

**Государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
Тверская государственная медицинская академия Министерства  
здравоохранения России  
(ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава России)**

*На правах рукописи*

**Бутавин Никита Юрьевич**

**ВЛИЯНИЕ ЭНДО- И ЭКЗОГЕННЫХ ФАКТОРОВ НА  
ИНФРАКРАСНЫЙ СПЕКТР СЫВОРОТКИ КРОВИ  
ПОДРОСТКОВ**

03.01.04 - биохимия

**Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор Зубарева Г.М.

Тверь, 2014

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Содержание:

<b>Список сокращений</b>	5
<b>Введение</b>	6
<b>I.Обзор литературы</b>	11
1. Особенности структурной организации воды	11
2. Влияние веществ разной природы, полярности и концентрации на организацию молекул воды	15
3. Аминокислоты и водная основа их растворов	20
4. Инфракрасная спектроскопия биологических жидкостей	26
5. Аминокислоты: метаболизм и функции	33
<b>II.Экспериментальная часть</b>	40
2. Материалы и методы	40
2.1. Материалы исследования	40
2.2. Методы исследования	41
2.2.1. ИК-спектрометрия с помощью аппаратно-программного комплекса «ИКАР»	41
2.2.2. Способ исследования воды и водосодержащих систем на АПК «ИКАР»	45
2.2.3. ИК - спектрометрия с Фурье преобразованием	46
2.2.4. Способ исследования крови на ИК-спектрометре с Фурье преобразованием.	47

2.2.5. Многомерный анализ результатов ИК-спектрометрии и определение критериев Махаланобиса и Бартлетта	48
2.2.6. Построение объемных образов	50
2.2.7. Статистическая обработка результатов исследований	52
<b>III. Результаты и их обсуждение</b>	<b>54</b>
3. ИК-спектрометрия с Фурье преобразованием	54
3.1 Фурье ИК- спектроскопия сыворотки крови здоровых подростков и с задержкой психического развития	54
3.2 Фурье ИК - спектроскопия модельной биологической системы, содержащей пептидный препарат	58
4. Анализ показателей целостного состояния биологических систем.	62
4.1. Широкополосная инфракрасная спектрометрия сыворотки крови здоровых подростков (контрольная группа)	62
4.2. Анализ влияния медикаментозной терапии на показатели пропускания ИК-спектра сыворотки крови детей с задержкой психического развития	63
5. Инфракрасная спектроскопия модельных растворов.	66
5.1 Фурье ИК-спектроскопия модельных систем, содержащих нейтральные аминокислоты и их смесь	66
5.1.1. Влияние малых количеств нейтральных аминокислот на дисперсии показателей пропускания ИК-излучения	67
5.1.2 Непараметрический анализ целостного состояния водных модельных систем нейтральных аминокислот	75
5.2 Фурье ИК-спектроскопия модельных систем, содержащих кислые аминокислоты и их смесь	81

5.2.1	Эффекты влияния малых количеств кислых аминокислот на дисперсию показателей пропускания ИК-излучения	83
5.2.2	Анализ целостного состояния водных модельных систем кислых аминокислот непараметрическими методами	90
5.3	Фурье ИК-спектроскопия модельной системы, содержащей основную аминокислоту	94
5.3.1	Особенности влияния малых количеств основной аминокислоты на дисперсии показателей пропускания ИК-излучения	95
5.3.2	Изменения параметров целостного состояния водной модельной системы основной аминокислоты	96
5.4	Фурье ИК-спектроскопия водных модельных растворов сверхмалых количеств пептидного препарата	100
5.4.1	Дисперсии показателей пропускания ИК-излучения тонких слоев растворов с малым количеством биологически активного вещества «Кортексин»	104
5.4.2	Изменение параметров целостного состояния водной модельной системы в присутствии препарата «Кортексин»	107
5.5	Анализ изменения дисперсий показателей пропускания ИК-излучения тонких слоев модельных растворов биологической жидкости (сыворотки крови), содержащей пептидный препарат	112
5.6	Диаграмма рассеяния в анализе целостного состояния модельных систем	115
	<b>Выводы</b>	120
	<b>Список использованных источников</b>	121

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

### Список сокращений

Ала – аланин

Арг – аргинин

Асп – аспарагиновая кислота

Вал – валин

Гис – гистидин

Гли – глицин

Глу – глутаминовая кислота

ГЭБ – гемато-энцефалический барьер

ИК – инфракрасный

ИКС – инфракрасная спектроскопия

Лей – лейцин

Лиз – лизин

Мет – метионин

П.П. – показатели пропускания

Сер – серин

Тир – тирозин

Тре – треанин

Трип – триптофан

Фен – фенилаланин

## Введение

В последнее время особую тревогу вызывает качественное ухудшение состояния здоровья молодого поколения. По данным Научного центра охраны здоровья детей и подростков РАМН, 50% подростков имеют функциональные отклонения, 35-40% хронические заболевания, только 10% детей считаются здоровыми. При этом каждый четвертый подросток имеет пограничные психические отклонения, что связано с чрезмерной умственной нагрузкой, социальными условиями и врожденными патологиями. Это усиливает неоднородность состава учащихся общеобразовательной школы. Как показывают исследования, среди неуспевающих учащихся примерно 50% - подростки с задержкой психического развития [Семаго Н. Я., 2000; Шевченко С.Г., 2001; Калашникова М.Б., 2008; Оки J., 2001]. Диагностика данной патологии на ранней стадии крайне сложна и осуществляется в настоящее время преимущественно в психолого-педагогическом плане. В связи с чем актуальным является изучение вопросов биохимических нарушений при психических заболеваниях, что позволит найти новые пути точной диагностики и определять возможность для решения теоретических и практических проблем детского здоровья.

Известно, что изменения метаболических процессов и соответствующие им изменения биологических жидкостей происходит на молекулярном уровне задолго до клинических проявлений заболевания, как под воздействием эндо- (возникновение патологии), так и экзогенных факторов (воздействие лекарственных препаратов, озонотерапия, физиолечение) [[Зубарева Г.М. 1995-2014, Бордина Г.Е.,2001; Мкрян Н.Г. и соавт., 2007; Mustafa A., 2012].

В настоящее время достоверно установлена роль липидного компонента в метаболизме клетки и всего организма в целом. Выявлена взаимосвязь между их изменением и развитием патологического процесса [Каргаполов А.В., 1978-2008; Грибанов Г.А., 1985; Слюсарь Н.Н., 1987-2000; Jahan-Milan A. et al., 2011; Nishikata N. et al., 2011]. Однако, для биологических систем характерно сочетание процессов синтеза и распада. В связи с этим актуально изучение действия аминокислот на

данные процессы, так как аминокислоты проявляют многообразие биологических эффектов, что связано с их строением, физико-химическими свойствами и способностью изменять рН водной среды. Это напрямую влияет на структурное состояние и физико-химические свойства воды [Аксенов С.И.,1977; Вербалович В.П.,1977; Кочнев И.Н.,2002; Коновалов А.И.,2002-2014; Zwier T.S., 2004].

В литературе есть многочисленные данные о воздействии на биологическую систему через ее водный компонент, причем эффект воздействия экзогенного фактора в микродозе сопоставим или превышает таковой для макродоз [Бурлакова Е.Б.,1999 - 2014; Коновалов А.И.,2002-2014; Пальмина Н.П.,1994-2014; Matera L. 2004].

Одним из способов, позволяющих изучить изменения в системе является физико-химический метод - инфракрасная спектроскопия (ИКС).

Наиболее перспективным для исследования этих эффектов является использование АПК «ИКАР», разработанного под руководством профессора А.В. Каргаполова (патент на изобретение №2137126 от 10.09.1999) работающего в широких диапазонах. Комплекс позволяет изучать биологические жидкости по характеру изменения коэффициентов пропускания ИК- излучения.

Специфика изменения ИК-спектра может быть ценным источником информации о действии лекарственного вещества «Кортексин», состоящего из смеси аминокислот и коротких пептидов, в качестве экзогенного фактора, и функционального состояния организма детей с задержкой психического развития, в качестве эндогенного.

Настоящая работа является частью научного исследования, проводимого в Тверской государственной медицинской академии «Технологи исследования гидратированных макромолекул и биологических жидкостей методом ИК-спектроскопии», регистрационный № 01201262726.

## **Цель работы**

Исследовать особенности ИК – спектра сыворотки крови подростков при воздействии эндо- и экзогенных факторов.

## **Задачи исследования**

В связи с этим в работе были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ спектральных характеристик сыворотки крови подростков с задержкой психического развития с группой здоровых детей методом Фурье ИК-спектроскопии;
2. Выявить особенности изменения водной основы сыворотки крови подростков в норме, при патологии и после лечения;
3. Изучить особенности показателей инфракрасного спектра модельных растворов аминокислот разной химической природы в диапазоне малых и сверхмалых концентраций.
4. Установить влияние биологически активного вещества (лекарственный препарат «Кортексин»), содержащего смесь аминокислот и пептидный компонент на биологическую жидкость и водную основу его модельных растворов в концентрации  $10^{-1}$ - $10^{-16}$  М.

## **Новизна исследования**

Впервые получен ИК-спектр сыворотки крови подростков с задержкой психического развития. Впервые установлены отличия ИК-спектра сыворотки крови здоровых и детей с задержкой психического развития в диапазонах:  $2990$ - $2950$   $\text{см}^{-1}$ ,  $2880$  –  $2860$   $\text{см}^{-1}$ ,  $3085$ - $2832$   $\text{см}^{-1}$ ,  $1067$ - $930$   $\text{см}^{-1}$  и  $1600$ – $1535$   $\text{см}^{-1}$ .

Установлено, что показатели пропускания ИК-спектра позволяют определить различие в состоянии водного компонента сыворотки крови между группой здоровых подростков и подростков, страдающих задержкой психического развития.

В работе впервые проведено изучение водной основы растворов при воздействия малых концентраций аминокислот различной химической природы и



их смеси, а также пептидного лекарственного препарата.

Впервые с помощью ИК-спектроскопии установлено, что аминокислоты, относящиеся к одной группе по кислотно-основной классификации, оказывают сходное воздействие на водный компонент их растворов, что отражается в ИК-спектре.

### **Практическая значимость**

Получен спектр сыворотки крови подростков с задержкой психического развития и выявлены характеристические полосы, позволяющие проводить раннюю и объективную диагностику данного патологического состояния.

Установлено и проведена оценка действия аминокислот различной химической природы и пептидного препарата, содержащего их смесь, на водный компонент их растворов, что может быть использовано в фундаментальных работах по изучению биологических систем.

АПК «ИКАР» позволяет быстро и эффективно контролировать действенность проводимой терапии и осуществлять мониторинг состояния детей в процессе лечения.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Зависимость изменения ИК-спектра сыворотки крови обусловлена как воздействием эндогенного фактора - наличием патологии, так и экзогенного – применением лекарственного препарата. ИКС может быть использована для контроля метаболических процессов в организме.

2. Характер воздействия отдельных аминокислот, их смесей и пептидного препарата на структурное состояние водной основы растворов зависит от химической структуры аминокислот и может быть охарактеризован при помощи показателей пропускания ИК-излучения, их дисперсии и целостных показателей многомерного анализа (расстояние Махаланобиса и критерий Бартлетта).

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности:**

полученные результаты соответствуют пунктам 10,12 паспорта специальности 03.01.04 – «биохимия».

### **Апробация материалов диссертации:**

Основные результаты и положения диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской научной школе для молодежи (Тверь, 2010); Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения - 2011» (С.-Петербург, 2011); VI Международном конгрессе «Слабые и сверхслабые поля и излучения в медицине и биологии» (С.-Петербург, 2012); V Всероссийском с международным участием медико-биологическом конгрессе молодых ученых «Симбиоз – Россия 2012» (Тверь, 2012); X Международной Крымской конференции «Космос и биосфера» (Украина, Коктебель, 2013); Международная конференция «Химия, физика, биология воды» (Болгария, София, 2013).

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ: из них 6 статьей в журналах, рекомендованных ВАК; 7 тезисов докладов на международных конгрессах и конференциях.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на 133 страницах машинописного текста. Состоит из введения, обзора литературы (глава I), методов исследования (глава II), результатов исследования и их обсуждения (глава III), выводов и библиографии, включающей 135 работ, из них 81 отечественных и 54 зарубежных авторов. Диссертация содержит 9 таблиц и 45 рисунков.

## Глава I. Обзор литературы

### 1. Особенности структурной организации воды

Вопрос о роли воды в биологических системах в последнее время является крайне актуальным, что обусловлено уникальным значением этого вещества для биосистем, в которых она составляет большую часть, а также ее аномальными свойствами, каждое из которых имеет конкретную биологическую направленность [4].

Известно, что в молекуле воды три ядра образуют равнобедренный треугольник с двумя протонами в основании и углом НОН, близким к тетраэдру ( $104^{\circ}31'$ ). Из десяти электронов молекулы воды два электрона находятся вблизи ядра кислорода, остальные же восемь движутся попарно по четырем вытянутым эллиптическим орбитам. Установлено, что оси двух орбит направлены вдоль связей О-Н, оси двух других лежат в плоскости, перпендикулярной НОН, причем угол между ними также близок к тетраэдру. Таким образом, оси четырех эллиптических орбит направлены к вершинам тетраэдра [50].

Выявлено, что электроны, движущиеся по орбитам в плоскости, перпендикулярной плоскости НОН, играют очень существенную роль во взаимодействии молекул воды. Они обуславливают более высокую электронную плотность в периферической части молекулы воды, в отличие той, в которой расположены атомы водорода (рис.1).

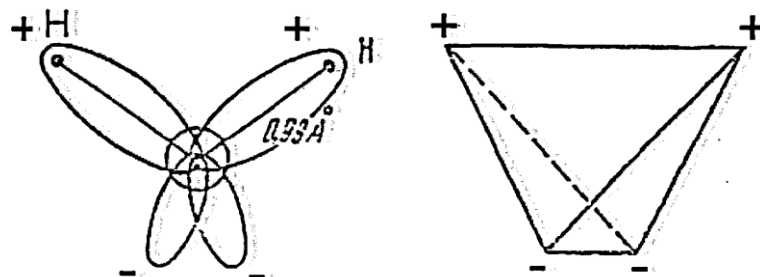


Рис.1. Схема электронных орбит молекулы воды

Электрические заряды молекулы сосредоточены в вершинах тетраэдра на расстоянии  $0,99\text{Å}$  от ядра кислорода [85]. Высокая полярность молекул воды

определяет характер и величину межмолекулярных взаимодействий, а так же ее структуру. Установлено, что молекулы воды могут иметь до 4-х водородных связей, в двух она выступает в качестве донора, а в двух других – в качестве акцептора электронов как при взаимодействии с ионами, так и с другими молекулами воды [17, 33, 52, 63, 91, 109, 132].

Предлагается несколько моделей структуры воды: кластерная (существование в воде двух микрофаз, по крайней мере, в одной из них молекулы воды связаны водородными связями), клатратная (непрерывный каркас молекул воды, соединенных Н-связями, содержащий пустоты, в котором располагаются дополнительные молекулы воды), контитуальная (непрерывный каркас из молекул, соединенных Н-связями) [15, 56, 57, 61, 68, 99, 102, 125; 130, 134]

В настоящее время самой хорошо изученной структурой воды является структура льда. Во льду каждая молекула воды связана с четырьмя соседними, образуя максимальное возможное число Н-связей. Строение молекул воды симметрично, то есть у протона не одно, а два равноправных положения и переходы протона из одного положения в другое могут рассматриваться как переориентация молекул с образованием электронных пар [86, 120].

Перемещение протонов между двумя возможными состояниями происходит по «туннелю» водородной связи, который облегчает переход по меньшей мере в 70 раз. Мигрирует не один и тот же индивидуальный протон, а лишь форма его свободного состояния, то есть протоны присоединяются к ближайшей молекуле воды в цепи упорядоченной последовательности, затем от этой молекулы отщепляется другой протон и присоединяется к последующей и так далее. Такая способность протона находится в двух возможных положениях в структуре льда, объясняет его аномально высокую подвижность во льду, которая только на порядок ниже подвижности электронов в металлах. В результате осуществляющегося транспорта протона сквозь туннели Н-связей снижаются энергетические барьеры [126, 135].

Основное отличие структуры жидкой воды и льда заключается в разрыве части связей под действием усиленных тепловых колебаний атомов решетки и, как результат этого, в более размытом их расположении, образовании дефектов, увеличении среднего координационного числа, возникновении областей с плотной упаковкой [12]. Оставшиеся связи образуют в микрообластях ассоциаты с максимальным количеством связей на молекулу, следовательно, со структурой близкой к структуре льда, обеспечивающей максимальное количество связей [27; 80]. Рентгеноструктурные исследования дают возможность представить воду как разломанную решетку льда. При температуре выше  $0^{\circ}\text{C}$  молекулы воды вследствие теплового возмущения утрачивают способность образовывать постоянную жесткую решетку, но тенденция к упорядочению сохраняется. Вода находится в состоянии, которое условно характеризуют как "квазикристаллическое"[41].

Лучше других разработанной моделью структуры воды считается теория мерцающих (короткоживущих) кластеров [68, 80], которая построена на основании данных протонного магнитного резонанса воды, согласно которым водородная связь становится частично ковалентной. Благодаря чему возникает относительно устойчивое соединение молекул воды, которые с помощью простых водородных связей образуют рои - кластеры (рис.2).

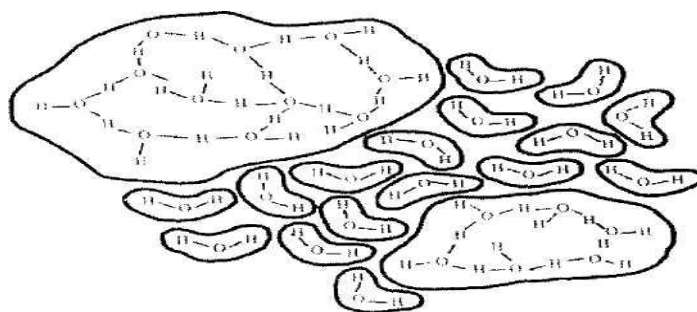


Рис. 2. Схематическое изображение связанных друг с другом молекул в кластерах (очерченные области), между которыми находятся свободные молекулы воды

В литературе существует описание ассоциатов молекул воды в виде клатратов – нейтральных и заряженных. Заряженные молекулярные структуры, с энергетической точки зрения, являются более выгодными. Они образуются на

положительно и отрицательно заряженных ионах. Процессу формирования таких водных кластеров способствуют наличие примесей в воде и ее диссоциация. Например, предложена структура однозарядного водного клатрата  $\text{H}^+(\text{H}_2\text{O})_{21}$ , которая представляет собой декаэдр, содержащий дополнительный протон в своей оболочке и молекулу, которая находится внутри клатрата [65, 125, 115, 135].

Стоит отметить, что ионы  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$ , занимают первое место по своему упорядочивающему воздействию на воду среди одновалентных ионов. Каждый из ионов  $\text{H}^+$  структурирует возле себя около 10-ти молекул воды. Ионы  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$  не локализованы в пространстве, а перемещаются посредством миграционного механизма с большой скоростью. Скорость их перемещения настолько велика, что фактически упорядочивающее действие ионов  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$  усредняется по всем молекулам воды, проявляя, таким образом, эффект дальнего действия в упорядочивании структуры [25]. Дальнее действие проявляется и в случае воздействия других ионов на воду, хотя и в значительно меньшей мере. Это связано с тем, что ионы изменяют размеры и время жизни упорядоченных кластеров [73].

С помощью различных методов: малоуглового рентгеновского рассеяния, светорассеяния водных систем, атомной силовой микроскопии, - установлено, что в воде присутствуют устойчивые структуры, размеры которых варьируются от нескольких нанометров до нескольких сот нанометров и даже микрон [105, 110].

Применение физических методов (инфракрасная спектроскопия, ядерный магнитный резонанс, термодинамические методы) для изучения воды, входящей в состав тканей, позволило сделать вывод о том, что большая часть воды в биологических системах мало отличается по своим структурным характеристикам от обычной воды [3, 64, 82, 129]. Возможно, в клетках и тканях одновременно могут существовать все расшифрованные структурные модификации воды (клатраты, кластеры и другие) [96].

Большинство исследовательских работ о «связанной» (гидратированной) воде в биосистемах посвящено экстраполяции на живые системы всего, что

известно о ней из более простых моделей. Изучение состояния воды в биологических системах позволит дать ответ на вопрос об участии воды в формировании нативной структуры биологических макромолекул, а также о возможности воздействия изменений ее структуры на ход и эффективность обменных реакций в физиологических и патологических условиях.

## **2. Влияние веществ разной природы, полярности и концентрации на организацию молекул воды**

Процессы, происходящие в воде под влиянием присутствующих веществ сложны, а их описание неоднозначно.

Самойловым О.Я. на основании молекулярно-кинетического теплового движения молекул в жидкости сформулирована теория о положительной и отрицательной гидратации. В соответствии с данной теорией, гидратация- влияние на трансляционное движение ближайших молекул воды и их обмен на молекулы растворенных веществ [67].

Свойства иона (радиус, заряд, строение электронной оболочки) определяют характер гидратации. В случае отрицательной гидратации обмен молекул воды вблизи иона происходит чаще, чем обмен молекул в воде, прочное связывание отсутствует. При положительной гидратации, наоборот, обмен ближайших к ионам молекул воды ослаблен из-за чего происходит их прочное связывание. Таким образом, отрицательная гидратация ионов вызывает значительное нарушение структуры воды, не компенсирующееся образованием связей между ними и молекулами воды [67].

Существование гидратации подтверждено радиоспектрометрическим, термодимическим и рентгенографическим и др. методами [37].

Было выявлено, что введение постороннего иона в раствор влияет на структуру воды [29, 30]. Наибольшее упорядочивающее действие среди однозарядных ионов имеют  $H^+$  и  $OH^-$ . Учитывая тот факт, что на 1 моль воды при

комнатной температуре приходится 1 моль водородных связей, то есть каждый  $\text{H}^+$  структурирует вокруг себя десять молекул воды. Согласно Эйгену и Майеру, ионы  $\text{H}_3\text{O}^+$  и  $\text{OH}^-$ , присутствующие в воде, координируют вокруг себя по 3 молекулы воды, создавая структуру  $\text{H}_3\text{O}^+(\text{H}_2\text{O})_3$  и  $\text{OH}^-(\text{H}_2\text{O})_3$  [73].

В отличие от ионов, неполярные молекулы взаимодействуют с молекулами воды через слабые ван-дер-ваальсовы силы [94, 97, 124]. Однако, низкая растворимость неполярных молекул обусловлена не тем, что энергия их ван-дер-ваальсова взаимодействия друг с другом больше, чем с молекулами воды, как предполагалось раньше, а тем, что их присутствие приводит к термодинамически неблагоприятным изменениям в структуре воды - ее упорядочиванию. Вода стремится снизить влияние этих молекул за счет уменьшения взаимных контактов. Это вытесняющее действие воды на неполярные группы обычно называют гидрофобным. Концепция гидрофобного взаимодействия впервые предложена Бреслером и Талмудом, а основные положения теории разработаны Кауцманом [80].

В биологических макромолекулах огромное количество групп, которые при контакте с водой должны вызывать гидрофобное взаимодействие. Причем вода не только стабилизирует структуру биомолекул, оказывая гидрофобное воздействие, но и разрыхляет их из-за конкуренции за водородные связи в пределах макромолекул [80].

Полярные функциональные группировки образуют сложные водородные связи с водой по донорно-акцепторному механизму за счет собственной свободной пары электронов [114]. Ионизированные группы белковой части глобулы гидратируются подобно ионам металлов. Неполярные группы макромолекул взаимодействуют с водой лишь через слабые ван-дер-ваальсовы силы, играя роль активных структурообразователей в отношении воды [94, 97, 124]. О. Я. Самойлов утверждает, что растворенные молекулы, заполняя пустоты решетки, снижают трансляционную подвижность молекул воды и увеличивают вероятность возникновения и продолжительность существования водородных связей. Поэтому



большое значение в степени структурирования имеет поверхность соприкосновения неполярной группы с водой: чем она больше, тем толще слой, стабилизируемой ею воды. Немаловажную роль играет так же ее форма, степень разветвленности, структура поверхности и электронное строение атомов, образующих водородные связи. Поскольку растворение в воде неполярных функциональных групп макромолекул приводит к ее упорядочению, то следствием этого является стремление снизить влияние неполярных групп за счет уменьшения взаимных контактов [68].

Применяя метод поляризационной четырехфотонной спектроскопии в терагерцовой и субтерагерцовой области спектра обнаружено существование спин-изомеров воды: орто- и пара-молекул. Более того, в растворах белков и ДНК наблюдалось селективное взаимодействие биополимеров с пара-молекулами  $H_2O$  [88].

Часть изомеров гидратных оболочек белков (в соответствии с Больцмановским распределением населенностей по энергиям) могут не вращаться в основном состоянии при комнатной температуре и температуре  $36.6\text{ }^{\circ}\text{C}$  [88]. Они могут «захватываться» из контактного слоя водного раствора и образовывать водородо-связанные комплексы с большей вероятностью, так как они проявляют большую адгезию к гидрофильным остаткам биополимерных молекул (белки, молекулы ДНК), чем орто-молекулы. Такое взаимодействие может приводить к формированию структурированного, льдоподобного слоя воды около молекул белка [60].

Именно благодаря такой двойственной роли воды мы можем наблюдать равновесие сил в пределах белковых макромолекул и обеспечить их высокую чувствительность к управляющему воздействию [3, 4]. Кауцман считает, что макромолекулы для поддержания устойчивости агрегируются, образуя различные компактные структуры, либо объединяются в более крупные фибриллярные агрегаты [108]. Таким образом, конформация белков макромолекул цитоплазмы и

нуклеиновых кислот в значительной степени определяется гидрофобным взаимодействием [10].

Таким образом, структура и свойства макромолекул находятся в тесной связи с водой и, в значительной степени, определяют ее состояние. Данные изменения будут зависеть от свойств и концентрации воздействующих компонентов [20, 44, 107, 122].

По мере эволюции биохимии и фармакологии меняются и представления о концентрации биологически активных веществ, в которых они способны оказывать воздействие. Эффективные дозы ряда гормонов и пептидов часто находятся в пределах  $10^{-9}$ - $10^{-12}$  моль/л и менее. А рабочие концентрации некоторых лекарственных препаратов и токсинов значительно ниже  $10^{-12}$  моль на 1 кг тела [11].

Особенно интересны данные о действии на биологические системы веществ в сверхмалых дозах (СМД,  $10^{-18}$ - $10^{-14}$  М). Данный интервал рассматривают в качестве сверхмалой концентрации, так как действие веществ в концентрации более  $10^{-13}$  можно объяснить лиганд - рецепторной теорией, а при концентрации  $10^{-19}$  в условиях эксперимента может не быть ни одной молекулы исследуемого вещества [14].

Однако, при экспериментальной работе с растворами сверхмалых доз и концентраций (СМК) наблюдается ряд методических трудностей. При приготовлении высокоразбавленных растворов очень сложно избежать сорбции единичных молекул на стенке посуды. Так же возможно взаимодействие вещества с растворителем и, даже, с некоторыми примесями, содержащимися в растворителе [25].

Главный критерий оценки эффективной концентрации биологически активных веществ - константа диссоциации  $K_D$  лиганд-рецепторного комплекса. Установлен ряд рецепторов, для которых  $K_D$  составляет менее  $10^{-12}$ , например, брадикинин, хотя, для большинства известных лиганд-рецепторных комплексов эта величина составляет  $10^{-6}$ - $10^{-12}$  моль/л. Поэтому можно считать возможным

принятие за действующие сверхмалые концентрации биологически активных веществ интервал  $10^{-15}$ - $10^{-20}$  моль/л (моль/кг). Концентрация вещества, при которой наблюдается максимальный эффект, может быть в несколько раз меньше константы диссоциации лиганд - рецепторного комплекса [109].

В процессе изучения данного вопроса были обнаружены четыре основных вида дозовой зависимости: колоколообразная; с противоположными максимумами при низких и высоких концентрациях; с несколькими максимумами и минимумами и с насыщением [25].

Необычной особенностью действия СМД является наличие максимума при сверхмалых концентрациях и «мертвой зоны», которая лежит в интервале  $10^{-12}$ - $10^{-6}$ М. Так же установлено, что в больших концентрациях вещество либо вообще не оказывает эффекта, либо воздействие того же или противоположного знака, что и при воздействии СМД [25].

Интересно, что в действии веществ в сверхмалых дозах, несмотря на различную природу соединений, и объектов воздействия, можно определить общие закономерности. В качестве наиболее важных можно выделить: сложный характер дозовой зависимости и действие СМК на фоне большей концентрации того же вещества, присутствующего в объекте воздействия эндогенно. Предполагается, что действие СМД осуществляется посредством рецепторного взаимодействия. В случае же проявления эффекта при больших концентрациях, его можно связать либо с рецепторами иного типа, чем при СМД, либо неспецифическими реакциями. Возможно, что действие СМД связано с естественными адаптационными механизмами, т.к. адаптация приводит к тому, что система реагирует не на действующую концентрацию вещества, а на ее изменение, включая, внесение его малых или сверхмалых количеств [62].

В настоящее время отсутствует общепринятая теория о механизмах и процессах, лежащих в основе действия СМД. Наиболее объемлющая теория, на наш взгляд, описывающая механизм действия веществ в сверхмалых

концентрациях в живой клетке предложена В.П. Ямской и И.А. Ямским. Ее основные положения представлены ниже:

1. Действие физико-химических факторов в СМД обусловлено их способностью оказывать влияние на гомеостатические процессы организма.
2. Распространение регуляторного сигнала осуществляется благодаря изменениям пространственной организации надмолекулярных структур клеточного микроокружения.
3. Система клеточного микроокружения представлена ассоциированными между собой молекулами небольших белков и воды - малым матриксом.
4. Малый матрикс - матрица для считывания, распространения и уничтожения информационного сигнала, поступающего извне в ткань.
5. Трехмерная сетка малого матрикса взаимодействует с конструкцией внутриклеточного матрикса и плазматической мембраной благодаря связыванию отдельных доменов белковых молекул этих структур [81].

Таким образом, пространственная организация водного компонента биологических систем постоянно модифицируется за счет изменения свойств и концентрации, входящих в его состав компонентов, в том числе и надмолекулярных ансамблей, образование и распад которых связан с функциональными изменениями, происходящими в организме человека.

### **3. Аминокислоты и водная основа их растворов**

Межмолекулярные взаимодействия в системе вода – аминокислота, определяют растворимость цвиттер-ионов и способность вступать в различные биологические превращения [58]. Аминокислоты содержат центры гидратации:  $\pi$ -сопряженную систему кольца гетероциклических и ароматических функциональных групп, заряженные и полярные радикалы и являются идеальной моделью для изучения межмолекулярных взаимодействий с участием воды.

Экспериментальные данные, полученные авторами [111] на основании расчета произведения Уальдена, свидетельствуют, что большинство аминокислот обладают умеренной способностью разрушать структуру водных сред. Однако, для L-лизина (Лиз), L- глутаминовой кислоты (Глу) и L-аспарагиновой кислоты (Асп) отмечена сравнительно высокая разрушающая способность и сделан вывод, что добавки биомолекул способны оказывать сильное влияние на структуру раствора.

Методом спинового эха в работах [90, 102] описана и измерена самодиффузия в водных растворах некоторых аминокислот, пептидов и белков. Было обнаружено, что коэффициент самодиффузии воды уменьшаются с ростом молекулярной массы исследуемого вещества. Возможными причинами снижения самодиффузии являются: взаимодействия молекул воды с группами  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{COO}^-$  с последующим разупорядочиванием структуры воды.

Для растворов пептидов выявлена аналогичная зависимость. Самодиффузия воды в растворах пептида выше, чем в растворах аминокислоты, что свидетельствует о разрушающем влиянии пептидной группы на структуру воды. Для растворов  $\alpha$ -Ала- $\alpha$ -Ала выявлена аномально высокая подвижность молекул воды по сравнению с растворами не только  $\beta$ -изомера, но и всех других аминокислот и пептидов, что можно объяснить сильным разрушающим действием этой молекулы на структуру воды из-за образования внутримолекулярной связи типа  $-\text{COO}^- \dots \text{H}_3\text{N}^+$  [95].

Установлено, что взаимное расположение гидрофобных и гидрофильных групп мало сказывается на изменении подвижности воды. Авторы работы считают, что причинами изменения коэффициентов самодиффузии воды является наличие специфического взаимодействия молекул воды с группами  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NH}_3^+$ ,  $\text{COOH}$ ,  $\text{COO}^-$  [95]. Если часть молекул воды сравнительно прочно связывается с растворенной молекулой, так что участвует вместе с ней в трансляционном движении, то это приводит к уменьшению коэффициента самодиффузии.

Изменение структуры воды связывают с тем, что молекулы аминокислот, по-видимому, сдвигают равновесие между структурами в сторону воды типа разупорядоченной [95].

В литературных источниках существуют данные по исследованию взаимодействия воды с аминокислотами, при этом проводится измерение активности воды, как растворителя, в зависимости от растворенного вещества.

Для изолейцина, метионина (Мет), Асп и Глу установлено взаимодействие с растворителем только при его высокой активности ( $a_w > 0,98$ ) [76].

Присутствие незначительного количества воды, в структуре аминокислот для изолейцина, Мет, Асп и Глу при спектроскопическом исследовании отражается полосой  $3590-3650 \text{ см}^{-1}$ , которая отражает наличие несвязанной ОН-группы [21]. Незначительная гидратация данных веществ даже при высокой активности растворителя вызвана ограниченным взаимодействием кристаллов аминокислот с молекулами воды, что обусловлено малой доступностью молекул воды к полярным и заряженным функциональным группам из-за насыщенности связей  $\text{COO}^-$  и  $\text{NH}_3^+$  [42]. Данное явление приводит к появлению на ИК-спектрах более интенсивных полос поглощения при длине волны  $3310-3265 \text{ см}^{-1}$ , указывающих на значительный вклад в структурную организацию межмолекулярных водородных связей.

Многочисленные данные экспериментов свидетельствуют о том, что Гли, аргинин (Арг) и  $\beta$ -Ала взаимодействуют с водой во всем диапазоне активности растворителя ( $a_w$ ) и являются гидрофильными соединениями [10].

Появление молекул воды в структуре Гли проявляется в виде дополнительных пиков поглощения на ИК-спектре при длине волны 3610, 3380,  $2585 \text{ см}^{-1}$ , отражающих появление водородных связей в структуре соединений: « $\text{H}_2\text{O} \dots \text{H}_2\text{O}$ » вблизи углеродного скелета аминокислоты,  $\text{NH}_3^+ \dots \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{COO}^- \dots \text{H}_2\text{O}$  соответственно [76].

Для водных растворов Глу наблюдается уширение полосы поглощения  $3440-3220 \text{ см}^{-1}$  и смещение в коротковолновую область спектра. Данное явление

объясняется образованием ассоциатов «H<sub>2</sub>O...H<sub>2</sub>O» при участии трех водородных связей в структуре аминокислоты [76].

Литературные данные [1, 55, 83] показали, что в водных растворах  $\alpha$ -аминокислот имеет место как гидрофобная, так и гидрофильная гидратация. В образующихся ассоциатах происходит перекрывание гидратных оболочек, приводящее к усилению разрушающего влияния молекул аминокислот на структуру воды.

В соответствии с литературными данными [72], уже при активности растворителя 0,1-0,4 в структуру кристаллической решетки  $\beta$ -Ала внедряется 2 молекулы воды, образуя стехиометрические комплексы  $\beta$ -Ала\*2 H<sub>2</sub>O. На ИК - спектре данного комплекса можно выделить полосу поглощения 3367 см<sup>-1</sup> характеризующей появлением связи NH<sub>3</sub><sup>+</sup>...H<sub>2</sub>O. Пик поглощения при длине волны 2570 см<sup>-1</sup> возможно отнести к колебаниям COO<sup>-</sup>... H<sub>2</sub>O. Выявлено образование связи H<sub>2</sub>O... H<sub>2</sub>O в структуре аминокислоты при 3590 см<sup>-1</sup>. Полоса поглощения 1649 см<sup>-1</sup> характеризует возникающие в данном комплексе деформационные колебания ОН-группы воды.

$\alpha$ -Ала обладает меньшим сродством к молекулам воды, чем  $\beta$ -Ала, что возможно объяснить большим взаимодействием групп COO<sup>-</sup> и NH<sub>3</sub><sup>+</sup> в структуре первой аминокислоты, из-за того, что карбоксильная группа отделена от аминогруппы всего одним атомом углерода, что приводит к усилению взаимного притяжения в цвиттер-ионе [7].

Установлено, что валин (Вал), лейцин (Лей) и треонин (Тре) обладают слабым взаимодействием с водой [10]. Удлинение углеродной цепочки в структуре Вал в сравнении с  $\alpha$ -Ала и структуре Лей по сравнению с Вал приводит к уменьшению поглощения молекул воды аминокислотой [80]. Замена группы -CH<sub>3</sub> в Вал на -OH в Тре вызывает увеличение поглощения воды. Удлинение на функциональную группу -CH<sub>2</sub> углеродного скелета Тре, по сравнению с серином (Сер) приводит к уменьшению его гидратационной способности [67]. Пик

поглощения при  $3210\text{ см}^{-1}$  относится к образованию связи  $\text{OH}\dots\text{H}_2\text{O}$  в структуре Тре.

В структуре Арг содержатся дополнительные полярные группы  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NH}$ , образующие большое количество дополнительных водородных связей с молекулами воды. На ИК - спектре данное явление находит отражение в виде образования дополнительных пиков поглощения при длине волны  $3310$  и  $3180\text{ см}^{-1}$ , относящихся к связям  $\text{NH}_2\dots\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{NH}\dots\text{H}_2\text{O}$  соответственно [67].

Установлено [36], что для всех  $\alpha$ -аминокислот общим является образование связи  $\text{COO}^-$  и  $\text{NH}_3^+$ , но для ароматических соединений, не имеющих других активных групп в радикале, структурообразование по Н-связям происходит только между этими группами. Результат - образование двумерных сеток водородных связей, и структура такого соединения имеет слоистый характер. Присутствующая в тирозине (Тир)  $\text{OH}$ - группа полагает возможность участия молекулы воды в образовании с молекулой аминокислоты связи  $\text{R-OH}\dots\text{H}_2\text{O}$ . Для Тир именно специфические межмолекулярные контакты являются главным фактором структурообразования. В результате  $\pi$ -электронного сопряжения в молекулах Тир, увеличивается его роль, как донора Н-связей за счет  $\text{OH}$ -группы [36].

Связь молекул Тир в слое растворителя, и между ними осуществляется связями  $\text{N} - \text{H}\dots\text{O}$  и  $\text{O-H}\dots\text{O}$  (полосы поглощения при  $3166$ ,  $2730$  и  $2660\text{ см}^{-1}$ ) [36]. На присутствие молекул воды в структуре Тир, указывают: уширение линии спектра в области  $3600 - 2600\text{ см}^{-1}$ , появление максимума при  $3147\text{ см}^{-1}$ , изменение интенсивности и сдвиг полосы поглощения при  $3166\text{ см}^{-1}$  в коротковолновую область. Можно говорить, что специфичность взаимодействия Тир с растворителем определяется, наличием  $\text{OH}$ -групп в его структуре, способных к образованию водородных связей с молекулами воды. Таким образом, в зависимости от термодинамической активности, молекулы воды, внедряясь в структуру данной аминокислоты, могут быть ассоциированы за счет водородных связей или находиться в виде одиночных молекул [48].



По литературным данным для гистидина (Гис) установлено, что в полосы поглощения при 2850 и 2780  $\text{см}^{-1}$  свидетельствуют об образовании связи молекул воды с азотом имидозольного кольца. Нахождение молекул воды вблизи цвиттерионной группировки аминокислоты подтверждается полосами поглощения при 3400, 3300 и 3224  $\text{см}^{-1}$ . На наличие молекул воды, не связанных водородной связью, и образование связей «вода-вода» вблизи гидрофобного радикала гистидина указывают соответственно полосы поглощения при 3752  $\text{см}^{-1}$  и 3490  $\text{см}^{-1}$ . Кристаллический Гис является как донором, так и акцептором Н-связей. Молекулы воды, взаимодействуя с ним, могут принимать участие в образовании водородных связей с атомами кислорода карбоксильных групп и атомами водорода аминогрупп. Появление дополнительных полос поглощения в области 3500 – 3700  $\text{см}^{-1}$  указывает на появление ассоциированных молекул воды и молекул воды с частично разорванными Н-связями [48].

По гидрационной активности аминокислоты можно расположить в следующей последовательности:

Аспарагиновая кислота  $\approx$  Глутаминовая кислота  $\approx$  Метионин  $\approx$  Изолейцин  $<$  Цистин  $<$  Глицин  $<$  Лейцин  $<$  Валин  $<$  Треонин  $<$   $\alpha$ -Аланин  $<$  Серин  $<$  Лиз  $<$  Цистеин  $<$  Фенилаланин = Триптофан  $<$  Тирозин  $<$  Аргинин  $\approx$   $\beta$ -Аланин  $<$  Гистидин [76, 117]

Таким образом, взаимодействие молекул воды с аминокислотами проявляется на ИК - спектре в виде новых полос поглощения. Область 3650 - 3580  $\text{см}^{-1}$  характеризует несвязанные ОН-группы воды. Образование связей  $\text{H}_2\text{O} \dots \text{H}_2\text{O}$  для димеров и полиассоциатов воды находит отражение в максимумах поглощения 3550-3450 и 3400-3200  $\text{см}^{-1}$ . Диапазон длин волн 1620-1650  $\text{см}^{-1}$  характеризует деформационные колебания ОН-группы воды. Для всех аминокислот взаимодействия  $\text{NH}_3^+ \dots \text{H}_2\text{O}$  и  $\text{COO}^- \dots \text{H}_2\text{O}$  описывается поглощение в интервале частот 3390-3360 и 2760-2530  $\text{см}^{-1}$ .

Эти данные могут объяснить изменения в сыворотке крови, возникающие под влиянием аминокислот, применяющихся в качестве лекарственных препаратов.

#### 4. Инфракрасная спектроскопия биологических жидкостей

ИК - спектроскопия - один из фундаментальных методов исследования веществ [8, 19, 38, 39, 43, 53, 54, 77, 78]. Метод является высокоспецифичным, т.к. позволяет по характерным спектрам поглощения инфракрасного излучения определить практически любые вещества количественно и качественно [6, 8, 43, 78, 79, 92, 98, 103, 104, 118].

