеты проводились методом молекулярной механики [10]. Далее структуры и электронное строение молекул уточнялись методами MNDO и AMI.

В экспериментах использовался ФХ, выделенный из куриных яиц [11], и стандартный образец кверцетина («Aldrich»). Очистку лецитина проводили методом колоночной хроматографии. Чистота контролировалась спектрами ЯМР и методами тонкослойной хроматографии. При исследовании применялись растворы с концентрацией лецитина 0,05 М, концентрация кверцетина менялась. В качестве растворителя использовался хлороформ. Спектры снимались при относительно низких концентрациях лецитина и флавоноида.

Это достигалось тем, что, несмотря на то, что малые концентрации приводят к возрастанию времени накопления сигналов, увеличение концентрации вызывает уширение линии поглощения из-за образования мицелл, что приводит к снижению точности измерения химических сдвигов (ХС). Одновременно, при повышении концентрации, уменьшается число точек связывания кверцетина, так как они оказываются внутри мицелл, что приводит к уменьшению интенсивности спектральных линий. При этом флавоноид образует цепочечные структуры через водородные связи, усложняющие анализ спектров. При принятых концентрациях плато кривой титрования не достигалось.

Значение рD среды поддерживалось равным 7,1, которое контролировалось прибором ОР-156/3. Точность измерений равна 0,01. При указанном значении рD зависимость ХС спектра ЯМР ^{13}C является наиболее слабой [12].

При взаимодействии кверцетина с ФХ образуются несколько разновидностей комплексов, в том числе формирующиеся посредством водородных связей. Поэтому спектры снимались в условиях, когда концентрация кверцетина превышала концентрацию ФХ и достигала 0,08 М. Повышение концентрации лецитина относительно флавоноида не оказывало существенного влияния на значение ХС.

Спектры ЯМР ^{13}C кверцетина, ФХ и их смесей записывались при температуре 30 °С на спектрометре AM-300 ("Bruker" ФРГ) с рабочей частотой на ядрах ^{13}C – 75 МГц. Температура исследуемых образцов поддерживалась с точностью 0,2 °С. Спектры ^{13}C регистрировались с помощью стандартных методик, имеющихся в спектрометре AM-300.

Длительность импульса составляла 45°, задержка между ними – 1,5 с. Число накопленных доводилось до 15 000. Такое количество накоплений обеспечивало соотношение сигнал/шум не меньше 10. Накопление проводилось на 64–128 к точек с шириной развертки 100–150 м.д.

В этих условиях при ширине развертки 100 м.д. на 128 к точек и времени выборки 8,65 с получается цифровое разрешение 0,06 Гц, при котором значение ХС определяется с

точностью до 0,001 м.д. На основании усреднения, полученного по нескольким измерениям ХС, можно сделать вывод о том, что достигнутая точность не менее 0,05 м.д.

Для проверки конформационного состояния кверцетина использовали метод Оверхаузера. Эксперименты по данному эффекту проводились на том же спектрометре, методом разностных спектров, когда суммирование нескольких прохождений происходит в условиях насыщения некоторого сигнала и того числа прохождений без насыщения. Для улучшения соотношения сигнал/шум и исключения систематических погрешностей, связанных с изменением температуры образца и возможной фазовой нестабильности, мы проводили по 24 накопления и этот процесс повторяли 32 раза. Время релаксации выбиралось в интервале $T_1 = 1-2$ с. Для декаплера использовался 90° импульс.

Результаты и обсуждение. Получены расчетные значения энергий комплексообразования за счет формирования π -связи полярной головки ФХ с кольцами А, В и С кверцетина. Они показали, что максимальная энергия комплексообразования при связи лецитина с кольцом С кверцетина равна 28 кДж/моль. Необходимо заметить, что рассматриваемые энергии получаются как малая разность больших величин и определяются со значительной погрешностью. Представленные данные носят качественный характер, однако такое соотношение величин энергий сохраняется при расчетах и другими полуэмпирическими методами.

Формирование комплексов лецитина с кольцом С молекулы кверцетина сопровождается изменением ХС от ядер ^{13}C кольца С. При образовании комплекса с участием π -системы электронов ХС углеродов ароматического цикла сближаются [13, 14].

В данном случае при введении ФХ в 0,08 М растворы кверцетина ХС у $\text{C}_{[16]}$ уменьшается на 0,24, а у $\text{C}_{[15]}$ увеличивается на 0,116 м.д. При образовании комплексов возникает изменение ХС и от углеродов холиновой группы ФХ. ХС от $\text{C}^{[1]}$, $\text{C}^{[2]}$, $\text{C}^{[3]}$, равный 53,23 м.д., у свободного лецитина смещается в слабое поле при формировании комплекса с кверцетином на 1,585 м.д. Одновременно наблюдается изменение ХС от $\text{C}^{[7]}$, примыкающего к фосфатной группе лецитина, в сторону сильного поля на $\sim 2,0$ м.д.

Полученные величины изменений ХС качественно согласуются с рассчитанными значениями изменения электронной плотности, если учитывается одновременно взаимодействие π -системы электронов кверцетина с холиновой и фосфатной группами лецитина.

Во взаимодействующей системе «кверцетин – лецитин» возникает значительное число комплексов, между которыми происходит быстрый обмен по шкале времени ЯМР. Поэтому метод ЯМР, при указанной температуре регистрирует усредненные величины ХС.

