

*На правах рукописи*



**Бутавин  
Никита Юрьевич**

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

03.01.04 - биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Тверь – 2014

Работа выполнена на кафедре химии ГБОУ ВПО «Тверская государственная медицинская академия» Минздрава России

**Научный руководитель:** доктор биологических наук, профессор **Зубарева Галина Мефодьевна**

**Официальные оппоненты:**

**Ямскова Виктория Петровна** - доктор биологических наук, профессор, ФГБУН «Институт биологии развития им. Кольцова» РАН, ведущий научный сотрудник, руководитель группы регуляторных белков;

**Хижняк Светлана Дмитриевна** - кандидат химических наук, ФГБОУ ВПО «Тверской государственной академии», зав. лабораторией спектроскопии центра коллективного пользования


**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится: «02» *апреля* 2015 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДМ212.263.08 в Тверском государственном университете по адресу: 170002, г. Тверь, пр. Чайковского, 70.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Тверского государственного университета по адресу: 170000, г. Тверь, ул. Володарского, 44а и на сайте: <http://university.tversu.ru>.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



**Петушков М.Н.**

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность проблемы**

В последнее время особую тревогу вызывает качественное ухудшение состояния здоровья молодого поколения. По данным Научного центра охраны здоровья детей и подростков РАМН, 10% детей считаются здоровыми, среди неуспевающих учащихся примерно 50% - подростки с задержкой психического развития, причины которой разнообразны [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 определить возможность для решения теоретических и практических проблем детского здоровья.

Известно, что изменения метаболических процессов и соответствующие им изменения биологических жидкостей происходят на молекулярном уровне задолго до клинических проявлений заболевания как под воздействием эндо- (возникновение патологии), так и экзогенных факторов (лекарственные препараты, озонотерапия, физиолечение) [Каргаполов А.В., 1978-2008; Зубарева Г.М., 1995-2014; Бордина Г.Е., 2001; Мкрян Н.Г., 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., 2011; Nishikata N., 2011]. Однако для биологических систем характерно сочетание процессов синтеза и распада, в связи с чем актуально изучение действия аминокислот в качестве экзогенного фактора на данные процессы. 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 веществ на биологическую систему через ее водный компонент, причем эффект от действия экзогенного фактора в микродозе сопоставим с эффектом макродоз или превышает его [Бурлакова Е.Б., 1999 - 2014; Коновалов А.И., 2002-2014; Пальмина Н.П., 1994-2014; Matera L. 2004].

Один из способов, позволяющих изучить изменения, происходящие в системе под влиянием эндо- и экзогенных факторов на молекулярном уровне - физико-химический метод: инфракрасная спектроскопия (ИКС).

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

Специфика изменения ИК-спектра сыворотки крови может быть ценным источником информации о действии агента и функциональном состоянии организма.

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

### **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 изменений водной основы растворов при воздействии 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.

Установлена 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); Международной конференции «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.

## **ОБЩЕЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы исследования**

Работа одобрена Этическим комитетом ГБОУ ВПО Тверская ГМА Минздрава РФ. Все подростки и их законные представители, от которых было

получено информированное согласие на все виды проводимых манипуляций, были ознакомлены с характером проводимого 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) был установлен при прохождении 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 1М растворов аминокислот различной химической природы и биологической активности в разведениях от  $10^1$  до  $10^{16}$  раз: аминокислоты глицин (50046 Sigma, SID 24873323), аланин (05129 Sigma, SID 24845820), глутаминовая (49449 Sigma, SID 24872908) и аспарагиновая кислота (A8949 Sigma,



SID 24891385 ), лизин (SID 24885268) и лекарственный препарат «Кортексин» (ООО «Герофарм»).

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

## **Методы исследования**

### **ИК-спектроскопия**

- ИК-спектроскопию биологических и модельных растворов проводили с помощью ИК-спектрометра с Фурье преобразованием Nicolet IS10 с приставкой НПВО при длине волны  $4000-400\text{ см}^{-1}$ . Обработка результатов осуществлялась в программной среде Omnic.

- Для исследования модельных водных систем в работе был использован аппаратно-программный комплекс (АПК) «ИКАР» (сертификат №5745 от 20.11.98г.), позволяющий регистрировать показатели пропускания ИК-излучения и их дисперсии в девяти широких диапазонах ( $3500-3100$ ,  $3085-2732$ ,  $2120-1880$ ,  $1831-1623$ ,  $1729-1533$ ,  $1543-1396$ ,  $1470-1330$ ,  $1170-1057$ ,  $1087-963\text{ см}^{-1}$ ) (Каргаполов А.В. и соавт., патент РФ №2137126, 1999г.). Кюветы, в которых проводили анализ, были изготовлены из хлористо-бромистого и йодисто-бромистого таллия (KRS). Время, в течение которого исследовали один образец объемом 0,02мл, не превышало 30 секунд. Первичную обработку сигнала с АПК проводили специализированным программным обеспечением на базе операционной системы Windows XP (MATLAB 6.5 Math Works Inc) (лицензия №146229).