Спектр биологического образца - суммарный спектр, в котором происходит наложение полос поглощения различных функциональных групп органических веществ, что значительно усложняет его расшифровку из-за взаимодействия отдельных видов колебаний указанных групп, при этом происходит искажение формы полос поглощения и смещение их максимумов [16].

В литературе присутствует большое количество разрозненной информации о спектрах отдельных компонентов, входящей в состав крови, используя эти данные, на спектрах сыворотки крови (рис.3) выявлены следующие полосы поглощения (табл.1) [8, 51]:

**Таблица 1**

**Частоты полос поглощения наиболее важных характеристических групп веществ в сыворотке крови здорового человека**

см <sup>-1</sup>	↔ Отнесения
3462	↔ Свободные -ОН и -NH
3417	↔ Свободные транс - NH
3228	↔ Связанные транс - NH
3207 (3192 )	↔ Связанные -ОН и -NH
3020-3000	↔ (-СН); ненасыщенные жирные кислоты, сложные эфиры холестерина
2990-2950	↔ <sub>ас</sub> (-СН <sub>3</sub> ); сложные эфиры холестерина; триглицериды
2950-2880	↔ <sub>ас</sub> (-СН <sub>2</sub> ); жирные кислоты; фосфолипиды

## Продолжение таблицы 1

2880-2860	$\leftarrow_c$ (-CH <sub>3</sub> ); сложные эфиры холестерина; триглицериды; глицерол
2870-2830	$\leftarrow_c$ (-CH <sub>2</sub> ); жирные кислоты; фосфолипиды
2996-2819	$\leftarrow_{ac}$ (-CH <sub>3</sub> ); $\leftarrow_{ac}$ (-CH <sub>2</sub> ); $\leftarrow_c$ (-CH <sub>3</sub> ); $\leftarrow_c$ (-CH <sub>2</sub> ); жирные кислоты; фосфолипиды; триглицериды
1739-1732	$\leftrightarrow$ (-C=O); липиды; сложные эфиры холестерина; триглицериды
1720-1600	Амид 1( $\leftrightarrow$ (-C=O) $\Leftarrow$ спираль белков)
1630-1560	$\Leftarrow$ (-NH <sub>2</sub> ); аминокислоты
1600-1480	Амид 2; $\Leftarrow$ (-N-H), $\Rightarrow$ спираль белков
1480-1430	$\Leftarrow_{ac}$ (-CH <sub>3</sub> ); $\Leftarrow_{ac}$ (-CH <sub>2</sub> ); $\Leftarrow_c$ (-CH <sub>3</sub> ); $\Leftarrow_c$ (-CH <sub>2</sub> ); жирные кислоты; фосфолипиды; триглицериды
1430-1360	$\leftrightarrow$ (-COO <sup>-</sup> ); аминокислоты
1342 (1339)	$\leftrightarrow$ (-C-N-) связанных с ароматическими кольцами
1330-1200	Амид 3; $\leftrightarrow$ (-C-N-), $\Leftarrow$ (-NH) и $\Leftarrow$ (-CH <sub>2</sub> )
1311 (1300)	$\Leftarrow$ (-NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )
1244 (1241)	$\leftrightarrow$ (-C-OH), ацетатные группы, $\leftrightarrow$ (-C-O-), $\leftarrow_{ac}$ (O-P=O)
1170	$\leftrightarrow$ (-CH <sub>2</sub> -O-P-); фосфолипиды
1165	$\leftarrow_{ac}$ (-CO-O-C), $\leftrightarrow$ (-C-OH); жирные кислоты
1152	$\leftrightarrow$ (-C-O-), $\Leftarrow$ (-C-OH) углеводов
1125	Маятниковые колебания -CH <sub>3</sub> ароматических систем
1104	$\leftrightarrow$ (-C-O-C-) 5,6- членных циклов сахаров
1084 (1076)	$\leftarrow_c$ (-C-P=O) (PO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) и $\Leftarrow_c$ (-C-OH)
1063	$\leftarrow_c$ (-CO-O-C); фосфолипиды
1057	$\leftarrow_c$ (-C-O-)
1034 (1030)	Скелетные колебания -C-C-N-

Условные обозначения:  $\leftrightarrow$  валентные колебания,  $\Leftarrow$  - деформационные колебания; c- симметричные, ac- ассиметричные колебания

Как следует из приведенных данных, биохимические показатели крови являются величиной постоянной на протяжении продолжительных промежутков времени, что может облегчить диагностику различных патологий (табл. 2).

В ряде исследований показано, что тонкие нарушения в структуре белково-липидных комплексов и других составных частей крови можно выявляться методом инфракрасной спектроскопии, что предоставит новую информацию при изучении патогенеза различных заболеваний [47].

Данный метод делает возможным с известным приближением судить об интенсивности водородных связей в молекулах.

В белковых молекулах это проявляется частичным сдвигом в диапазонах поглощения групп  $-NH$ ,  $-OH$  ( $3400\text{ см}^{-1}$ ),  $-C=O$  ( $1750 - 1710$ ,  $1650\text{ см}^{-1}$ ).

Таблица 2

**Основные составные компоненты цельной крови у детей различного возраста и взрослых [49, 70]**

Составные части (компоненты)		5-7 дней	10-12 месяцев	10-12 лет	Взрослые
Вода	%	90-91	90-91	90-91	90-91
Сухой остаток	%	9-10	9-10	9-10	9-10
Гемоглобин	г/л	150-200	115-133	120-150	120-150
Общий белок	г/л	47-65	57-78	65-85	62-82
Альбумин	г/л	23-46	29-51	37-52	35-50
Фибриноген	г/л	1,25-3,0	2,0-4,0	2,0-4,0	2,0-4,0
Мочевина	Моль/л	2,5-4,5	3,3-5,6	3,33-8,32	3,33-8,32
Мочевая кислота	Моль/л	140-330	140-210	170-410	120-400
Креатинин	Моль/л	27-88	18-35	27-62	44-100
Глюкоза	Моль/л	1,7-4,2	2,5-4,7	3,3-5,5	3,3-5,5
Триацилглицерины	Моль/л	0,2-0,86	0,1-1,1	0,36-1,12	0,4-1,7
Холестерин общий	Моль/л	1,3-3,5	1,82-4,94	3,11-5,18	3,63-5,2
Фосфолипиды	г/л	0,75-1,7	1,0-2,75	1,8-2,95	1,25-2,75
Билирубин общий	Моль/л	100	8,5-20,5	8,5-20,5	8,5-20,5

Свободные  $-C=O$  - группы дают линии поглощения в области  $1670-1700\text{ см}^{-1}$ , при взаимодействии с водородом - в диапазоне -  $1630-1680\text{ см}^{-1}$ . По интенсивности указанных полос можно судить о вторичной структуре белка и изменению количества водородных связей в биологических системах [50].

Известно, что методом ИКС, за счет измерения качественных и количественных характеристик исследуемой биологической жидкости, которая имеет определенные особенности при различных патологических состояниях, возможна диагностика нозологических форм [84].

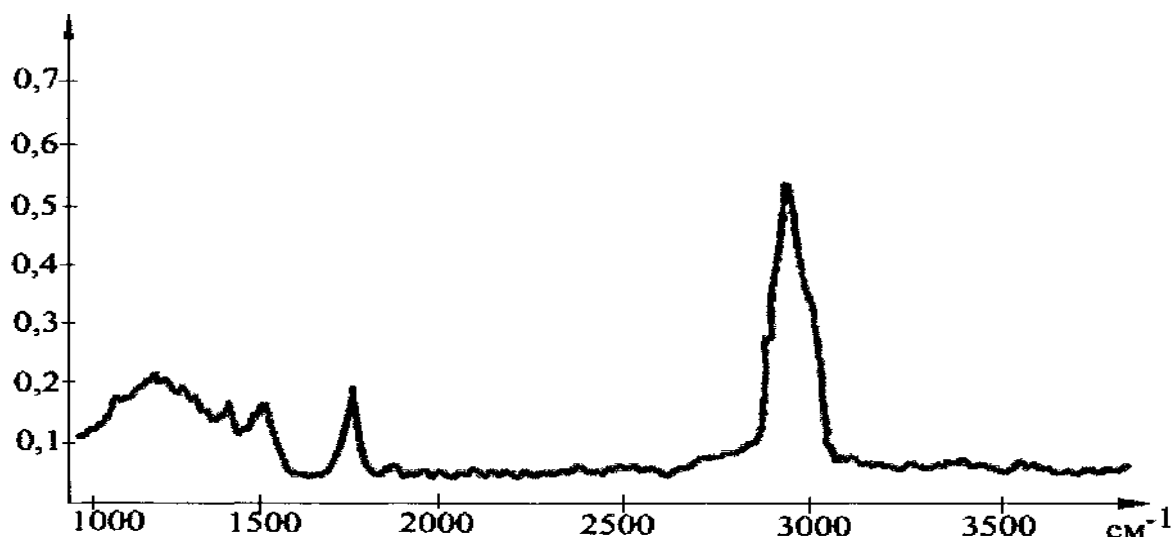


Рис. 3. Инфракрасный спектр сыворотки крови

В медицине этот метод начали применять для диагностики онкологических заболеваний, а впоследствии он получил более широкое распространение [90, 98].

В ИК-спектрах сыворотки крови больных с сахарным диабетом I и II типов наблюдались отличия в областях  $1180\text{--}1250$  и  $1260\text{--}1440\text{ см}^{-1}$ , что связывают с увеличением содержания в сыворотке крови больных этой группы веществ, богатых  $\text{--OH}$ ,  $\text{C-O-C}$  и  $\text{C-OH}$  группами. В роли таких веществ могут выступать молекулы углеводов, а также комплексы углеводов с другими соединениями. Рост интенсивности полосы поглощения  $1550\text{--}1570\text{ см}^{-1}$  свидетельствует об увеличении содержания групп  $\text{NO}$  в сыворотке крови больных этой группы. Данное утверждение находит подтверждение наличием полос поглощения в области  $1350\text{--}1390\text{ см}^{-1}$  [16].

Для больных сахарным диабетом I типа характерна большая интенсивность поглощения в области  $1010\text{--}1130$ ,  $1180\text{--}1250$  и  $1130\text{--}1180\text{ см}^{-1}$ , а для больных с сахарным диабетом II типа наблюдалось увеличение поглощения в области  $1450\text{--}1480\text{ см}^{-1}$ . Такие различия характера поглощения инфракрасного излучения связаны с различием химического состава. В спектрах сыворотки крови больных с сахарным диабетом II типа изменение характера поглощения позволяет предположить меньшую концентрацию  $\text{--OH}$  групп, по сравнению со спектрами сыворотки крови больных с сахарным диабетом I типа. В то же время, увеличение

интенсивности поглощения в области 1450-1480  $\text{см}^{-1}$ , характерное для –  $\text{CH}_3$  группы, позволяет предположить увеличение содержания более простых соединений, содержащих предельные радикалы углеводородов, гидроксильные и кетоновые группы. На роль таких соединений в сыворотке крови могут претендовать интермедиаты углеводного обмена, в частности, молочная и пировиноградная кислоты [40, 87].

Метод ИКС использовался в офтальмологии для изучения тканей глаз в норме и при внутриглазных опухолях. Показано, что понижение степени минерализации при увеальной злокачественной меланоме может служить дополнительным тестом для прогноза неблагоприятного клинического течения опухоли [22].

Полянская Н. К. (2008г.) в своей работе доказала возможность использования метода ИКС слезной жидкости у больных с тяжелыми деструктивными заболеваниями роговицы, которая позволяет установить этиологию и, проводя исследование в динамике, прогнозировать клиническое течение [64].

Спектроскопический анализ биологических сред нашел применение в судебной медицине [121], неврологии, хирургии, пульмонологии [13, 66].

Подобные исследования позволяют оценивать, как фармакокинетику различных лекарственных препаратов, так и его доброкачественность [113].

Результаты метода ИКС сложны в интерпретации и не находят широкого применения в практической медицине, поэтому возникла необходимость модифицировать «классический» метод ИКС.

Модифицированный спектрометрический метод создавался не только как новый информативный и легко реализуемый в практической медицине, но и как результат представления о том, что анализируемая водная система, например, кровь, является целостной биологической субстанцией, в которой каждый анализируемый момент изменения одних ее параметров связан в той или иной степени с изменениями других параметров. Данный подход к исследованию

позволяет учесть структурное состояние воды, которая зависит от различных ассоциатов молекул, связанных друг с другом неупорядоченной сетью водородных связей с часто встречающимися деформированными или разорванными связями, подвергающимися систематической перестройке [129, 123].

Степень изменения межмолекулярных взаимодействий в водных системах под влиянием различных агентов в нативных условиях позволяет регистрировать инфракрасный анализатор низкого разрешения, входящий в состав аппаратно-программного комплекса «ИКАР». Новизна исследования с помощью данного аппарата заключается в возможности многократной регистрации измеряемых коэффициентов пропускания инфракрасного излучения в короткие интервалы времени, что позволяет характеризовать величину их колебания с помощью дисперсии. На основании полученных данных, а также критериев многомерного анализа (критерия Бартлетта и расстояния Махаланобиса) осуществляется целостная оценка свойств биологических растворов с учетом изменений воды и основных компонентов исследуемых систем. В свою очередь характеристика биологического материала, в том числе сыворотки крови, с помощью целостных критериев позволяет установить достоверные отличия от нормы при патологическом состоянии. Данная методика отличается высокой специфичностью и нашла применение для диагностики эпилепсии [35], диагностики и определения степени тяжести остеопороза, а также для прогнозирования течения и оценки эффективности его лечения [34].

В офтальмологической практике АПК «ИКАР» применяется для определения нарушений кровообращения в сосудах сетчатки и зрительного нерва [23], в терапии проникающих ранений глазного яблока и у пациентов с открытоугольной глаукомой [71].

Данный метод нашел применение в диагностике и прогнозировании функциональных и органических нарушений репродуктивной системы девушек, а также скрининговой диагностике синдрома поликистозных яичников и в прогнозировании гестоза у беременных с ожирением [18, 75].

За счет измерения качественных характеристик исследуемой биологической жидкости, удалось на молекулярном уровне охарактеризовать функциональное состояние организма при различных заболеваниях, что дает принципиально новую информацию о механизме развития этих патологий и расширило возможности их диагностики [32].

Однако, для более детальной интерпретации изменения компонентов крови необходимо использовать инфракрасную спектроскопию с Фурье преобразованием. Сложность описания спектров, полученных с помощью Фурье-спектрометров, перекрывается преимуществом данного метода над другими спектральными приборами - быстрая регистрация одновременно всего спектра.

Необходимо отметить, что, несмотря на высокую диагностическую значимость ИК-спектроскопии, нам не встретились работы, посвященные изучению растворов аминокислот, являющихся одним из наиболее биологически важных веществ сыворотки крови людей, в лечении которых применялись бы препараты как отдельных аминокислот, так и их смеси.

Приведенные ранее примеры описывают возможность применения ИК-спектроскопии в диагностике патологий у взрослых людей, для детей такой информации в литературе нами обнаружено не было. Между тем, медицинская помощь и лечение детей с поведенческими, психическими и психосоматическими расстройствами получила в последнее время особое внимание среди педиатров из-за увеличения числа таких пациентов [119]. Диагностика таких состояний в настоящее время проводится исключительно путем психолого-педагогической экспертизы, что, на наш взгляд, не является полностью объективной системой оценки психического здоровья. Это послужило поводом к проведению представленного исследования у детей школьного возраста с задержкой психического развития для выяснения характера и роли обменных нарушений в патогенезе изучаемой патологии, а также с целью уточнения прогностической значимости указанного метода.



## 5. Аминокислоты: метаболизм и функции

В живых организмах создается аминокислотный фонд, величина которого во взрослом состоянии при физиологических условиях остается постоянной. Его количество соответствует разнице между аминокислотами, поступающими из экзо- и эндогенных источников, а также расходом их в анаболических и катаболических процессах [8, 46.].

Продукты гидролиза белков всасываются в желудочно-кишечном тракте человека в основном в виде свободных аминокислот. Система транспорта для большинства аминокислот общая. Изучение кинетики всасывания АК в кишечнике в опытах *in vivo* и *in vitro* свидетельствует, что аминокислоты всасываются свободно с ионами натрия [8]. Выход аминокислот из клетки происходит преимущественно благодаря диффузии. Энергия АТФ не расходуется непосредственно на транспорт аминокислот, а утилизируется на создание новых градиентов в клеточных мембранах для его обеспечения [46]. Транспорт аминокислот через клеточные мембраны с помощью специфических клеточных систем определяется их химической структурой.

На рис. 4 отражены многообразные пути метаболизма АК после всасывания в кишечнике.

Необходимо отметить, что совместное присутствие некоторых АК приводит к конкурентному торможению их всасывания. Тормозящее влияние одних на транспорт других осуществляется путем прямой конкуренции за транспортные системы.

Так, в присутствии Лиз тормозится всасывание аргинина, но не изменяется всасывание Ала, Лей и Глу. L-Ала и Глу подавляют транспорт Met и серина (Сер), а L – Ала и Вал замедляют утилизацию Лей;  $\beta$  - Ала и Фен тормозят поглощение Сер и пролина. Фен как сильный конкурентный ингибитор транспорта важнейших незаменимых аминокислот тормозит снабжение тканей Тир, Трип, Вал и Лей [8].

Аминокислотный обмен непосредственно связан с синтезом и распадом белковых соединений, вовлечения АК в обменные процессы, путей превращения каждой из них, обусловлен метаболизмом тканей, состоянием клеточных мембран, гемато-энцефалического барьера (ГЭБ) [8, 128, 131].

При этом живые организмы обладают постоянным резервом свободных аминокислот, содержащихся в тканях и во внутриклеточной жидкости, они находятся в динамическом равновесии при многочисленных обменных реакциях с аминокислотами, входящими в состав белков [8].

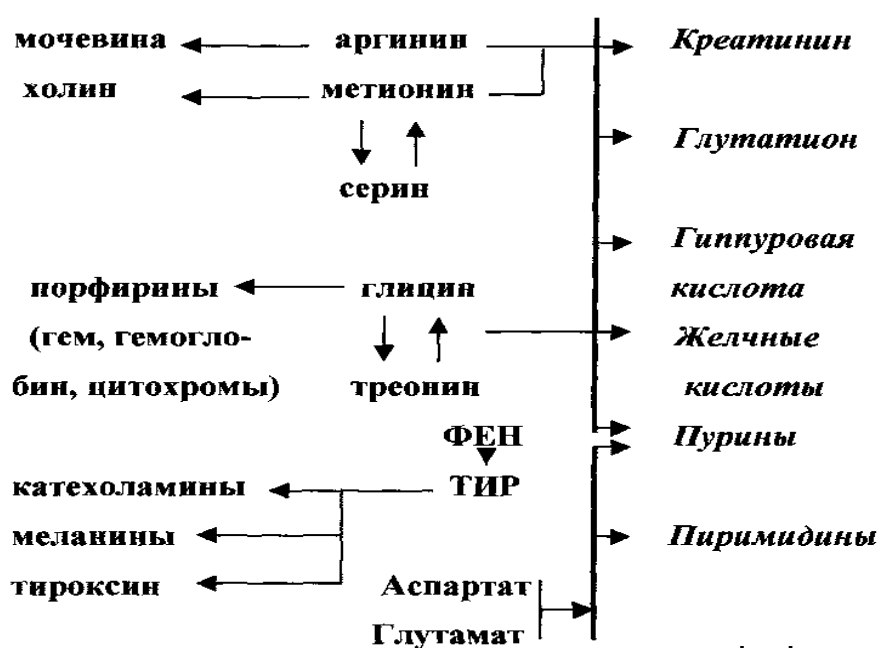


Рис.4 Пути метаболизма аминокислот в организме человека

Аминокислотный «спектр» сыворотки крови примерно соответствует аминокислотному составу свободных АК в органах и тканях (таб. 3) [46].

Содержание аминокислот в сыворотке крови влияет на метаболизм и зависит от состояния систем транспорта через клеточные мембраны, pH, температуры, электролитного обмена и гормональной регуляции, возрастных особенностей организма, а так же возникновения и развития патологии [128, 131,133]. Однако, данных о возрастных изменениях содержания аминокислот в сыворотке крови и

тканях организма немногочисленны. Установлено, что с возрастом ослабевает транспорт аминокислот в клетки из-за снижения синтеза транспортных белков [26].

Установлено, что в головном мозге с возрастом достоверно уменьшается количество Асп, Тир, Мет, Вал. Отмечается тенденция к снижению уровня Глу [26].

**Таблица 3**

**Концентрация свободных аминокислот в сыворотке крови человека**

<b>Аминокислота</b>	<b>Концентрация, мг%</b>
Лизин	3,26 ± 0,161
Аланин	2,84 ± 0,219
Валин	2,21 ± 0,124
Глутаминовая кислота	1,69 ± 0,172
Серн	1,46 ± 0,072
Лейцин	1,42 ± 0,08
Глицин	1,36 ± 0,085
Аргинин	1,11 ± 0,084
Тирозин	0,93 ± 0,041
Фенилаланин	0,89 ± 0,058
Гистидин	0,83 ± 0,044
Изолейцин	0,69 ± 0,048
Цистеин	0,62 ± 0,08
Треонин	0,59 ± 0,17
Метионин	0,24 ± 0,026
Аспарагиновая кислота	0,19 ± 0,035

Для биологических систем характерно сочетание процессов синтеза и распада, в связи с чем актуальным является изучение взаимосвязи аминокислот и других участников метаболизма, в частности, действия липидов на данные процессы. В настоящее время при диагностике патологий уделяется большое внимание изучению липидного обмена [89, 31].

Липидный обмен - сложная интегративная система, отдельные звенья которой находятся в постоянном динамическом равновесии. Изменение липидного

состава ведет к изменениям функций организма, что позволяет использовать некоторые его показатели для характеристики состояния органов и систем [28, 127].

Одним из наиболее универсальных патогенетических механизмов при различных психоневрологических патологических состояниях является повреждение биологических мембран [106].

Органические поражения головного мозга сопровождаются изменением количества различных фракций фосфолипидов и нарушение синтеза и распада сфингомиелина, фосфатидилхолина, фосфатидилсерина [112]. Фосфолипиды являются активной составной частью клеточных мембран и служат мощными антиоксидантами, предотвращая патологическое воздействие липидных перекисей на мембраны [106]. Ряд исследований показал значение сфингомиелина в прогрессировании нейродегенеративных процессов и формировании болезни Альцгеймера [28, 127].

Анализ литературы показал недостаточное количество информации о метаболизме липидов при психической патологии у детей и подростков [119]. В то же время в терапии этого состояния преимущество должно отдаваться лекарственным препаратам с мембранотропным эффектом. К таим препаратам относится «Кортексин», представляющий собой смесь аминокислот и коротких пептидов, обуславливающих его биологические эффекты.

В частности, Глу является основным возбуждающим нейромедиатором центральной нервной системы. Глу может оказывать эффекты через метаботропные G-белки глутаматного рецептора. Дисфункция данной системы вовлечена в патологию многих заболеваний ЦНС: шизофрения, наркомания, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера [128]. Весьма эффективным лекарственным препаратом является производное Глу – гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), она тормозит передачу нервного импульса в синапсах центральной нервной системы и влияет на обмен глюкозы, тканевое дыхание и окислительное фосфорилирование в головном мозге [2].

Доказано, что Гли, подобно ГАМК, является медиатором торможения в ЦНС [2]. Подтверждено его участие в патогенезе перинатальной ишемии - одной из важнейших причин неонатальной смертности. Последние исследования показали роль L-Гли и L-серина в активации N-метил-D-аспартат рецепторов (NMDA), которые что можно рассматривать, как важнейший защитный механизм предотвращения ишемии. В условиях возникающей гипоксии наблюдается резкий рост содержания в крови L-Гли или L-серина, защищающих нейроны от токсического действия Глу [133].

Примечательно, что  $\beta$ -Ала так же является тормозным медиатором, действуя на те же рецепторы, что и Гли [69], при этом он является важным источником энергии для мышц, головного мозга и центральной нервной системы.

Имеются данные о благоприятном влиянии препаратов Гис на липидно-белковый обмен у больных атеросклерозом. Так же отмечается, что соотношение орнитин/гистидин можно использовать в качестве маркера почечной карциомы [116].

Установлено, что наследственная невропатия I типа приводит к увеличенной выработке нейротоксичного дезоксисфинголипида. Одним из наиболее эффективных путей терапии является внесение в пищу L-серина [100].

Глутамин- аминокислота с неразветвленной цепью, которая является важнейшим нетоксичным носителем азота в организме, выполняя функцию «азотного трансфера». Многочисленные исследования показывают уменьшения содержания данного вещества при онкологических заболеваниях, так как раковая опухоль является «глутаминовой ловушкой». Применение у пациентов при химиотерапии данной кислоты оказывает благотворное воздействие на печень, защищая ее от окислительных травм, за счет увеличения уровня глутатиона [101]. Положительные эффекты показало применение данного соединения в терапии воспалительных заболеваний кишечника, так как подавляет окислительный стресс, влияя на обмен триарбитуровой кислоты увеличивая синтез АТФ6, АТФ4 из мРНК [93].

Ряд исследований показали участие гомоцистеина в патогенезе гипергомоцистеинемии- факторе риска развития ишемической болезни крови. Последние данные говорят о дисфункции адипоцитов при данной патологии, в том числе и адипонектина, что ведет к снижению чувствительности к инсулину. Гомоцистеин ингибирует липазу, снижая высвобождение глицерина и жирных кислот, положительно влияя так же на аденозин-5'-монофосфат – активированную протеинкиназу [131].

Таким образом, многочисленные данные говорят о важности отдельных аминокислот для функционирования организма человека, изменение уровня которых приводит к возникновению различных патологических состояний. Однако, часто применение отдельных аминокислот не приводит к желаемому результату, и требует использования комбинированных препаратов, например, препаратов полипептидов коры головного мозга скота, состоящих из смеси аминокислот и микроэлементов (торговая марка «Кортексин» производитель: ООО «Герофарм»).

Кортексин содержит смесь аминокислот и комплекс низкомолекулярных водорастворимых полипептидных фракций, проникающих через ГЭБ непосредственно к нервным клеткам. Препарат оказывает ноотропное, нейропротекторное, антиоксидантное и тканеспецифическое действие.

Механизм действия препарата обусловлен активацией пептидов нейронов и нейротрофических факторов мозга; оптимизацией баланса метаболизма возбуждающих и тормозных аминокислот, дофамина, серотонина; ГАМКергическим воздействием; снижением уровня пароксизмальной судорожной активности мозга, способностью улучшать его биоэлектрическую активность; предотвращением образования свободных радикалов (продуктов перекисного окисления липидов).

Таким образом исследование влияния препарата, содержащего аминокислоты, входящих в состав препарата «Кортексин», на водную компонент сыворотки крови с помощью ИК-спектроскопии позволит более точно

осуществлять контроль за эффективностью проводимой терапии, а так же выявить новую фундаментальную информацию об опосредованном действии аминокислот на живые организмы, через его водную составляющую.

## Глава II. Экспериментальная часть

### 2. Материалы и методы

#### 2.1. Материалы исследования

Работа одобрена Этическим комитетом ГБОУ ВПО Тверская ГМА. Все участники исследования и их законные представители были ознакомлены с характером проводимого обследования и лечения, от которых было получено информированное согласие на все виды обследования и лечения.

Настоящее исследование проводилось в г. Твери в 2008-2011 гг. на базе Специализированного коррекционного образовательного учреждения VII типа школы-интерната №2. Оценка интеллекта проводилось сертифицированным психологом ГУЗ «Областной психоневрологический диспансер».

В качестве анализируемой биологической системы использовали сыворотку крови подростков. Забор крови у всех пациентов (60 человек) проводился утром натощак из кубитальной вены и совмещался с общим клиническим и биохимическим анализом крови с последующим отделением сыворотки.

Первую группу составляли 30 подростков в возрасте от 12 до 15 лет (средний возраст  $14,0 \pm 0,6$  лет), из них 17 мальчиков, 13 девочек. Пациенты отбирались до лечения с четко выраженными клиническими симптомами. Диагноз «Задержка психического развития» (ЗПР) обследованных подростков был установлен при прохождении ими медико-педагогической психологической комиссии.

Во вторую (контрольную) группу вошли 30 подростков с нормативным психическим развитием аналогичного возраста ( $13,8 \pm 0,8$  лет) из них 14 мальчиков, 16 девочек. Критериями исключения детей из обследования стало наличие острой инфекционной патологии и обострение сопутствующих хронических заболеваний.

Курс лечения препаратом «Кортексин» составлял 10 внутримышечных инъекций через 2 дня по 10 мг.

Одновременно с биологическими системами анализировали ИК-спектр 1 М растворов аминокислот различной химической природы и биологической активности в разведениях от исходного 1 М раствора до  $10^{-16}$  М раз: аминокислоты



Гли (50046 Sigma, SID 24873323), Ала (05129 Sigma, SID 24845820), Глу (49449 Sigma, SID 24872908), Асп (A8949 Sigma, SID 24891385 ), Лиз (SID 24885268) и лекарственный препарат «Кортексин» (ООО «Герофарм»).

Приготовление растворов сопровождалось последовательным десятикратным разведением исходных растворов в концентрации 1 М до  $10^{-16}$  М и перемешиванием при помощи дозатора. Создание растворов смесей исследуемых аминокислот включало смешение навесок необходимой массы отдельных аминокислот и разведение бидистиллированной водой до создания концентрации 1 М. Полученные растворы оставлялись на 20 мин при комнатной температуре, после чего проводили спектрометрическое исследование.

В качестве эталона сравнения использовали дважды перегнанную деионизированную воду ( $pH=6,6\pm 0,2$ ;  $\rho=17$  Мом\*см).

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. ИК-спектрометрия с помощью аппаратно-программного комплекса «ИКАР»**

Для проведения спектрометрии использовался разработанный совместно с сотрудниками НИИ-2 МО РФ аппаратно-программный комплекс, представляющий собой девятизональный спектроанализатор. Аппаратно-программный комплекс состоит из девятизонального спектроанализатора сопряженного с персональным компьютером (рис. 5). Прибор функционирует следующим образом.

От источника (1) инфракрасного излучения GLOBAR световой поток проходит через формирующую оптическую систему (2) и попадает на кювету (3) с исследуемой жидкостью. Затем излучение проходит через модулятор (4) и попадает на фотоприемник (6) (полупроводниковый болометр) и преобразуется в электрический сигнал. Модулятор (4) расположен перед входным зрачком фотоприемника и представляет собой диск с 9-тью полосовыми фильтрами (5), расположенными по окружности.

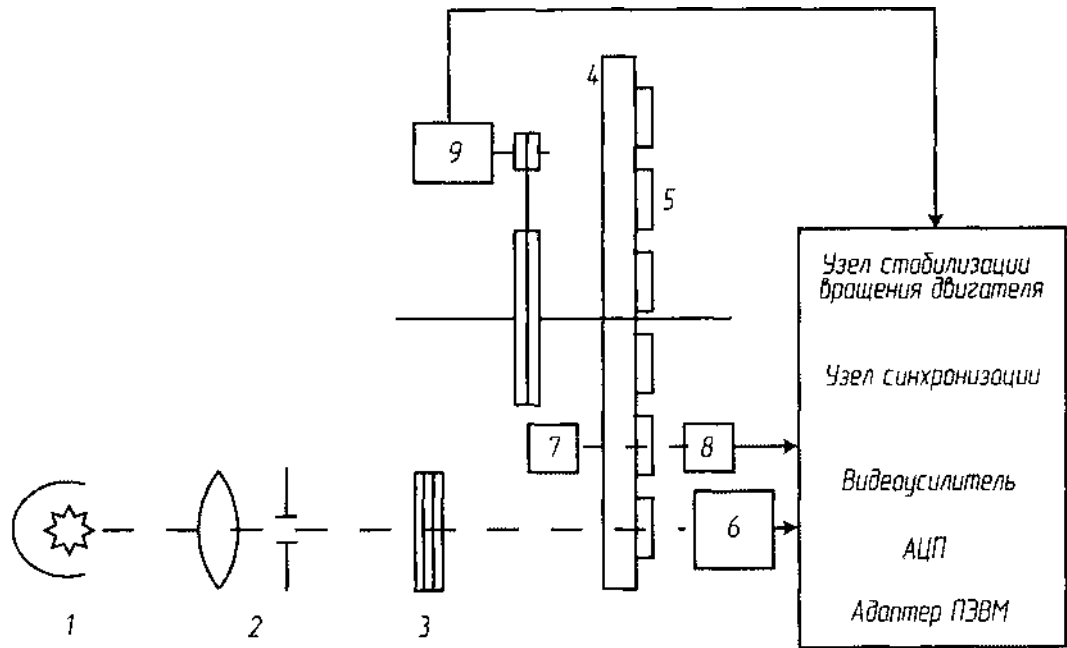


Рис 5. Упрощенная оптико-механическая схема анализатора

Диск приводится во вращение двигателем (9) со скоростью 1-2 об/сек. С помощью блока светодиодов (7), блока фотодиодов (8) и специальных синхронизационных отверстий на диске модулятора формируются синхроимпульсы, которые поступают в узел синхронизации, осуществляющий правильную работу всех процессов и узлов анализатора. С фотоприемника (6) сигналы поступают на видео усилитель, где они частично обрабатываются и преобразовываются. В аналого-цифровом преобразователе (АЦП) сигналы преобразуются в цифровую форму и через адаптер поступают на шину ПЭВМ. Положение и число исследуемых диапазонов выбрано, исходя из особенностей спектров поглощения воды и фундаментальных органических компонентов крови. Цикл девяти измерений не превышал 1 секунды. Спектральная область действия прибора составляла от 3500 до 960  $\text{см}^{-1}$ , объем исследуемого материала 0,02мл. С помощью интерференционных фильтров выделялись следующие диапазоны: 3500 - 3200, 3085 - 2832, 2120 - 1880, 1710 - 1610, 1600 - 1535, 1543 - 1425, 1430 - 1210, 1127 - 1057, 1067 - 930  $\text{см}^{-1}$ . Инфракрасное излучение от источника (глобар) проходит через пустую кювету (режим калибровки) и с помощью модулятора (за один цикл) разделяется на девять спектральных зон (рис.6). В результате такого преобразования формируется группа из девяти показателей, каждый из которых

имеет свой признак и временной момент появления.

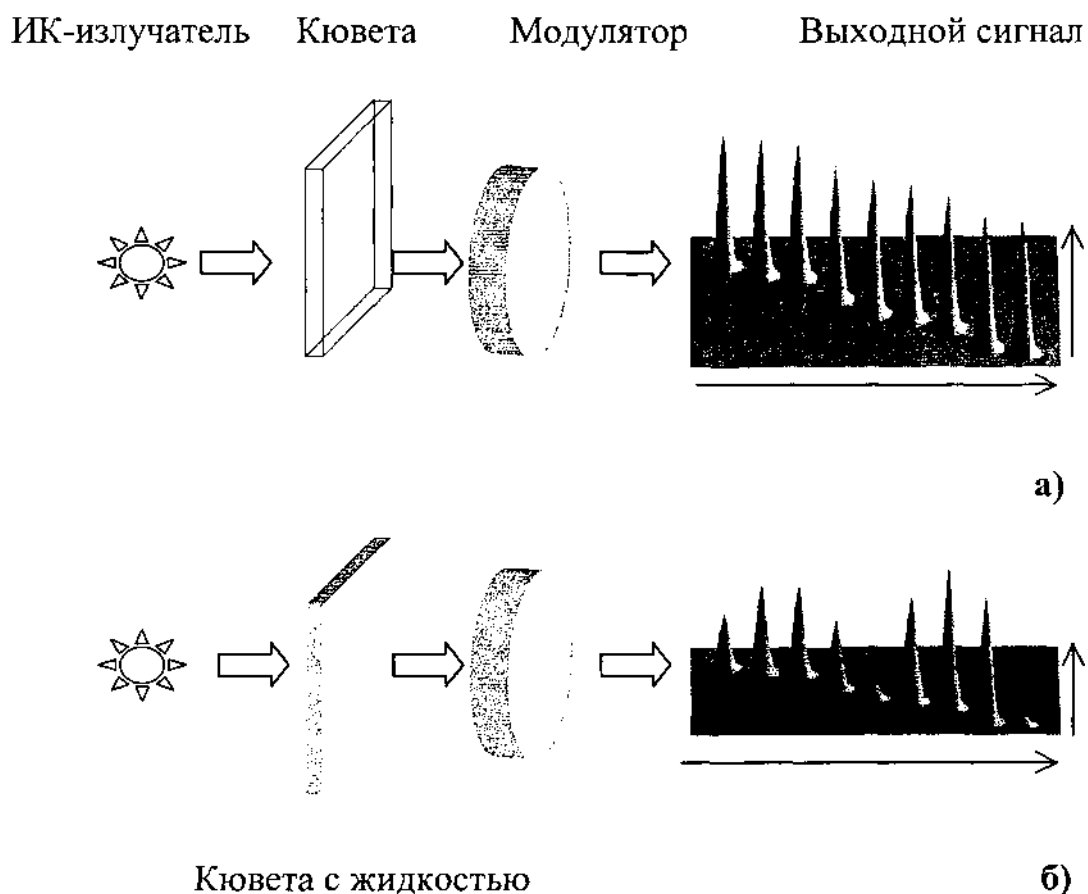


Рис 6. Схема режима калибровки (а) и эксперимента (б)

В случае отсутствия жидкости в кювете амплитуда показателей в любой момент времени одинакова и равна 100%, если в кювете находится жидкость (рис. 7) показатели с разными индексами признака будут иметь различную амплитуду, определяемую молекулярным спектром жидкости, который в свою очередь функционально зависит от связей между атомами молекулы и ее вращательно-колебательной характеристикой. Эти различия в амплитуде признаков представляют портрет или профиль исследуемой жидкости, который для каждой жидкости является индивидуальным и легко узнаваемым, после соответствующей алгоритмической обработки массива данных. Структура массива данных имеет принципиальное значение для использования того или иного алгоритма обработки, что важно для принятия правильного решения относительно определяемых

СВОЙСТВ ЖИДКОСТИ.

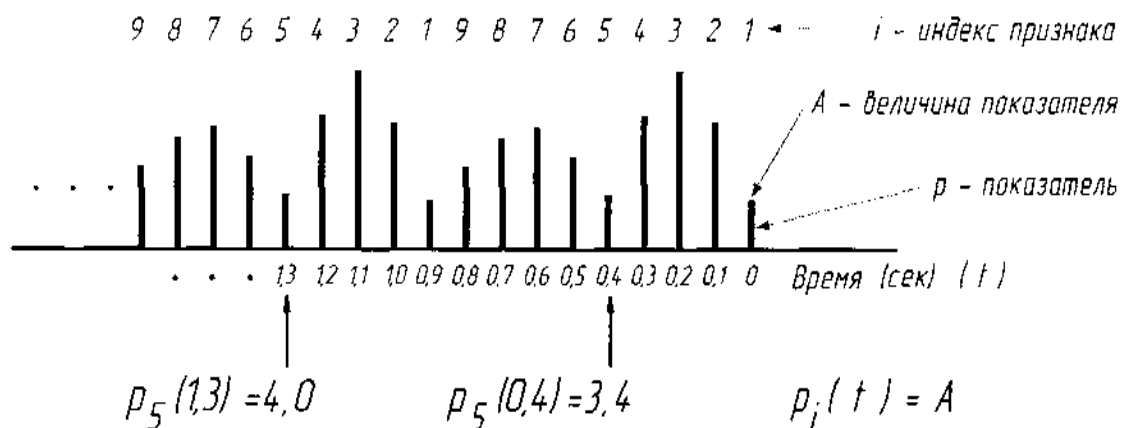


Рис 7. Схема получаемых показателей пропускания

Показатели пропускания со своими индексами на выходе спектроанализатора появляются последовательно, через 0,1 сек (рис. 9). Для дальнейшей обработки данные формируются в математическую структуру, называемую матрицей (таблица) показателей, которая состоит из 32-х строк и 9-ти столбцов. Номер строки матрицы обозначает наблюдение (один цикл преобразования спектра модулятором), к которому относится показатель, столбец - индекс признака показателя. Спектрометр сертифицирован как новый тип измерителя (сертификат № 5745 от 20.11.1998), который позволяет регистрировать П.П. ИК-излучения после их многократного определения в девяти широких диапазонах в слоях жидкости толщиной 15мк. Кюветы, в которых проводили анализы, изготовлены из сплава хлористо-бромистого и йодисто-бромистого талия (KRS). Для сравнения состояний исследуемых систем в качестве эталона сравнения были взяты предварительно определенные значения П.П. ИК-излучения тонких слоев бидистиллированной воды. В процессе создания эталона было изучено влияние на дисперсию П.П. температурного фактора, а так же особенностей действия на состояние воды водонерастворимых материалов кюветы (германия, кремния, стекла, кварца). Полученные данные были

учтены при калибровке прибора и создания программного обеспечения. Первичную обработку сигнала с аппаратно-программного комплекса «ИКАР» и аппаратных данных проводили специализированным программным обеспечением, разработанным для этих целей на базе операционной системы Windows XP в вычислительной среде системы MATLAB 6.5 фирмы Math Works Inc (лицензия №146229).

### **2.2.2. Способ исследования воды и водосодержащих систем на АПК «ИКАР»**

При температуре  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  пробу воды помещали в кювету ИК-спектрометра и многократно определяли П.П. ИК-излучения в течение 30 секунд каждую секунду. Из полученных данных рассчитывали величину дисперсии. Причем особенности ее временных изменений в конкретный момент времени отражали состав и суммарный эффект влияния различных веществ, присутствующих в воде в минимальных количествах, на ее физико-химические свойства. Это позволило идентифицировать пробы, имеющие различное состояние, при этом в качестве образца сравнения использовали дисперсию эталона (бидистиллированной воды) [59].

Пробу сыворотки крови после взятия помещали в кювету ИК-спектрометра. В течение 30 секунд через каждую секунду проводилась измерение П.П. ИК-излучения сыворотки крови. Используя полученные данные, определяли величины П.П. и дисперсий в исследуемом временном интервале. На основании полученных данных посредством многомерного анализа выводили обобщенную дисперсию для дальнейшего расчета критерия Бартлетта. Статистический и динамический анализ показателей ИК-спектра в исследуемом диапазоне длин волн позволил качественно определить изменения состояния сыворотки крови, выраженное в целостных критериях Махаланобиса и Бартлетта. После чего создавалась пространственная модель, визуально характеризующая состояние биологической

системы крови в норме и патологии [24, 74].