Расчеты показали, что рассмотренные комплексы формируются за счет кулоновского взаимодействия, которое характеризуется перераспределением части заряда между компонентами комплекса. Расстояние между центром ароматического кольца кверцетина и атомом азота лецитина составляет около 5 Å. Отметим, что при использовании метода MNDO для расчетов подобных комплексов происходит систематическое завышение длины связей [13].

Результаты квантово-химических расчетов изменения заряда, полученные для комплекса кверцетина с ФХ, а также спектры ЯМР на ядрах ^{13}C позволяют предположить, что для исследованной группы молекул наиболее вероятными являются взаимодействия с π -системой электронов цикла с одновременным формированием водородной связи –ОН группы кольца А с фосфатной группой ФХ. Такой комплекс является достаточно прочным и блокирует активные центры ФХ.

Расчеты также показывают, что при формировании комплексов происходит деформация плоскости кверцетина. Она определяется поворотом кольца С вокруг одиночной связи $\text{C}_{[2]}-\text{C}_{[11]}$, при котором средние значения двугранных углов $\text{O}_{[1]}-\text{C}_{[2]}-\text{C}_{[11]}-\text{C}_{[16]}$ и $\text{C}_{[3]}-\text{C}_{[2]}-\text{C}_{[11]}-\text{C}_{[12]}$ изменяются на 33° .

Конформационные изменения состояний кверцетина, сопровождающие комплексообразование, определялись по эффекту Оверхаузера. Они показали, что при облучении $H_{[25]}$ или $H_{[27]}$ раствора кверцетина интегральная интенсивность спектральной линии протона $H_{[28]}$ возрастает примерно на 2,8 и 3,2 %, соответственно, с погрешностью 0,2 %. Подобное изменение интенсивности сигнала показывает сближение атомов водорода за счет вращения кольца С вокруг связи $C_{[2]}-C_{[11]}$. При введении в раствор лецитина образуется комплекс цикла С и холиновой группы ФХ, вызывающий торможение этого вращения. При этом в спектрах от протонов $H_{[25]}$ и $H_{[27]}$ возрастание интенсивности сигналов при облучении протона $H_{[28]}$ и наоборот не наблюдается. Исчезновение влияния облучения $H_{[25]}$ или $H_{[27]}$ и наоборот в комплексе качественно подтверждают поворот кольца С относительно плоскости флавоноида вокруг связи $C_{[2]}-C_{[11]}$.

Как следует из того же эффекта, при облучении атома $H_{[29]}$ интенсивность сигналов от ядер $H_{[25]}$, $H_{[27]}$ свободного кверцетина меняется приблизительно одинаково, хотя эти атомы расположены на расстояниях, отличающихся в 1,7 раза, что свидетельствует о достаточно быстром вращении кольца С вокруг связи $C_{[2]}-C_{[11]}$.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Kahl.R., H.Sies*, Protective and Adverse Biological Actions of Phenolic Antioxidants (London, 1991), pp. 245-273.
2. *S.A. van Acker, D.J. van den Berg, M.N. Tromp, D.H. Griffioen, .W.P. van Bennekom, W.J. van der Vijgh, and A. Bast*, Free Radic. Biol. Med. 20(3), 331 (1996).
3. *C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, and G. Paganga*, Free Radic. Biol. Med. 20, 933 (1996).
4. *R.T. Davies, I. Moodley*, Pharmacol. Then, 17(3), 279 (1982).
5. *Middleton E. Jr. And Kandaswami, C.* The Impact of Plant Flavonoids on Mammalian Biology: Implications for Immunity, Inflammation and Cancer (London, 1993), pp. 619-652.
6. *F.V. So, N.Guthrie, A.F. Chambers, M. Moussa, and K.K. Carroll*, Nutr. Cancer 26, 167 (1996).
7. *P.G. Pietta*, J. Nat. Prod. 63, 1035 (2000).
8. *Р.С. Насибуллин, Л.В. Спирихин, В.А. Пономарева*, Биофизика, 36(4), 594. 1991.
9. *Р.С. Насибуллин, Т.И. Никитина, Ю.Г. Афанасьева, Т.Р. Насибуллин, Л.В. Спирихин*, Хим.-фарм. Журнал. 36(9), 33. – 2002.
10. *M.P. Allen, D.J. Tidesley*, Computer simulation of loquids, (Clarendon Press, Oxford, 1987).
11. *R.M.C. Dawson*, Biochim, 88(3), 414(1993).
12. *E. Breitmaier, K.H. Spohn*, Tetrahedron, 29(8), 1145 (1973).
13. *R.S. Nasibullin, D.I. Kosareva, L.V. Spirichin*, Biophysics, 5, 761 (2002).
14. *А.В. Иогансен*, Водородная связь. – М., Наука, 1981.

УДК 622

В.В. Поляков, И.Б. Старченко, Г.Ю. Джуплина

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОТЕХНОЛОГИЙ В БИМЕДИЦИНСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Одним из приоритетов технологического развития лидирующих мировых держав в XXI веке является нанотехнология, которая открывает новые возможности для эффективного развития медицины.

Одной из важных составляющих приоритетных исследований в области нанотехнологии и нанонауки является развитие биомедицинского направления, включающего как создание новых лекарственных препаратов и устройств мониторинга, так и применение но-