Для статистической обработки результатов исследований применялась среда математического моделирования MATLAB, где рассчитывались критерии Фишера и Стьюдента. Критический уровень ( $p$ ) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

### **Многомерный анализ результатов ИК-спектроскопии**

На основании ковариационных матриц был проведен многомерный анализ и рассчитан критерий Бартлетта, который позволил при наличии эталона (бидистиллированной воды) определить степень различия дисперсий анализируемых систем на основании математического выражения:

$W=b*(-2\ln v)$ , где параметры  $b$  и  $-2\ln v$  определяются по формулам:

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

$-2\ln v=-(\sum_{j=1}^2(n_j-1))*\ln|S|-\sum_{j=1}^2(n_j-1)*\ln|S_j|$ , где  $n_j$  – число строк в таблице данных,  $S_j$  – объединенная ковариационная матрица. Величина многомерного критерия Бартлетта сравнивается с  $\chi^2_{\alpha, v}$  (Хи-квадрат распределение) при  $\alpha=0,05$ ;  $v= n_1+ n_2-2$ . Данный показатель характеризует состояние системы с позиций его динамичности.

Для учета характера изменений абсолютных показателей пропускания исследуемых модельных растворов применялся целостный критерий – расстояние Махаланобиса, который рассчитывался при сравнении исследуемого объекта с эталоном. В данном случае анализировали средние значения показателей пропускания инфракрасного излучения двух многомерных выборок модельных систем по формуле:  $D_{o, \text{э}} = (M_o - M_{\text{э}}) * S_{\text{э}}^{-1} * (M_o - M_{\text{э}})^T$ , где  $M_o$  и  $M_{\text{э}}$  – векторы средних выборок «образца» и «эталона» соответственно,  $S_{\text{э}}^{-1}$  – обратная ковариационная матрица «эталона»,  $T$  - знак транспонирования.

Таким образом, критерии Махаланобиса и Бартлетта позволили оценить статические и динамические свойства состояния. Использование диаграммы рассеивания в координатах этих показателей для графической и аналитической интерпретации полученных результатов позволило определить

на основе дистанционного анализа степень близости модельных систем друг к другу и оценить эффекты воздействия вещества на изменения водной составляющей.

## **Результаты исследования и их обсуждение.**

### **ИК-спектроскопия биологической системы- сыворотка крови подростков**

*а) ИК-спектроскопия сыворотки крови подростков здоровых и с задержкой психического развития*

В ИК-спектре сыворотки крови подростков с задержкой психического развития относительно здоровых установлено изменение ширины полос и высоты пиков всех основных характеристических групп (рис.1).

Так, 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). Поглощение в области  $3207\text{ см}^{-1}$ , смещенное к  $3190\text{ см}^{-1}$  и менее интенсивное, может быть приписано симметричным валентным колебаниям связанных групп  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}$ .

Для валентных колебаний  $-\text{CH}$  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 ( $3013\text{-}3030\text{ см}^{-1}$ ). В ИК-спектре сыворотки крови детей с ЗПР не обнаружены полосы, относящиеся к ассиметричным ( $2990\text{-}2950\text{ см}^{-1}$ ) и к симметричным колебаниям метильной группы эфиров холестерина, триглицеридов, глицерола ( $2880\text{-}2860\text{ см}^{-1}$ ). Установлено изменение ширины полосы ассиметричных валентных колебаний группы  $-\text{CH}_2$  жирных кислот и фосфолипидов с  $2950\text{-}2880\text{ см}^{-1}$  до  $2957\text{-}2870\text{ см}^{-1}$ .

Определено незначительное уширение диапазона (с падением интенсивности поглощения), характеризующего симметричные валентные

колебания  $-\text{CH}_3$  групп жирных кислот и фосфолипидов, от  $2870\text{-}2830\text{ см}^{-1}$  до  $2870\text{-}2825\text{ см}^{-1}$ .