### 2.2.3. ИК - спектрометрия с Фурье преобразованием

Снятие спектра с помощью спектрометра включает два этапа. Первый - регистрация интерферограммы, т.е. выходного светового потока в зависимости от разности хода разделенной на когерентные пучки входной волны от источника. После чего, путём обратного преобразования Фурье (по разности хода), вычисляется спектр. Вторая часть требует большого объема вычислений, в связи с чем метод получил широкое распространение только с появлением современных компьютеров.

В работе использовался спектрометр Nicolet IS10. Оптическая схема которого представлена на рис.8.

Интерферометр содержит два взаимно перпендикулярных зеркала - неподвижное 1 и подвижное 2 и полупрозрачную светоделительную пластину 3, расположенную в месте пересечения падающих пучков излучения и пучков, отраженных от обоих зеркал. Пучок излучения от источника 4, попадая на пластину 3, разделяется на два пучка. Один из них направляется на неподвижное зеркало 1, второй - на подвижное зеркало 2; затем оба пучка, отразившись от зеркал, выходят через светоделитель из интерферометра в одном и том же направлении. Далее излучение фокусируется на образце 5 и поступает на детектор излучения 6. Два пучка отличаются друг от друга оптической разностью хода, величина которой меняется в зависимости от положения подвижного зеркала. В результате интерференции пучков интенсивность результирующего потока периодически меняется (модулируется). Частота модуляции зависит от частоты падающего излучения и смещения подвижного зеркала  $x$ . В результирующей интерферограмме выделяется так называемая точка нулевой разности хода, или точка белого света. В этой точке для всех частот наблюдается максимум; от нее ведут отсчет смещения подвижного зеркала.

При поглощении образцом излучения любой частоты наблюдается уменьшение интенсивности интерферограммы, соответствующей этой частоте. После проведения Фурье-преобразования в полученном спектре наблюдается полоса поглощения образца. Преобразование Фурье первичного сигнала, полученного с аппарата, осуществляли на компьютере в программной среде OMNIS.

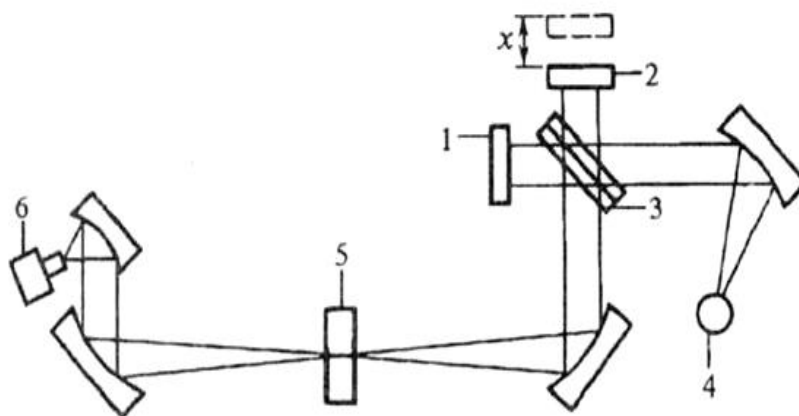


Рис.8. Оптическая схема Фурье-спектрометра: 1 - неподвижное зеркало интерферометра; 2 - подвижное зеркало; 3 - светоделительная пластина (светоделитель); 4 - источник излучения; 5 - исследуемый образец; 6 - детектор излучения

При выполнении работы использовались приставки, входящие в комплект поставки аппарата: на пропускание; горизонтальная приставка неполного внутреннего отражения (НПВО), устойчивая к воздействию агрессивных сред. Использование приставки НПВО позволило нам исследовать высушенные образцы биологической жидкости.

#### 2.2.4 Способ исследования крови на ИК-спектрометре с Фурье преобразованием

ИК-спектры анализируемых образцов изучались в диапазоне длин волн 4000-400  $\text{см}^{-1}$ , при 32 параллельных сканах и разрешении 4  $\text{см}^{-1}$  с использованием приставки НПВО с кристаллом из ZnSe.

Для получения ИК спектров исследуемые образцы сыворотки крови помещались на прозрачную подложку и при комнатной температуре ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ) сушили в ламинарном потоке воздуха на подложке из полистерола, после чего пробу переносили на кристалл ZnSe.

Перед измерением каждой пробы проводилась тщательная обработка приставки НПВО. Белки, входящие в состав компонентов крови, адсорбируются на поверхности кристалла ZnSe, что может привести к неточности получаемых результатов. После получения спектра каждого образца кристалл тщательно очищали водой и, дополнительно, водно-спиртовым раствором.

С целью увеличения воспроизводимости получаемых результатов, спектры подвергались нормализации по отношению к интенсивности полосы амид I (карбонильное поглощение).

### **2.2.5. Многомерный анализ результатов ИК-спектрометрии и определение критериев Махаланобиса и Бартлетта**

Анализ состояния модельных растворов и биологических систем проводили на основании данных ИК-спектрометрии с использованием комплекса методов и подходов, включавших в себя создание компьютерных объемных образов состояний и их профилей. Методы многомерного анализа позволили рассчитать целостные системные критерии Махаланобиса и Бартлетта, которые позволяют дать характеристику статистическим и динамическим свойствам системы соответственно.

Путем многомерного анализа при использовании ковариационных матриц рассчитывался критерий Бартлетта [24,74], позволяющий при наличии эталона (бидистиллированной воды) определить степень различия дисперсий свойств исследуемых веществ от эталона. Другими словами, оценить отличие или сходство динамических свойств исследуемых веществ с эталоном.

В основе расчета лежит выражение:



$$W=b*(-2\ln v),$$

Где параметры  $b$  и  $-2\ln v$  определяются по формулам:

$$b=1-(2_{j=1}^{n_j}(1/(n_j-1))-1/2_{j=1}^{n_j}(n_j-1))*3,13;$$

$$-2\ln v=2_{j=1}^{n_j}(n_j-1)*\ln|S|^{-2_{j=1}^{n_j}(n_j-1)}*\ln|S_j|,$$

Где  $n_j$ - число строк в таблице данных,

$S_j$ - ковариационная матрица данных,

$S$ - объединенная ковариационная матрица.

Величина многомерного критерия Бартлетта сравнивается с  $\chi^2_{\alpha, v}$  (Хи-квадрат распределение) при  $\alpha=0,05$ ;

$$v=n_1+n_2-2.$$

Расстояние Махаланобиса, при расчете которого производили сравнение исследуемого объекта с эталоном, позволило учесть изменения абсолютных П.П. исследуемых систем. В этом случае анализу подвергались средние значения П.П. инфракрасного излучения двух многомерных выборок биологических жидкостей.

Расстояние Махаланобиса в геометрическом смысле характеризует расстояние между многомерными объектами, которыми являются матрицы веществ и эталона, с учетом их корреляционных связей между спектральными характеристиками.

Если обозначить:

$Y_{k,n}$  – матрица спектральных характеристик вещества

$X_{m,n}$  – матрица спектральных характеристик эталона

$k, m$  – число строк матрицы  $X, Y$  соответственно

$n$ - число столбцов матрицы  $=9$ . Должно выполняться условие, что  $m \geq n$ .

Математическое выражение расстояния Махаланобиса имеет вид:

$$d = \frac{1}{k} \sum_{j=1}^k ((m - n) * \sum_{i=1}^n (A^2)^T),$$

где  $T$ - символ транспонирования матрицы,

A- промежуточная матрица, каждый элемент которой возведен во вторую степень,

$$A = \frac{R^2}{(Y-M)^T},$$

Где  $M = \frac{1}{m} * (\sum_{i=1}^m X_1, \sum_{i=1}^m X_2, \dots, \sum_{i=1}^m X_n)$ - вектор, элементы которого являются средним арифметическим столбцов матрицы X,

$$[Q,R]=qr(C),$$

Где qr - разложение матрицы C,

Q – ортогональная матрица,

R – верхняя треугольная матрица,

$$C=X-(m(M,M,\dots M))^T.$$

Для вычисления расстояния Махаланобиса в работе использовались функции СКМ MATLAB-d=mahal (Y,X).

### 2.2.6. Построение объемных образов

Объемные образы состояний исследуемых систем (рис.9) строились в следующей последовательности. Определяется среднее значение П.П. для всех девяти диапазонов исследуемой области ИК-спектра на основании 30 измерений, полученных за 30 с. Далее подсчитывались абсолютные величины отклонений для всех измерений. На основании полученных значений строится квадратичная матрица размером 9\*9, включающую 81 ячейку, содержащую значения произведений величин отклонений П.П., полученных путем последовательного их перемножения друг на друга. По диагонали матрицы находились произведения величин отклонений одинаковых диапазонов, другими словами, их дисперсии, определяющие вариацию системы, остальные ячейки принимались как ковариация.

В трехмерном пространстве вертикальные линии, перпендикулярные плоскости матрицы, соответствуют величине ковариации ячеек, которые в

последствие аппроксимировали поверхностью, конфигурация которой отражает их особенности, формируя портрет целостного состояния.

В качестве иллюстрации формы представления полученных матричных данных, они были выражены в виде объемных образов и их горизонтальных профилей

Созданный образ и его горизонтальный профиль являются усредненными и не являются количественными характеристиками, однако, могут использоваться в экспресс-диагностике системы

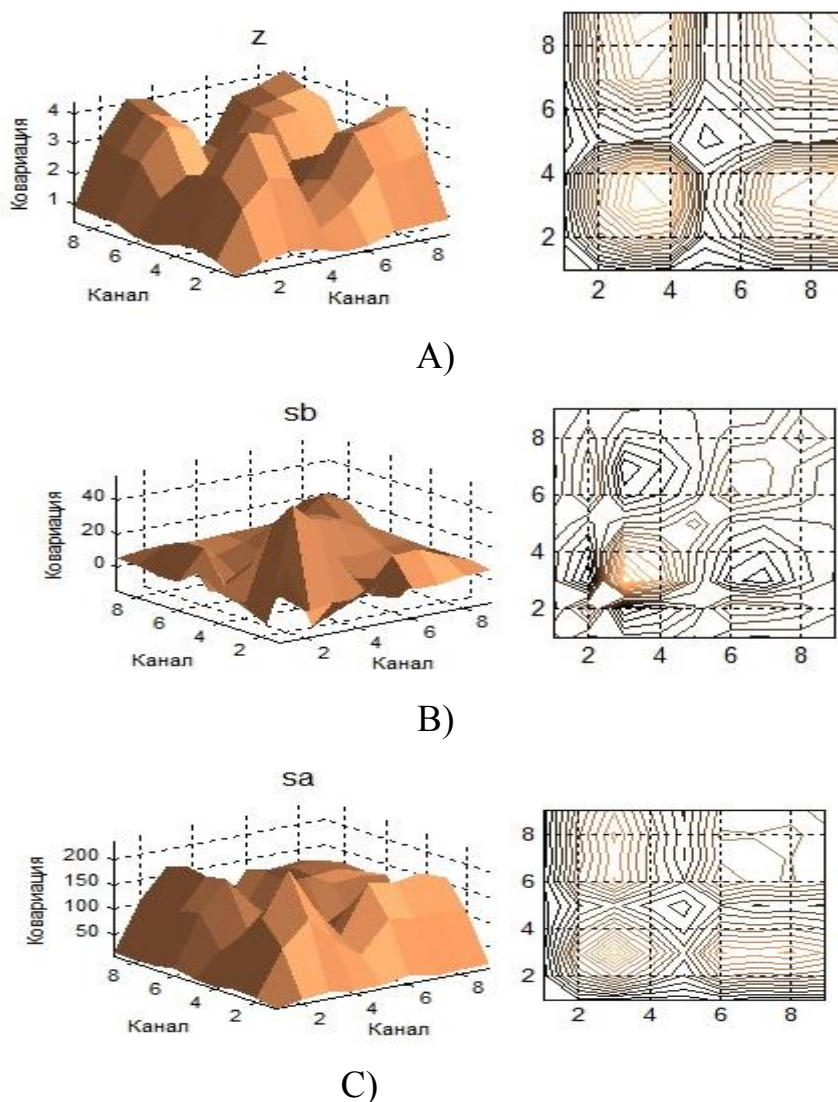


Рис.9. Пространственные модели и их горизонтальные профили детей с задержкой психического развития: здоровых (А), до лечения(В), после лечения (С)

### 2.2.7. Статистическая обработка результатов исследований

Весь полученный цифровой материал обрабатывался методом вариационной статистики по соответствующим биометрическим алгоритмам с использованием критерия Стьюдента [45].

Формулы для расчетов:

Среднее арифметическое ( $\bar{X}$ ):

$$\bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

Среднее квадратичное отклонение ( $\bar{\sigma}$ ):

$$\bar{\sigma} = \pm \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Средняя ошибка среднего арифметического (m):

$$m = \frac{\sigma}{n} = \pm \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Критерий Стьюдента (t):

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

где n – число членов вариационного ряда,

$X_i$  – числовой результат отдельного определения,

$(\bar{X} - X_i)$  – величина абсолютного отклонения каждого из членов вариационного ряда от среднего арифметического,

$(\bar{X} - X_i)^2$  – величина квадрата абсолютного отклонения каждого из членов вариационного ряда от среднего арифметического

t -показатель существенной разницы.

Различия принимались за достоверные, если есть различия между сравниваемыми величинами при  $p < 0,05$ . Статистическую обработку проводили с

помощью персонального компьютера в среде математической программной среды MatLab-5.2(лицензия №146229).

Для оценки разности двух дисперсий использовался критерий Фишера [45]. Для чего определялось расчетное значение дисперсий двух показателей в каждом диапазоне:

$$F_{\phi} = \sigma_1^2 / \sigma_2^2$$

Принято брать отношение большей дисперсии к меньшей. Затем формулируется условие нулевой гипотезы. Мы принимали в нашем случае нулевую гипотезу – равенство дисперсий, альтернативную их неравенство. Расчетное значение  $F_{\phi}$  сравнивается с табличным значением  $F_{ст}$ , если  $F_{\phi} > F_{ст}$ , то нулевая гипотеза должна быть отвергнута.

## Глава III. Результаты и их обсуждение

### 3. ИК-спектроскопия с Фурье преобразованием

#### 3.1 Фурье ИК- спектроскопия сыворотки крови здоровых подростков и с задержкой психического развития

В ИК-спектрах (рис.10) сыворотки крови подростков с патологией и без нее выявлен ряд отличий. В диапазоне длины волны  $3462\text{ см}^{-1}$ , относящейся к симметричным валентным колебаниям групп  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}$ , значительно снижена высота пика, что говорит о меньшем содержании веществ с данными функциональными группами (пептиды, липиды и т.д.). Обнаружено уменьшение высоты пика  $3417\text{ см}^{-1}$ , характеризующего симметричные валентные колебания транс  $-\text{NH}$  группы, а так же ее смещение к  $3412\text{ см}^{-1}$ . Колебания связанных транс  $-\text{NH}$  групп смещены от своего нормального положения ( $3228\text{ см}^{-1}$ ) к  $3227\text{ см}^{-1}$ , при этом происходит уменьшение высоты пика. Поглощение симметричных валентных колебаний связанных групп  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}$  из области  $3207\text{ см}^{-1}$  смещено к  $3190\text{ см}^{-1}$  и менее интенсивное. Деформационные колебания  $-\text{NH}_3^+$ , определяемые у здоровых детей при длине волны  $1311\text{ см}^{-1}$ , значительно ослаблены и смещены к  $1300\text{ см}^{-1}$  для детей с патологией.

Для валентных колебаний  $-\text{CH}$  групп ненасыщенных жирных кислот и эфиров холестерина, определяемых в области полосы  $3020\text{-}3000\text{ см}^{-1}$ , отмечено уменьшение интенсивности и смещение в сторону более длинных волн ( $3013\text{-}3030$ ). В ИК-спектре детей с ЗПР не обнаруживаются полосы, относящиеся к ассиметричным колебаниям метильной группы эфиров холестерина, триглицерида ( $2990\text{-}2950\text{ см}^{-1}$ ) и к симметричным колебаниям метильной группы эфиров холестерина, триглицеридов, глицерола ( $2880\text{-}2860\text{ см}^{-1}$ ).

Установлено смещение интенсивности полосы ассиметричных валентных колебаний группы  $-\text{CH}_2$  жирных кислот и фосфолипидов с  $2950\text{-}2880$  до  $2957\text{-}2870\text{ см}^{-1}$ . При этом определено незначительное уширение диапазона (с падением интенсивности поглощения), характеризующего симметричные валентные колебания  $-\text{CH}_3$  групп жирных кислот и фосфолипидов, от  $2870\text{-}2830\text{ см}^{-1}$  на 5

см<sup>-1</sup>, причина - различное соотношение липиды\белки в сыворотке крови больных детей. Установлено значительное увеличение площади поглощения валентных колебаний группы  $-C=O$ , определяемой в липидах, эфирах холестерина и триглицеридах (1739-1732 см<sup>-1</sup>). Полоса поглощения Амид I (1720-1600 см<sup>-1</sup>) незначительно уширена от 1723 до 1609 см<sup>-1</sup>. Полоса поглощения деформационных колебаний  $-NH_2$  группы аминокислот смещена от 1630-1560 к 1623-1559 см<sup>-1</sup>. Полоса 1609-1481 см<sup>-1</sup>, обнаруженная на спектре, является смещенной полосой поглощения колебаний Амид II (1600-1480 см<sup>-1</sup>). Незначительное уширение полосы поглощения 1480-1430 см<sup>-1</sup>, характеризующей деформационные ассиметричные и симметричные колебания групп  $-CH_3$  и  $-CH_2$ , сопровождающееся падением интенсивности поглощения. Полоса поглощения валентных колебаний группы  $-COO^-$  уширена на 3 см<sup>-1</sup> до 1430-1360 см<sup>-1</sup>. Полоса Амид III смещена от нормального положения (1330-1200 см<sup>-1</sup>) к 1331-1200 см<sup>-1</sup>. Установлено, что в диапазоне 1200-1000 см<sup>-1</sup>, где основной вклад имеют колебания групп  $-O-P=O$  фосфолипидов, фосфорилированных белков, полоса поглощения определенная в сыворотке крови первой группы ниже контрольной, что говорит о меньшем содержании названных выше веществ (табл.4, 5).

В области 3600-3450 см<sup>-1</sup> обнаружены пики, которые можно отнести к валентным колебаниям  $-OH$  групп, что говорит о наличии воды в составе гидратных оболочек биологически активных веществ крови. Область деформационных колебаний воды сыворотки (1645 см<sup>-1</sup>) исследуемой группы достоверно ниже контрольной.

При помощи программного обеспечения Omnic была проведена оценка различий в ИК-спектрах сыворотки крови исследуемых групп исходя из интенсивности и площади полос поглощения основных функциональных групп биологической жидкости. Результаты представлены в табл. 4, 5.

Количественные данные, характеризующие различия в ИК-спектрах, подтверждают разницу в составных компонентах крови и состоянии водного

компонента биологической жидкости, возникающие при задержке психического развития.

Таблица 4

**Величина поглощения основных функциональных групп в ИК-спектре сыворотки крови**

Длина волны, см <sup>-1</sup>		Поглощение, у. е.	
Здоровые	Больные	Здоровые	Больные
3462	3462	0,465	0,079
3417	3412	0,497	0,083
3228	3227	0,478	0,092
3207	3190	0,31	0,082
1342	1339	0,132	0,053
1311	1300	0,154	0,06

Таблица 5

**Площадь полос поглощения основных функциональных групп в ИК-спектре сыворотки крови**

Длина волны, см <sup>-1</sup>		Площадь полосы, у. е.	
Здоровые	Больные	Здоровые	Больные
3020-3000	3013-3030	4,73	1,035
2990-2950	-	9,771	-
2950-2880	2957-2870	17,58	2,328
2880-2860	-	3,337	-
2870-2830	2870-2825	7,869	2,19
2996-2819	3013-2821	40,015	7,258
1739-1732	1732-1739	0,232	0,543
1720-1600	1723-1609	51,047	5,063
1630-1560	1623-1559	26,52	0,937
1600-1480	1609-1481	42,484	2,097
1480-1430	1481-1430	8,785	1,527
1430-1360	1429-1362	12,807	2,160
1330-1200	1200-1331	15,661	4,547



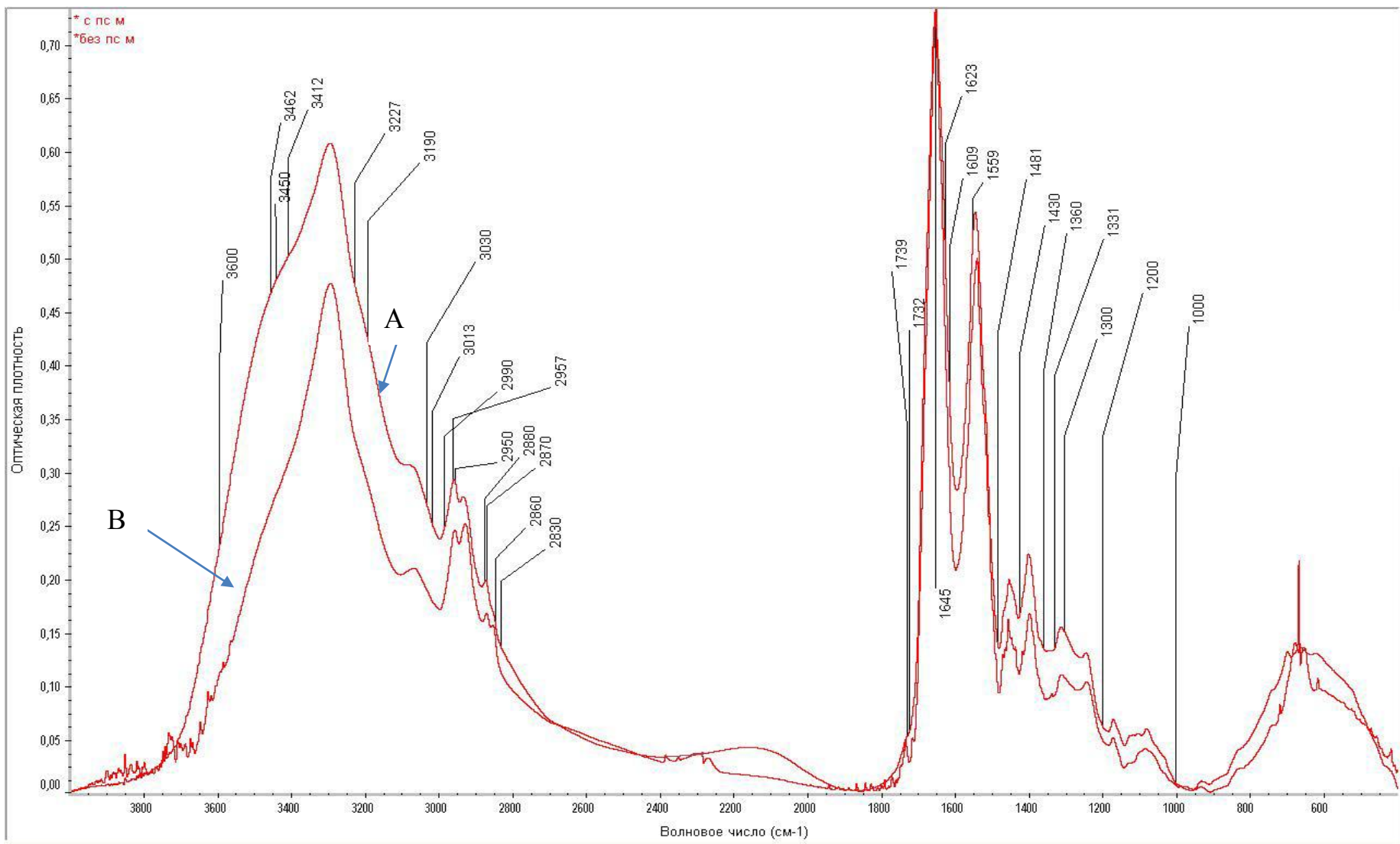


Рис.10. ИК-спектр сыворотки крови подростков здоровых (А) и с задержкой психического развития (В)

Представленные отличия в ИК-спектрах сыворотки крови можно объяснить качественными и количественными изменениями ее состава - фосфолипидов, эфиров холестерина, триглицеридов, аминокислот. Установлено, что для детей с задержкой психического развития наиболее информативными являются интенсивности полос поглощения 2990-2950 и 2880 – 2860  $\text{см}^{-1}$ .

Таким образом, основываясь на полученных данных, можно предложить ИК-спектроскопию как один из объективных методов оценки психического состояния.

### **3.2 Фурье ИК - спектроскопия модельной биологической системы, содержащей пептидный препарат**

Было проведено исследование модельной системы – 1 М раствор препарата «Кортексин» в сыворотке крови здоровых детей с помощью Фурье ИК-спектроскопии (рис. 11).

В широкой полосе колебания связанной воды в диапазоне длин волн, характеризующих валентные колебания, можно различить спектральную полосу пара-гидроксильной группы, относящуюся к тирозину, имеющую незначительное сужение и лежащую в области 3654-3583  $\text{см}^{-1}$ . Это характеризует связанные гидроксильные группы с молекулами растворителя. Обнаружены спектральные пики, характерные для имидазолил-радикала, входящего в структуру гистидина, на отрезке длин волн 3231-3504  $\text{см}^{-1}$ , что уже их нормального положения на спектре.

Малоинтенсивные валентные колебания тиольной группы(-SH) несколько смещены и уширены от нормального их положения и были обнаружены на частотах 2558-2608  $\text{см}^{-1}$ .

Для аминогруппы (-NH<sub>2</sub>) определены ассиметричные колебания при длине волны 1661-1601  $\text{см}^{-1}$ , а маятниковые колебания занимали свое обычное положение на 1295-1090  $\text{см}^{-1}$ . Колебания COOH- группы смещены и сужены от нормального в область, лежащую в диапазоне 1562-1601  $\text{см}^{-1}$ .

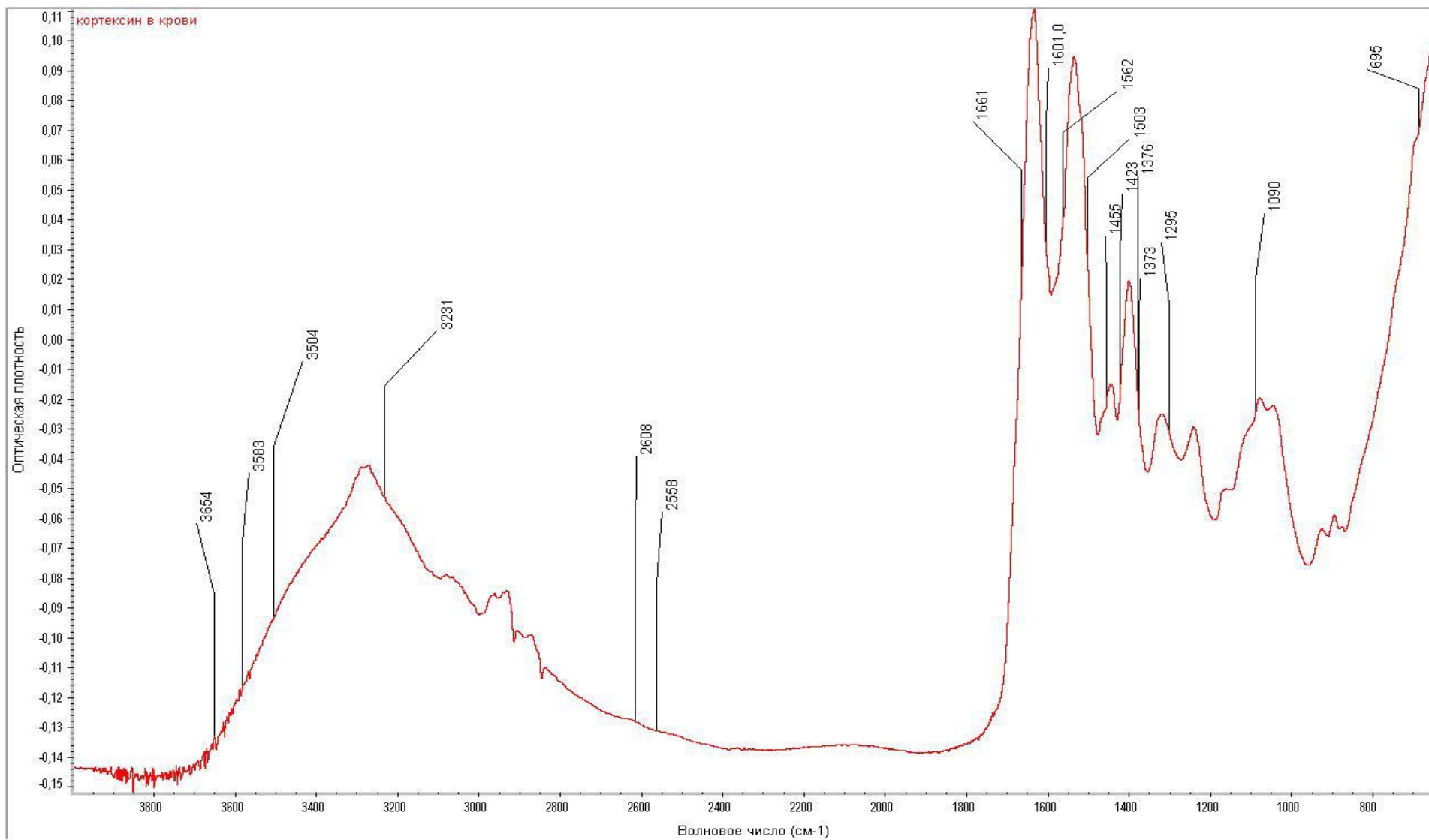


Рис.11. ИК - спектр препарата «Кортиксин» в сыворотке крови здоровых подростков концентрацией 1 М

Скелетные колебания иминогруппы, содержащейся в составе пролина, лежат в области  $1601-1373 \text{ см}^{-1}$  и, практически, не отличаются от нормального их положения.

Скелетные и деформационные колебания бензольного цикла, относящегося к фенилаланину и тирозину, уширены и лежат в диапазоне длин волн ИК-спектра  $1455-1503$  и  $695 \text{ см}^{-1}$  соответственно.

Деформационные колебания -ОН группы, относящейся к ряду органических компонентов: фенилаланину, треонину и серину, определены в интервале  $1423-1376 \text{ см}^{-1}$ , что значительно отличается от обычного ее положения. Это связано с образованием новых водородных связей между функциональной группой и водным компонентом сыворотки крови. Положение спектральных пиков, характеризующих, гуанидиновую функциональную группировку, принадлежащую аргинину обнаружены нами в области  $1687-1470 \text{ см}^{-1}$ .

Таким образом, на ИК-спектре исследованной модельной системы определены колебания функциональных групп веществ, входящих в состав препарата «Кортексин» и не обнаружены связи, образующиеся за счет реакций взаимодействия данных веществ.

Для оценки влияния препарата «Кортексин» на водную составляющую сыворотки крови рассчитали площадь полос ИК-спектра, характерных валентных, деформационных и либрационных колебаний воды. Полученные результаты представлены в таблице 6.

Как следует из полученных экспериментальных данных, во всех анализируемых диапазонах наблюдается достоверное изменение исследуемой величины, что можно отнести на увеличение активности водной основы модельной системы.

Таким образом, наблюдаемые изменения показателей ИК-спектра сыворотки крови под влиянием экзогенного фактора (лекарственный препарат) указывают на стабилизацию водной основы исследуемой модельной системы.

Таблица 6.

**Величина полос поглощения ИК-спектра водной основы сыворотки крови при воздействии лекарственного препарата «Кортексин» (1М)**

Вид колебаний	Величина полосы поглощения сыворотки крови детей с патологией, у. е.	Величина полосы поглощения модельного раствора (сыворотка крови больных детей с лекарственным препаратом), у. е.
Валентные	26,67	44,77
Деформационные	2,64	3,096
Либрационные	0,0174	0,085

#### **4. Анализ показателей целостного состояния биологических систем**

##### **4.1 Широкополосная инфракрасная спектрометрия сыворотки крови здоровых подростков (контрольная группа)**

Исследование сыворотки крови проводили на аппаратно-программном комплексе «ИКАР». Установлено, что контрольная группа пациентов обладает однородной структурой и может быть отнесена к «норме» с дальнейшим использованием в качестве «эталона».

В дальнейшем проводилось определение П.П. сыворотки крови у пациентов с задержкой психического развития.

Достоверность множественных различий проверялась параметрическим методом (критерий Стьюдента) после предварительной проверки данных на нормальность функций распределения. Расчетные величины получены при уровне значимости –  $p < 0,05$ . Установлены достоверные отличия П.П. во всех анализируемых диапазонах ИК-спектра между контрольной группой и детьми с задержкой психического развития (табл.7).

Анализ изменения П.П. выявил значимые различия в диапазонах: 3500–3100, 1600-1535, 1067-930  $\text{см}^{-1}$ , характеризующих валентные, деформационные и либрационные колебания связей молекул воды сыворотки крови.

Таким образом, широкополосная инфракрасная спектроскопия, проводимая с помощью аппаратно-программного комплекса «ИКАР» позволяет проводить анализ не только всех составных компонентов крови, но и состояния водного компонента, характеризующего уровень здоровья.

#### 4.2 Анализ влияния медикаментозной терапии на показатели пропускания ИК-спектра сыворотки крови детей с задержкой психического развития

По литературным источникам, «Кортексин» обладает мембранотропным действием, что служит основанием для его использования в терапии подростков, страдающих психическим расстройством.

Таблица 7

**Показатели пропускания ( $M \pm m$  (%)) в контрольной группе и в группе пациентов с задержкой психического развития**

Диапазон, см <sup>-1</sup>	Группа	Контроль	Исследуемая группа
	Показатели пропускания		
3500-3200		2,36±0,09	4,89±0,19
3085-2832		9,02±0,36	46,91±1,78
2120-1880		34,84±1,33	86,39±3,41
1710-1610		19,71±0,76	65,85±2,5
1600-1535		8,20±0,33	13,40±0,51
1543-1425		15,45±0,59	36,19±1,8
1430-1210		15,12±0,57	36,69±1,46
1127-1057		16,49±0,66	47,75±1,9
1067-930		13,91±0,52	45,87±1,75

Кортексин вводился внутримышечно в дозе 10 мг 1 раз в 2 дня, курс лечения составил 10 инъекций. Для определения эффективности лечения использовалась ИК-спектрометрия сыворотки крови на 7 день после последней инъекции препарата. Анализ полученных данных позволил установить достоверные отличия в составе сыворотки пациентов до и после терапии во всех исследуемых диапазонах (таб.8).

Среди наиболее информативных областей ИК-спектра были отмечены области: 1750-1610 см<sup>-1</sup>, характеризующая поглощение –C=O связи, которая

содержится во всех фосфолипидах; 1067-930  $\text{см}^{-1}$ , определяющая фосфатидные связи –Р-О-С и –Р-ОН, присущие фосфатидилинозитолу, фосфатидилэтаноламину и фосфатидилсерину.

Таблица 8

**Показатели пропускания ИК-спектра сыворотки крови подростков с задержкой психического развития до и после лечения препаратом «Кортексин» (%),  $M \pm m$**

Группа Диапазон, $\text{см}^{-1}$	До лечения	После лечения	Р
	Показатели пропускания		
3500-3200	4,89±0,19	1,87±0,07	Р <0,05
3085-2832	46,91±1,78	6,78±0,26	Р <0,05
2120-1880	86,39±3,41	31,47±1,24	Р <0,05
1710-1610	65,85±2,5	16,58±0,66	Р <0,01
1600-1535	13,40±0,51	7,38±0,31	Р <0,05
1543-1425	36,19±1,8	13,88±0,54	Р <0,05
1430-1210	36,69±1,46	12,34±0,61	Р <0,05
1127-1057	47,75±1,9	13,60±0,68	Р <0,05
1067-930	45,87±1,75	10,82±0,47	Р <0,01

После курса лечения в данных областях происходит понижение значений П.П. в 3,9 и 4,2 раза соответственно. Указанные особенности ИК-спектра сыворотки крови свидетельствуют об активации метаболизма фосфолипидов и увеличение концентрации основных представителей данного класса соединений в сыворотке под действием препарата «Кортексин».

Установлено, что П.П. ИК-спектра сыворотки крови подростков с задержкой психического развития после лечения препаратом «Кортексин» приближены к таковым для группы здоровых детей.

Таким образом, результаты ИК-спектрометрии сыворотки крови подростков с задержкой психического развития, свидетельствует об эффективности



применения препарата «Кортексин» у данной категории детей, и способности данного препарата корректировать метаболические нарушения, свойственные данной патологии и использоваться для оценки эффективности лечения психических расстройств.

## 5. Инфракрасная спектроскопия модельных растворов

### 5.1 Фурье ИК-спектроскопия модельных систем, содержащих нейтральные аминокислоты и их смесь

В дальнейших этапах исследования проводили изучение ИК-спектров отдельных компонентов лекарственного препарата «Кортексин» и их смесей.

Результаты ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием водных 1 М растворов Гли, Ала а так же их смеси, полученного путем смешивания равных количеств 1 М растворов исследуемых аминокислот представлены на рисунке 12.

Спектр 1 М растворов нейтральных аминокислот Гли и Ала позволили обнаружить полосу поглощения в области  $3130 - 3030 \text{ см}^{-1}$ , характеризующие валентные колебания  $\text{NH}_2$  группы средней силы. При этом в диапазоне  $3000-3600 \text{ см}^{-1}$  определяются пики, характеризующую сильные валентные колебания гидроксильной группы воды [8]. В области  $3100-3150 \text{ см}^{-1}$  проявляются пики водородных связей, которые свидетельствует об увеличении их энергетики и структурировании воды. В диапазонах  $2800-2850, 2900-2950 \text{ см}^{-1}$  обнаружены валентные колебания группы  $\text{CH}_3$ - Ала, обладающие средней силой. Наблюдали спектральные пики в интервале длин волн  $2800-2200 \text{ см}^{-1}$ , что свидетельствует о проявлении взаимодействия  $\text{OH}$ -групп воды с аминогруппами кислот. Деформационные колебания воды ( $1620 \text{ см}^{-1}$ ) незначительно отличаются по интенсивности для исследуемых растворов. В диапазоне  $1600-1560 \text{ см}^{-1}$  определены валентные колебания группы  $\text{COO}^-$ .

В диапазонах  $1660-1610$  и  $1550-1485 \text{ см}^{-1}$  отмечались полосы Пептид I и Пептид II соответственно. Различия в интенсивности максимумов  $3100 \text{ см}^{-1}$  -  $3500$  и  $1620 \text{ см}^{-1}$  для водных растворов Гли, по сравнению с растворами Ала, незначительно, что указывает на сходное действие аминокислот на структуру воды.

На следующем этапе работы было проведено исследование смеси водных растворов Гли и Ала.

В ИК-спектре наблюдается наложение спектральных полос аминокислот, при

этом не происходило исчезновения полос поглощения, отвечающих одному из компонентов, как и не образовывались новые, которые характеризовали бы образование дополнительных связей, что говорит об отсутствии химических реакций взаимодействия данных веществ.

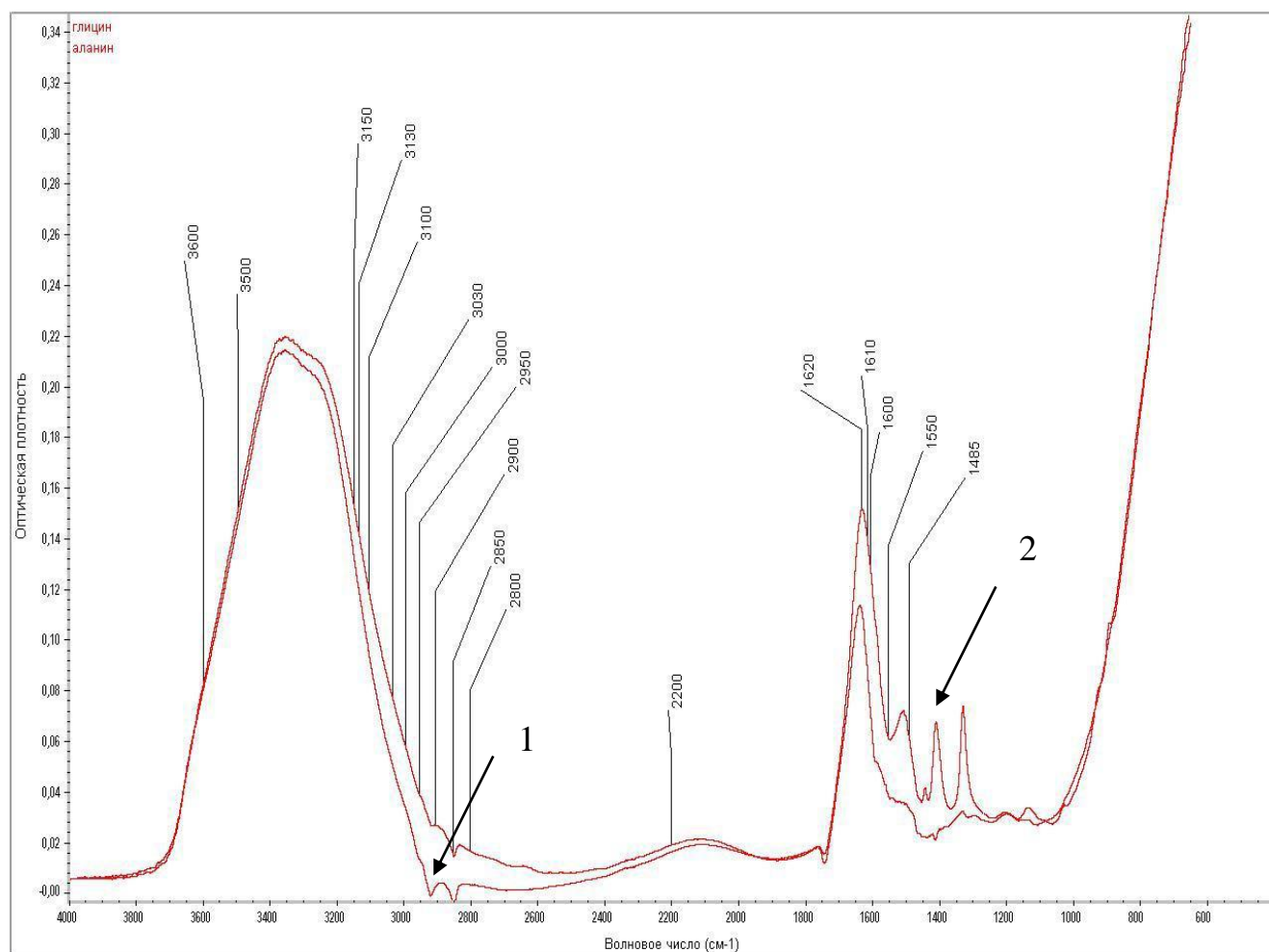


Рис.12. ИК- спектры водных 1 М водных растворов аланина (1), глицина(2)

### 5.1.1. Влияние малых количеств нейтральных аминокислот на дисперсии показателей пропускания ИК-излучения

На данном этапе эксперимента с помощью аппаратно-программного комплекса «ИКАР» проведены изучение и анализ П.П. ИК-спектра растворов аминокислот в разведении от 1 М до  $10^{-16}$  раз. Установлено, что малые количества

аминокислот не вызывают достоверные изменения показателя пропускания, в связи с чем анализировали колебания коэффициентов пропускания ИК-излучения растворов нейтральных аминокислот.