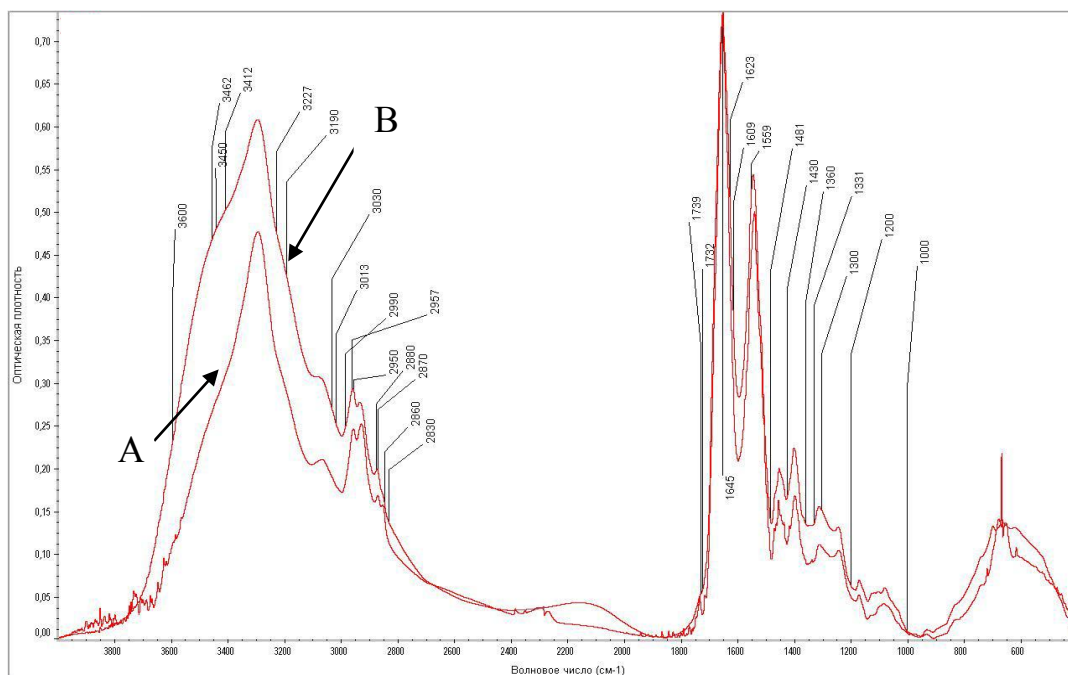


Рис. 1. ИК-спектр сыворотки крови подростков здоровых (А) и с задержкой психического развития (В)

Отличие в интенсивности пиков деформационных колебаний  $-\text{CH}_3$  и  $-\text{CH}_2$  ( $2996\text{-}2819\text{ см}^{-1}$ ) указывает на различное количество жирных кислот, фосфолипидов и триглицеридов, т.е. на изменение соотношения липиды/белки в сыворотке плазмы крови больных детей. Отмечается значительное увеличение площади диапазона валентных колебаний группы  $-\text{C}=\text{O}$ , определяемой в липидах, эфирах холестерина и триглицеридах ( $1739\text{-}1732\text{ см}^{-1}$ ). В диапазоне  $1200\text{-}1000\text{ см}^{-1}$ , где основными являются колебания групп  $-\text{O}-\text{P}=\text{O}$  фосфолипидов, фосфорилированных белков, полоса поглощения для сыворотки плазмы крови группы № 1 ниже контрольной, что говорит о меньшем содержании вышеназванных веществ.

В области  $3600\text{-}3450\text{ см}^{-1}$  обнаружены пики, которые можно отнести к валентным колебаниям  $-\text{OH}$  групп, что говорит о наличии воды в составе гидратных оболочек биологически активных веществ крови. Область

деформационных колебаний молекул воды сыворотки плазмы ( $1645\text{ см}^{-1}$ ) исследуемой группы по сравнению с контрольной достоверно ниже.

*б) ИК-спектр сыворотки крови подростков с ЗПП в процессе лечения*

Обнаружено, что применение препарата «Кортексин» приводит к понижению значений пропускания в области ИК-спектра, характеризующего полосы поглощения групп:  $\text{C}=\text{O}$  связи (фосфолипиды), а также связей групп  $\text{P-O-C}$  и  $\text{P-OH}$ , присущих фосфатидилинозитолу, фосфатидилэтаноламину и фосфатидилсерину ( $1750\text{-}1610\text{ см}^{-1}$  и  $1067\text{-}930\text{ см}^{-1}$  соответственно), что свидетельствует об активации метаболизма фосфолипидов и увеличении концентрации основных представителей данного класса соединений в сыворотке. Это подтверждает взаимосвязь метаболических процессов аминокислот и липидов [Лунева Е.В., 2007; Кильчевская М.А., 1976].

Для оценки влияния препарата «Кортексин» на водную составляющую сыворотки крови рассчитали площадь полос поглощения ИК-спектра, характерных для воды (валентные, деформационные и либрационные колебания). Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Величина полос поглощения ИК-спектра водной основы сыворотки крови при воздействии лекарственного препарата «Кортексин» (1М) ( $p < 0,05$ )

Вид колебаний Н-ОН связей	Величина полосы для сыворотки крови у 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*

Представленные экспериментальные данные свидетельствуют об увеличении измеряемого признака во всех анализируемых диапазонах, что

связано с изменением структурного состояния водной основы исследуемой модельной системы.

### **ИК-спектроскопия модельных систем**

*а) Фурье ИК-спектроскопия водных модельных систем, содержащих нейтральные (Гли и Ала), кислые (Глу и Асп) аминокислоты и их двухкомпонентные смеси*

На ИК-спектре 1М растворов исследуемых аминокислот определяются характеристические пики всех функциональных групп, входящих в состав этих веществ. При длине волны  $1620\text{ см}^{-1}$  для всех растворов наблюдаются деформационные колебания связи Н–ОН, которые незначительно отличаются по интенсивности, что говорит о сходном действии веществ на водную основу модельных растворов.

В ИК-спектре двухкомпонентной смеси происходит наложение спектральных полос исследуемых аминокислот, при этом не обнаружено исчезновение полос поглощения, отвечающих одному из компонентов, и не определено новых спектральных полос, подтверждающих образование новых связей.

*б) Широкополосная ИК-спектроскопия растворов, содержащих малые и сверхмалые количества нейтральных (Гли и Ала) и кислых (Глу и Асп) аминокислот*

Исследование растворов проводили с помощью АПК «ИКАР» и анализировали дисперсии показателей пропускания свежеприготовленных 1М растворов в разведении от  $10^1$  до  $10^{16}$  раз.

Установлено, что сверхмалые количества глицина ( $10^{-11}\text{М}$ ) и аланина ( $10^{-14}\text{ М}$ ) вызывают наибольшую флуктуацию показателей пропускания в диапазонах  $1127\text{-}1057\text{ см}^{-1}$  и  $1710\text{-}1610\text{ см}^{-1}$  соответственно (либрационные и деформационные колебания воды), а наименьшую - при разведении  $10^{16}$  раз в диапазоне  $1600\text{-}1535\text{ см}^{-1}$  для первой аминокислоты и  $10^5$  раз в области ИК-

спектра 3085-2832  $\text{cm}^{-1}$  для второй (валентные и деформационные колебания молекул воды соответственно).

Для растворов глутаминовой и аспарагиновой кислот в концентрации  $10^{-10}\text{M}$  и  $10^{-15}\text{M}$  соответственно максимальная величина дисперсии показателей пропускания определена в диапазоне 3085-2832  $\text{cm}^{-1}$ , а минимальная - в области спектра 1600-1535  $\text{cm}^{-1}$  при разведении в  $10^1$  и  $10^{10}$  раз соответственно (валентные и деформационные колебания молекул воды соответственно).

Многомерный анализ полученных данных позволил установить для нейтральных аминокислот следующее: одинаковые разведения ( $10^{-5}$ ,  $10^{-14}$ ,  $10^{-16}$ ) вызывают разнонаправленное изменение величины критерия Махаланобиса (рис. 2).