Обнаружено, что в диапазоне 3500-3200  $\text{см}^{-1}$  разведение Гли от  $10^1$  по  $10^6$  раз вызывает постепенное повышение дисперсии П.П. с достижением максимума при разведении  $10^8$  раз. Дальнейшее уменьшение содержания аминокислоты приводит к снижению этой величины с достижением минимальных значений, не имеющих достоверных отличий от контроля (бидистиллированная вода) (рис. 13а).

Анализ исследуемых величин в диапазоне ИК-спектра 3085-2832  $\text{см}^{-1}$  (рис. 13в) позволяет выделить 3 области изменения:  $10^{-1}$ - $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ - $10^{-12}$ ,  $10^{-12}$ - $10^{-16}$ .

В первой области наблюдается постепенное понижение изучаемого показателя с достижением минимума при разведении  $10^6$  раз.

Во второй – резкое увеличение дисперсии П.П. с появлением 2-х максимумов: в растворе с концентрацией Гли  $10^{-8}$  М и, несколько меньшего, в растворе  $10^{-11}$  М.

В третьей - незначительные колебания исследуемого признака, которые в 3-5 раз меньше, чем в 1.

В интервале 2120-1880  $\text{см}^{-1}$  (рис. 13с) установлено плавное, незначительное повышение дисперсии П.П. до разведения  $10^4$  раз. Для раствора с содержанием Гли  $10^{-11}$  М обнаружен максимум изучаемой величины, который превышает повышение дисперсии при разведении  $10^{15}$  в 2 раза.

В диапазоне 1710-1610  $\text{см}^{-1}$  при уменьшении содержания исследуемой аминокислоты от  $10^{-4}$  до  $10^{-11}$  М наблюдалось постепенное увеличение дисперсии с достижением максимального значения при концентрации  $10^{-11}$  М, что на порядок выше минимума, определяемого в растворе  $10^{-1}$  М ( $p < 0,05$ ) (рис. 14а).

В интервале 1600-1535  $\text{см}^{-1}$  наблюдаются значительные колебания величины дисперсии в растворах Гли при концентрации  $10^{-3}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-11}$  М (рис. 14в). Максимальный уровень исследуемой величины определен при  $10^{-11}$  М.

В области ИК-спектра 1543-1425  $\text{см}^{-1}$  при изменении содержания вещества в растворе от  $10^{-7}$  до  $10^{-14}$  М наблюдается резкое колебание величины дисперсии с чередованием максимальных и минимальных значений. Дальнейшее уменьшение содержания Гли в растворе до  $10^{-16}$  М приводит к снижению исследуемого показателя практически до исходного уровня (рис. 14с).

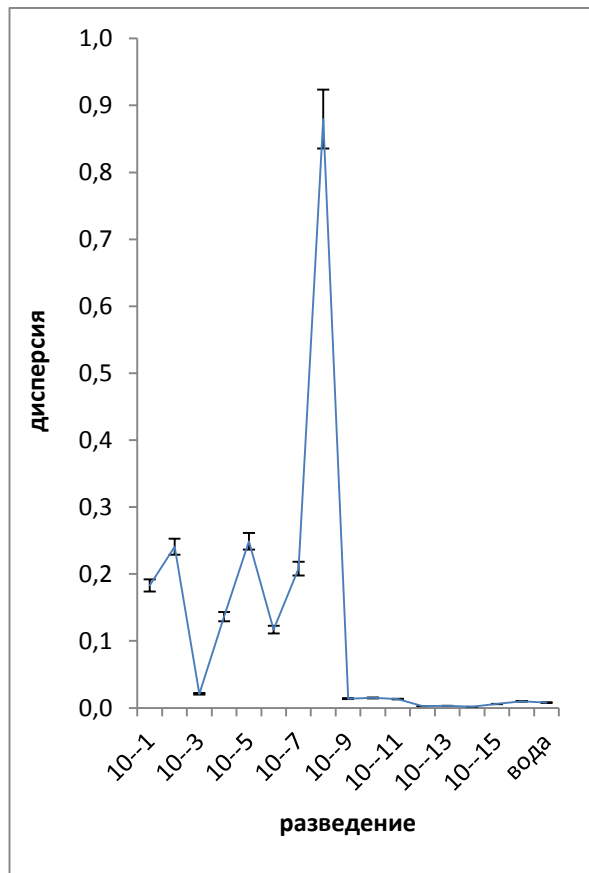
Изменение дисперсии, происходящее в диапазоне 1430-1210  $\text{см}^{-1}$  (рис. 15а) имеют сходный характер с колебаниями в интервале 1710-1610  $\text{см}^{-1}$  (рис. 14а). Однако, при этом обнаружен дополнительный максимум при концентрации  $10^{-3}$ М.

Область длин волн 1127-1057  $\text{см}^{-1}$  характеризуется незначительными колебаниями величины дисперсии. Максимум исследуемого показателя определен при концентрации  $10^{-11}$ М. Минимум, установленный для раствора Гли концентраций  $10^{-6}$  и  $10^{-13}$  М, достоверно отличается от максимума ( $p < 0,01$ ) (рис. 15в).

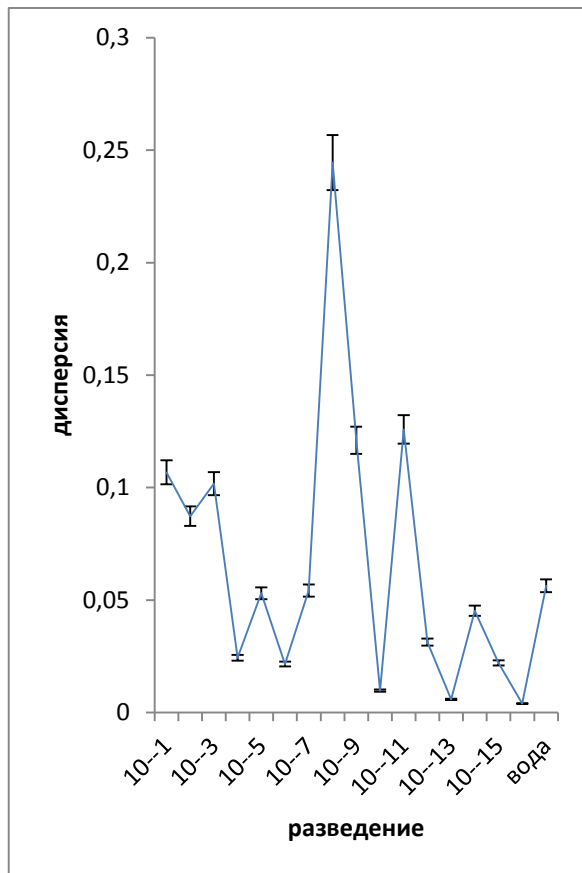
Интервал 1067-930  $\text{см}^{-1}$  характеризуется резким колебанием дисперсии с достижением максимумов при концентрации Гли  $10^{-8}$  и  $10^{-11}$  М, что выше минимального показателя, определенного для  $10^{-13}$ М, в 7 раз ( $p < 0,05$ ) (рис. 15с).

В диапазоне 1710-1610  $\text{см}^{-1}$  при уменьшении содержания исследуемой аминокислоты от  $10^{-4}$  до  $10^{-11}$  М наблюдалось постепенное увеличение дисперсии с достижением максимального значения при концентрации  $10^{-11}$ М, что на порядок выше минимума, определяемого в растворе  $10^{-1}$ М ( $p < 0,05$ ) (рис. 14а).

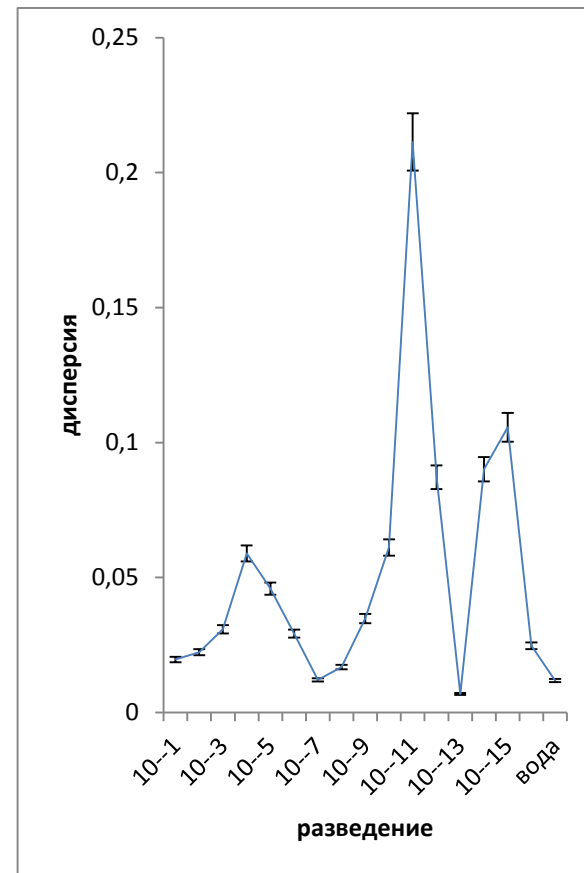
Таким образом, анализ влияния Гли на дисперсию П.П. позволил установить, что максимальное изменение величин определено для концентрации  $10^{-11}$ М во всех областях кроме 3500-3200, 3085-2832 и 1430-1210  $\text{см}^{-1}$ ; абсолютный максимум для данной концентрации лежит в области 1127-1057  $\text{см}^{-1}$ . Минимальное значение исследуемого признака установлено в диапазонах 3085-2832 и 1600-1535  $\text{см}^{-1}$  при  $10^{-16}$  М.



а)

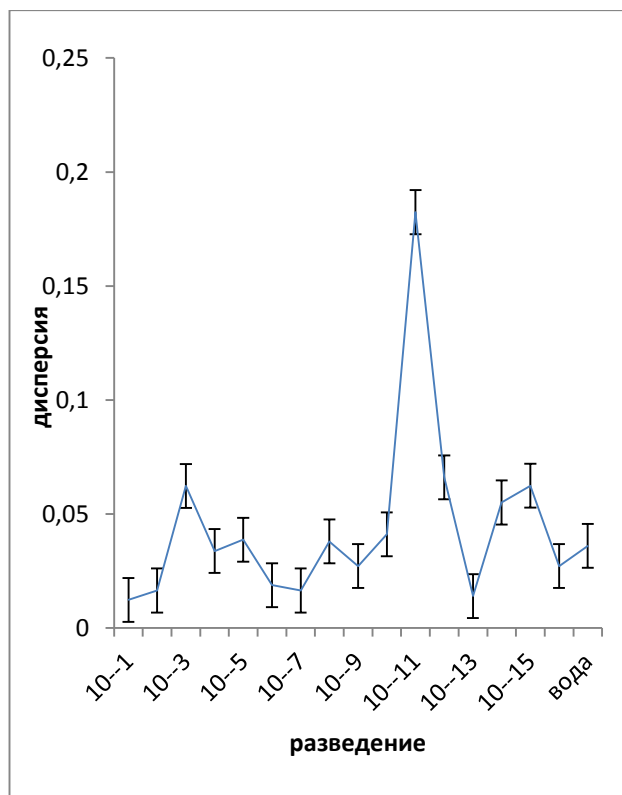


в)

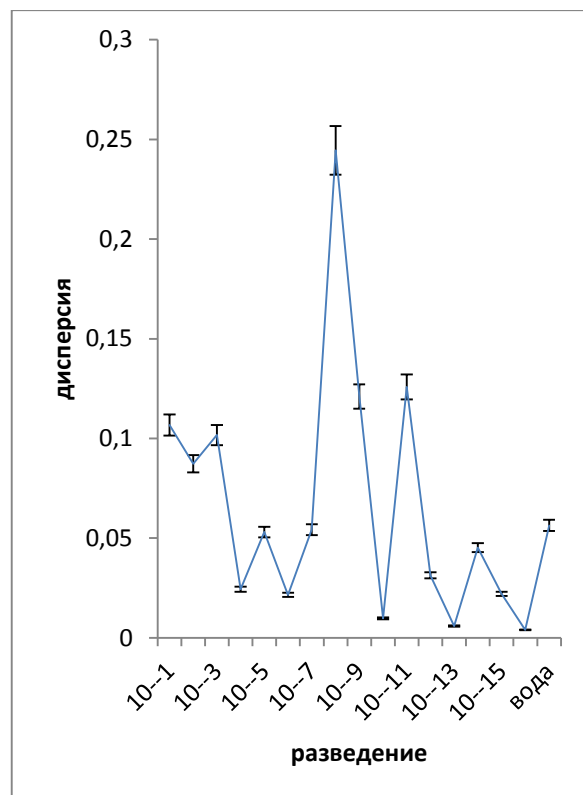


с)

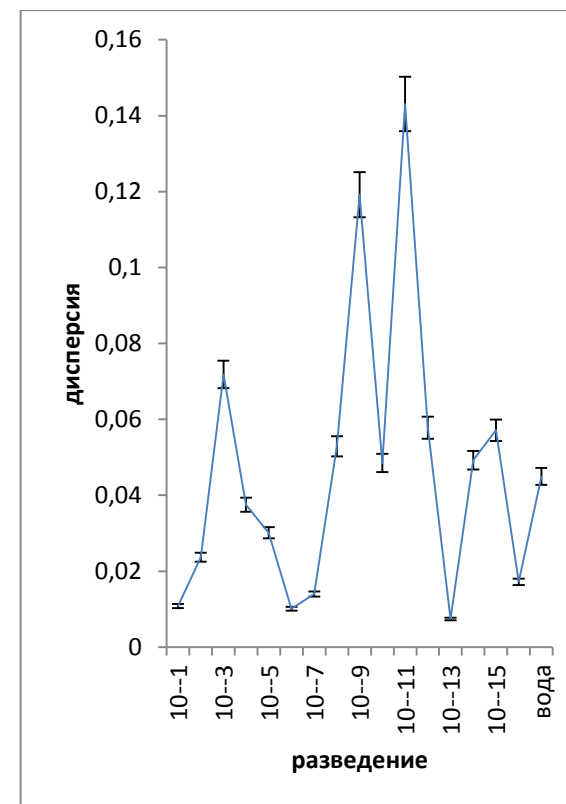
Рис.13. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов глицина концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а) 3500-3200  $\text{см}^{-1}$  в) 3085-2832  $\text{см}^{-1}$  с) 2120-1880  $\text{см}^{-1}$



а)



в)



с)

Рис.14 Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов глицина концентрацией от  $10^{-1}$ М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)1710-1610  $\text{см}^{-1}$  в) 1600-1535  $\text{см}^{-1}$  с) 1543-1425  $\text{см}^{-1}$

На следующем этапе эксперимента проводили подобный анализ для растворов Ала.

Обнаружено, что интервал 3500-3200  $\text{см}^{-1}$  характеризуется динамичным изменением величины колебания П.П. при различных разведениях исследуемого вещества. Однако, флуктуация дисперсии не превышают значения, характерного для контроля (рис. 16а).

В диапазоне 3085-2832  $\text{см}^{-1}$  следует отметить тот факт, что внесение в воду исследуемой кислоты приводит к понижению величины дисперсии, которая при дальнейшем разбавлении практически не флуктуирует (рис.16в).

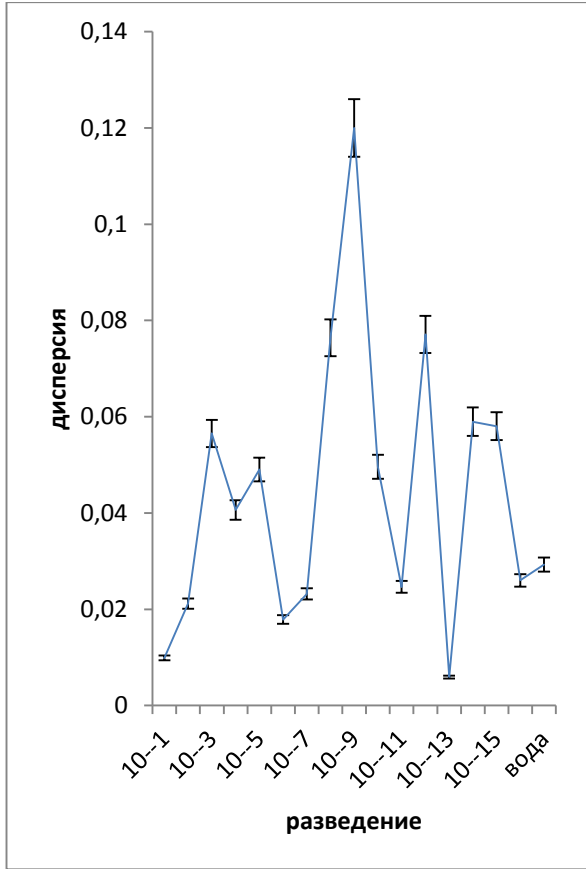
В диапазоне 2120-1880  $\text{см}^{-1}$  постепенное уменьшение концентрации Ала ( $10^{-2}$ - $10^{-5}$  М) приводит к последовательному уменьшению значения дисперсии П.П. Для интервалов  $10^{-7}$ - $10^{-11}$  М и  $10^{-12}$ - $10^{-16}$  М выявлен сходный характер изменения исследуемого признака, но в первом интервале амплитуда колебаний более выраженная (рис. 16с).

Анализ изменения величины дисперсии, происходящий под влиянием разведения, показал, что в интервалах: 1710-1610 (рис. 18а), 1600-1535 (рис.18в), 1543-1425 (рис. 18с), 1430-1210 (рис. 19а) и 1067-930  $\text{см}^{-1}$  (рис. 19с) наблюдаются сходные флуктуации П.П. ИК - спектра. Для данных диапазонов максимумы определены при разведении  $10^2, 10^8, 10^{14}$ .

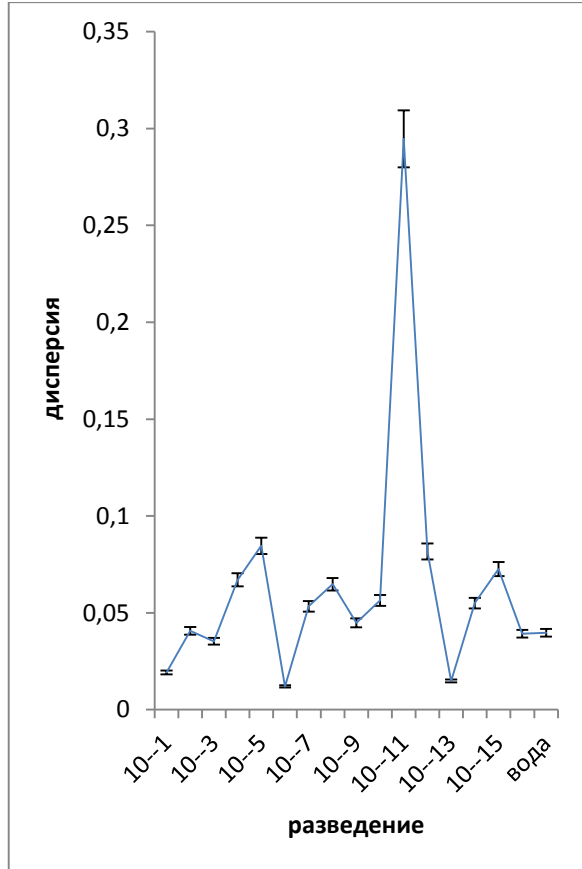
Область разведений  $10^{-2}$ - $10^{-5}$  характеризуется постепенным понижением величины дисперсии. Однако, у каждого из перечисленных диапазонов наряду со сходными признаками есть и отличия.

В интервале 1543-1425  $\text{см}^{-1}$  при концентрации Ала  $10^{-9}$ - $10^{-13}$ М исследуемая величина практически не колеблется.

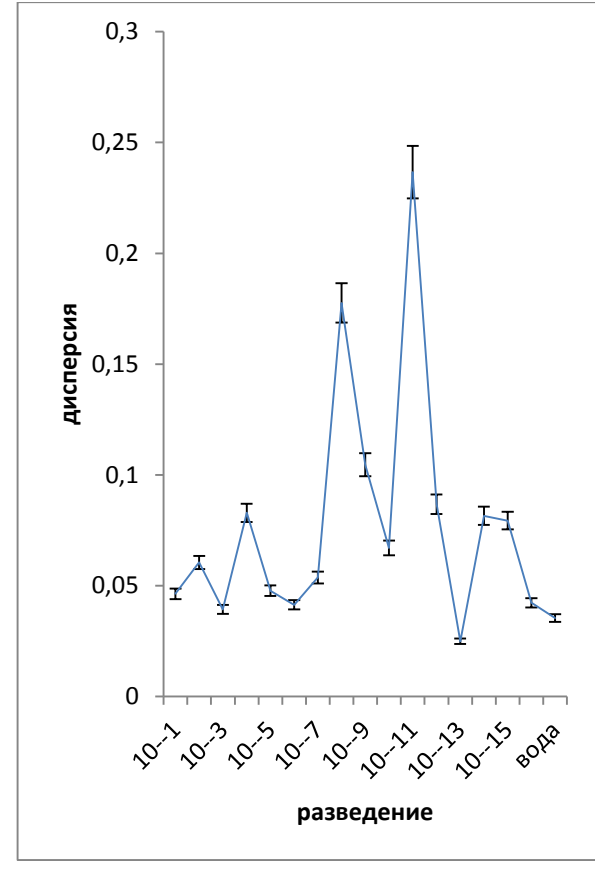




а)

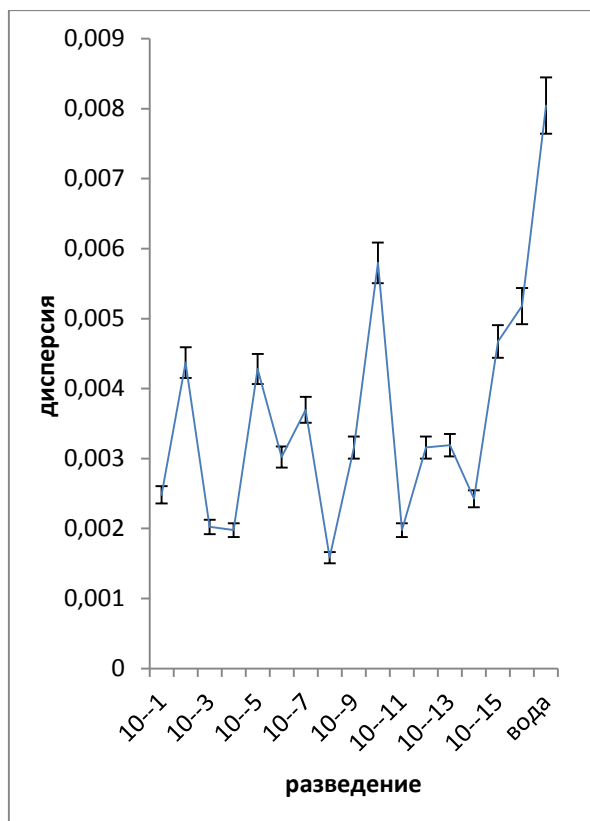


в)

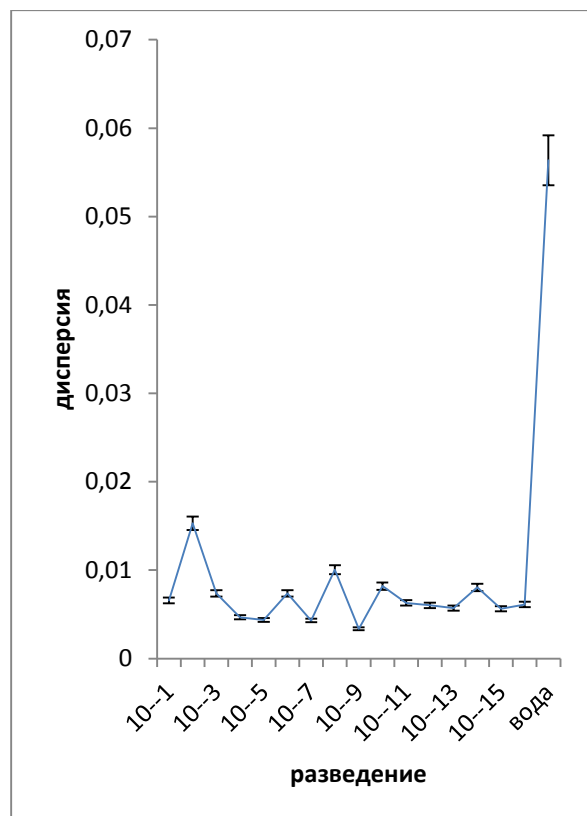


с)

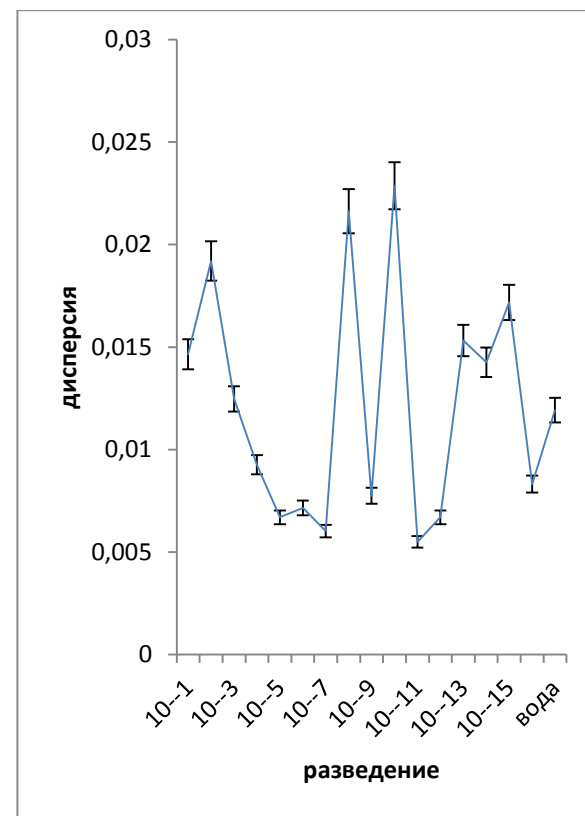
Рис.15 Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов глицина концентрацией от  $10^{-1}$ М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $1430-1210 \text{ см}^{-1}$  в)  $1127-1057 \text{ см}^{-1}$  с)  $1067-930 \text{ см}^{-1}$



а)



в)



с)

Рис. 16 Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов аланина концентрацией от  $10^{-1}$ М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а) 3500-3200  $\text{см}^{-1}$  в) 3085-2832  $\text{см}^{-1}$  с) 2120-1880  $\text{см}^{-1}$

В диапазоне  $1430-1210\text{ см}^{-1}$  (рис. 18а) интервал концентраций  $10^{-7}-10^{-15}\text{ М}$  характеризуется волнообразным изменением величины дисперсии с достижением минимума при содержании вещества  $10^{-13}\text{ М}$ , что меньше величины определенной для бидистиллированной воды в 2,2 раза ( $p < 0,05$ ).

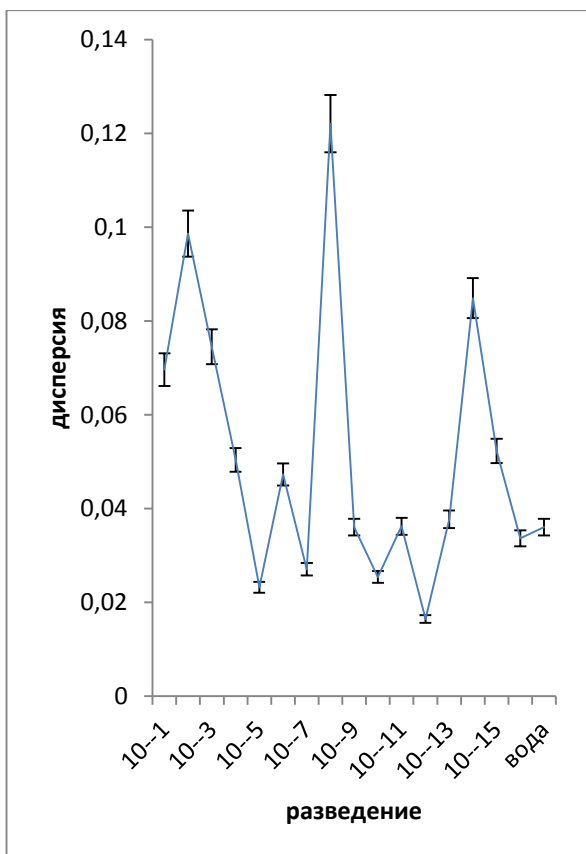
В области длин волн  $1127-1057\text{ см}^{-1}$  максимум величины дисперсии определен для концентрации  $10^{-3}\text{ М}$ , что выше минимума ( $10^{-5}\text{ М}$ ) в 3,9 раза ( $p < 0,05$ ) (рис. 18в). В растворах  $10^{-5}-10^{-10}\text{ М}$  и  $10^{-13}-10^{-16}\text{ М}$  уменьшение содержания вещества приводит к постепенному увеличению дисперсии с достижением величин равных максимальной.

Для интервала  $1067-930\text{ см}^{-1}$ , по сравнению с предыдущим диапазоном, определено смещение пика увеличения исследуемого признака с разведения  $10^{-14}$  на  $10^{-12}$  (рис. 18с).

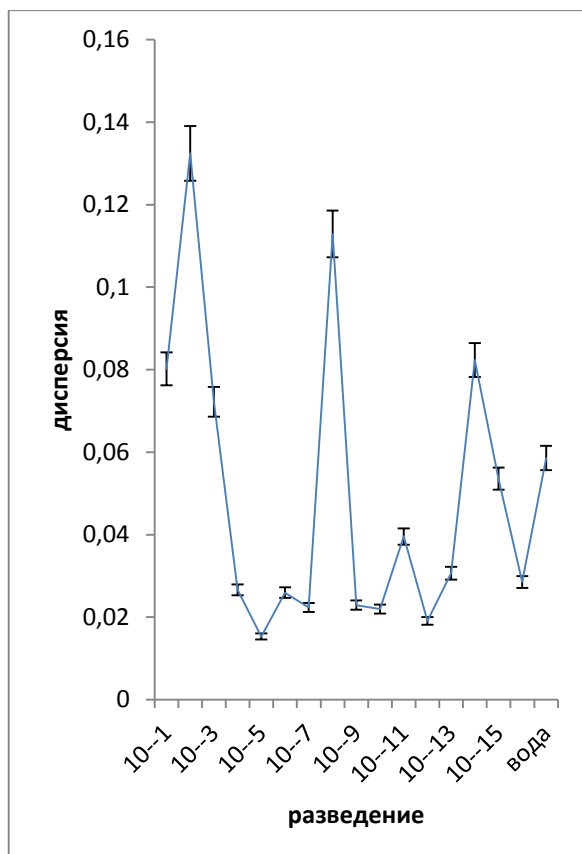
Таким образом, анализ влияния Ала на дисперсию П.П. позволил установить, что максимальное изменение этой величины определено для концентрации  $10^{-14}\text{ М}$  областей  $3085-2832$  и  $1710-1610\text{ см}^{-1}$ ; минимальные - в диапазонах  $3085-2832$ ,  $1600-1535$ ,  $1543-1425$ ,  $1127-1057$  и  $1067-930\text{ см}^{-1}$  при  $10^{-5}\text{ М}$ . Абсолютный минимум исследуемого признака лежит в области  $3085-2832\text{ см}^{-1}$  при  $10^{-5}\text{ М}$ .

### **5.1.2 Непараметрический анализ целостного состояния водных модельных систем нейтральных аминокислот**

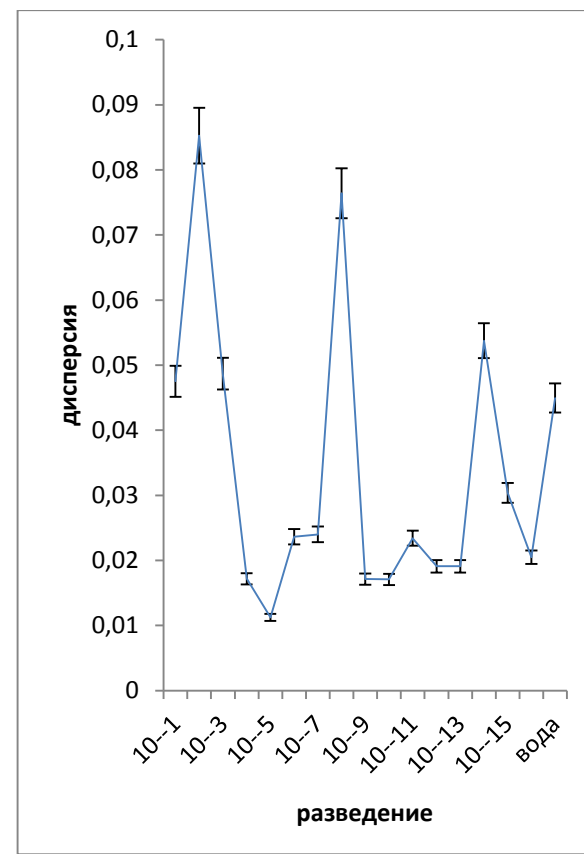
Полученные устройством данные о показателях пропускания и их дисперсиях на различных частотах ИК-спектра исследуемых областей обрабатывались компьютерными программами, позволяющими оценивать систему в целом.



а)

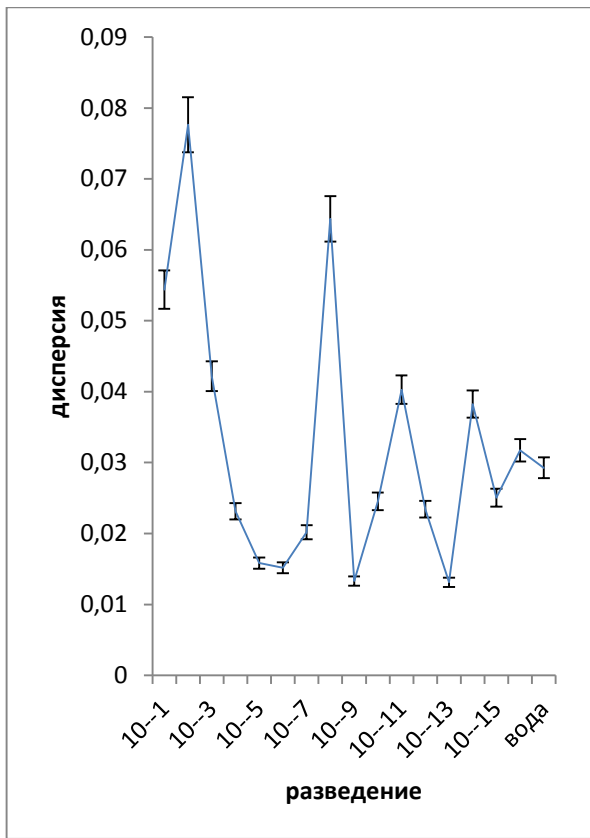


в)

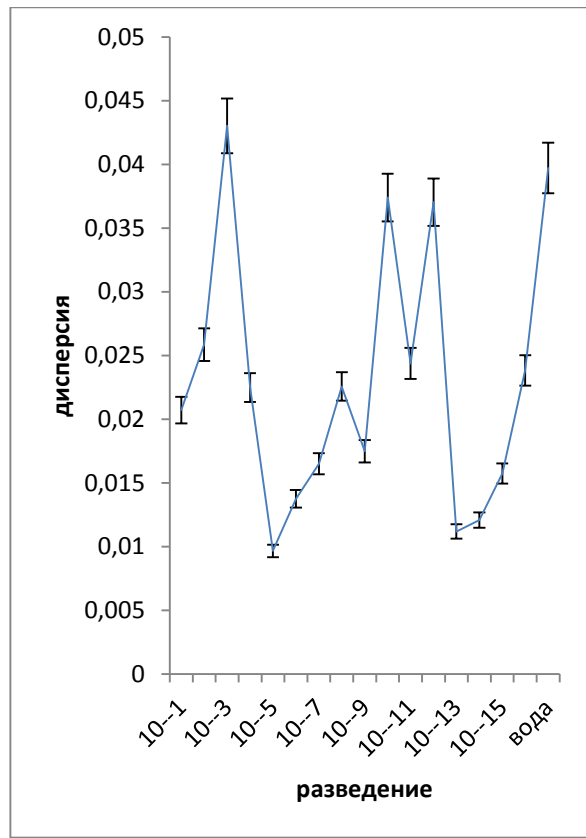


с)

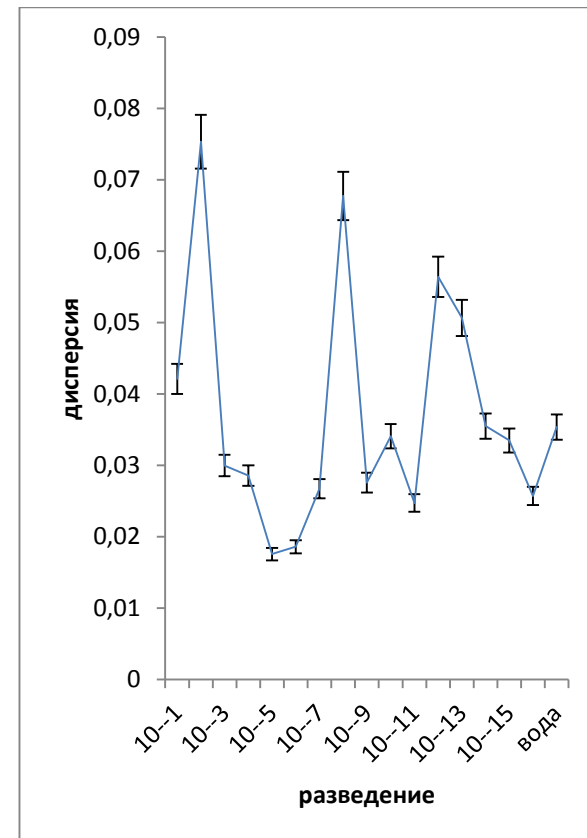
Рис. 17 Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов аланина концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $1710-1610 \text{ см}^{-1}$  в)  $1600-1535 \text{ см}^{-1}$  с)  $1543-1425 \text{ см}^{-1}$



а)



в)



с)

Рис.18 Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов аланина концентрацией от  $10^{-1}$ М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $1430-1210 \text{ см}^{-1}$  в)  $1127-1057 \text{ см}^{-1}$  с)  $1067-930 \text{ см}^{-1}$

Информация основывается на результатах корреляционного и дискриминантного анализа результатов по предварительно выбранному эталону (бидистиллированная вода), с последующим сравнением целостных показателей состояния системы по критериям Махаланобиса и Бартлетта.

Определено, что для Гли критерий Махаланобиса изменяется волнообразно с достижением максимальных значений при разведении в  $10^{16}$ . Разведения раствора Ала приводят к постепенному снижению критерия Махаланобиса, для которой минимальное значение исследуемой величины определено при максимальном разведении.

Установлено, что исходные концентрации, а так же растворы одинаковой степени разведения ( $10^{-5}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-16}$ ) имеют разнонаправленное изменение величины критерия Махаланобиса (рис.19), что скорее всего связано с противоположным действием кислот на структурное состояние водной основы растворов.

На дальнейшем этапе исследования проведен сравнительный анализ дисперсий коэффициентов пропускания отдельных исследуемых областей инфракрасного спектра, в образцах, имеющих сходные высокие или низкие критерии Махаланобиса, что может дать более детальную идентификацию состояний водных систем возникающих в присутствии различных количеств исследуемых веществ.

Анализ дисперсий П.П. растворов, с максимальным значение критерия Махаланобиса позволил установить для растворов Гли (разведения в  $10^9$  и  $10^{16}$  раз достоверные различия данного показателя во всех диапазонах длин волн (рис.20).

Для раствора Ала (разведения  $10^5$  и  $10^{14}$ ) имеются достоверные различия во всех исследуемых областях ИК-спектра, кроме области  $1127-1057 \text{ см}^{-1}$ , где определяются либрационные колебания молекул воды (рис.21).