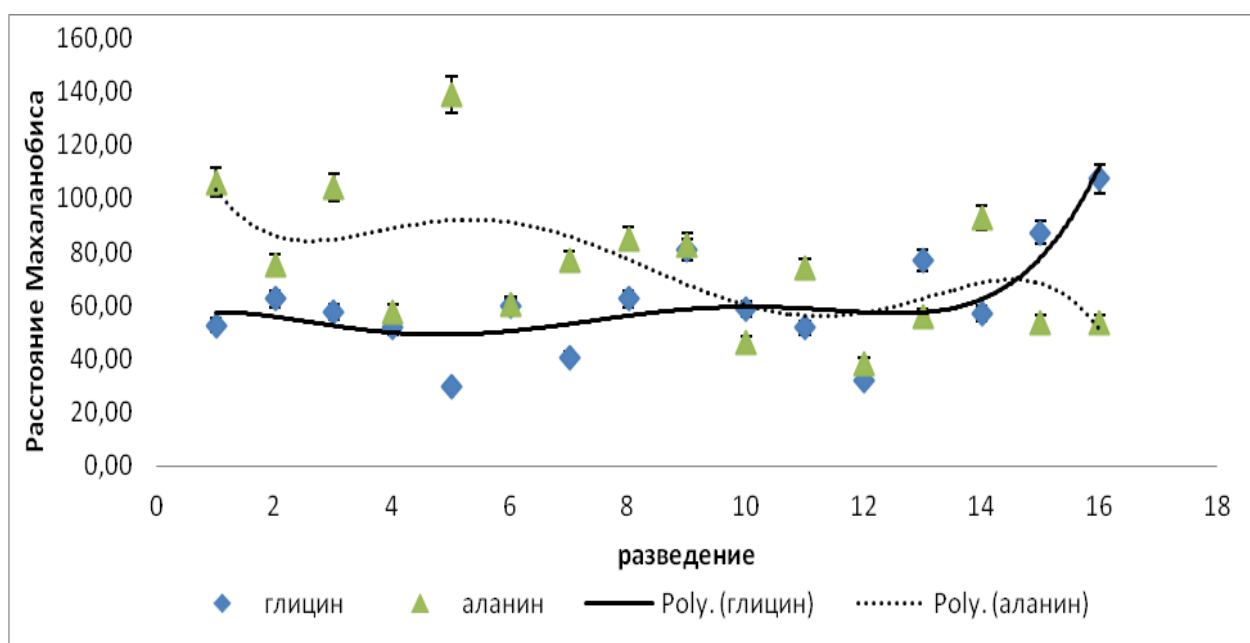


Рис. 2. Влияние глицина и аланина (разведение 1М растворов в  $10^1$ - $10^{16}$  раз) на величину флуктуации показателей пропускания ИК-излучения тонких слоев воды. Количественная оценка дана в величине критерия Махаланобиса

Для растворов кислых аминокислот показатель целостного состояния изменяется волнообразно с достижением максимальных значений при разведении в  $10^9$  раз. Установлено, что равное количественное содержание кислот вызывает сходное изменение критерия Махаланобиса (рис. 3).

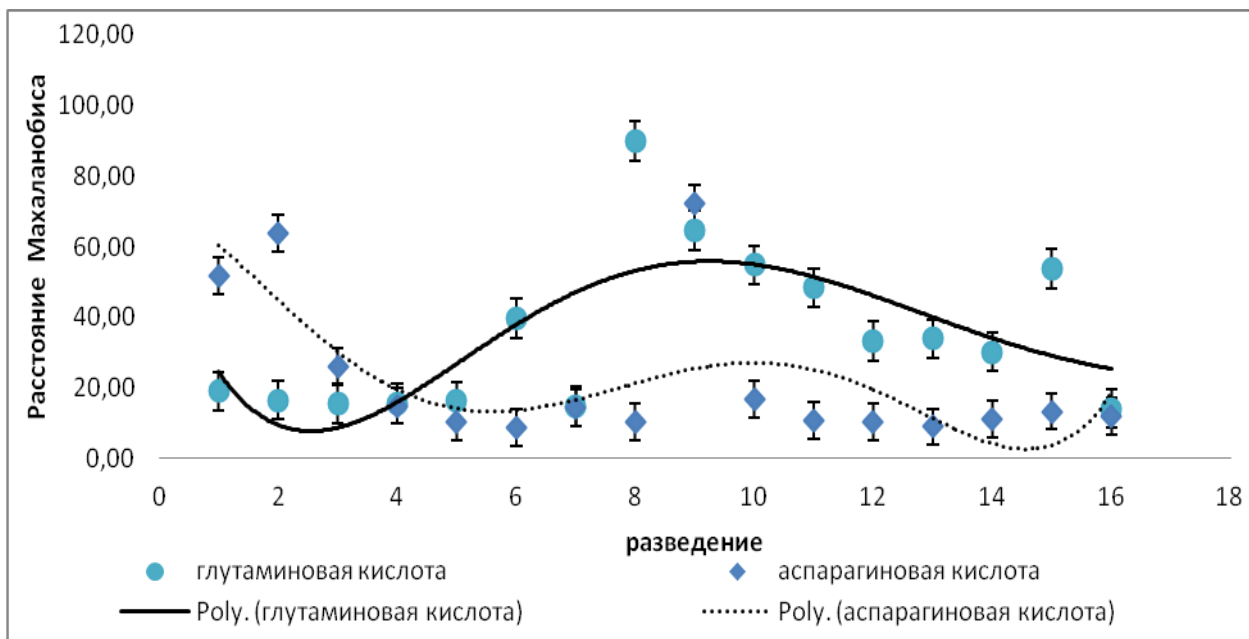


Рис. 3. Влияние глутаминовой и аспарагиновой кислот (разведение 1М растворов в  $10^1$ - $10^{16}$  раз) на величину флуктуации показателей пропускания ИК-излучения тонких слоев воды. Количественная оценка дана в величине критерия Махаланобиса

в) ИК-спектроскопия растворов лизина

В спектре 1 М раствора лизина, полученного с помощью Nicolet IS10, установлены характеристические полосы всех химических связей данной аминокислоты.

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 [Стрельникова О.Ю., 2002].

Анализ данных, полученных при помощи АПК «ИКАР», показал, что лизин вызывает наибольшую флуктуацию показателей пропускания в концентрации  $10^{-2}$  М диапазона  $1710$ - $1610\text{ см}^{-1}$ , а наименьшую - при разведении  $10^{12}$  в области ИК-спектра  $1600$ - $1535\text{ см}^{-1}$ , где определяются связи N-H и амидные группы.



Многомерный анализ полученных данных позволил установить, что лизин практически не влияет на значение расстояния Махаланобиса, которое при разведении 1М раствора в 16 раз колеблется в пределах 8 у.е. и существенно не отличается от эталона (рис. 4).

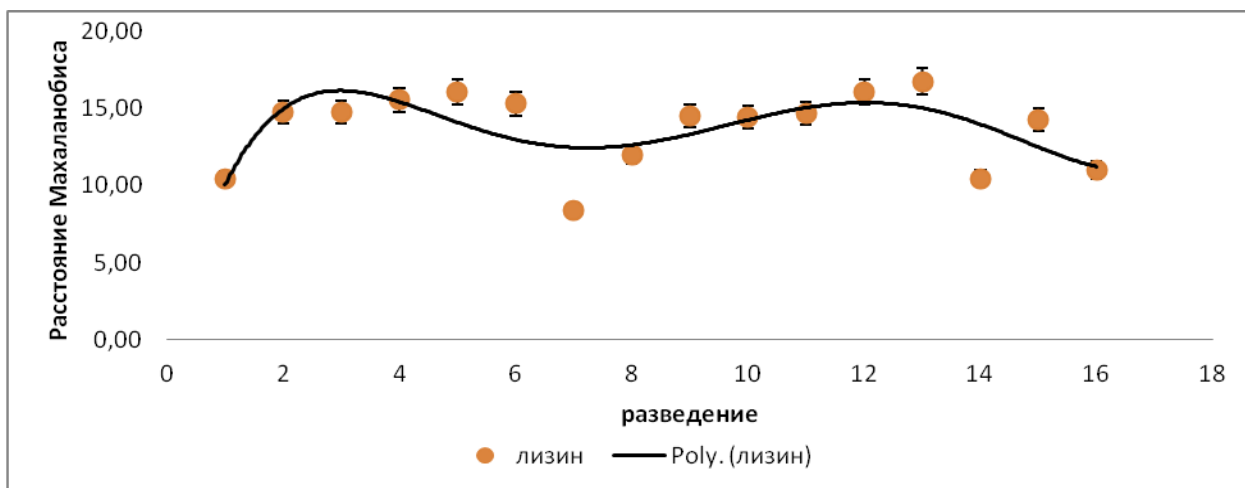


Рис. 4. Изменение расстояния Махаланобиса водного раствора лизина (при разведении 1М раствора) и его аппроксимация

Этот факт можно объяснить наличием дополнительной аминогруппы в радикале аминокислоты, которая снижает ее кислотные свойства и уменьшает эффект влияния на структурное состояние водной основы раствора.

Таким образом, исследуемые аминокислоты оказывают влияние на структурное состояние водной основы растворов, что соответствует данным литературы, согласно которым аминокислоты по силе данного воздействия можно представить в виде ряда: аспарагиновая кислота  $\approx$  глутаминовая кислота > глицин  $\approx$  аланин > лизин [Бейлина Д.С., 2003]. При этом установлено: в концентрации  $10^{-4}$  М исследованные аминокислоты оказывают сопоставимое по силе воздействие на водную основу, в то время как в концентрациях  $10^{-3}$ ,  $10^{-13}$  М характер этого воздействия отличен.

#### г) ИК-спектроскопия водной модельной системы препарата «Кортексин»

Фурье спектроскопия 1М раствора Кортексина позволила установить наличие всех функциональных групп, соединений, входящих в его состав. Незначительное изменение их положения относительно справочных данных

связано с их взаимодействием с водной основой раствора. В спектре не обнаружены связи новых веществ, образованных в результате взаимодействия соединений, составляющих препарат.

Анализ растворов, полученных путем разведения исходного раствора от  $10^1$  до  $10^{16}$  раз с помощью АПК «ИКАР», показал, что наибольшая величина дисперсий показателей пропускания определена для концентрации  $10^{-2}$  М в диапазоне  $3085-2832 \text{ см}^{-1}$ , а наименьшая - при разведении  $10^{10}$  в области ИК-спектра  $1430-1210 \text{ см}^{-1}$ .

По сравнению с растворами отдельных аминокислот целостный критерий Махаланобиса для разведений препарата «Кортексин» имеет более низкие значения (рис. 5), что можно объяснить его стабилизирующим воздействием на водный компонент.