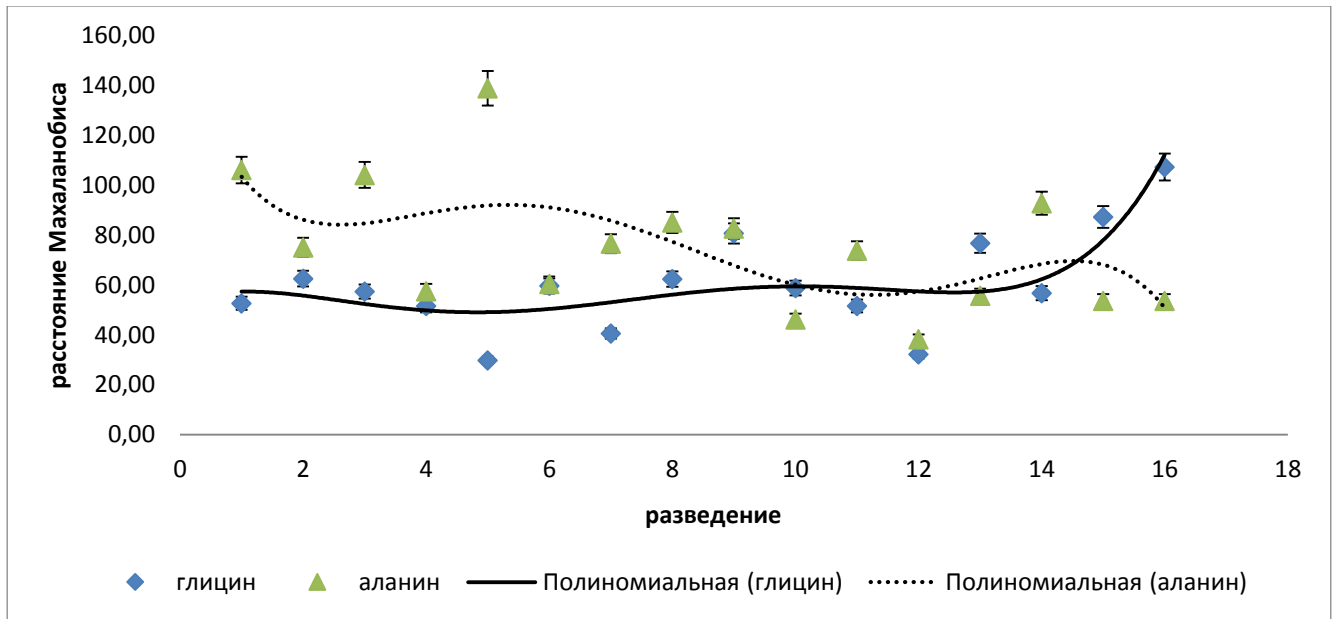


Рис.19 Влияние глицина и аланина (разведение 1 М растворов в  $10^1$ - $10^{16}$  раз) на величину флуктуации показателей пропускания ИК-излучения тонких слоев воды

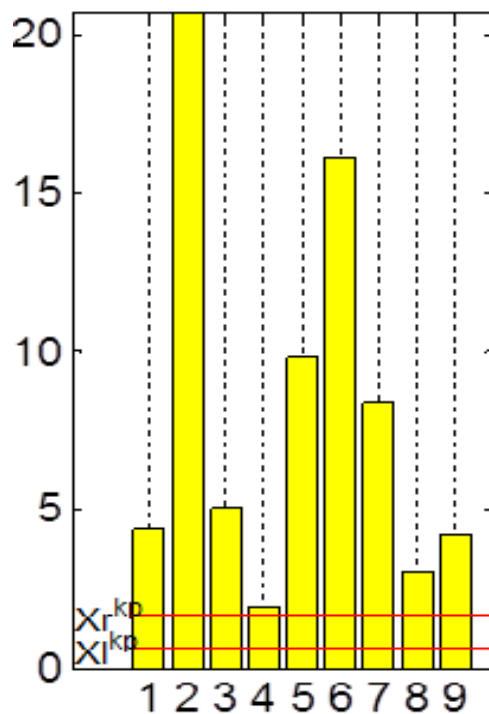


Рис.20 Сравнение дисперсий коэффициентов пропускания растворов глицина в разведении  $10^9$  и  $10^{16}$  раз по одномерному критерию Фишера

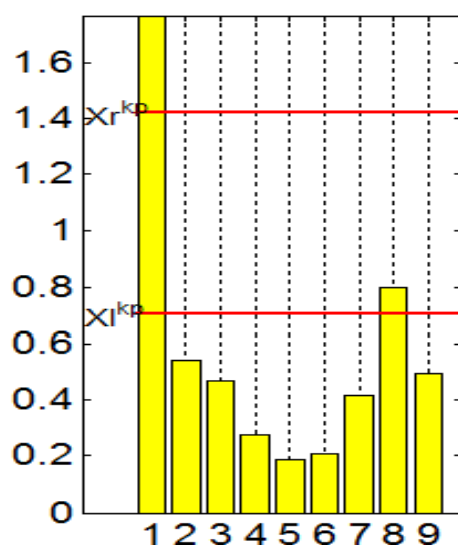


Рис.21 Сравнение дисперсий коэффициентов пропускания растворов аланина в разведении  $10^5$  и  $10^{14}$  раз по одномерному критерию Фишера

Анализ дисперсий П.П. растворов с минимальным значением критерия Махаланобиса показал, что для Гли (рис.22) и Ала (рис.23) обнаружено отсутствие достоверных отличий во всех областях, кроме  $1543-1425\text{ см}^{-1}$  и  $1710-1610\text{ см}^{-1}$ ,  $1067-930\text{ см}^{-1}$  соответственно. Данные диапазоны являются характеристическими для связей групп  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$ ; деформационных и либрационных колебаний молекул воды

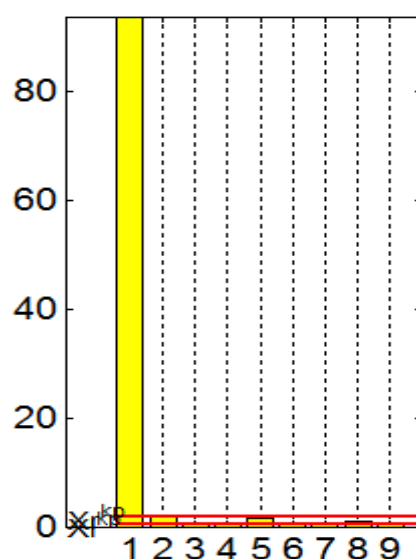


Рис.22 Сравнение дисперсий коэффициентов пропускания раствора глицина в разведении  $10^5$  и  $10^{12}$  раз по одномерному критерию Фишера



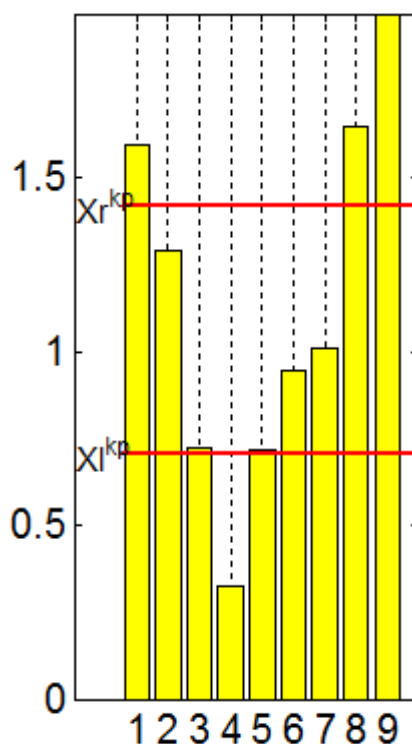


Рис.23 Сравнение дисперсий коэффициентов пропускания раствора аланина в разведении  $10^4$  и  $10^{12}$  раз по одномерному критерию Фишера

По результатам опытов можно сделать вывод о влиянии малых количеств нейтральных аминокислот на дисперсию пропускания ИК- спектра тонких слоев модельных растворов: Гли является более активным в отношении к водной основе своих растворов (при меньшем содержании способен вызывать большие изменения), что может быть обусловлено отсутствием углеводородного заместителя в структуре данной молекулы и снижением гидрофобного влияния.

## 5.2 Фурье ИК-спектроскопия модельных систем, содержащих кислые аминокислоты и их смесь

На первом этапе эксперимента было проведено исследование модельных растворов кислых аминокислот (1 М растворов Глу и Асп, их смесь). Результаты спектроскопии представлены на рисунке 24.

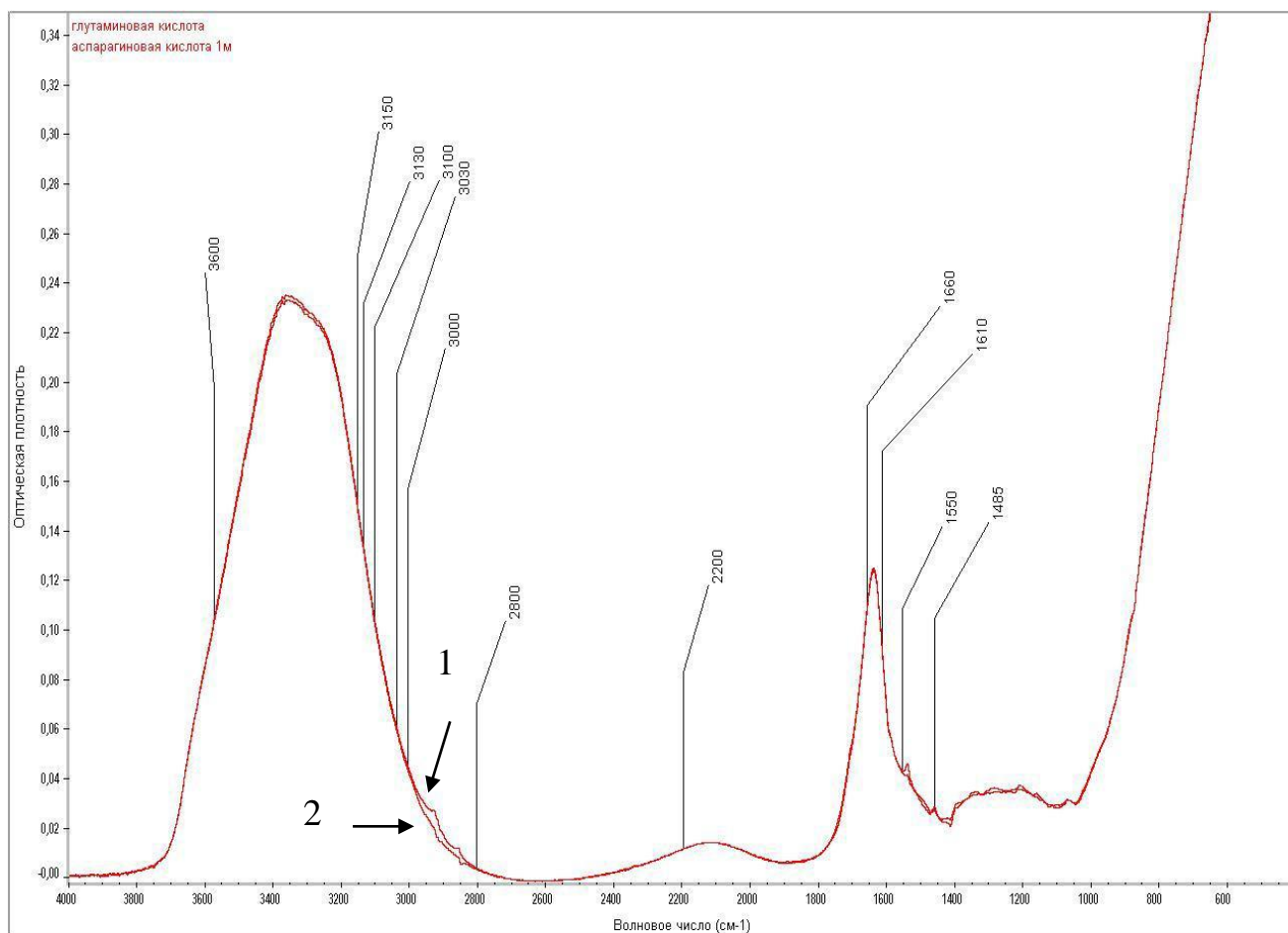


Рис.24. ИК - спектры водных 1 М водных растворов глутаминовой (1) и аспарагиновой кислот (2)

В областях 3130 - 3030, 3000-3600, 3100-3150, 2800-2200, 1600-1560, 1660-1610 и 1550-1485  $\text{см}^{-1}$  не установлено отличий от спектра нейтральных аминокислот. Однако, обнаружено уширение полосы поглощения 3440-3220  $\text{см}^{-1}$  и смещение в коротковолновую область спектра. Данное явление объясняется образованием ассоциатов «вода...вода» при участии трех водородных связей в структуре аминокислоты [8]. В диапазонах длин волн 1755-1720  $\text{см}^{-1}$  определены валентные колебания  $\text{C}=\text{O}$  в  $\text{COOH}$  группе, относящейся к углеводородному радикалу аминокислоты. При длине волны 1620  $\text{см}^{-1}$  наблюдаются характерные для деформационных колебаний воды пики, не отличающиеся по интенсивности для исследуемых растворов.

В ИК - спектре водного раствора Глу и Асп, полученного путем смешивания

равных количеств 1 М растворов, наблюдается наложение спектральных полос исследуемых аминокислот, при этом в спектре не происходило исчезновения полос поглощения, отвечающих одному из компонентов, как и не образовывалось новых спектральных полос, которые характеризовали бы образование новой связи, что говорит об отсутствии химических реакций взаимодействия данных веществ.

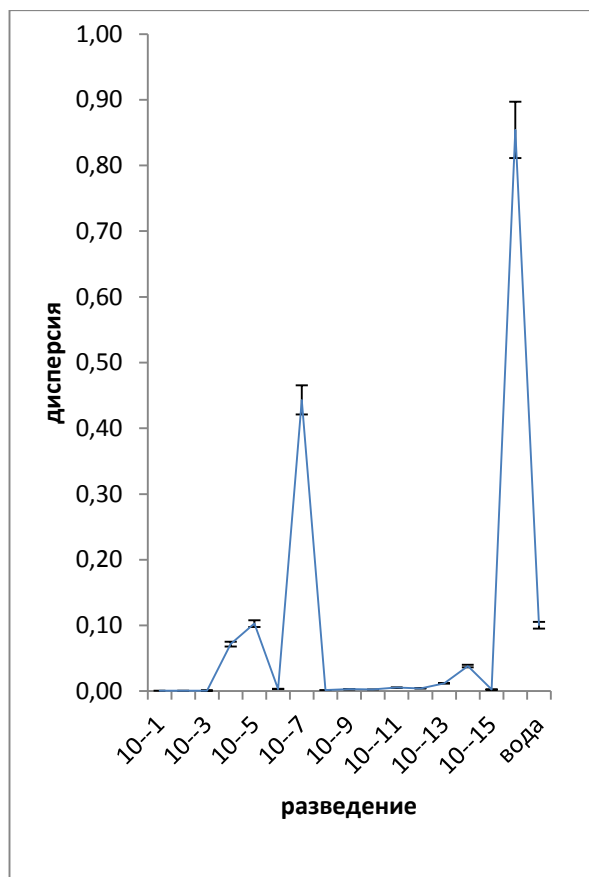
Таким образом, анализ ИК-спектров водных растворов кислых аминокислот позволил установить сходный характер воздействия данных веществ на водную основу их растворов.

### **5.2.1 Эффекты влияния малых количеств кислых аминокислот на дисперсию показателей пропускания ИК-излучения**

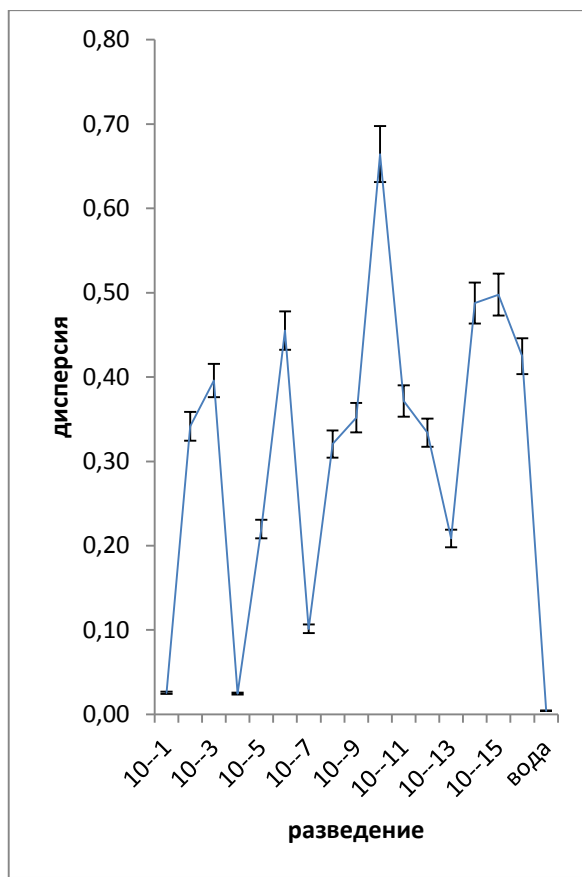
На следующем этапе эксперимента изучали изменения дисперсии П.П. ИК-излучения водной основы растворов под влиянием кислых аминокислот: Глу и Асп в разведении от  $10^1$  до  $10^{16}$  раз.

В диапазоне  $3500-3200\text{ см}^{-1}$  установлено наиболее выраженные изменения дисперсии происходили при содержании в растворе Глу  $10^{-7}$  и  $10^{-16}$  М. При этом микроколичества исследуемого вещества ( $10^{-16}$  М) характеризовались максимальным значением дисперсии, что выше значения, определенного для бидистиллированной воды в 8,5 раз ( $p < 0,01$ ) (рис. 25а). При разведении растворов от  $10^{-8}$  до  $10^{-15}$  М величина дисперсии практически не колеблется.

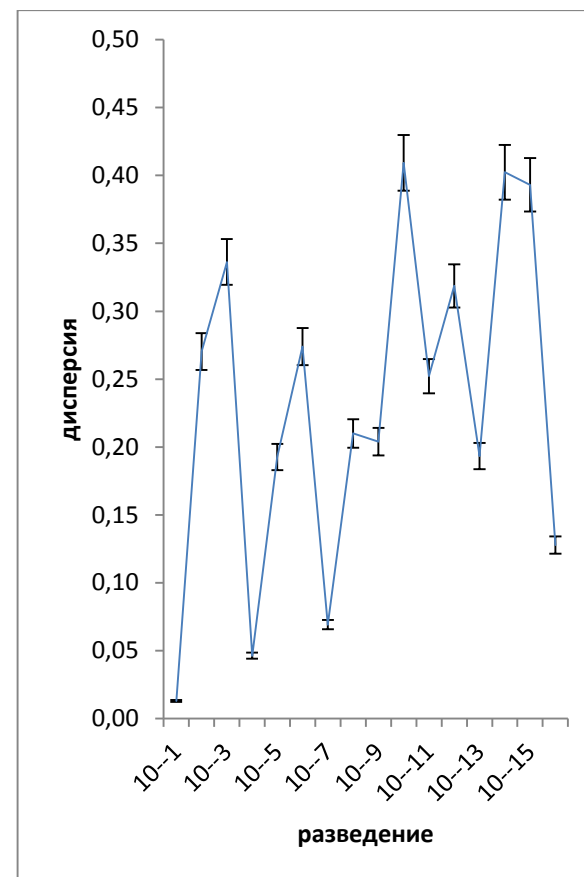
В областях  $3085-2832$  (рис. 25в),  $2120-1880$  (рис. 25с),  $1543-1425\text{ см}^{-1}$  (рис. 26с) обнаружено сходное изменение дисперсии П.П. с достижением максимумов ( $10^{-3}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-10}$ ) и минимумов ( $10^{-1}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-16}$ ) данного признака. В то же время, отличия для вышеперечисленных областей ИК-спектра определены в максимальных разведениях растворов ( $10^{-13}-10^{-16}$ ).



а)



в)



с)

Рис.25. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов глутаминовой кислоты концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а) 3500-3200  $\text{см}^{-1}$  в) 3085-2832  $\text{см}^{-1}$  с) 2120-1880  $\text{см}^{-1}$

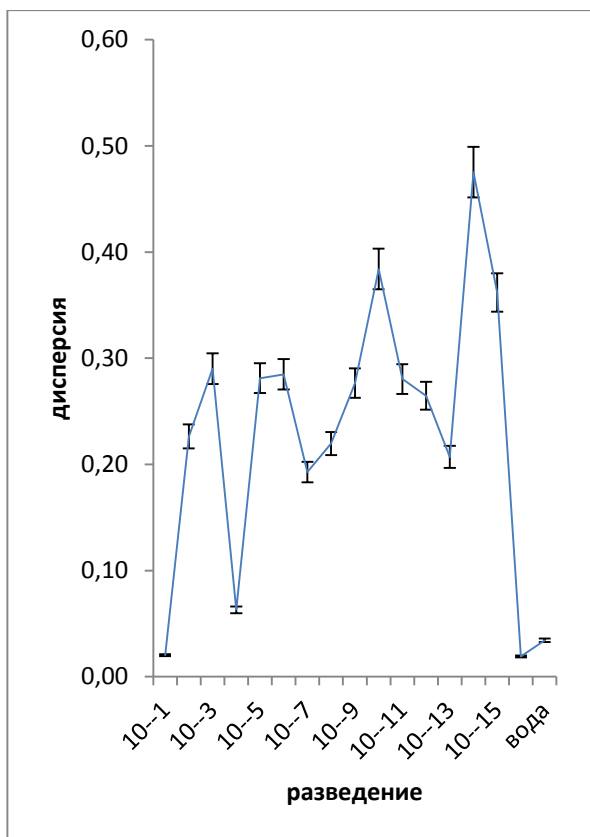
В данном интервале концентраций для диапазона  $3085-2832\text{ см}^{-1}$  прослеживается плавное и незначительное колебание дисперсии, в то время как в областях  $2120-1880\text{ см}^{-1}$  и  $1543-1425\text{ см}^{-1}$  увеличение значения исследуемого признака в растворах  $10^{-14}\text{ М}$  и  $10^{-15}\text{ М}$  сопровождается резким ее уменьшением к последующему разведению. Для интервалов ИК-спектра  $1710-1610\text{ см}^{-1}$  и  $1600-1535\text{ см}^{-1}$  (рис. 26а, в) происходят аналогичные колебания анализируемого показателя в растворах  $10^{-1}-10^{-4}\text{ М}$  и  $10^{-7}-10^{-13}\text{ М}$ . При этом, определенный для раствора Глу минимум-  $10^{-16}\text{ М}$  ( $1710-1610\text{ см}^{-1}$ ), является максимумом для области  $1600-1535\text{ см}^{-1}$ . Различие связано с амплитудой колебания исследуемого признака.

Изменения исследуемой величины в области ИК-спектра  $1430-1210\text{ см}^{-1}$  (рис. 27а) носят сходный характер с диапазоном  $1710-1610\text{ см}^{-1}$ .

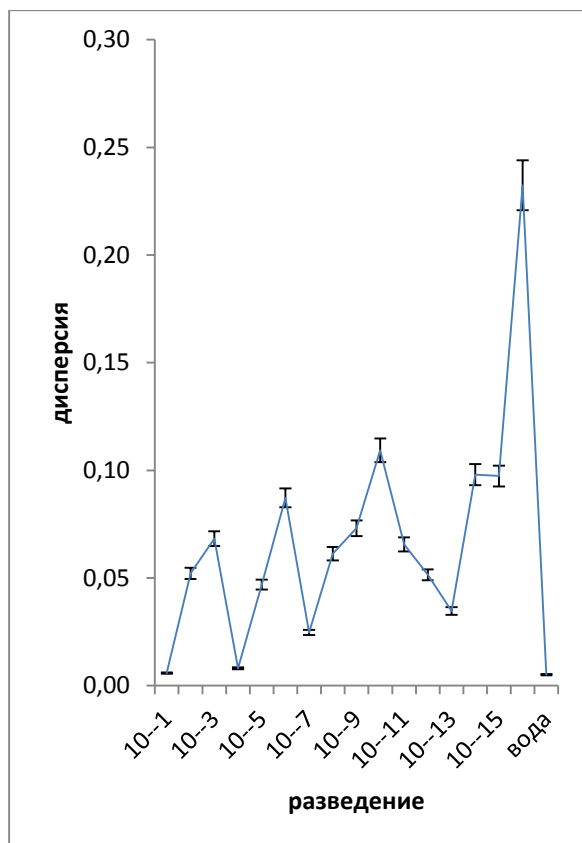
В диапазонах  $1127-1057$  и  $1067-930\text{ см}^{-1}$  (рис. 27в,с) увеличение содержания вещества в растворе от  $10^{-10}\text{ М}$  до  $10^{-1}\text{ М}$  вызывают аналогичные изменения величины дисперсии П.П. ИК-спектра.

Таким образом, анализ величин дисперсии П.П. ИК-спектра растворов Глу показал, что можно выделить три группы диапазонов с аналогичным характером изменений данного признака:  $3085-2832$ ,  $2120-1880$  и  $1543-1425\text{ см}^{-1}$  с максимумом  $10^{-10}\text{ М}$  и минимумом  $10^{-1}\text{ М}$ ;  $1600-1535$  и  $1710-1610\text{ см}^{-1}$  с максимумом  $10^{-14}\text{ М}$  и минимумом  $10^{-16}\text{ М}$ ;  $1127-1057$  и  $1067-930\text{ см}^{-1}$  с максимумом  $10^{-14}\text{ М}$  и минимумом  $10^{-1}\text{ М}$ . Абсолютный максимум для данной аминокислоты определен при содержании вещества в растворе  $10^{-10}\text{ М}$  ( $3085-2832\text{ см}^{-1}$ ) и минимум -  $10^{-16}\text{ М}$  в области  $1710-1610\text{ см}^{-1}$ .

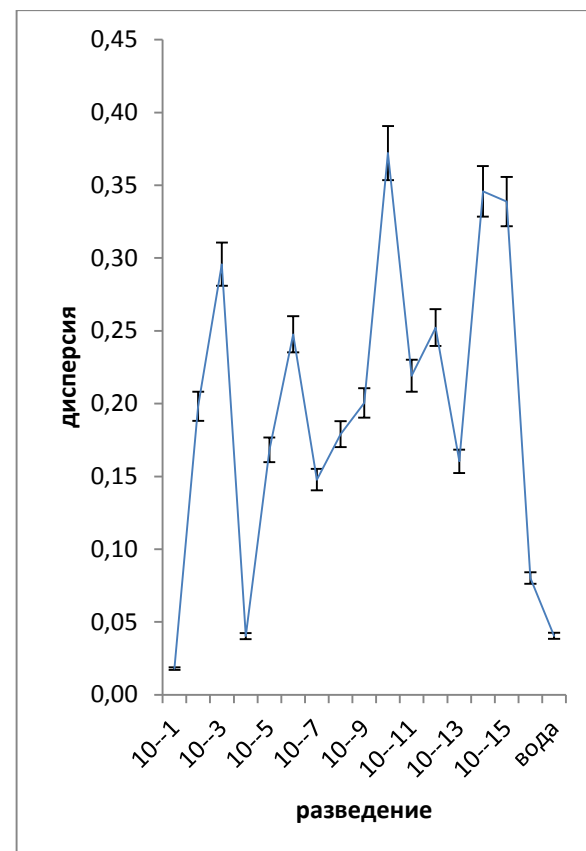
В последующей серии экспериментов проводился анализ колебаний коэффициентов пропускания ИК-излучения растворов Асп в разведении от  $10^1$  до  $10^{16}$  раз.



а)

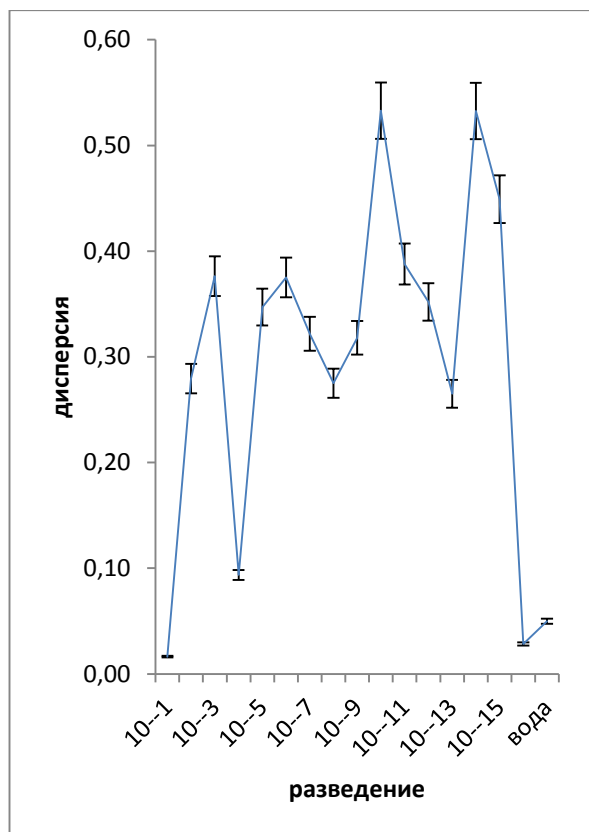


в)

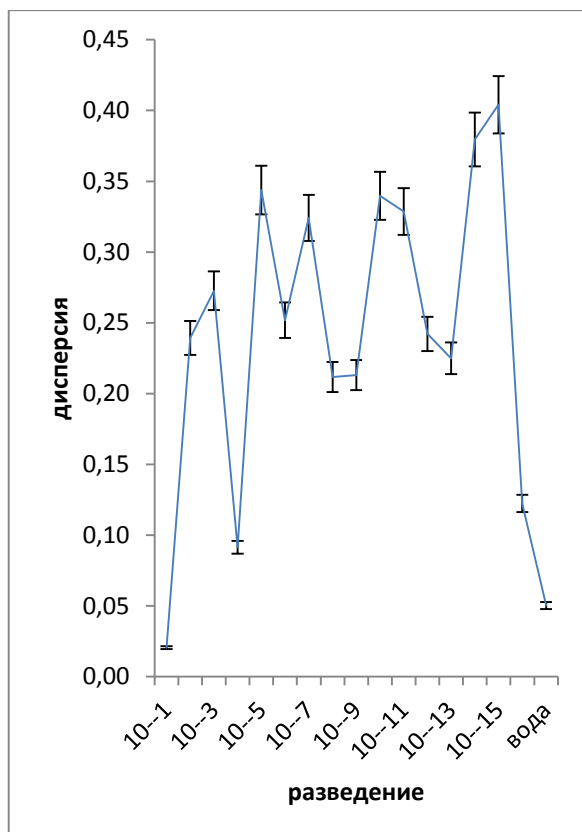


с)

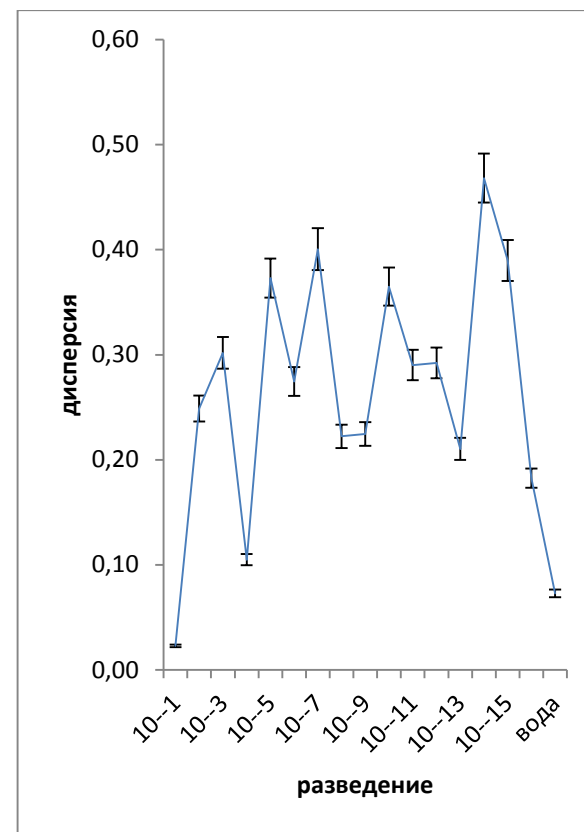
Рис.26. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов глутаминовой кислоты концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $1710-1610 \text{ см}^{-1}$  в)  $1600-1535 \text{ см}^{-1}$  с)  $1543-1425 \text{ см}^{-1}$



а)



в)



с)

Рис.27. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов глутаминовой кислоты концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $1430-1210 \text{ см}^{-1}$  в)  $1127-1057 \text{ см}^{-1}$  с)  $1067-930 \text{ см}^{-1}$

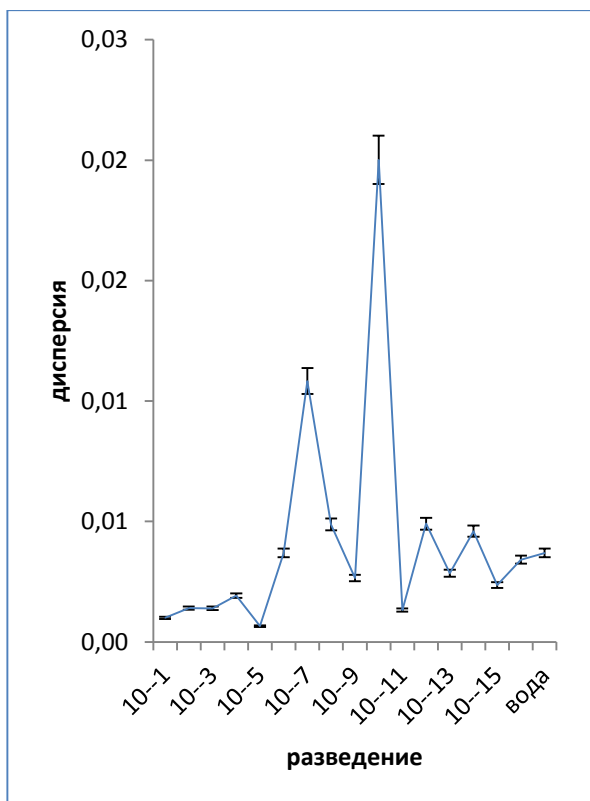
Установлено, что в области 3500-3200  $\text{см}^{-1}$  (рис. 28а) наличие аминокислоты в растворе в концентрации  $10^{-1}$ - $10^{-5}$  М приводит к понижению величины дисперсии, которая меньше в 4 раза ( $p < 0,05$ ), величины характерной для эталона. Последующее уменьшение содержания аминокислоты ведет к увеличению дисперсии с достижением максимума при концентрации  $10^{-7}$  М. В растворах  $10^{-11}$ - $10^{-16}$  М каждое последующее разведение ведет к чередованию увеличения и понижения значения дисперсии относительно предыдущего.

В областях ИК-спектра 3085-2832 (рис. 28в), 2120-1880 (рис. 28с), 1710-1610 (рис. 29а), 1600-1535 (рис. 29в), 1543-1425 (рис. 29с), 1430-1210 (рис. 30а), 1127-1057 (рис. 30в), 1067-930  $\text{см}^{-1}$  (рис. 30с) отмечается сходный характер изменений дисперсии для концентраций аминокислоты  $10^{-10}$ - $10^{-16}$  М. Данные разведения Асп характеризуется тем, что при увеличении содержания вещества в растворе наблюдается резкое достижение максимума (концентрация аминокислоты в растворе  $10^{-15}$  М) с последующим плавным снижением значений дисперсии и достижении минимума, определенного при  $10^{-10}$  М.

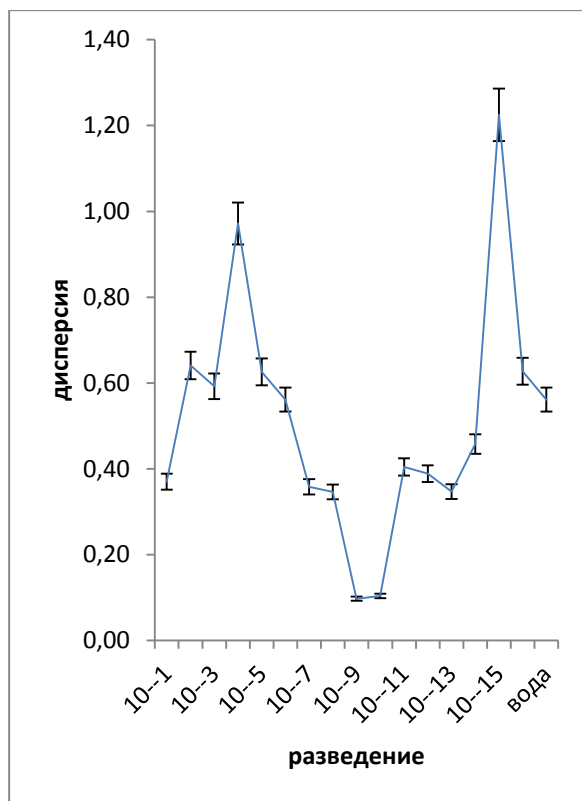
Отличие исследуемого признака в перечисленных областях спектра заключается в амплитуде колебания. Однако, для диапазонов 3085-2832 (рис. 28в), 1710-1610 (рис. 29а) и 1430-1210  $\text{см}^{-1}$  (рис. 30а) в концентрации  $10^{-9}$ - $10^{-4}$  М, при увеличении содержания вещества в растворе происходит постепенный рост дисперсии. Интервал 2120-1880  $\text{см}^{-1}$  - изменение содержания вещества в растворе от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$  М характеризуется гиперболическим изменением величины дисперсии с постепенным ростом до  $10^{-4}$  М и понижением к  $10^{-9}$  М (рис. 28с). Для области 1600-1535  $\text{см}^{-1}$  характерно резкое изменение значения исследованного признака в диапазоне концентраций  $10^{-1}$ - $10^{-8}$  М (рис. 29в).

В диапазоне ИК-спектра 1543-1425  $\text{см}^{-1}$  при содержании Асп в растворе в концентрации  $10^{-2}$  М обнаружен максимум дисперсии.

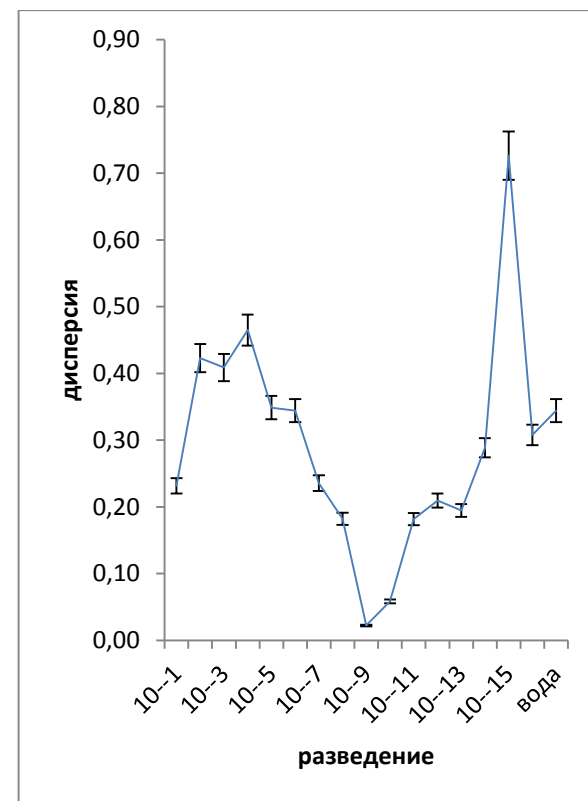




а)



в)



с)

Рис.28. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов аспарагиновой кислоты концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $3500-3200 \text{ см}^{-1}$  в)  $3085-2832 \text{ см}^{-1}$  с)  $2120-1880 \text{ см}^{-1}$

Последующее разведение ведет к постепенному уменьшению этой величины с достижением минимума при содержании вещества в растворе  $10^{-10}$  М (рис. 29с).

Характер изменений дисперсии в интервале длин волн  $1127-1057$   $\text{см}^{-1}$  (рис. 30в) носит сходный характер с интервалом  $2120-1880$   $\text{см}^{-1}$ .

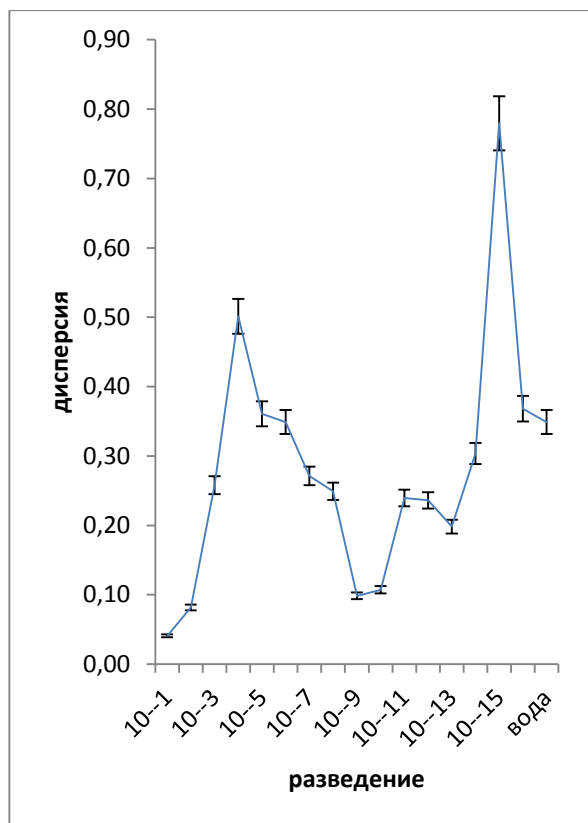
В диапазоне  $1067-930$   $\text{см}^{-1}$  в растворах разведением от  $10^{-1}$  -  $10^{-9}$  М (рис. 30с) колебания анализируемой величины практически отсутствуют.

Таким образом, анализ величин дисперсии П.П. ИК-спектра для растворов Асп показал сходную высокую активность ее малых и сверхмалых концентраций во всех исследуемых диапазонах ИК-спектра, кроме  $3500-3200$   $\text{см}^{-1}$ .

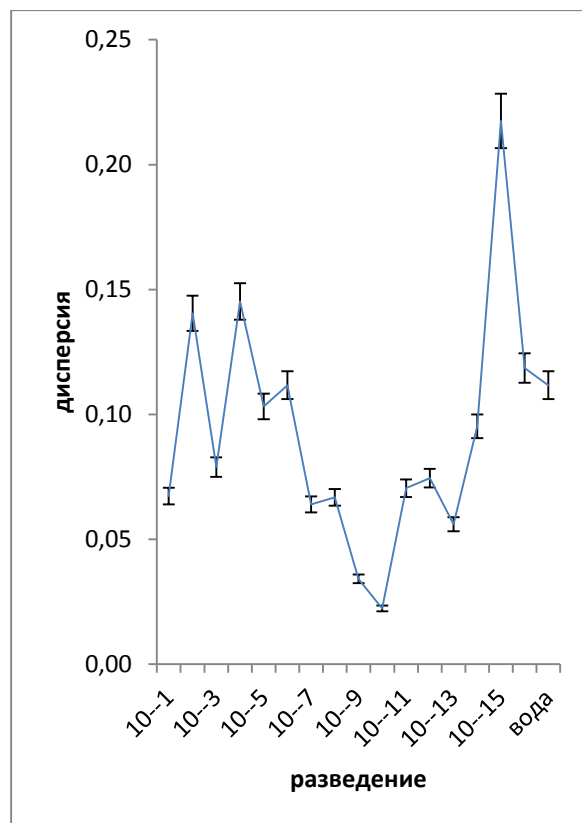
Максимум величины дисперсии определен при концентрации аминокислоты в растворе  $10^{-15}$  М во всех исследуемых диапазонах ИК-спектра, кроме  $3500 - 3200$   $\text{см}^{-1}$ , а абсолютный максимум - при этой же концентрации в области  $3085 - 2832$   $\text{см}^{-1}$ , абсолютный минимум -  $10^{-9}$  М в области  $2120-1880$   $\text{см}^{-1}$ , он же является минимумом для всех областей, кроме  $3085 - 2832$   $\text{см}^{-1}$ .