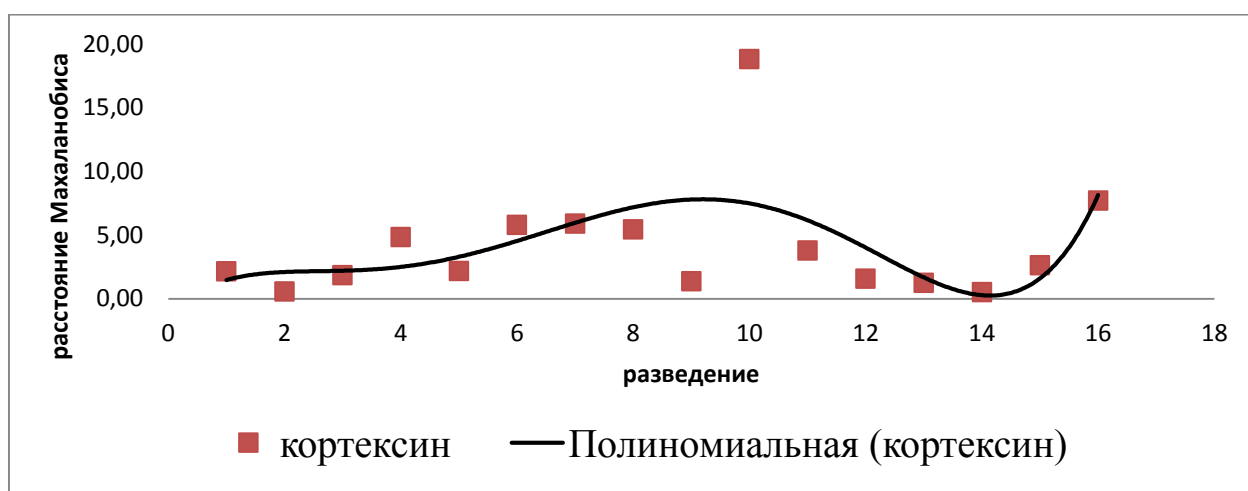


Рис. 5. Изменение расстояния Махаланобиса водного раствора препарата «Кортексин» (при разведении 1М раствора в  $10^{16}$  раз) и его аппроксимация

На основании полученной методом инфракрасной спектроскопии информации о показателях пропускания и их дисперсиях была построена диаграмма рассеивания в целостных критериях для модельных растворов аминокислот и препарата «Кортексин» (рис. 6).

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.

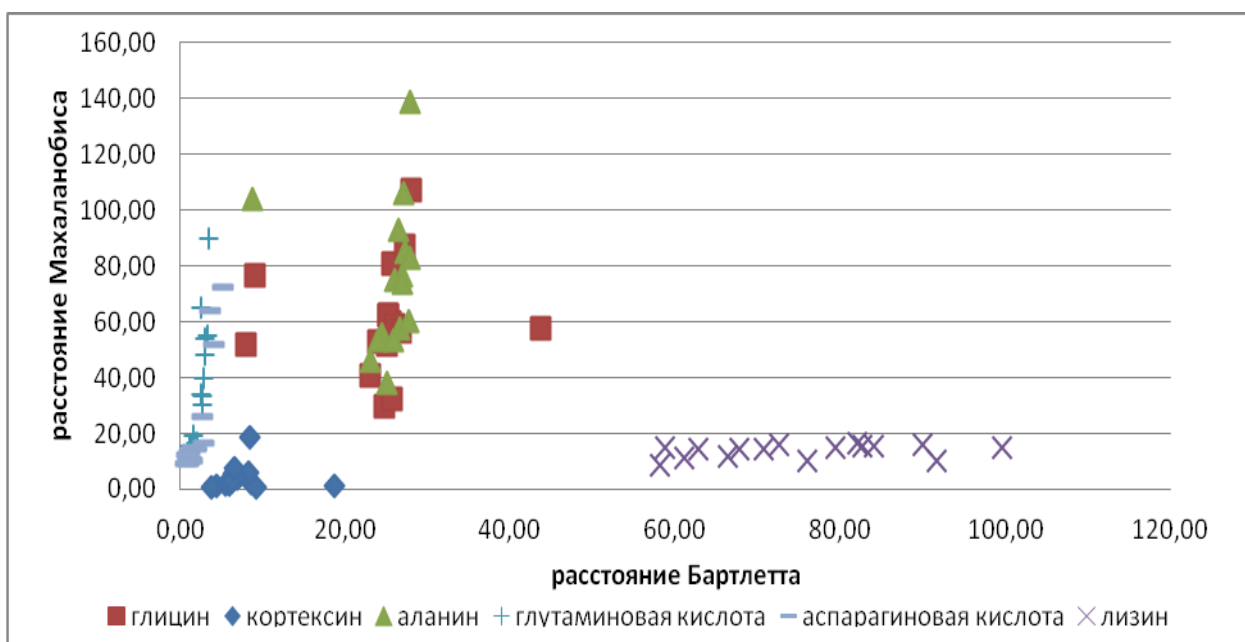


Рис. 6. Диаграмма рассеивания модельных растворов аминокислот и препарата «Кортексин»

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 концентрация при низкой общей концентрации. В этом случае концентрация, необходимая для проявления эффекта лекарственного вещества, будет достигнута при соотношении: чем выше склонность к образованию гидрофобных связей между компонентами, тем меньше концентрация вещества в растворе.

## 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 биохимический 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 фосфолипиды, 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 его 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 работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бутавин Н.Ю., Зубарева Г.М., Зиньковский К.А., Мусина Л.О. Особенности изменения инфракрасного спектра сыворотки крови у женщин, страдающих эпилепсией / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева, К.А. Зиньковский, Л.О. Мусина // Вестник ТвГУ, Серия «Биология и экология». – 2011. – С. 157-162

2. Бутавин Н.Ю., Зубарева Г.М. Эффекты действия малых концентраций некоторых аминокислот на водный компонент их растворов / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева // Вестник ТвГУ, Серия «Химия». – 2012. – № 28. – С. 55-61

3. Бутавин Н.Ю., Зубарева Г.М. Влияние кислых аминокислот и их смеси на водный компонент модельных растворов [Электронный ресурс] / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – №3. – Режим доступа: [www.science-education.ru/109-9204](http://www.science-education.ru/109-9204)

4. Бутавин Н.Ю., Зубарева Г.М. ИК-спектроскопия в изучении влияния глицина, аланина и их смеси на водный компонент модельных растворов [Электронный ресурс] / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 2; – Режим доступа: [www.science-education.ru/108-8909](http://www.science-education.ru/108-8909)

5. Бутавин Н.Ю., Зубарева Г.М. Влияние глицина и аланина и их смеси на водный компонент модельных растворов /Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – №4. – С. 71 - 74

6. Бутавин Н.Ю., Зубарева Г.М. Возможность использования инфракрасной спектроскопии в диагностике задержки психического развития [Электронный ресурс] / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 4. – Режим доступа:[http://www.rae.ru/use/?section=content&op=show\\_article&article\\_id=10002493](http://www.rae.ru/use/?section=content&op=show_article&article_id=10002493)

7. Бутавин Н.Ю. Инфракрасный спектр сыворотки крови детей с задержкой психического развития / Н.Ю. Бутавин // Тезисы IV международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения – 2011». – 2011. – С. 270

8. Бутавин Н.Ю. Зубарева Г.М., Зиньковский А.К., Кочегуров В.В. Инфракрасная спектрометрия сыворотки крови в диагностике и контроле эффективности лекарственной терапии подростков с задержкой психического развития / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева, А.К. Зиньковский, В.В. Кочегуров // Материалы межвузовской учебно-методической конференции, Тверь. – 2011. – С. 121-124.

9. Бутавин Н.Ю., Зубарева Г.М., Волкова Л.Р., Лопина Н.П. Диагностика и контроль лекарственной терапии у подростков с задержкой психического развития методом инфракрасной спектрометрии сыворотки крови / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева, Л.Р. Волкова, Н.П. Лопина // Материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 45-летию кафедры педиатрии и 20-летию кафедры педиатрии последипломного и дополнительного образования, Ставрополь. – 2011. – С. 210-213

10. Бутавин Н.Ю. Зубарева Г.М., Алексеев А.В., Зиньковский А.К., Кочегуров В.В. ИК-спектрометрия в диагностике задержки психического развития у подростков / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева, А.В. Алексеев, А.К. Зиньковский, В.В. Кочегуров // Решение вопросов здравоохранения, теоретической и прикладной медицины. Ежегодный сборник научно-практических работ, Тверь. – 2011. – С. 46-47

11. Бутавин Н.Ю., Зубарева Г.М. Инфракрасная спектрометрия сыворотки крови детей подросткового возраста / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева // Вестник ТвГУ, Серия «Химия». – 2012. – №13. – С.51-55

12. Бутавин Н.Ю., Зубарева Г.М., Зубарев С.М. Подтверждение эффективности применения препарата «Кортексин» у подростков методом

ИК-спектрометрии / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева, С.М. Зубарев // Успехи современного естествознания. – 2012. – №7. – С. 19-21

13. Бутавин Н.Ю. Зубарева Г.М. Изменение водной основы растворов под влиянием сверхмалых количеств глицина и аланина / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева // VI Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в медицине и биологии» С.-Петербург. – 2012. – С. 70

14. Бутавин Н.Ю. Зубарева Г.М., Зубарев С.М. Особенности ИК-спектров водных растворов нейтральных аминокислот и лекарственного препарата, содержащего их смесь / Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева, С.М. Зубарев // Космос и биосфера: тезисы докладов X Международной крымской конференции. Симферополь. – 2013. – С. 154-155

15. Бутавин Н.Ю. Зубарева Г.М., Отклик водного компонента на воздействие малых количеств аминокислот [Электронный ресурс] /Н.Ю. Бутавин, Г.М. Зубарева// Химия, физика, биология воды. София. – 2013. – Режим доступа: <http://www.waterconf.org/participants-materials/2013/posters>