### **5.2.2 Анализ целостного состояния водных модельных систем кислых аминокислот непараметрическими методами**

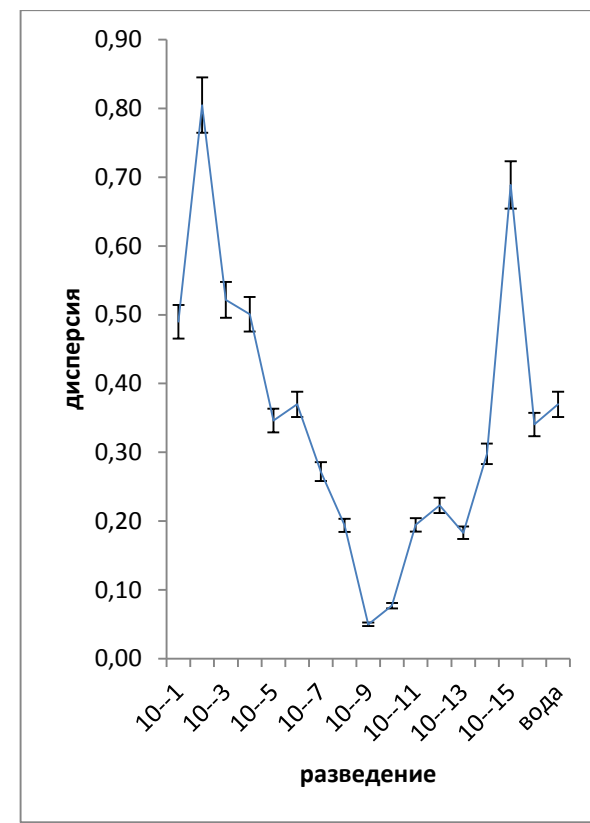
Изменение критерия Махаланобиса под влиянием сверхмалых количеств кислых аминокислот показало, что для Глу анализируемая величина изменяется волнообразно с достижением максимального значения при разведении в  $10^9$ . Для раствора Асп не установлены достоверные изменения исследуемого признака для сверхнизких разведений, значимые изменения водной системы происходят при содержании кислоты в концентрации  $10^{-1}-10^{-4}$  М.



а)

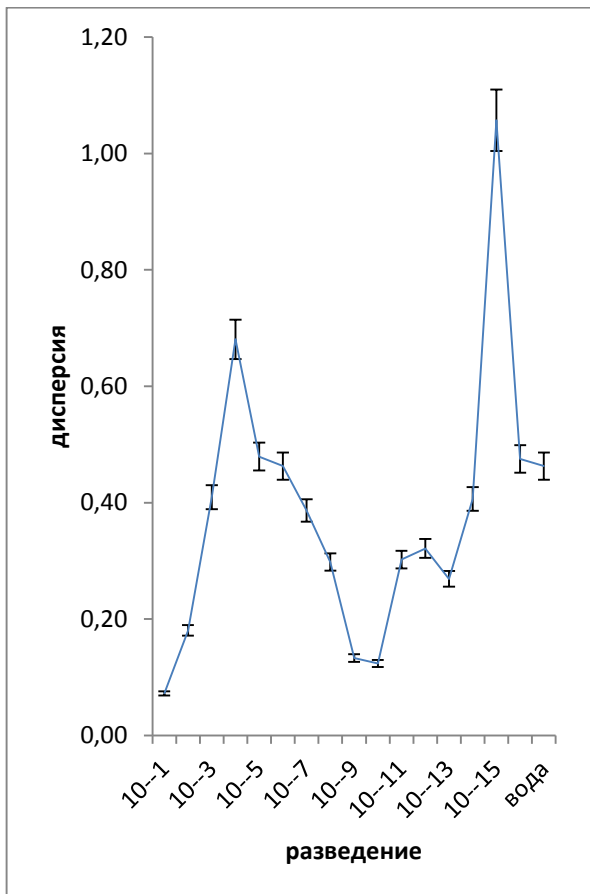


в)

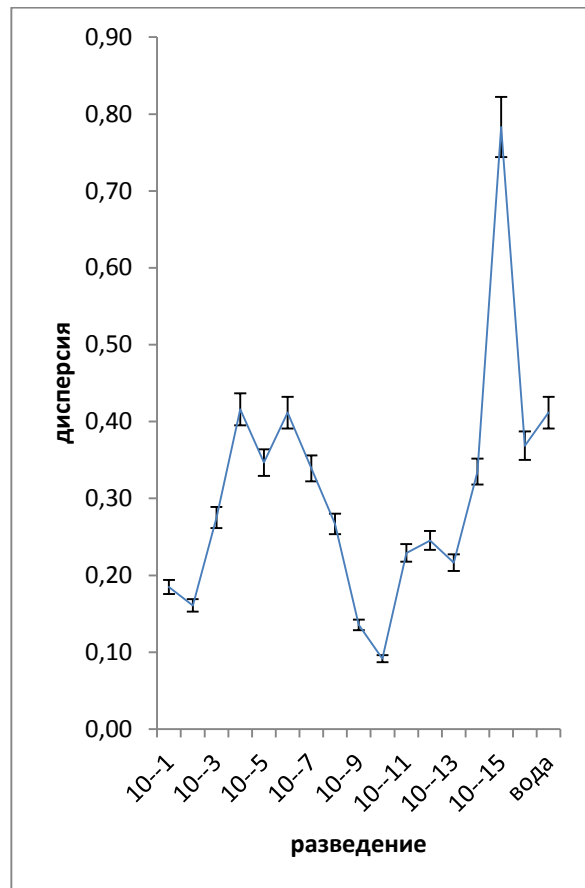


с)

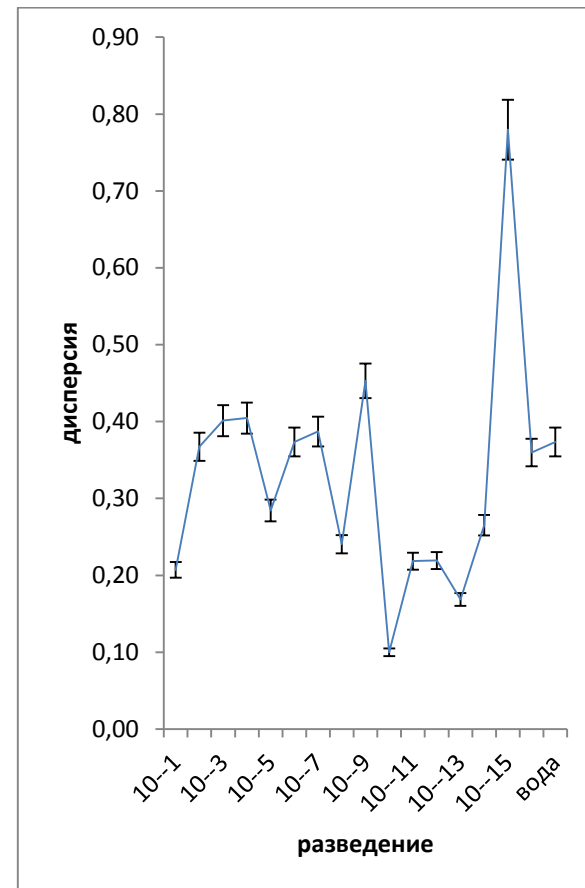
Рис.29. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов аспарагиновой кислоты концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $1710-1610 \text{ см}^{-1}$  в)  $1600-1535 \text{ см}^{-1}$  с)  $1543-1425 \text{ см}^{-1}$



а)



в)



с)

Рис.30. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов аспарагиновой кислоты концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $1430-1210 \text{ см}^{-1}$  в)  $1127-1057 \text{ см}^{-1}$  с)  $1067-930 \text{ см}^{-1}$

При этом обнаружено, что сходные количественные содержания кислот в растворах вызывают однонаправленное изменение величины критерия Махаланобиса, что, возможно, сопровождается сходными изменениями структурного состояния водной основы (рис.31).

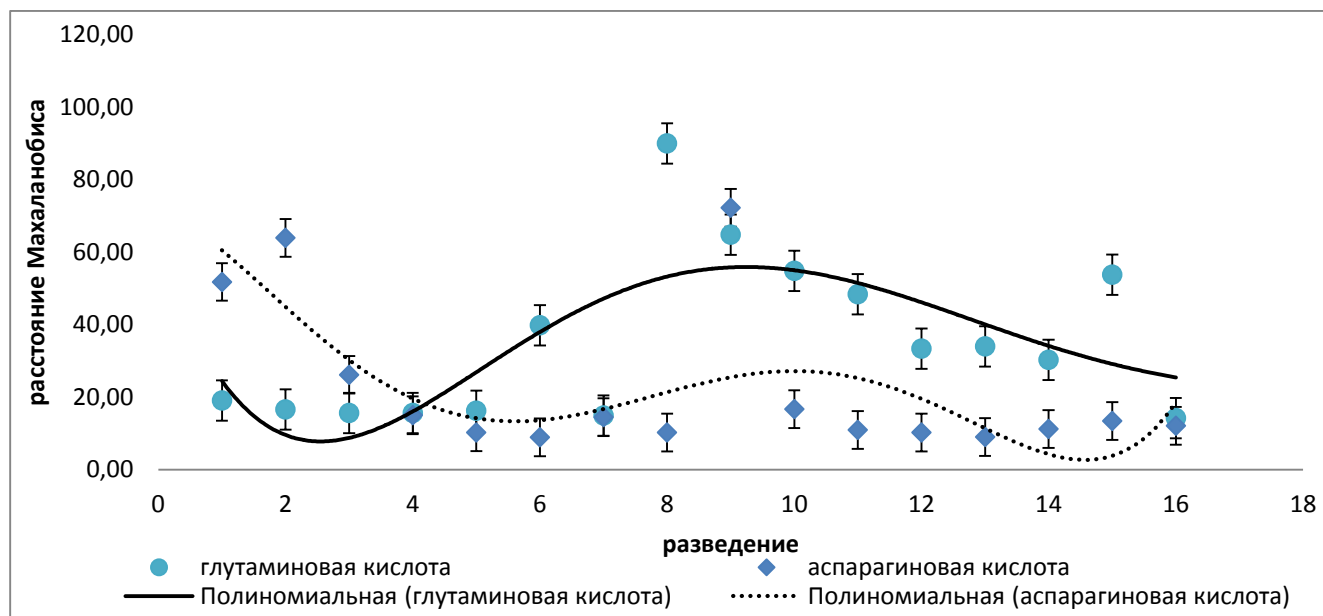


Рис.31. Влияние глутаминовой и аспарагиновой кислот (разведение 1 М растворов в  $10^1$ - $10^{16}$  раз) на величину флуктуации показателей пропускания ИК-излучения тонких слоев воды

На дальнейшем этапе исследования проведен сравнительный анализ по критерию Фишера дисперсий коэффициентов пропускания отдельных исследуемых областей инфракрасного спектра, в образцах, имеющих сходные высокие или низкие критерии Махаланобиса.

Для растворов Глу, имеющих максимально высокие значения критерия Махаланобиса (разведения  $10^9$  и  $10^{15}$  раз) и Асп (разведения  $10^2$  и раз $10^9$ ) установлены достоверные различия этого показателя в диапазоне длин волн: 3085-2832, 2120-1880, 1600-1535, 1543-1425, 1430-1210  $\text{см}^{-1}$ , где определяются полосы поглощения, характерные для:  $-\text{CH}_2$ ,  $-\text{CH}$ ;  $-\text{N}-\text{H}$ ;  $-\text{CH}_3$  групп, а так же валентных и деформационных колебаний молекул воды.

Анализ величин колебаний коэффициентов пропускания растворов аминокислот, имеющих сходные минимальные значения исследуемого признака, показал наличие достоверных отличий во всех диапазонах как для Глу (разведение  $10^5$  и  $10^{12}$  раз), так и для Асп (разведение  $10^5$  и  $10^{13}$  раз), что, возможно, связано со свободными протонами Н, которые образуются при диссоциации аминокислоты [111] и увеличивают структурную температуру.

Обобщая результаты опытов о влиянии различного содержания кислых аминокислот на водную основу, установлено, что дисперсия П.П. ИК-спектра для тонких слоев модельных растворов имеет общий характер изменения, при этом для Асп это воздействие более выражено.

### **5.3 Фурье ИК-спектроскопия модельной системы, содержащей основную аминокислоту**

На первом этапе эксперимента с помощью ИК-Фурье спектрометра Nicolet IS10 исследовали 1 М водный раствор Лиз. Результаты спектрографии представлены на рис.32.

В областях  $3130 - 3030$ ,  $3000-3600$ ,  $3100-3150$  и  $2800-2200 \text{ см}^{-1}$  не установлено отличий от спектра нейтральных аминокислот. В исследуемом растворе увеличивается интенсивность полосы слабосвязанной воды, о чем свидетельствует возрастающая по интенсивности в область высоких частот полоса с максимумом  $3500 \text{ см}^{-1}$ . Уширение спектральной полосы в область низких частот (до  $2700 \text{ см}^{-1}$ ) свидетельствует о проявлении взаимодействия ОН-групп воды с аминогруппами аминокислоты [8].

Таким образом, анализ ИК-спектра водного раствора исследуемой аминокислоты показывает, что в растворе Лиз водородная связь между молекулами воды ослабевает, а взаимодействие между молекулами воды и аминокислоты увеличивается.

### 5.3.1 Особенности влияния малых количеств основной аминокислоты на дисперсии показателей пропускания ИК-излучения

На данном этапе эксперимента с помощью аппаратно-программного комплекса «ИКАР» проводили анализ дисперсии П.П. ИК-излучения растворов Лиз, полученных последовательным десятикратным разведением 1 М раствора до  $10^{16}$ .

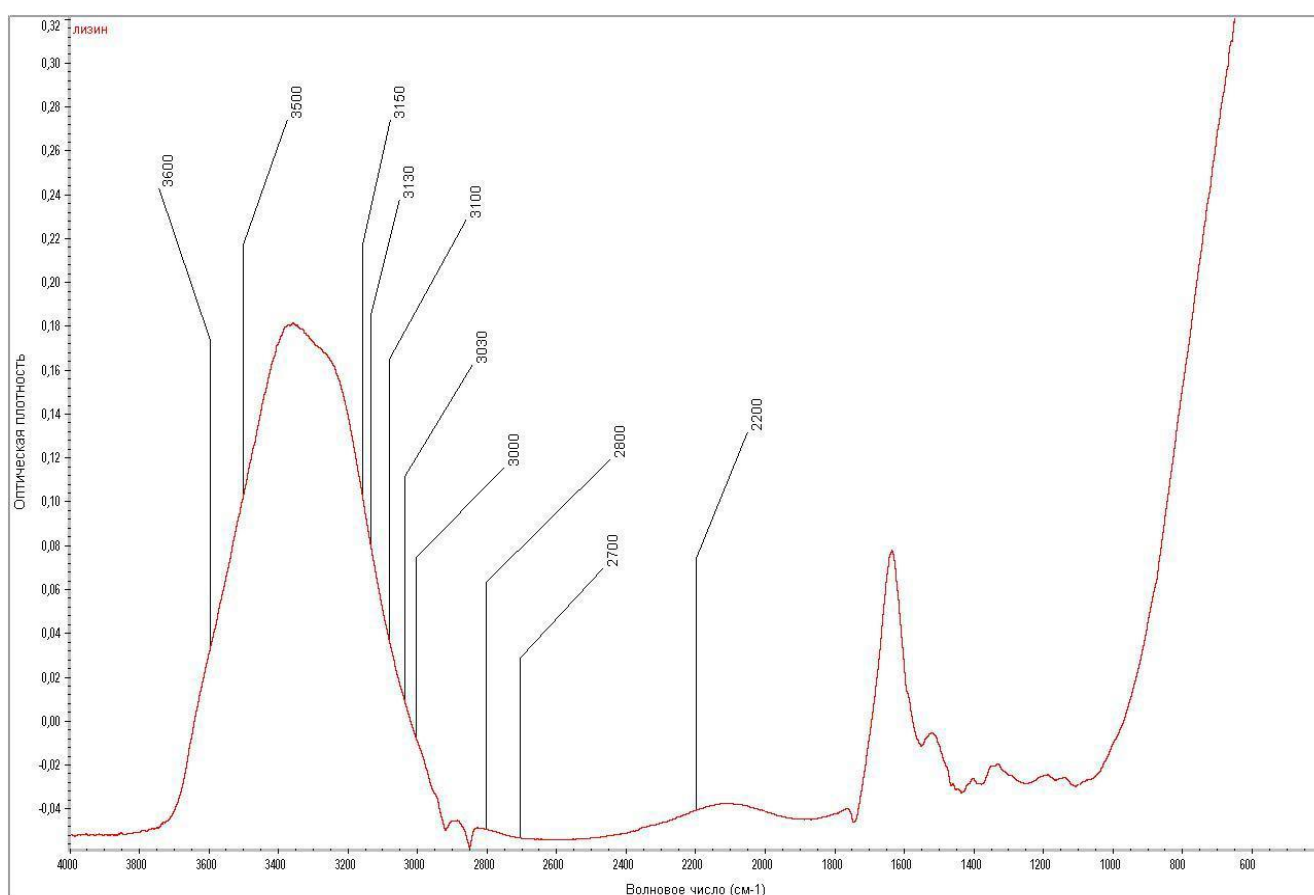


Рис.32. ИК - спектр 1 М водного раствора лизина

Установлено, что в диапазоне  $3500-3200\text{ см}^{-1}$  (рис.33а) при разведении  $10^2$  и  $10^5$  раз выявлены максимумы дисперсии П.П. для данного диапазона. В интервале концентраций  $10^{-7}-10^{-12}\text{ М}$  и  $10^{-14}-10^{-16}\text{ М}$  исследуемая величина практически не колеблется, оставаясь на уровне значения, определенного для бидистиллированной воды.

В области 3085-2832  $\text{см}^{-1}$  (рис.33в) отмечались динамические изменения дисперсии, сходные с таковыми для диапазонов 2120-1880 (рис.33с); 1710-1610 (рис.34а); 1543-1425 (рис.34с); 1430-1210 (рис.35а); 1127-1057 (рис.35в); 1067- 930  $\text{см}^{-1}$  (рис.35с). Основные отличия были связаны с величиной амплитуды колебания исследуемого признака.

Для интервала 3085-2832  $\text{см}^{-1}$  минимальные величины дисперсии определены при содержании Лиз в растворе  $10^{-5}$  и  $10^{-13}$  М, которые достоверно не отличались от эталона. Максимумы - для разведения аминокислоты в  $10^2$  и  $10^{12}$  раз.

В диапазонах 2120-1880 (рис.33с), 1710-1610 (рис.34а), 1430-1210 (рис.35а), 1127-1057  $\text{см}^{-1}$  (рис.35в) в отличие от других исследованных областей ИК-спектра определено появление максимума для раствора аминокислоты  $10^{-1}$  М.

В области 1600-1535  $\text{см}^{-1}$  (рис.34в) – постепенное уменьшение содержания аминокислоты от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$  М ведет к понижению величины дисперсии. Максимум определен при разведении  $10^{12}$  раз и достоверно отличается от контроля.

Таким образом, установлено, что в интервале 1710-1610  $\text{см}^{-1}$  определен максимум дисперсии при концентрации Лиз  $10^{-2}$  М, а минимум в области 1600 - 1535  $\text{см}^{-1}$  при содержании вещества  $10^{-8}$  М. Наибольшая амплитуда исследуемого показателя определена для диапазона 1710-1610  $\text{см}^{-1}$ . При этом характер изменения флуктуации П.П. ИК-спектра описывается сходными динамическими изменениями дисперсии для областей: 3085-2832; 2120-1880; 1710-1610; 1543-1425; 1430-1210; 1127-1057; 1067-930  $\text{см}^{-1}$ .

### **5.3.2 Изменение параметров целостного состояния водной модельной системы основной аминокислоты**

Многомерный анализ полученных данных позволил установить, что под влиянием аминокислоты величина критерия Махаланобиса изменяется



волнообразно с достижением максимальных значений при разведении в  $10^{13}$  раз (рис.36). Важно отметить, что значения расстояния Махаланобиса для концентрации вещества  $10^1$  и  $10^{14}$  М достоверно не отличаются, а разведение  $10^{17}$  раз характеризуется значительным понижением целостного критерия с достижением его минимальной величины.

Для выявления глубины различий или сходства целостного состояния системы был проведен сравнительный анализ дисперсий коэффициентов пропускания отдельных исследуемых областей инфракрасного спектра с помощью критерия Фишера для образцов, имеющих сходные высокие или низкие значения критерия Махаланобиса.

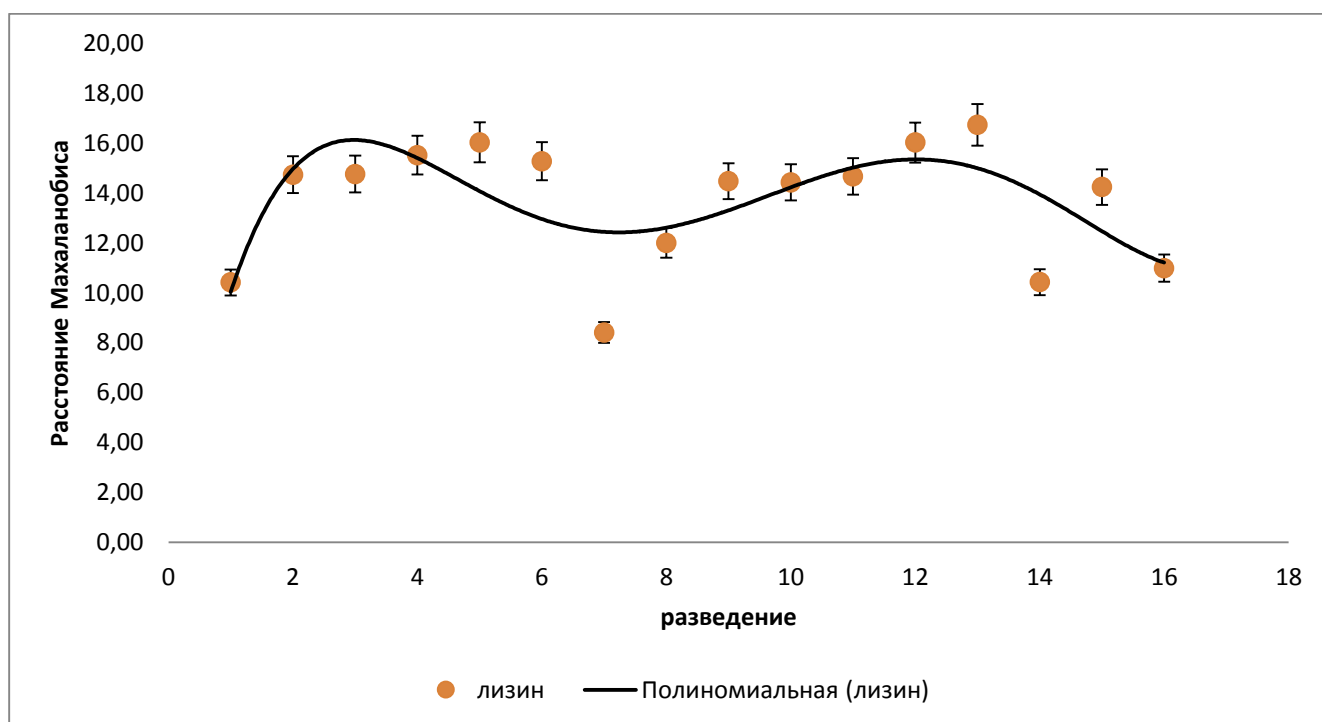
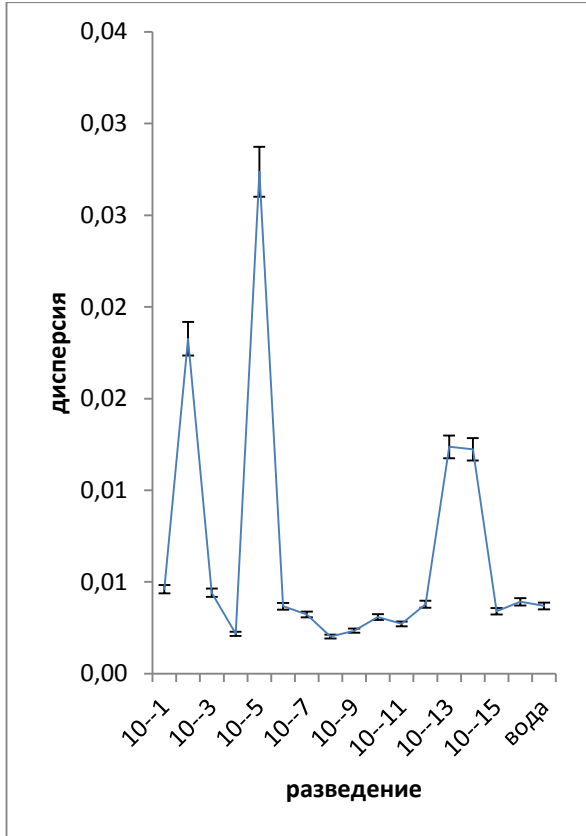
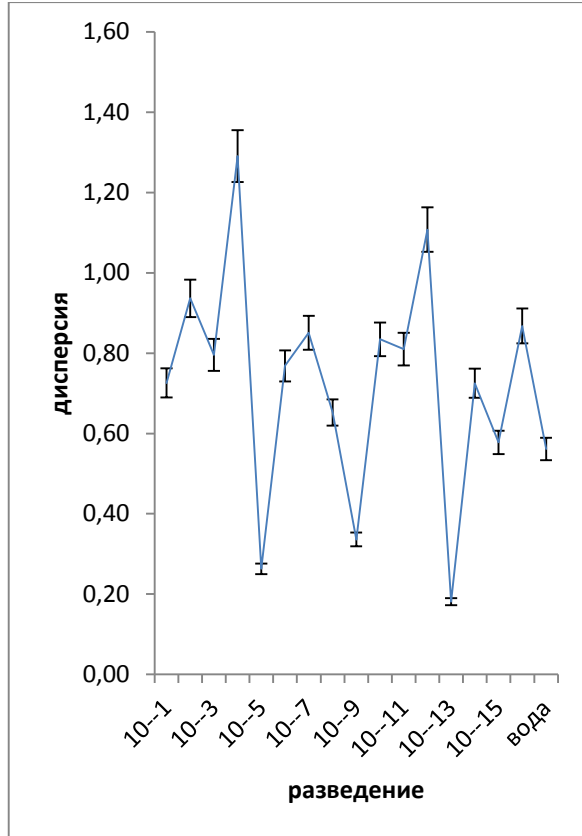


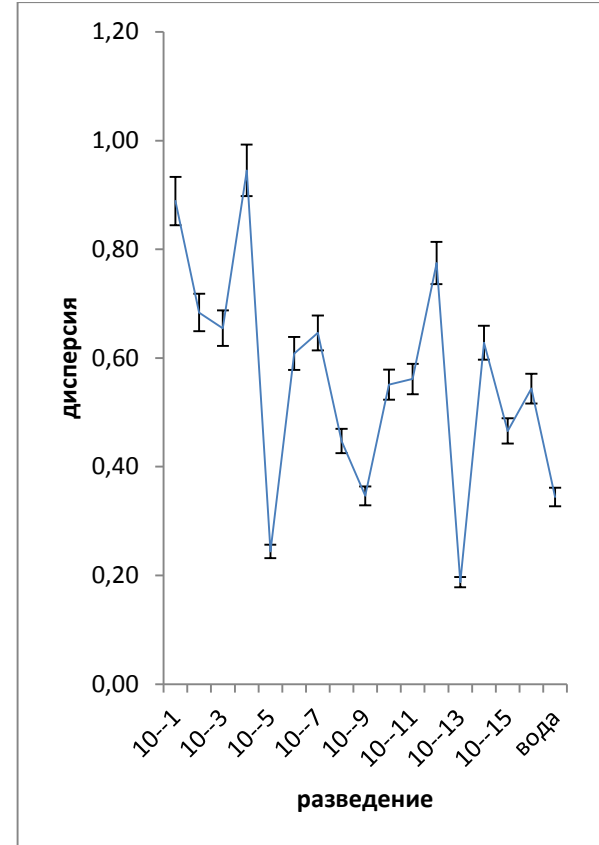
Рис.36. Изменение расстояния Махаланобиса водного раствора лизина (при разведении 1 М раствора) и его аппроксимация



а)

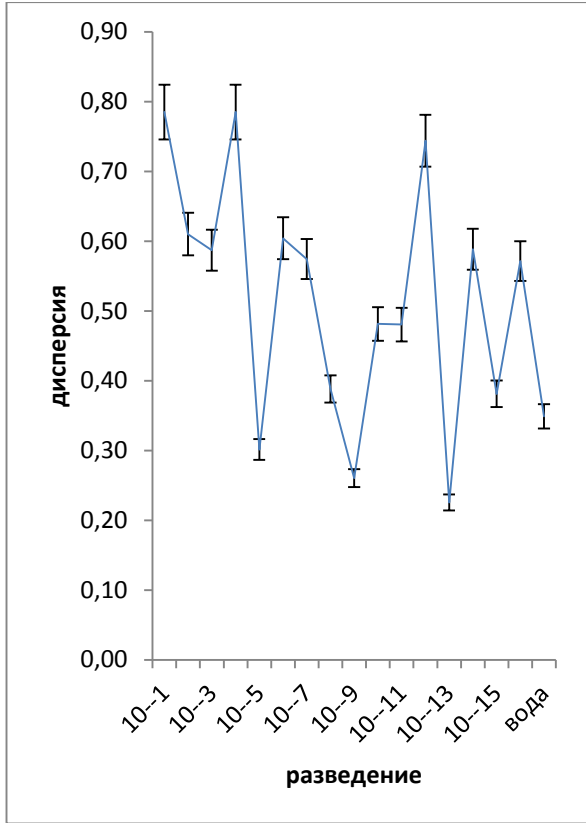


в)

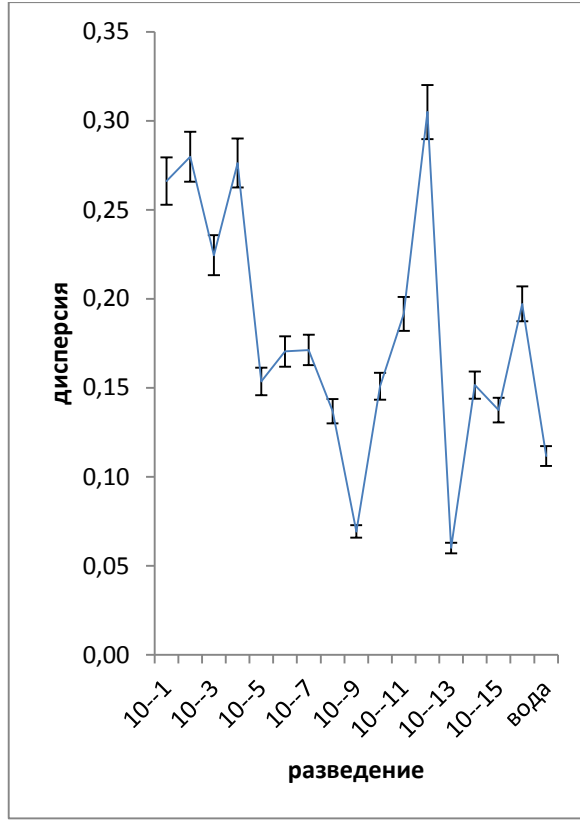


с)

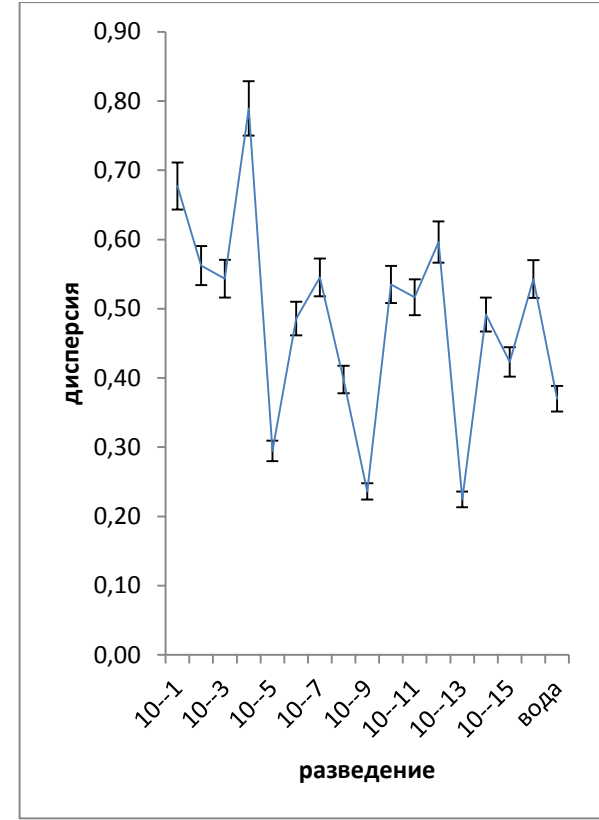
Рис.33. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов лизина концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $3500-3200 \text{ см}^{-1}$  в)  $3085-2832 \text{ см}^{-1}$  с)  $2120-1880 \text{ см}^{-1}$



а)



в)



с)

Рис.34. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов лизина концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а) 1710-1610  $\text{см}^{-1}$  в) 1600-1535  $\text{см}^{-1}$  с) 1543-1425  $\text{см}^{-1}$

Анализ дисперсий П.П. растворов, для которых определено максимальное значение критерия Махаланобиса показал, что модельные системы Лиз  $10^5\text{М}$  и  $10^{13}\text{М}$  достоверно различаются во всех анализируемых областях ИК-спектра, кроме диапазона  $3500\text{-}3200$  и  $3085\text{-}2832\text{ см}^{-1}$ , характеризующих области поглощения связей первичных амино-, метильных и гидроксильных групп, а так же валентных колебаний молекул воды.

Для растворов, имеющие сходные минимальные значения критериев Махаланобиса установлено, что разведения Лиз  $10^7\text{ М}$  и  $10^{14}\text{ М}$  достоверно не различаются во всех анализируемых областях спектра, кроме диапазона  $3500 - 3200\text{ см}^{-1}$ , характеризующего область поглощения связей гидроксильных и первичных аминокрупп, а так же валентные колебания молекул воды.

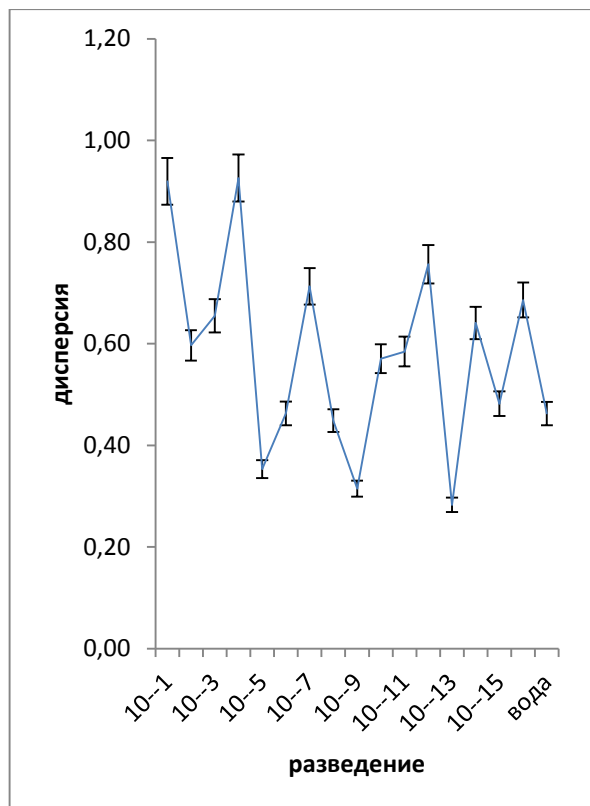
Обобщая полученные данные, можно говорить о подтверждении существующих в научной литературных данных о том, что исследуемые аминокислоты оказывают влияние на структурное состояние собственных растворов. По силе данного воздействия, аминокислоты можно представить в виде ряда: Асп  $\approx$  Глу  $>$  Гли  $\approx$  Ала  $>$  Лиз [76, 117].

#### **5.4 Фурье ИК-спектроскопия водных модельных растворов сверхмалых количеств пептидного препарата**

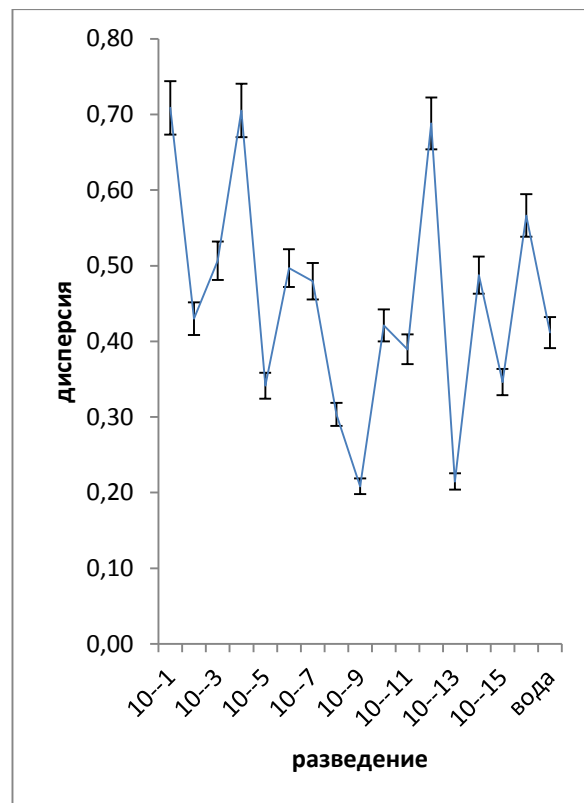
ИК-спектр  $1\text{ М}$  водного раствора препарата «Кортексин» (рис.37) получали с помощью Nicolet IS 10.

В областях  $3130 - 3030$ ,  $3000\text{-}3600$ ,  $3100\text{-}3150$  и  $2800\text{-}2200\text{ см}^{-1}$  не имеет отличий от спектра нейтральных аминокислот.

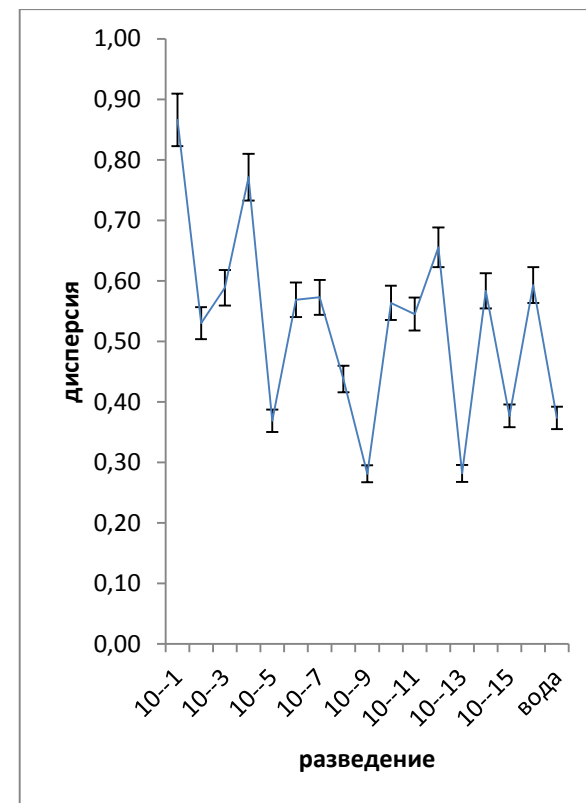
В спектре установлены пики функциональных групп аминокислот, входящих в состав лекарственного препарата.



а)



в)



с)

Рис.35. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов лизина концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а) 1430-1210  $\text{см}^{-1}$  в) 1127-1057  $\text{см}^{-1}$  с) 1067-930  $\text{см}^{-1}$

Для связанной воды в диапазоне волн, характеризующих ее валентные колебания, можно различить спектральную полосу пара-гидроксильной группы, относящуюся к тирозину. Она имеет незначительное уширение и лежит в области  $3654\text{-}3585\text{ см}^{-1}$ , что характеризует связанные гидроксильные группы с молекулами растворителя. В спектре отмечаются пики, характерные для имидазол-радикала, входящего в структуру гистидина, на отрезке длин волн  $3223\text{-}3500\text{ см}^{-1}$ , что несколько уже их нормального положения.

Средне – слабые, малоинтенсивные валентные колебания тиольной группы несколько смещены и уширены от нормального ее положения и были обнаружены на частотах  $2551\text{-}2604\text{ см}^{-1}$ .

Скелетные колебания фенольного цикла, относящегося к фенилаланину и тирозину, уширены и лежат в диапазоне длин волн ИК-спектра  $1455\text{-}1504\text{ см}^{-1}$ , а деформационные -  $695\text{ см}^{-1}$ .

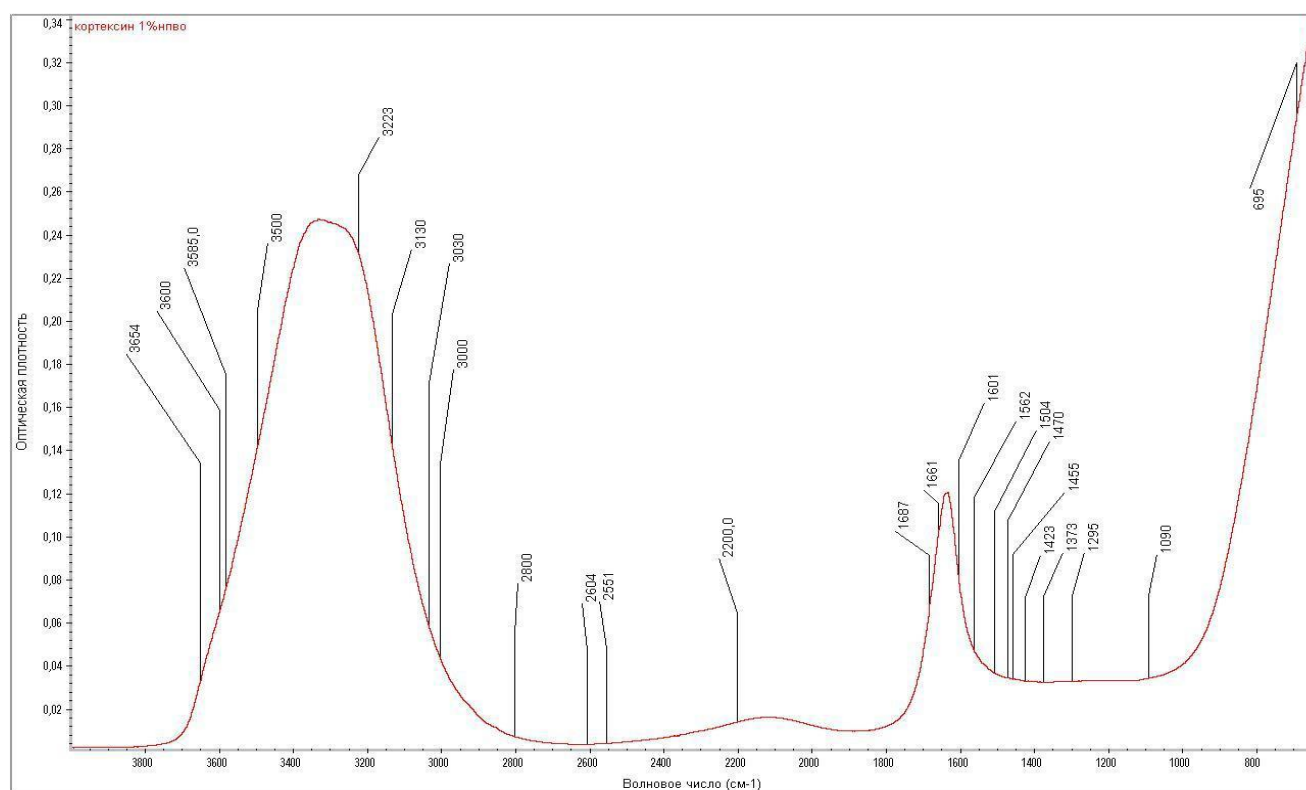


Рис.37. ИК - спектр 1 М водного раствора препарата «Кортексин»

Ассиметричные и маятниковые колебания аминогруппы были обнаружены при длине волны 1661-1601 и 1295-1090  $\text{см}^{-1}$  соответственно. Колебания карбоксильной группы, смещены и сужены от нормального на область ИК-спектра, лежащую в диапазоне 1562-1601  $\text{см}^{-1}$ . Скелетные колебания аминогруппы, содержащейся в составе пролина, лежат в области 1601-1373  $\text{см}^{-1}$  и, практически, не отличаются от нормального их положения.

В интервале 1687 – 1470  $\text{см}^{-1}$  обнаружены пики, характеризующие гуанидиновую функциональную группировку, принадлежащую аргинину.

Деформационные колебания гидроксильной группы, относящейся к ряду органических компонентов: фенилаланину, треонину и серину, лежат в области длин волн ИК-спектра 1423-1373  $\text{см}^{-1}$ , что значительно отличается от обычного ее положения.

Эти изменения ИК-спектра связаны с наличием воды, которая может оказывать влияние на составные компоненты лекарственного препарата с образованием водородных связей, гидрофобного и гидрофильного взаимодействия, отсутствующих в сухом препарате [1].

Для оценки влияния препарата «Кортексин» на водную составляющую модельного раствора, по сравнению с отдельными аминокислотами, входящими в его состав, провели расчет площадей полос ИК-спектра, характерных для воды (валентные, деформационные и либрационные колебания). Полученные результаты представлены в таблице 9.

Совместное нахождение компонентов препарата компенсирует индивидуальное воздействие каждого из них на водную основу раствора.

Таким образом, изменение полос поглощения относительно их нормального положения связано с взаимодействием с водным компонентом модельной системы. На спектре Кортексина не обнаружены связи новых веществ, образованных в результате взаимодействия компонентов препарата.

Таблица 9.

**Величина площади поглощения полосы связей воды в модельной биологической системе**

Вид колебаний	Асп, у. е.	Глу, у.е.	Асп + Глу, у. е.	Гли, у. е.	Ала, у. е.	Гли + Ала, у. е.	Лиз, у. е.	Кортексин, у. е.
Валентные	97,02	101,33	100,87	46,08	50,65	93,7	65,45	99,06
Деформационные	3,64	3,85	3,68	4,49	1,18	3,65	2,13	3,54
Либрационные	0,5	0,5	0,8	0,35	0,3	0,75	0,56	0,58

**5.4.1 Дисперсии показателей пропускания ИК-излучения тонких слоев растворов с малым количеством биологически активного вещества «Кортексин»**

На данном этапе эксперимента изучали изменения дисперсии П.П. ИК - излучения водной основы растворов под влиянием препарата «Кортексин» с помощью аппаратно-программного комплекса «ИКАР». Исследовали модельные растворы данного вещества концентрацией  $10^{-1}$ - $10^{-16}$  М.

В диапазоне  $3500$ - $3200$   $\text{см}^{-1}$  (рис. 38а) последовательное разведение исходного раствора приводит к постепенному повышению величины дисперсии с достижением максимальной величины при концентрации  $10^{-10}$  М. Минимальное значение определено при содержании вещества  $10^{-13}$  М. Наличие в растворе препарата концентрации  $10^{-4}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-12}$  М вызывает повышение анализируемой величины достоверное отличное от максимума ( $p < 0,05$ ).

В области ИК - спектра  $3085$ - $2832$   $\text{см}^{-1}$  определены две концентрации ( $10^{-2}$ ,  $10^{-13}$  М) вызывающие резкое увеличение флуктуации исследуемого признака. В растворах с содержанием Кортексина  $10^{-3}$ - $10^{-12}$  М дисперсия П.П. практически не колеблется (рис. 38в).



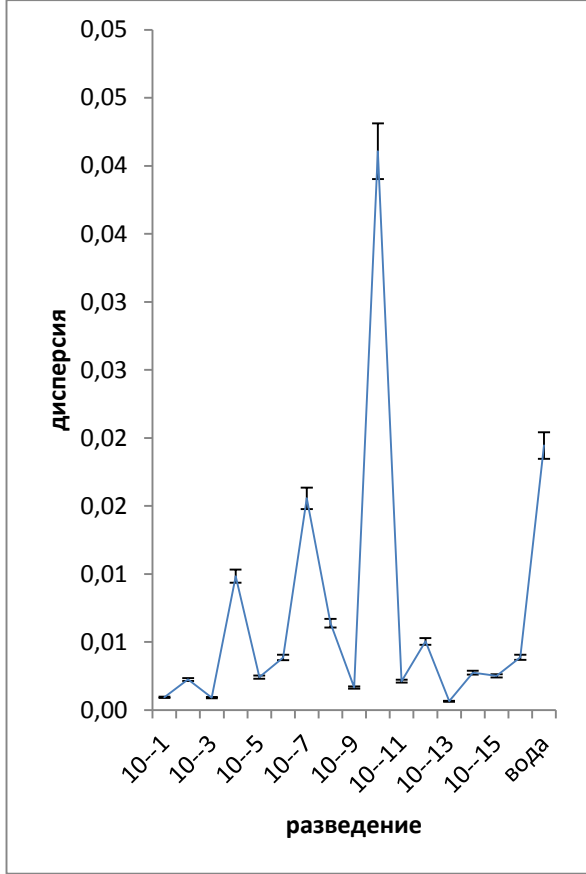
В интервалах 2120-1880 (рис. 38с), 1710-1610 (рис. 39а), 1600-1535 (рис. 39в), 1543-1425 (рис. 39с), 1127-1057  $\text{см}^{-1}$  (рис. 40в) изменения дисперсии носили сходный характер с колебания в диапазоне 3085-2832  $\text{см}^{-1}$ .

Отмечаются максимальные значения анализируемой величины при содержании препарата  $10^{-13}$  (2120-1880  $\text{см}^{-1}$ ) и  $10^{-2}$  М для остальных диапазонов, которые достоверно не отличались от дисперсии бидистиллированной воды ( $p < 0,05$ ).

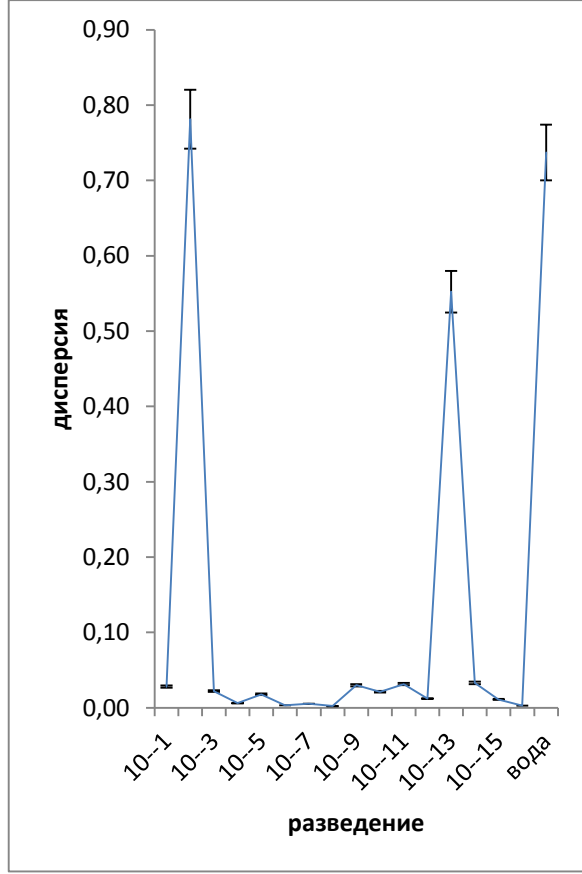
В областях ИК-спектра 1430-1210 (рис. 40а) и 1067-930  $\text{см}^{-1}$  (рис. 40с) уменьшение содержания исследуемого вещества в растворе не вызывало существенного изменения дисперсии П.П. для всех концентраций относительно исходной, кроме концентрации  $10^{-13}$  М, при которой был определен максимум колебания, который в 1,8 раза превышает таковой для бидистиллированной воды ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, анализ влияния различных количеств препарата «Кортексин» на водную основу раствора позволил выявить следующее: максимум исследуемой величины определен при концентрации  $10^{-2}$  М в интервале 3085-2832  $\text{см}^{-1}$  и минимум  $10^{-10}$  М в области 1430-1210  $\text{см}^{-1}$ . Следует отметить факт стабилизации дисперсии в диапазонах концентраций  $10^{-3}$ -  $10^{-12}$  М, для всех интервалов кроме 3500-3200  $\text{см}^{-1}$ , а так же сходный характер изменения флуктуации П.П. в диапазонах 3085-2832, 1710-1610, 1600-1535, 1543-1425, 1127-1057 и 2120-1880, 1430-1210, 1067-930  $\text{см}^{-1}$ . Отличительной особенностью водных растворов препарата «Кортексин» является то, что дисперсия анализируемой системы во всем интервале разведений имеет меньшее значение, чем у контроля.

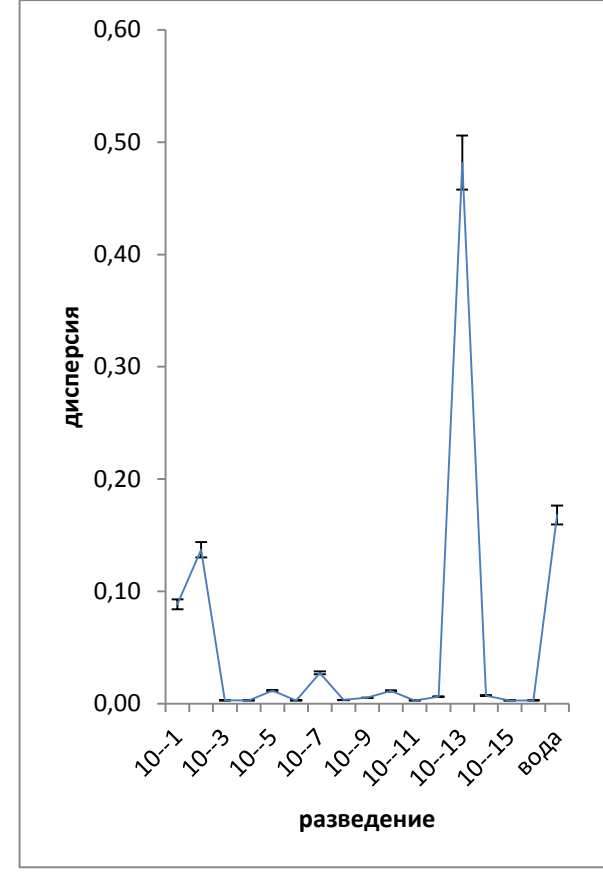
Исключение составили растворы концентрацией  $10^{-2}$  М в областях 3085-2832, 1710-1610, 1600-1535, 1543-1425  $\text{см}^{-1}$  и  $10^{-13}$  М в интервалах 2120-1880, 1430-1210  $\text{см}^{-1}$ .



а)



в)



с)

Рис.38. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов препаратов «Кортексин» концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а) 3500-3200  $\text{см}^{-1}$  в) 3085-2832  $\text{см}^{-1}$  с) 2120-1880  $\text{см}^{-1}$

Таким образом, наличие в растворах смеси аминокислот, входящих в состав препарата «Кортексин» способствует стабилизации структурного состояния водной основы модельной системы.

#### **5.4.2 Изменение параметров целостного состояния водной модельной системы в присутствии препарата «Кортексин»**

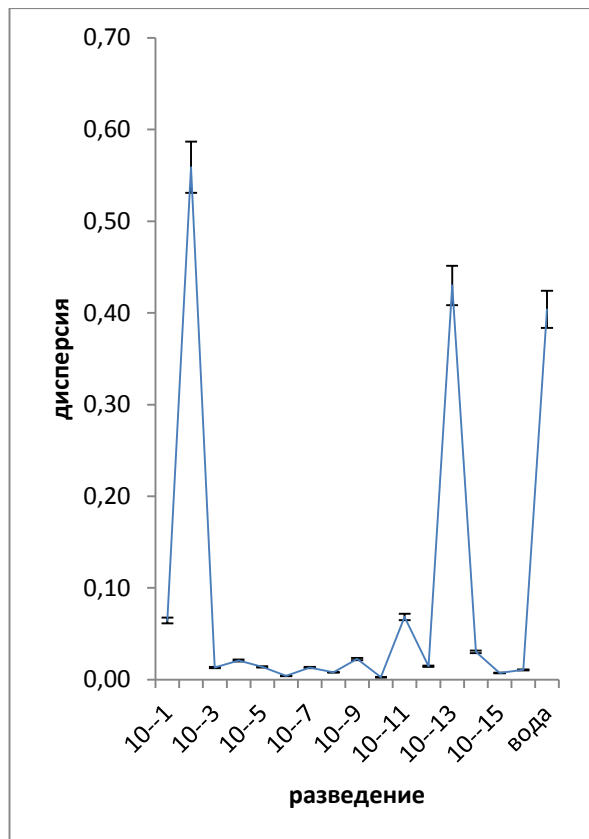
Результаты многомерного анализа П.П. ИК-спектра растворов препарата «Кортексин»  $10^{-1}$ - $10^{-16}$  М свидетельствует о том, что величины критерия Махаланобиса для всех растворов достоверно ниже, чем у растворов индивидуальных исследованных аминокислот. Максимальные значения расстояния Махаланобиса наблюдаются при концентрации исследуемого препарата  $10^{-10}$ ,  $10^{-16}$  М (рис.41).

Минимальная величина критерия Махаланобиса наблюдаются при содержании препарата  $10^{-14}$  М. Растворы лекарственного препарата концентрацией  $10^{-1}$ - $10^{-3}$  М,  $10^{-12}$ - $10^{-14}$  М не имеют достоверных отличий от эталона.

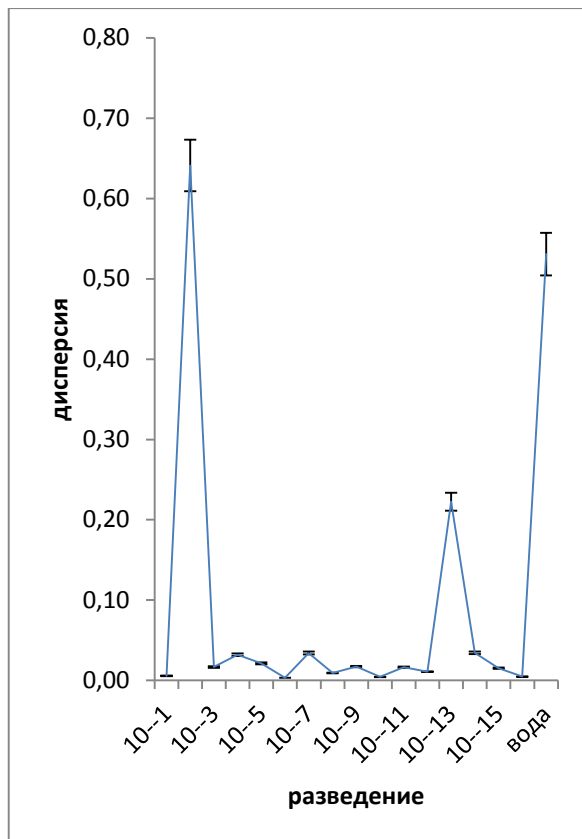
Сравнительный анализ дисперсий коэффициентов пропускания отдельных исследуемых областей инфракрасного спектра, в образцах, имеющих сходные высокие или минимальные критерии Махаланобиса, может дать более детальную идентификацию состояний водных систем возникающих в присутствии различных количеств исследуемых веществ.

Для растворов с максимальными значениями критерия Махаланобиса (разведение  $10^{10}$  и  $10^{16}$ ) установлены достоверные различия дисперсии П.П. во всем диапазоне длин волн.

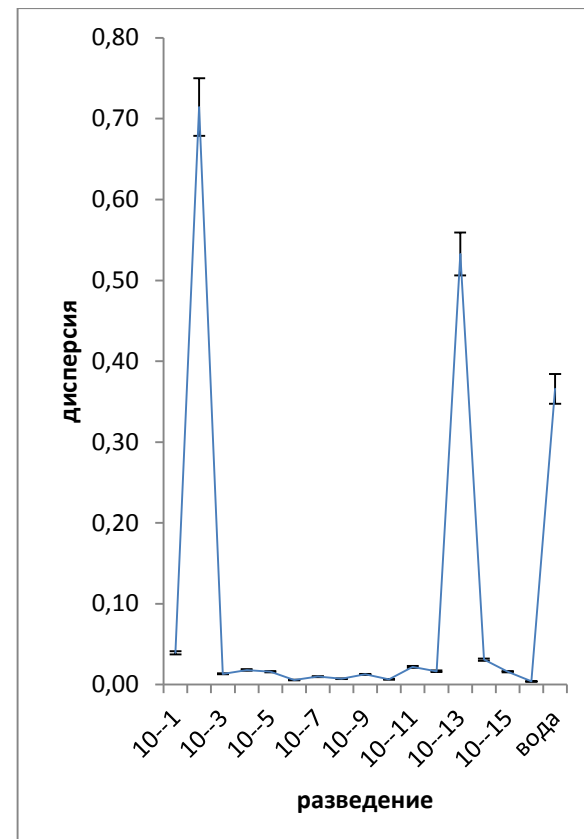
Анализ разведений  $10^{-2}$  и  $10^{-14}$  М препарата «Кортексин», имеющих минимальные значения критерия Махаланобиса, показал, что достоверно не отличаются все исследуемые диапазоны, кроме 3500-3200, 2120 - 1880, 1600 - 1535  $\text{см}^{-1}$ .



а)

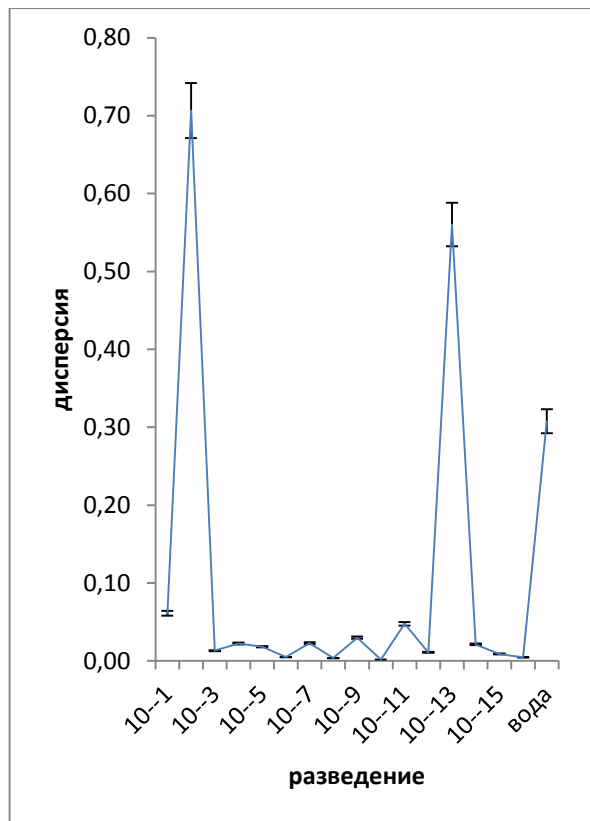


в)

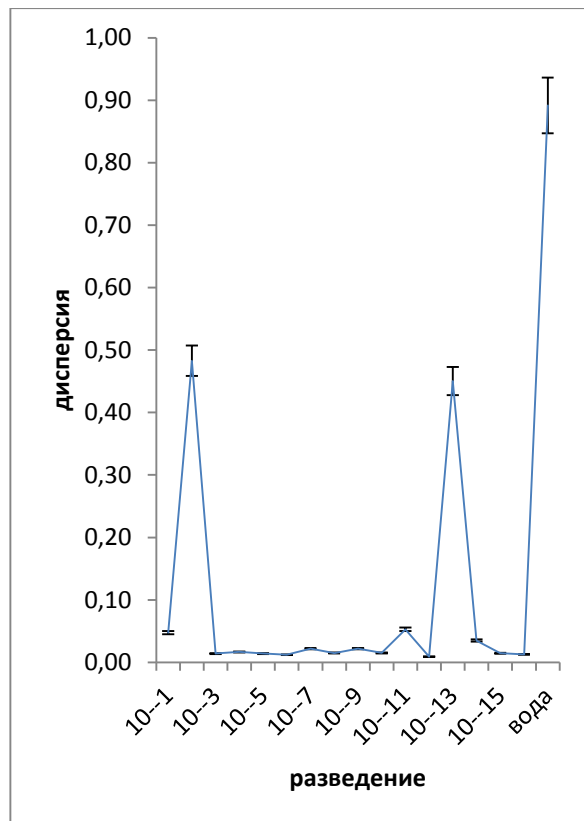


с)

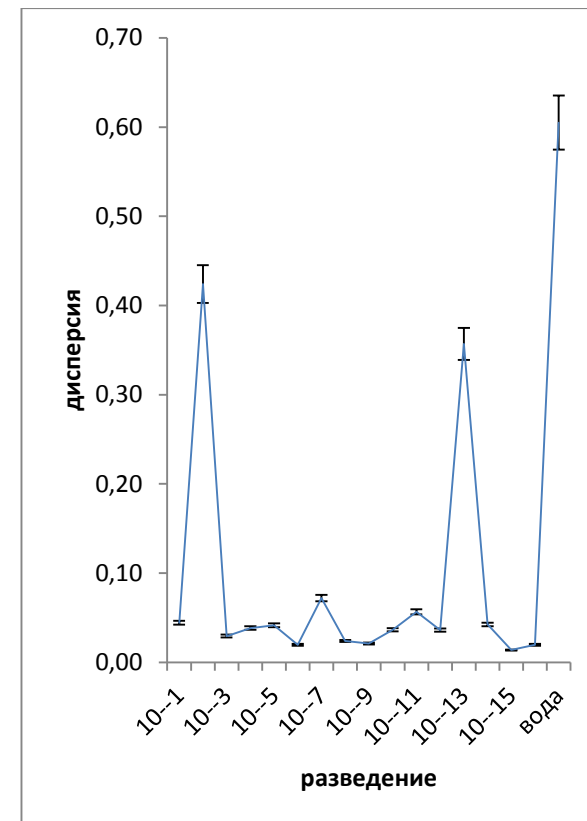
Рис.39. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов препарата «Кортексин» концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $1710-1610\text{ см}^{-1}$  в)  $1600-1535\text{ см}^{-1}$  с)  $1543-1425\text{ см}^{-1}$



а)



в)



с)

Рис.40. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельных растворов препарата «Кортексин» концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а) 1430-1210  $\text{см}^{-1}$  в) 1127-1057  $\text{см}^{-1}$  с) 1067-930  $\text{см}^{-1}$

Данные диапазоны характеризуют поглощение связей: -N-H, -OH, -NH<sub>2</sub>, деформационные и валентные колебания молекул воды, что подтверждает аналогичное действие вещества на водный компонент его растворов.

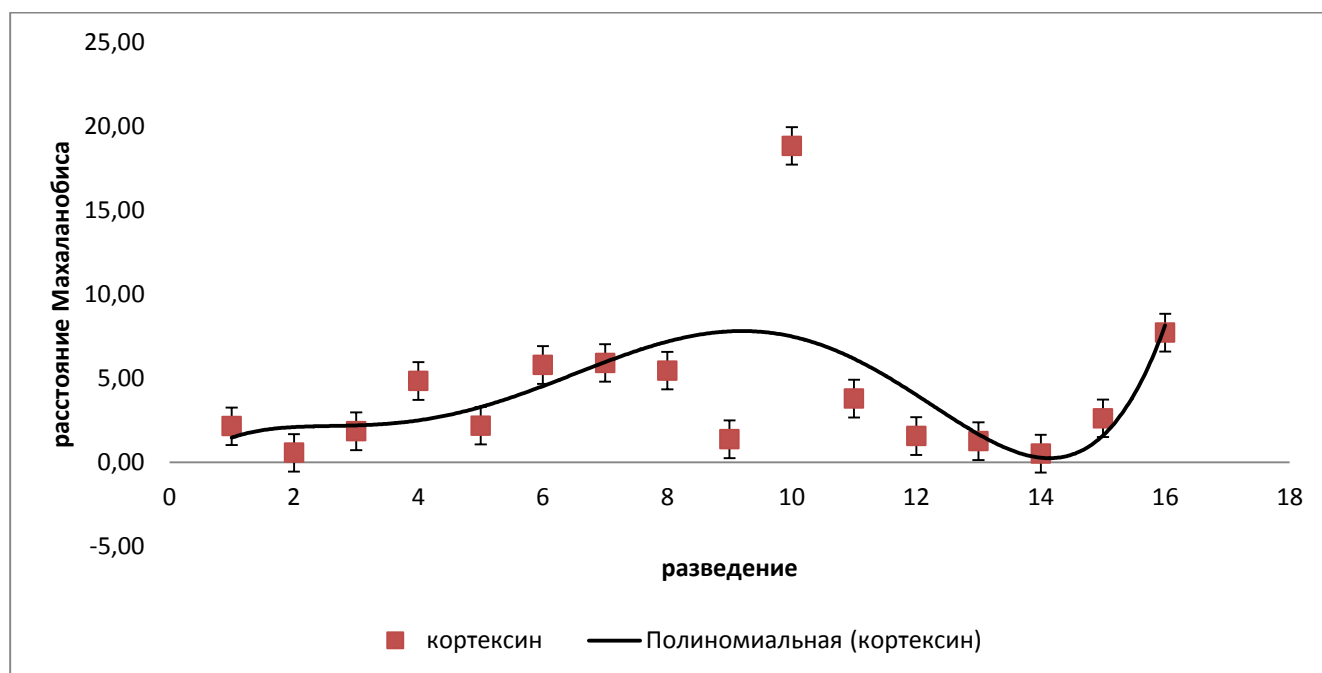


Рис.41. Расстояния Махаланобиса и его аппроксимация для водной системы раствора препарата «Кортексин» разведением от  $10^{-1}$  до  $10^{-16}$  раз

Анализ полученных результатов дает возможность предположить, что ультрамикрочколичества исследуемого вещества, как от их более высоких концентраций, являются факторами, способными резко изменять структурную организацию воды. При этом, вода обладает свойствами компенсировать присутствие активных субстанций (препарат «Кортексин») в концентрации  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  М, сохраняя свое состояние и резко его изменять при концентрации  $10^{-10}$ - $10^{-16}$  М, что может играть существенную роль в реализации различных биологических эффектов.

Таким образом, одинаково неустойчивое состояние воды может быть дополнительно идентифицировано с помощью значений дисперсий отдельных широких диапазонов ИК-спектра. В отличие от максимальных, анализ величин

колебания коэффициентов пропускания растворов исследованных веществ, имеющих сходные минимальные значения критериев Махаланобиса, показал, что достоверной разницы дисперсий в девяти исследуемых областях спектра не обнаруживается, что, по-видимому, обусловлено тем, что они характеризуют состояние водной основы растворов, приближающееся к эталону.

Следовательно, с помощью дисперсии коэффициентов пропускания ИК-спектра изученных растворов получена принципиально новая информация об особенностях влияния смеси биологически активных веществ на целостное состояние водного компонента растворов, что позволит использовать данный показатель в качестве критерия, позволяющего оценить эффективность действия различных агентов на биологические жидкости через их водный компонент, что можно и нужно учитывать в медицине, фармации и экологии.

Из полученных результатов можно заключить, что в условиях опыта, сверхмалые количества аминокислот и препарата, содержащего их смеси, в широком интервале разведений изменяют структурное состояние водной основы растворов, вероятно, по-разному индуцируют процесс образования кластерных структур, которые, в значительной степени, определяют наблюдаемые флуктуации коэффициентов пропускания и состояние водной основы растворов.

Особенность действия сверхмалых количеств исследованных веществ на дисперсии коэффициентов пропускания отдельных частот ИК-спектр и критерий Махаланобиса, характеризующий целостное состояние водной основы растворов, свидетельствует от том, что механизм влияния данного вещества на биологические процессы может быть обусловлен переструктуризацией воды. Таким образом, специфичность проведенного воздействия может идентифицироваться как с помощью критерия Махаланобиса, так и величинами отдельных дисперсий коэффициентов пропускания в конкретной области ИК-спектра.

### **5.5 Анализ изменения дисперсий показателей пропускания ИК-излучения тонких слоев модельных растворов биологической жидкости (сыворотки крови), содержащей пептидный препарат**

На данном этапе изучали изменения дисперсии П.П. ИК - излучения водной основы сыворотки крови здоровых детей под влиянием препарата «Кортексин». Исследования осуществлялись для модельных растворов этого вещества в концентрации  $10^{-1}$ - $10^{-16}$  М, растворителем была сыворотка плазмы крови.

В диапазоне  $3500$ - $3200$   $\text{см}^{-1}$  (рис.42а) было обнаружено, что наличие вещества в растворе в концентрации  $10^{-1}$  М не влияет на величину дисперсии и равно значению характерному для бидистиллированной воды. При этом отмечается значительное повышение дисперсии при концентрации препарата в растворе  $10^{-12}$  М. В интервале разведений  $10^{-1}$ - $10^{-10}$  М изменения анализируемого показателя носят параболический характер. Однако, последовательное уменьшение концентрации ведет к повышению величины исследуемого признака с достижением максимума при содержании препарата в системе  $10^{-3}$  М. Постепенное увеличение содержания вещества в растворе до  $10^{-13}$  М не вызывает достоверных изменений водной основы.

В области ИК - спектра  $3085$ - $2832$   $\text{см}^{-1}$  в растворах концентраций  $10^{-6}$ - $10^{-12}$  М установлены значительные колебания дисперсия П.П. Определено минимальное значение анализируемого показателя при содержании препарата в растворе  $10^{-8}$  М, с резким увеличением значения дисперсии для последующего разведения ( $10^9$ ), определенного в качестве максимума (рис.42в). Изменение флуктуации П.П. данного диапазона длин волн носят сходный характер с таковыми в областях:  $1127$ - $1057$  (рис.44в) и  $1067$ - $930$   $\text{см}^{-1}$ (рис.44с). Однако, незначительные различия в исследуемой величины определены для концентраций  $10^{-12}$ - $10^{-16}$  М.

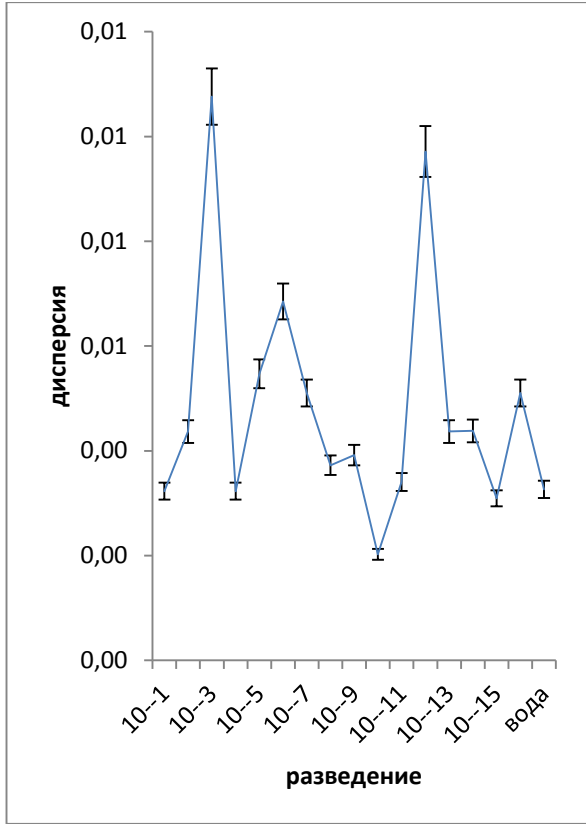
В интервале длин волн  $2120$ - $1880$   $\text{см}^{-1}$  (рис.42с) определено, что изменения дисперсии носит гармонический характер при разведении от  $10^6$  до  $10^{16}$  раз.



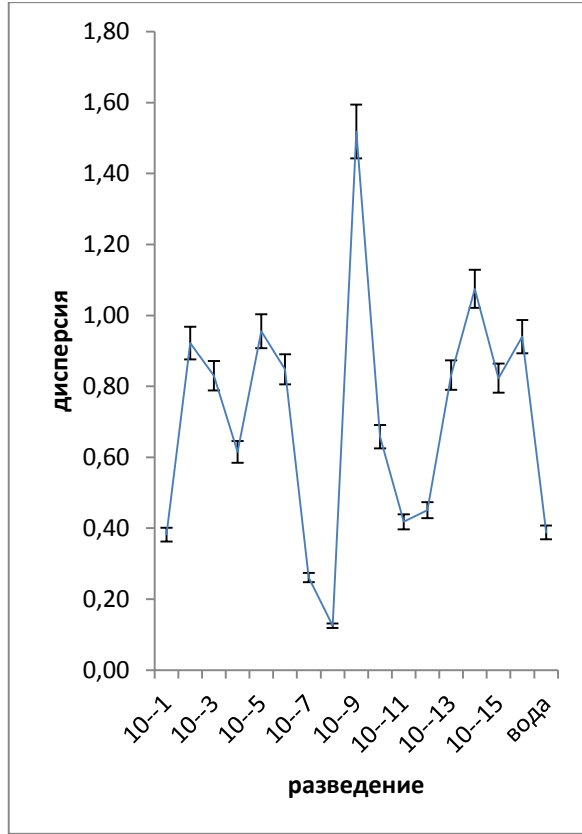
При уменьшении содержания препарата в растворе снижается и амплитуда колебания исследуемой величины. Максимальный уровень исследуемого признака наблюдается при концентрации  $10^{-7}$  М. Необходимо отметить, что величина флуктуации П.П. в растворе с концентрацией вещества  $10^{-1}$  М не отличается от эталона. Установлено, что уменьшение содержания препарата в растворе  $10^{-1}$ - $10^{-7}$  М вызывает изменение величины дисперсии сходное с интервалами: 1710-1610, 1600-1535  $\text{см}^{-1}$ . В диапазоне 1710-1610  $\text{см}^{-1}$  (рис.43а) отмечается минимальное значение анализируемой величины при концентрации исследуемого вещества в растворе  $10^{-8}$  М, которые достоверно отличались максимума ( $p < 0,01$ ). Уменьшение содержание в растворе анализируемого препарата от  $10^{-10}$  до  $10^{-16}$  М не приводит к достоверному колебанию исследуемой величины. Максимальный уровень дисперсии определен для раствора с концентрацией препарата «Кортексин»  $10^{-7}$  М, что выше контроля в 5 раз ( $p < 0,01$ ) и соответствует таковому для области ИК-спектра 1600-1535  $\text{см}^{-1}$  (рис.43в). Для диапазонов 1710-1610 и 1543-1425  $\text{см}^{-1}$  (рис. 43с) разведение модельной системы от  $10^{-10}$  М до  $10^{-16}$  М сопровождаются сходным характером изменения анализируемого показателя.

Для области длин волн 1430-1210  $\text{см}^{-1}$  (рис.44а) и диапазонов ИК-спектра 1600-1535, 1543-1425  $\text{см}^{-1}$  выявлен сходный характер изменения величины дисперсии в растворах разведением  $10^1$ - $10^9$ ,  $10^{10}$ - $10^{16}$  раз.

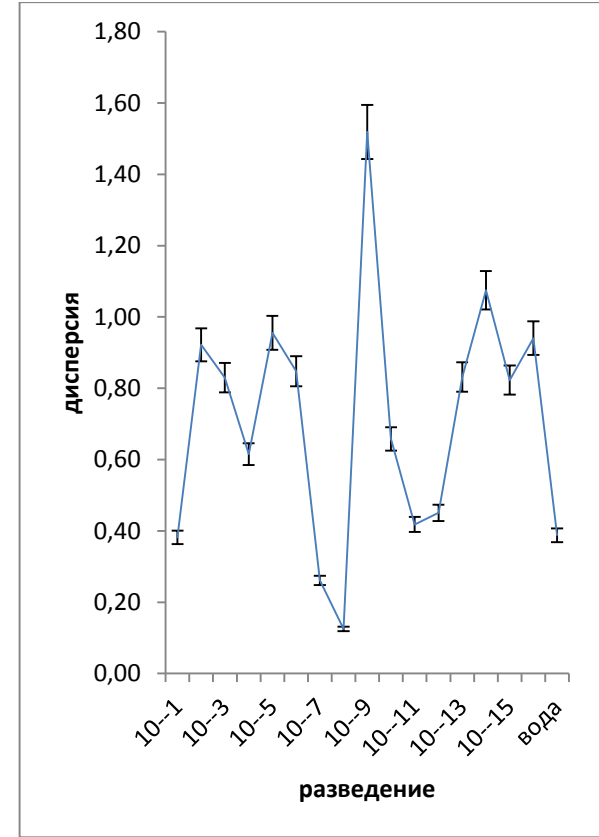
В интервалах 1127-1057  $\text{см}^{-1}$  (рис.44в) и 1067-930  $\text{см}^{-1}$  (рис.44с) уменьшение содержания исследуемого вещества в растворе от  $10^{-1}$  до  $10^{-7}$  и  $10^{-8}$  приводит к уменьшению значения дисперсии. При этом характер изменения данной величины носит синусоидальный характер с максимумами, определенными, соответственно, при содержании препарата в растворе  $10^{-2}$  и  $10^{-5}$  М и смещением максимума до концентрации  $10^{-6}$  М для интервала 1127-1057  $\text{см}^{-1}$ .



а)



в)



с)

Рис.42. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельного раствора препарата «Кортексин» в сыворотке крови концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $3500-3200 \text{ см}^{-1}$  в)  $3085-2832 \text{ см}^{-1}$  с)  $2120-1880 \text{ см}^{-1}$

Для растворов разведением от  $10^{-11}$  до  $10^{-16}$  М определяются незначительные различия в динамике изменения дисперсии.

Таким образом, анализ влияния различных количеств препарата «Кортексин» на водную основу сыворотки крови позволил выявить сходный характер изменения исследуемого показателя:

- минимальное значение дисперсии установлено для растворов в концентрации  $10^{-9}$  М во всех интервалах ИК-спектра, кроме 3500-3200  $\text{см}^{-1}$ ;

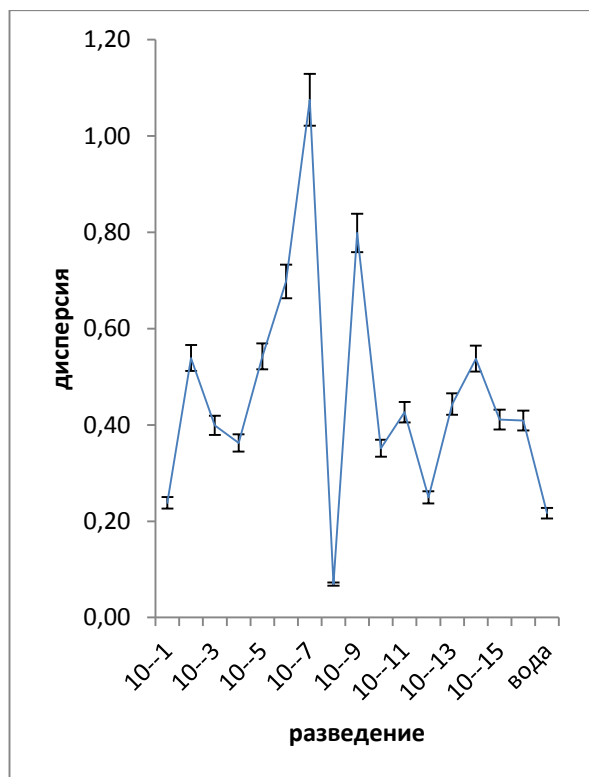
- максимальное значение флуктуации П.П. установлено для растворов в концентрации  $10^{-9}$  М интервалов 3085-2832, 1543-1425, 1430-1210, 1127-1057 и 1067-930  $\text{см}^{-1}$ .

Для растворов препарата «Кортексин» в концентрации  $10^{-1}$  -  $10^{-8}$ ;  $10^{-8}$  -  $10^{-10}$ ;  $10^{-11}$  -  $10^{-16}$  М обнаружен сходный характер колебания дисперсии в областях ИК-спектра 3085-2832, 1127-1057, 1067-930; 2120-1880, 1710-1610  $\text{см}^{-1}$ .

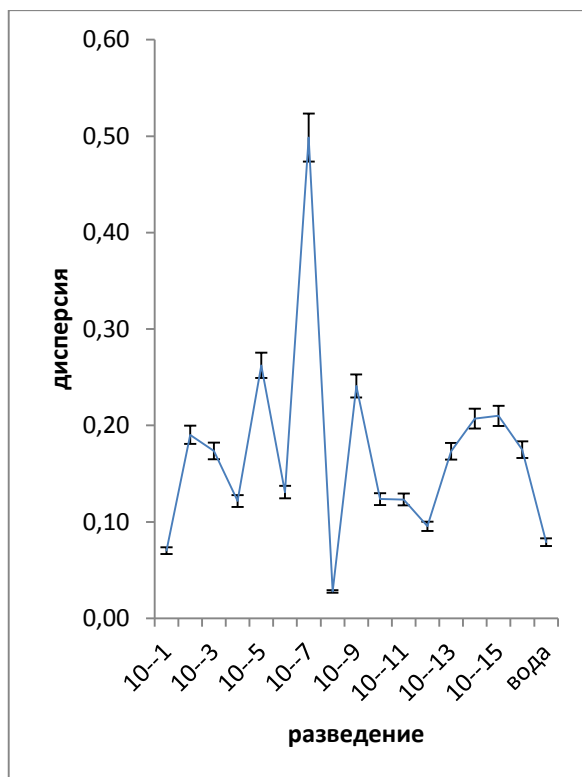
Наличие препарата «Кортексин» в растворе в концентрации  $10^{-1}$  М не изменяет величину дисперсии П.П. ИК-спектра и равен значению дисперсии контроля.

## **5.6 Диаграмма рассеяния в анализе целостного состояния модельных систем**

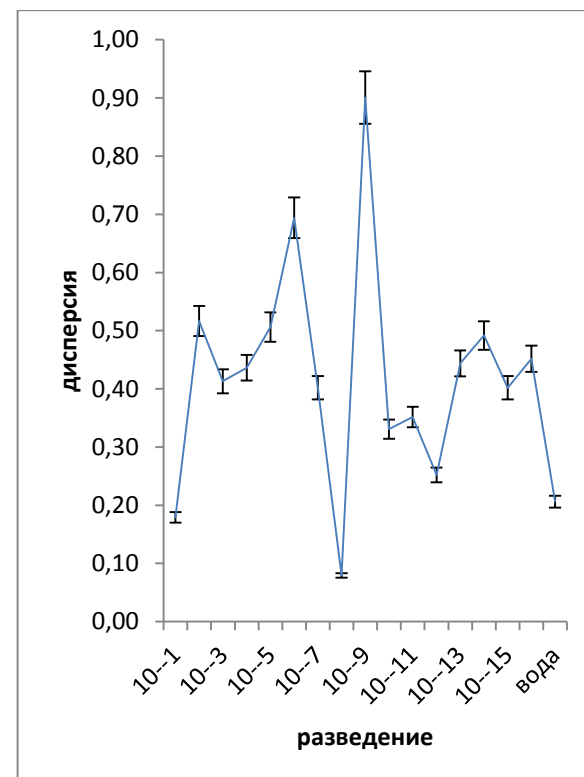
На данном этапе эксперимента проведен сравнительный анализ особенностей влияния на целостные критерии водных систем аминокислот нейтрального, кислого и основного характера и биологически активного вещества («Кортексин»), которые способны активно участвовать в процессах метаболизма. Это можно связать с тем, что любой биохимический процесс в водной среде сопровождается трансформацией ее структур (клатратов, кластеров) в ответ на изменение концентрации метаболитов, т.к. целостные состояния водной системы определяются характером и количеством присутствующих компонентов.



а)

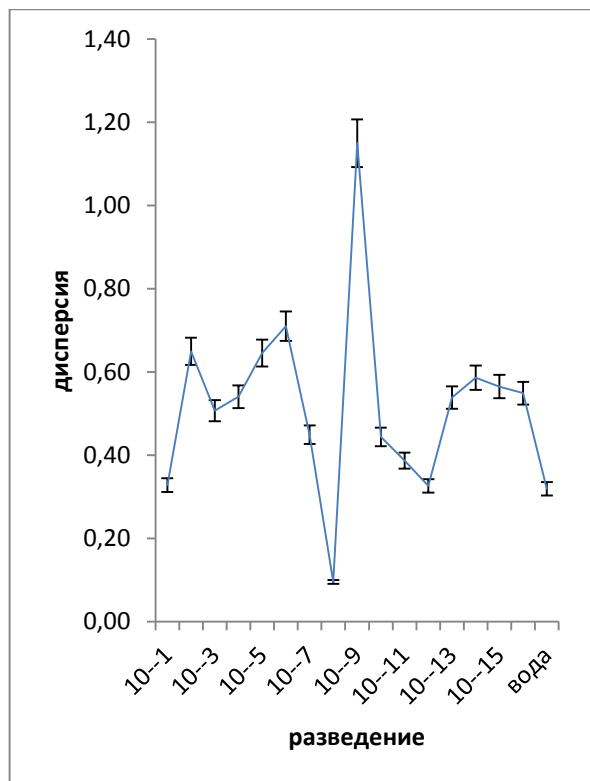


в)

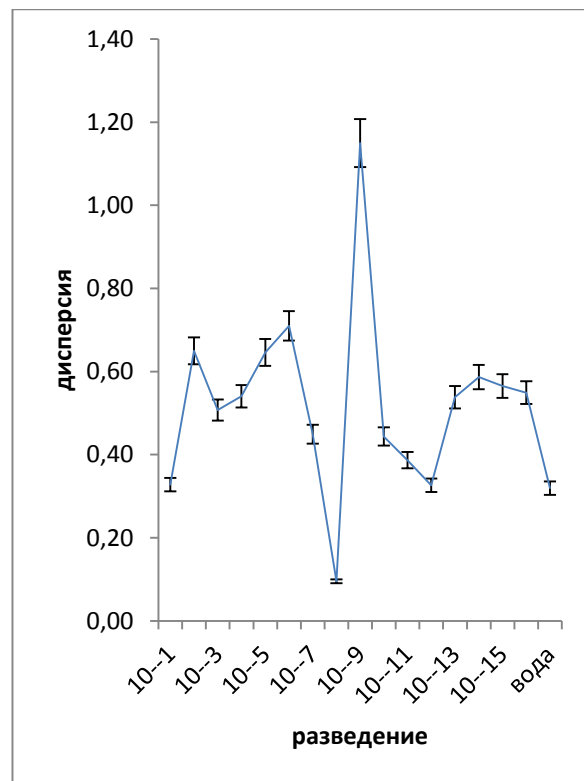


с)

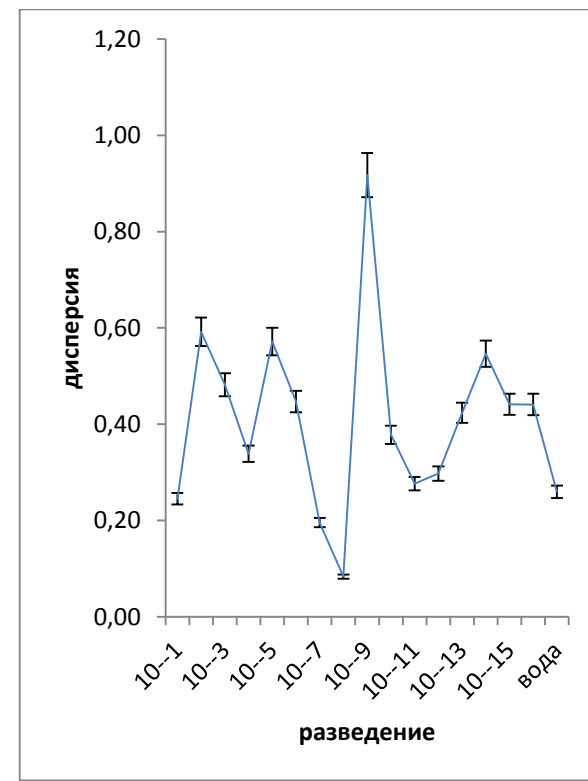
Рис.43. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельного раствора препарата «Кортексин» в сыворотке крови концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $1710-1610 \text{ см}^{-1}$  в)  $1600-1535 \text{ см}^{-1}$  с)  $1543-1425 \text{ см}^{-1}$



а)



в)



с)

Рис.44. Изменение дисперсии показателей пропускания ИК-излучения модельного раствора препарата «Кортексин» в сыворотке крови концентрацией от  $10^{-1}$  М до  $10^{-16}$  М в диапазоне: а)  $1430-1210 \text{ см}^{-1}$  в)  $1127-1057 \text{ см}^{-1}$  с)  $1067-930 \text{ см}^{-1}$

На основании данных, полученных методом инфракрасной спектроскопии о показателях пропускания и их дисперсиях, были рассчитаны критерии Махаланобиса, Бартлетта и построена диаграмма рассеивания в целостных критериях для модельных растворов аминокислот и препарата на их основе (рис.45).

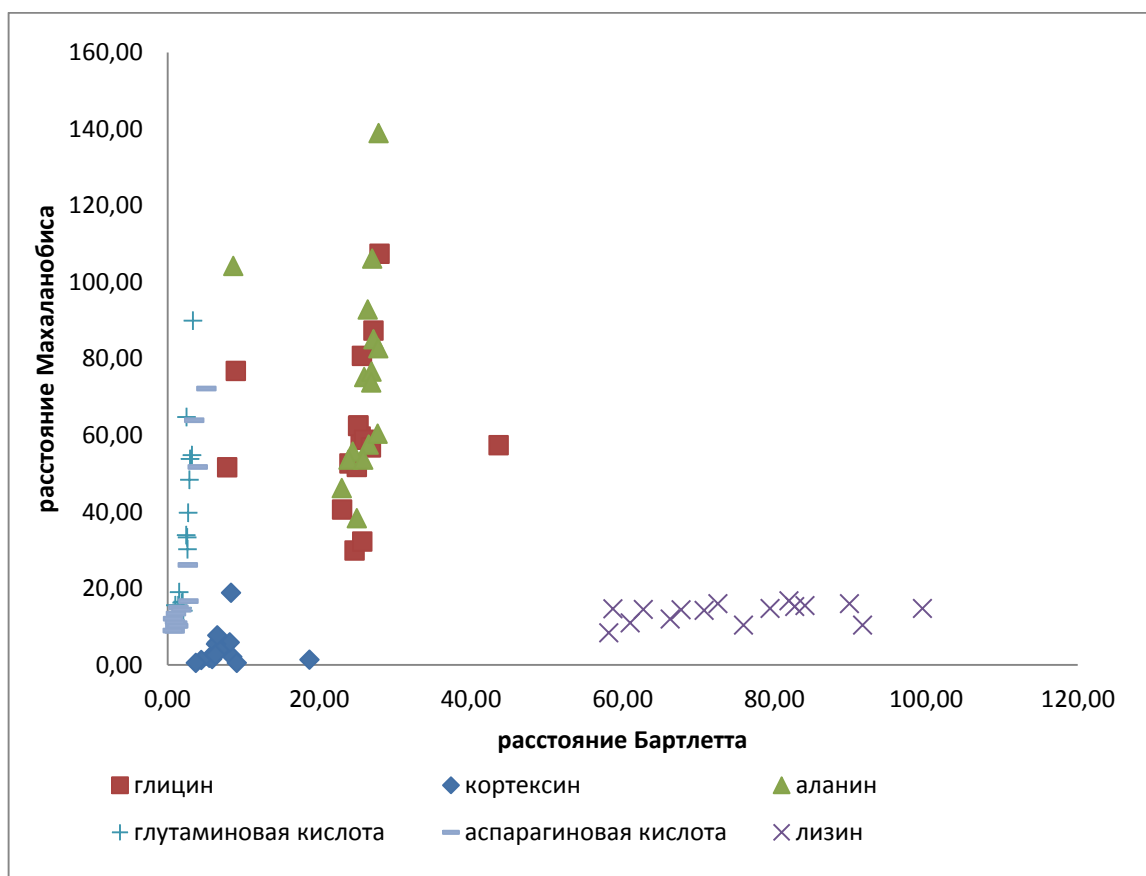


Рис.45. Диаграмма рассеивания модельных растворов аминокислот и препарата «Кортексин»

На рисунке видно, что исследуемые вещества образуют обособленные для каждого из них области. Обнаружено, что нейтральные и кислые аминокислоты располагаются на диаграмме вдоль оси Махаланобиса, в то время как Лиз формирует область, расположенную преимущественно вдоль оси Бартлетта, что может характеризовать способность вещества влиять на динамические свойства раствора. При этом препарат «Кортексин», в котором присутствуют все исследованные аминокислоты оказывает специфическое влияние на водный компонент, компактно располагаясь на диаграмме. Данный факт, видимо, связан

с гидрофобным взаимодействием всех молекул препарата, при этом создается высокая локальная концентрацию при низкой общей концентрации. В этом случае концентрация, необходимая для проявления эффекта лекарственного вещества, будет достигнута при тем меньшей концентрации вещества в растворе, чем выше его склонность к образованию гидрофобных связей между компонентами.

## Выводы

1. Интенсивности полос поглощения  $2990-2950\text{ см}^{-1}$  и  $2880 - 2860\text{ см}^{-1}$ , относящихся, соответственно, к ассиметричным и симметричным колебаниям метильной группы сложных эфиров холестерина и триглицеридов, могут использоваться, как тест для диагностики задержки психического развития.

2. Состояние водного компонента сыворотки крови подростков с задержкой психического развития достоверно отличается от такового для здоровых в диапазонах валентных, деформационных и либрационных колебаний связей Н-ОН. Проведение терапии ведет как к изменению водного компонента сыворотки крови, приближая его к значениям, характерным для здоровых, так и росту интенсивности полос  $1750-1610\text{ см}^{-1}$  и  $1067-930\text{ см}^{-1}$ , где определяются фософлипиды, содержащие С=О связи, а также фосфатидилинозитол, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин (содержат фосфатидные связи –Р-О-С и –Р-ОН).

3. Глицин, аланин, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, лизин в концентрации  $10^{-4}\text{ М}$  оказывают сопоставимое по величине и направленности воздействие на водную основу растворов (выраженное в расстоянии Махаланобиса), а в концентрациях  $10^{-3}\text{ М}$  и  $10^{-13}\text{ М}$  - разнонаправленное: для глутаминовой кислоты и лизина отмечается рост исследуемого признака в концентрации  $10^{-3}\text{ М}$  и уменьшение при  $10^{-13}\text{ М}$ , в то время как аспарагиновая кислота вызывает обратную динамику. Для глицина данные разведения вызывают противоположно направленное воздействие по сравнению с аланином.

4. Эффект влияния смеси аминокислот, содержащихся в препарате «Кортексин», на показатели инфракрасного спектра снижен по сравнению с воздействием отдельных аминокислот, что связано с его стабилизирующим воздействием на водный компонент.



**Список литературы:**

1. Абросимов В.К. Влияние связанных с гидратацией  $\alpha$ -аминокислот структурных изменений воды на термодинамические характеристики растворения аргона при 283-328 К / В.К. Абросимов, Г.В. Сибрина // Журн. структ. химии - 1990. - Т.31, №3. - с.60-65
2. Аданина В.О., Рио Ж.П. ГАМК- и Глицин-иммунореактивные синапсы в спинном мозге лягушки *Rana Temporaria* / В.О. Аданина, П.Ж. Рио // Цитология. -2010. -Том 52, выпуск 7. -с.537-548
3. Аксенов С.И. Вода и ее роль в регуляции биологических процессов и в их чувствительности к слабым воздействиям // Космическая биология и авиакосмическая медицина: Тезисы докл. XI конф.-М., 1998.-с. 21-22
4. Аксенов С.И. Роль воды в процессах функционирования биологических структур и в их регулировании / С.И. Аксенов // Биофизика. -1985.-Т. 30.-с.220-223
5. Антонченко В.Я. Основы физики воды / В.Я. Антонченко, А.С. Давыдов, В.В. Ильин. - Киев, 1991.- 667с.
6. Антошина Н.Н. Колебательные спектры многоатомных молекул. / Н.Н. Антошина, В.Г. Растилович –М.: Наука, 1968. -283с.
7. Бакеев М.И. Основы теории гидратации и растворения солей / М.И. Бакеев. - Алма-Ата: Наука Каз.ССР, 1990. - 54 с
8. Беллами Л.Ю. Новые данные по ИК-спектрам сложных молекул. -М.: Мир. 1971. -230с.
9. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия.-М.:Медицина,1990.-709с.
- 10.Бирштейн Т. М. Гидрофобные взаимодействия неполярных молекул/ Т.М. Бирштейн// В сб.: «Состояние и роль воды в биологических объектах». –Л., 1967. – с.16-30
- 11.Бонавида Б. Иммунологические эффекты веществ в сверхмалых дозах: новые механизмы и синергетические взаимодействия / Б.Бонавида // Российский хим. журнал. – 1999. –т. XLIII, №5. – с.100-107

- 12.Борина А.Ф. О структурных особенностях воды вблизи 30t° C// Инс. общей и неорг. химии АН СССР. М. 1982. - 15 с.
- 13.Брейо В.В. Перекисное окисление липидов и повреждение печени при острой алкогольной интоксикации / В.В. Брейдо // Вопросы наркологии. - 1991. -№2. -с.2-4
- 14.Бурлакова Е.Б. Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности / Е.Б. Бурлакова // Российский хим.журнал. -1999. -т.XLIII,№5.-с.3-11
- 15.Вдовенко В.М. Исследования по применению двухструктурной модели к изучению состояния воды в водных растворах / В.М. Вдовенко, Ю.В. Гуриков, Е.К. Легин. // В сб. «Структура и роль воды в живом организме». –Л.,1966. –с.3-35
- 16.Вербелович В.П. Инфракрасная спектроскопия биологических мембран. / В.П. Вербелович. –Алма-Ата .: Наука.,1977. -128с.
- 17.Вода-космическое явление / под ред. Ю.А. Рахманина, В.К. Кондратова – М., 2002. -427с
- 18.Гармонова Н.А. Новые подходы к прогнозированию гестоза у беременных с ожирением методом инфракрасной спектрометрии / Н.А. Гармонова // Материалы 8-го всероссийского научного форума «Мать и дeтjа». – Москва,2006. –с.66-67
- 19.Грибов Л.А. Введение в теорию и расчет колебательных спектров многоатомных молекул / Л. А. Грибов. –Изд. ЛГУ. -1965
- 20.Григорьев Е.И. О роли водной среды в механизмах действия иммуноактивных пептидов в сверхмалых дозах / Е.И.Григорьев // Бюллетень эксперимент. биологии и медицины. -2003. –т.136, №8. – с.173-177
- 21.Гуриков Ю.В. Современное состояние проблемы структуры воды. Состояние и роль воды в биологических объектах / Ю.В. Гуриков. - М.: Наука,- 1967. -с. 5-16

22. Дерягина Б.В. Вода в дисперсных системах / Б.В.Дерягина. - М.: Химия. - 1989.-289с.
23. Дженгурова А.В. Инфракрасная спектрометрия слезной жидкости в диагностике острых нарушений кровообращения сосудов сетчатки и зрительного нерва: дис. ... канд.мед.наук.: 14.00.08, 03.00.04 / Дженгурова Айса Валерьевна –М., 2007. -123с.
24. Дубов А.М. Многомерные статистические методы / А.М. Дубов, В.С. Мхитарян, Л.И. Трошин – М., 1998. -96с.
25. Зайцев С.В. Общие закономерности и возможные механизмы действия биологически активных веществ в малых дозах / С.В. Зайцев, А.М. Ефанов, Л.А. Сазанов // Российский хим.журнал. – 1999. – Т.ХLIII, №5. – с. 28-34
26. Западнюк В.И. Аминокислоты в медицине / В.И.Западнюк, Л.П. Купраш, М.У.Заика, И.С. Безверхая - Киев:Здоров'я,1982.-200с.
27. Зацепина Г.Н. Свойства и структура воды / Г.Н. Зацепина – М., 1974. – 166с.;
28. Зиньковский, А.К. Изменения в содержании фосфолипидов у больных неврозами / А.К.Зиньковский, Н.Н.Слюсарь // Психовегетативные аспекты внутренней патологии. – Тверь, 1992. – с. 62–64
29. Зубарева Г.М., Каргаполов А.В., Ягужинский Л.С. Влияние сверхмалых количеств пероксида водорода на водную основу растворов / Г.М. Зубарева, А.В. Каргаполов, Л.С. Ягужинский // Биофизика. – 2003. – т.48, №4. –с.581-584
30. Зубарева Г.М., Каргаполов А.В., Ягужинский Л.С. Особенности влияния сверхмалых количеств аскорбиновой кислоты на флуктуации коэффициента пропускания воды в инфракрасной области спектра / Г.М. Зубарева, А.В. Каргаполов, Л.С. Ягужинский // Доклады Академии Наук. – 2003. – т.388, №4. –С.549-551
31. И.В. Меркушкина Коррекция липидного метаболизма головного мозга при токсическом поражении/ И.В. Меркушкина // Фармация. - 2009. - №1. - с. 42-44

32. Использование ИК-спектроскопии в медицине, экологии и фармакологии / Под редакцией А.В. Каргаполова. –Тверь, 2003. –216с.
33. Каплан Н.Г. Введение в теорию межмолекулярных взаимодействий /Н.Г.Каплан. -М.: Наука, 1982. -311с.
34. Каргаполов А.В. Диагностика и прогнозирование остеопороза с помощью инфракрасной спектроскопии крови / А.В. Каргаполов, В.А. Киселев, А.В. Мамухина// II Международный конгресс «Человек и его здоровье»: тезисы докладов. –С.-Петербург, 1999. –С.15-16
35. Каргаполов А.В. Использование быстрых изменений ИК-спектра крови для прогнозирования эпилепсии / А.В. Каргаполов, Г.Е. Бордина, А.К. Зиньковский, Г.М. Зубарева// Вопросы первичной и вторичной профилактики заболеваний в Тверской области. – Тверь, 1999. –с.203-207
36. Каррер П. Курс органической химии / П. Каррер- Д.: Госхимиздат, - 1962. - 1216 с.
37. Кашпур В.А. Исследование гидратации глобулярных белков методом диэлектрической спектроскопии в миллиметровом диапазоне / В.А. Кашпур, В.Я.Малеев, Г.Ю.Щеглова // Молекулярная биология. -1976.-т.10.- с.239-345
38. Кесслер И. Методы инфракрасной спектроскопии в химическом анализе / И. Кесслер –М.:, 1964. – 328с.
39. Кисловский Л.Д. О стабилизации активных комплексов в додектраэдрических структурах воды. Физико-химический и биологический аспект проблемы / Л.Д. Кисловский // В сб. «Структура и роль воды в живом организме». – Л., 1966. –с.171-178
40. Ключев Д.А. Особенности ИК-спектров плазмы крови больных с сосудистыми осложнениями сахарного диабета типа II. / Д.А. Ключев, В.Б. Молотов- Лучанский, Л.Е. Муравлева // Материалы межвузовской научной конференции «Современные проблемы медицины и биологии», Караганда, 16.03. 2007 г., -с. 32-34

41. Кочнев И.Н. Винниченко М.Б., Смирнова Л.Б. Состояние воды в различных физико-химических условиях // В книге: Молекул, физика и биофизика водных систем. -Л., 1986. - вып. 6.-с. 53-62
42. Крестов Г.А. Термодинамика ионных процессов в растворах / Г.А. Крестов - Л.: Химия, - 1984. - 272 с.
43. Кросс А. Введение в практическую инфракрасную спектроскопию/ А.Кросс –М. -1691. -326с.
44. Крупянский Ю.Ф. Равновесие флуктуации в миоглобине и лизоциме / Ю.Ф. Крупянский // Биофизика. – 2004. – т.49, вып.3, - с.401-412
45. Ланкин Г.Ф. Биометрия /Г.Ф. Ланкин. –М.,1990. -352с.
46. Ленинджер А. Основы биохимии: В 3-х т.Т.1 .Пер. с англ./ А.Ленинджер - М.: Мир,1985. -368с.
47. Майчук Ю.Ф. Аллергические заболевания глаз / Ю.Ф. Майчук - М.: Медицина, 1983. - 223 с.
48. Маленков Г.Г. Структура воды в кристаллогидратах некоторых биологически важных веществ / Г.Г. Маленков // Состояние и роль воды в биологических объектах. - М.: Наука, - 1967. - с. 41-54
49. Медведев В.В., Волчек Ю.З. Клиническая лабораторная диагностика: справочник для врачей/ В.В.Медведев, Ю.З. Волчек/ Под ред. В.А.Яковлева – Спб.: Гиппократ,2006.-360с.
50. Митчелл Дж. Акватметрия / Дж.Митчелл, Д.Смит: Пер. с англ. – М., 1980. – 600с.
51. Мкрян Н.Г., Мелик-Оганджян Л.Г., Макарян Ш.А. Исследование плазмы и эритроцитов больных миелопролиферативными заболеваниями крови методом ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием / Н.Г. Мкрян, Л.Г. Мелик-Оганджян, Ш.А. Макарян // Биолог.журн. Армении. -2007. -№3-4(59). -с.203-209
52. Москва В.В. Водородная связь в органической химии / В.В.Москва // Соросовский образовательный журнал. -1999. -№2. – с.58-64

53. Накамото К. ИК-спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений. Пер. с англ. / К. Накамото - М.: Мир. -1991
54. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений / К. Наканиси - М.: Мир. -1965
55. Недев К.Н. Исследование поверхностного слоя белковой глобулы. Гидратация молекулы  $\alpha$ -химотрипсина / К.Н. Недев, Ю.И. Хургин // Молекуляр. биология. -1975. - т.9, №5. - с.761-767
56. Немухин А.В. Ван-дер ваальсовы кластеры / А.В. Немухин // Соросовский образовательный журнал. - 2001. - Т.7, №1. - с.39-44
57. Немухин А.В. Молекулы в матрицах и кластерах / А.В. Немухин // Соросовский образовательный журнал. - 2000. - Т.6, №6. - с.27-3
58. Николаева Н.Н. Особенности состояния воды и полиморфизм в арбутине / Н.Н. Николаева, Л.П. Смирнова, В.А. Боков // Хим. фарм. журнал. - №12, 1999. - С. 25 - 27
59. Пат. 2137126 Российской Федерации, С16G01 N33/487 Способ исследования биологических жидкостей и устройство для его осуществления / А.В. Каргаполов, А.М. Пилигин, Г.М. Зубарева, Г.П. Шматов; заявитель и патентообладатель Тверс. гос. мед. Академия - №98108578/14; заявл. 13.05.98; опубл. 10.09.99 // Бюл. -1999. -№25. -3с.: ил/
60. Першин С.М., Букин А.Ф., Нурматов А.А. Четырехфотонная лазерная спектроскопия водных растворов биополимеров в микроволновом диапазоне/ С.М. Першин, А.Ф. Букин, А.А. Нурматов // Квантовая электроника. - 2007. -Т.37, №10. - с.941-946
61. Петренко В.Е. Трех- и четырехточечные эмперические жесткие модели воды / В.Е. Петренко // Ж. физ. химии. -2002. -т.76, №2. - с.271 -277
62. Петросян В.И. Вода, парадоксы и величие малых величин / В.И. Петросян // Биомедицинская радиоэлектроника. - 2000. -№2. - с.4-9
63. Пиментел Д. Водородная связь / Д. Пиментел, О.Мак-Клеллан. М.: Мир, 1964. -107с

64. Полянская Н.К. Тактика и методы лечения больных с тяжелыми деструктивными заболеваниями и травмами роговицы: автореферат. дис. ...д.м.н.: 14.00.08/ Полянская Наталья Константиновна – Самара, 2008. -44с.
65. Рыжкина И.С. Свойства супрамолекулярных наноассоциатов, образующихся в водных растворах низких и сверхнизких концентраций биологически активных веществ / И.С. Рыжкина, Л.И. Муртазина, Ю.В. Киселева, А.И. Коновалов // Доклады РАН, 2009. Т.428. №4. -с.487-491
66. Садов А.К. Использование инфракрасной спектрофотометрии крови у больных с неспецифическими гнойно-деструктивными заболеваниями легких и плевры в качестве диагностического метода / А.К. Садов, А.В. Каргаполов, К.В. Галичев, В.С. Ржеутский и др. // Вопросы частной хирургии и онкологии: сб. науч. тр. – Тверь, 1996. – с.35-37
67. Самойлов О.Я. Структура водных растворов электролитов и гидратация ионов / О.Я. Самойлов - М.: Изд-во АН СССР, - 1957. - 179 с.
68. Самойлов О.Я., Носова Т.А. Структурные особенности воды / О.Я. Самойлов, Т.А. Носова // Журн. Структур. Химии. -1956. – вып.6, №5. – с.798-808
69. Carr S. Защитный эффект и катаболизм L-аланина и L-глутамата у крыс в условиях замкнутого пространства / С. Carr, А.Я. Розанов // Современные проблемы токсикологии, - 2000. Выпуск 4. -с.120-127
70. Семенов Н.В. Биохимические компоненты и константы жидких сред и тканей человека / Семенов Н.В. -М.: Медицина, 1971. -151с
71. Сильченко С.А. Инфракрасная спектрометрия слезной жидкости в диагностике первичной открытоугольной глаукомы: дис. ... канд. мед. наук.: 14.01.07, 03.01.04 / Сильченко Светлана Александровна – М., 2001. -86с.
72. Соловьев Ю.И. История учения о растворах / Ю.И. Соловьев - М.: Изд-во АН СССР, - 1959. - 580 с.

73. Соркисов Г.Н. Дальний порядок в жидкостях: короткодействующие и дальнедействующие потенциалы. Док. Акад. Наук. - 1998. - Т. 359, №3. - с. 326
74. Сошникова Л.А. Многомерный статистический анализ / Л.А. Сошникова, В.Н. Тамашевич. – М.: Юнита-Дана, 1999. -350с.
75. Федоренко И.И. Поиск новых возможностей для ранней диагностики синдрома поликистозных яичников / И.И. Федоренко, Ю.В. Раскуратов, В.М. Микин// Материалы 8-го всероссийского научного форума «Мать и дитя». – Москва, 2006. –с.544-545
76. Черенкова Ю.А. Закономерности взаимодействия алифатических аминокислот с водой / Ю.А. Черенкова, Д.Л.Котова, Т.А. Крысанова / Сорбционные и хроматографические процессы. -2008. –т.8, вып.2. – с.314-319
77. Чиргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков/ Ю.Н. Чиргадзе –М.: Медицина. -1965
78. Шеуджен М.Б. Инфракрасная спектроскопия слезной жидкости при проникающих ранениях глазного яблока: дисс. ...канд.мед.наук.: 14.00.08, 03.01.04/ Шеуджен Мурат Байзетович – М., 2009. -244с.
79. Шляпочников В.А. Колебательные спектры алифатических нитросоединений / В.А.Шляпочников –М., 1989. -124с.
80. Эйзенберг Д. Структура и свойства воды / Д. Эйзенберг, В.Кауцман - Л.: Гидрометеиздат, - 1975. - с. 259-268
81. Ямсков И.А. Механизм биологического действия физико-химических факторов в сверхмалых дозах / И.А. Ямсков, В.П. Ямскова, А.Н. Даниленко // Российский химический журнал - 1999. -Т. XLIII, №2. -с.74-80
82. Aksyonov S.I. On the state of water in biological systems. Evaluation of methods of its investigation / S.I. Aksyonov // Water and ions in biological systems. - 1985.- P. 687-696
83. Astos M.B. Hydration of ds-DNA and ss-DNA by neutron quasielastic scattering / M.B Astos // Biophys J. – 2004. –vol.86, №6. –P.3822-3827



84. Bergqvist S. Heat capacity effects of water molecules and ions at a protein-DNA interface / S. Bergqvist // *J. Vj. Biol.* -2004. -vol.336, №4. -P.829-842
85. Bjerrum N. Structure and Properties of Ice. / N. Bjerrum // *Dan. Mat. Fys. Med.* – 1951. - № 27 –P.271-273
86. Bragg A.E. et al. Hydrated electron dynamics: from clusters to bulk // *Science.* 2004. - Vol. 306, № 5696. – P. 669-611
87. Brockhays R. Lactoferrin and the protective function of the lacrimal fluid / R. Brockhays // *Ophthalmologies.* - 1976. - Vol. 173, № 34. - P. 268-210
88. Bunkin A.F. Four-Photon Spectroscopy of ortho/para spin-isomer H<sub>2</sub>O molecules in sub-millimeter range / A.F. Bunkin, S.M. Pershin, A.A. Nurmatov // *Laser Phys. Lett.* -2006. -№3(6). P. 275-277
89. Chan, P.H. Oxygen radicals in focal cerebral ischemia / P.H.Chan // *Brain. Pathol.* – 1994. – Vol. 4. – №1. – P. 59-65
90. Chapman D. Infrared spectra and the chain organization of erythrocyte membranes / D. Chapman, U. Kamat, R. Lereine // *Science.* -1968.- vol.160, №3825.-p.314-316
91. Chatake T. Hydration in proteins observed by high-resolution neutron crystallography // *Proteins.* -2003. –vol.50, №3. – P.516 -523
92. Choi S. Interaction of cytochrome C with cardiolipin: an infrared spectroscopic study / S. Choi, J.M. Swanson // *Biophys. Chem.* -1995. Vol.54, №3. -P.271-278
93. Crespo I. Glutamine treatment attempts Endoplasmic reticulum stress and apoptosis in TNBS-induced colitis / I. Crespo // *PLoS One.* -2012. - №7(11) –  
Режим доступа: [10.1371/journal.pone.0050407](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050407)
94. Dakanali M. Synthesis and spectroscopic and structural studies of a new cadmium (II)-citrate aqueous complex. Potential relevance to cadmium (II)-citrate speciation and links to cadmium toxicity / M. Dakanali // *Inorg. Chem.* - 2003. –vol.42, №8. – P.2531 -2537
95. Duke M.M. The volumetric and thermochemical properties of aqueous solutions of L- valine, L-leucine and L-isoleucine of 288,15, 298,15, 313,15 and 328,15 K

- / M.M. Duke, A.W. Hakin, R.M. Mckay // *Can. J. Chem.* - 1995. - V. 72, №6. - P. 1489-1494
96. Everett K.H. How mach do we real know about water? / K.H. Everett // *Water and aqueous solutions.* - 1986.- P. 232 – 342
97. Finney J.I. The role of water perturbations in biological processes / J.I. Finney // *Water and aqueous solutions.* Bristol-Boston. -1986.- P.227-232
98. Franck P. Applications of infrared spectroscopy to medical biology / P. Franck // *Cell. Mol. Biol.* – 1998 -Vol. 44, № 2. - P. 273-275
99. Frank H.S. Strukture of Ordinary Water / H.S. Frank // *Science.*-1970. –N196. – P.635
100. Garafalo K. Oral l-serine supplementation reduces production of neurotoxic deoxysphingolipids in mice and humans with hereditary sensory autonomic neuropathy type 1./ K. Garafalo// *The journal of clinical investigation.* -2011. - №121 (12). -P.4735-4745
101. Gaurav K. The Role of Glutamine Synthetase and Glutamate Dehydrogenase in Cerebral Ammonia Homeostasis / K. Gaurav // *Indian journal of Medical and pediatric oncology.* – 2012. -№1. -P.13-20
102. Hagler A.T. Current status of the water structure problem; application to proteins / A.T.Hagler, H.F.Scherada, G.Nemethy // *Ann.New York Acad. Sci.* -1973. – vol.204. –P.51-75
103. Heise H.M. Multireariate determination of glucose in venue blood by total reflection infrared spectroscopy/ H.M. Heise, R. Marbach, G. Janatsch // *Anal.Chem.Sep.* -1989. –vol.61, №18. –P.2009-2015
104. Horeecker B.L. The absorbtion spectra of haemoglobin and its deriration in the visible and near infrared regions/ B.L. Horeecker // *J.Biol.Chem.* -1990. – vol.148,№1. – P.173
105. Huang C.K.T., Wikfeldtb T., Tokushimac et al. The inhomogeneous structure of water at ambient conditions. // *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2009. V.106. P.15214-15218

106. Jesberger, J.A. Oxygen free radicals and brain disfunction / J.A. Jesberger // Int. J. Neurosci. - 1992. - Vol. 57. - P.1-17
107. Katragadda M. Structural studies of the putative helix 8 in the human beta(2) adrenergic receptor: an NMR study / M.Katragadda, M.W. Maciejewski, P.L. Yeagle // Biochim. Biophys. Acta. -2004.-vol.1663, №(1-2).- P.74-81
108. Kauzmann W. Some factors in the interpretation of protein denaturation / W.Kauzmann// Adv. Protein. Chem. – 1959. –vol.14. –P.1-63
109. Keutsch F.N., Saykally R.J Water clusters: untangling the mysteries of the liquid, one molecule at a time // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. \_ 2001. - Vol.98, №19. - P. 10533 – 10540
110. Lo S. Y., Geng X., Gann D. Evidence for the existence of stable-water-clusters at room temperature and normal pressure. // Physics Letters A., 2009. V.373. P.3872–3876
111. Lutz O. Use of the walden product to evaluate the effect of amino acids on water structure / O. Lutz, M. Vrachopoulou, M. Groves // J. Pharm and Pharmacol. - 1994. - V. 46, № 9. - P. 698-703
112. Mahfoud R. Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins / R.Mahfoud, // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277. – P. 11292-11296
113. Marcovich R.J. Introduction to Fourier transform infrared spectroscopy and applications in the pharmaceutical sciences / Marcovich R.J. // Pharmacol. Res. -1991. - Vol. 8, № 6. - P.663-675
114. Mildvan A.S. Structures and mechanisms of Nudix hydrolases / A. S. Mildvan // Arch Biochem Biophys. -2005. –vol.433,N1.- P.129-143
115. Miyazaki M. Infrared spectroscopic evidence for protonated water clusters forming nanoscale cages / M. Miyazaki // Science. – 2004. –vol.304, N5674. – p.1134-1137
116. Mustafa A. Serum amino acid levels as a biomarker for renal cell carcinoma / A. Mustafa// The journal of urology. - №186(4). - P.1206-1212

117. Nozaki Y. The Solubility of Amino Acids and Two Glycin Peptides in Aqueous Ethans and Dioxane Solutions / Y. Nozaki, C. Tanford // J. Biol. Chem.-1976. - Vol. 246.- №7.- P.2211-2217
118. Oka T. Estimation of infrared spectrophotometry of calcium oxalate dehydrate to calcium oxalate monohydrate ratio / T. Oka, T. Koide, T. Sonda // J.Urol. - 1985. -vol.134. -P.813-817
119. Oki J., Eto T., Yamagata Z. Survey of neurosis and psychosomatic diseases among children in hospitals and schools in Japan. / J. Oki, T. Eto, Z. Yamagata // Jpn J Pediatr Soc.- 2001.-№105. -P.1317-1323
120. Olsen C. Dephosphorylation of the calcium pump coupled to counterion occlusion / C.Olsen // Science.-2004. - vol.306, №5705. - P.2251-2255
121. Roy R. Infrared fluorescent detection of D1S80 alleles / R. Roy // Forensic. Sci. Int. - 1997.-V.87, № 1.-P.63 -71
122. Sailer E.L. Use of multiple internal reflection spectroscopy in the study and identification of steroids/ E.L. Sailer// Appl. Spectroscopy. - 1968. -vol.22, №5, part 1. - P.445-448
123. Santiveri C.M. Factors involved in the stability of isolated beta-sheets: Turn sequence, beta-sheet twisting and hydrophobic surface burial / C.M. Santiveri // Protein Sci. -2004. - vol.13,№4- P.1113-1147
124. Shibata M. Water molecules in the Schiff base region of bacteriorhodopsin / M. Shibata, T.Tanimoto, H.Kandori // J. Am. Chem. Soc. -2003. -vol.125, №44. - P.13312-13313
125. Shin J.W. Infrared signature of structures associated with the H<sup>+</sup>(H<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>(n=6 to 27) clusters / J.W. Shin // Science. -2004. -vol.304, №5674. - P.1137-1140
126. Shoji J., Inada N. Sawa M Antibody array-generated cytokine profiles of tears of patients with vernal keratoconjunctivitis or giant papillary conjunctivitis // Jpn. J. ophthalmol. -2006. -Vol.50' N3. -P. 195-200
127. Soderberg M. Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease / senile dementia of Alzheimer's type / M.Soderberg // J. Neurochem. - 1999. - Vol. 259. - P. 1646-1653

128. Sotty F. Therapeutic potential of metabotropic glutamate receptor modulators / F.Sotty // *Current neuropharmacology*. – 2012. -№1 -P.12-48
129. van Balen G.P. Liposome/water lipophilicity: methods, information content, and pharmaceutical applications / G.P. van Balen // *Med. Res. Rev.* – 2004. –vol.24, №3 – P.299-324
130. Wales D.L. Structure, dynamics, and thermodynamics of clusters: tales from topographic potential surfaces / D/J/ Wales // *Science*. – 1996. –vol.271. – P.925-929
131. Wang Z. Homocysteine suppresses lipolysis in adipocytes by activation the AMPK pathway / Z. Wang // *American journal of physiology, Endocrinology and Metabolism*. -2011. -№301(4). -P.703-712
132. Ye B.H. Syntheses and characterization of aqua-bridged dimetallic complexes,  $M_2(\mu-H_2O)(\mu-OAc)_2(Im)_4(OAc)_2(M=Mg^{2+}, Mn^{2+} \text{ And } Ni^{2+})$ . Structural models for the active sites of dimetallic hydrolases / B.H. Ye, I.D. Williams, X.Y. Li// *J Inorg Biochem*. -2002. – vol.92, №2. – p. 128-136
133. You H. A  $\beta$  -neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and N-methyl-D-aspartate receptors / H.You // *PNAS*. -2012. -vol. 109 №5. -P.1737-1742
134. Zubavicus Y., Grunze M. New insight irjfo the structure of water with ultra fast probes // *Science*. - 2004. - Vol. 304, № 5673- P. 973 – 976
135. Zwier T.S. The structure of protonated water clusters // *Science*. - 2004. - Vol' 304, № 5674. – P. 1119 – 1120