

## ИНСТРУМЕНТАЛЬНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СТРУКТУР С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Корнеев В.Н.<sup>1</sup>, Шлектарёв В.А.<sup>2</sup>, Забелин А.В.<sup>3</sup>, Ланина Н.Ф.<sup>2</sup>, Толочко Б.П.<sup>4</sup>,  
Вазина А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики клетки ФИЦ ПНЦБИ РАН

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ, e-mail: kvn\_40@mail.ru

<sup>2</sup> ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

г. Пущино, РФ

<sup>3</sup> Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

г. Москва, РФ

<sup>4</sup> ФГБУН Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН

г. Новосибирск, РФ

Поступила в редакцию: 22.07.2019

**Аннотация.** Рассмотрены основные компоненты инструментальных и методических разработок для исследования биологических тканей методами структурной биологии с использованием синхротронного излучения (СИ) из накопительных колец ВЭПП-3 и Сибирь-2 в Московском и Сибирском центрах коллективного пользования. Наша цель состоит в изучении механизмов структурно-функциональной устойчивости нативных и трансформированных тканей человека и животных при различных физико-химических воздействиях. Представлены возможности созданных аппаратуры и методов, а также экспериментальные данные по исследованию биологических полимеров с различной степенью упорядоченности в молекулярной и наномасштабной шкале.

**Ключевые слова:** синхротронное излучение, система первичных коллиматоров, рентгеновская дифракция с высоким временным разрешением.

Важная роль в изучении структурного механизма функциональной активности биологических систем принадлежит инструментальным и методическим разработкам с использованием синхротронного излучения (СИ). С момента создания российских источников СИ (ВЭПП-3 в ИЯФ СО РАН и Сибирь-2 в НИЦ «Курчатовский институт») появились экспериментальные возможности прижизненного изучения структурных основ функционирования биологических систем, обеспечивающих такие функции, как подвижность, сократимость, динамика цитоскелета, мембранный транспорт, проведение возбуждения, деление клеток, клеточная дифференциация, трансформация при старении и патологических процессах [1-3]. В этой связи решены два аспекта использования СИ для решения задач структурной биологии тканей: во-первых, проведены разработки инструментального обеспечения для исследования механизмов функционирования биологических полимеров в молекулярной и наномасштабной шкале и, во-вторых, развиты методы рентгеновской дифракции под большими (WAXS) и малыми (SAXS) углами [4-15].

Экспериментальная техника и методы исследования предназначались для проведения следующих экспериментов: исследование структуры и структурной динамики поперечно-полосатой скелетной мышцы, образцов эпителиальных тканей в норме и патологии; изучение природных и инженерных конструкций шелка, а также влияния высокочастотной электрохирургической сварки (ВЧ-сварки) на биологические ткани.

На рабочих каналах источников СИ созданы рентгеновские станции на основе методов монохроматической ( $\lambda = \text{const}$ ) и энергетической ( $\Theta = \text{const}$ ) дифрактометрии. На рисунке 1 приведена их обобщенная блок-схема с принципиальными отличиями для каждого метода в системах формирования пучка СИ и регистрации рентгендифракционных картин на основе позиционно-чувствительного координатного или энерго-дисперсионного детекторов [16-21].

В системе формирования пучка СИ для метода  $\lambda = \text{const}$  вначале пучок коллимируется до размера входных апертур последующих рентгенооптических элементов. Далее обеспечивается монохроматизация потока с выбором перестраиваемой длины волны и его коллимация в меридиональной и сагиттальной плоскостях. В устройстве контроля за субклеточными структурами формируется канал видимого диапазона с лазерным дифрактометром, который настраивается соосно с рентгеновским потоком, что позволяет одновременно вести контроль и за субклеточными структурами в микрометровом диапазоне. Для метода  $\Theta = \text{const}$  в системе формирования пучка СИ обеспечивается коллимация полихроматического потока с заданной расходимостью, размерами и ориентацией.

Полученная информация хранится и обрабатывается соответствующей системой, также имеется дистанционная система по управлению настройкой комплекса.

Таким образом, в методе  $\lambda = \text{const}$  полученная дифракционная картина представляет собой распределение интенсивности как функции угла рассеяния. В методе  $\Theta = \text{const}$  дифракционная картина является распределением интенсивности как функции длины волны при фиксированном угле рассеяния ( $\Theta$ ). Межплоскостные расстояния объекта ( $d_{hkl}$ ) однозначно определяются дискретным набором энергий фотонов.



**Рисунок 1.** Блок-схема рентгendifракционных станций на источниках СИ на основе методов монокроматической и энергетической дифрактометрии

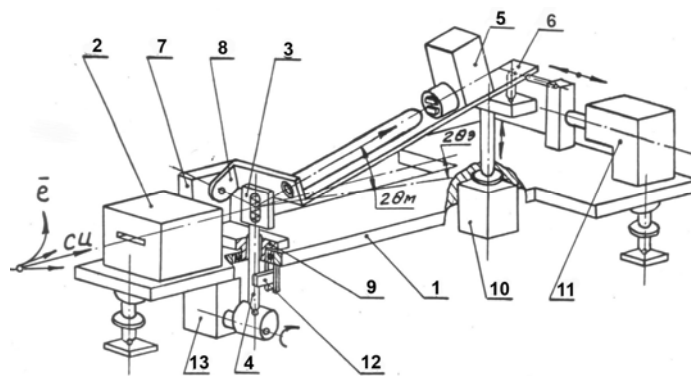
Метод  $\Theta = \text{const}$  обеспечивает увеличение интенсивности рентгеновского пучка на 2-3 порядка, однако в ранний период разработки первых источников СИ это преимущество было недостижимо в связи с низким быстродействием детектирующих систем. В настоящее время разработаны энерго-дисперсионные детекторы с высокой эффективностью регистрации и энергетического разрешения, поэтому весьма заманчиво использовать полихроматическое излучение.

Наиболее традиционным и отлаженным является метод  $\lambda = \text{const}$ , что в большей степени связано с развитием позиционно-чувствительных координатных детекторов.

На рисунке 2 представлена принципиальная схема рентгенографической камеры, созданной на основе метода энергетической дифрактометрии. На рабочем основании камеры (1) по ходу пучка СИ расположены: устройство формирования пучка (2); держатель образца (3) с механизмом его сканирования (4, 12, 13); полупроводниковый детектор (5), установленный на платформе (6) и средства ее перемещения (10) и (11). Перед детектором (5) располагается приемная щель, определяющая угол регистрации  $2\Theta$ . Пространство прохождения потока рассеянного излучения закрыто вакуумопроводом [8, 14].

Устройство формирования пучка СИ (2) (рис. 2) обеспечивает его коллимацию с заданной расходимостью, размерами и ориентацией. Выставление детектора в требуемую зону плоскости регистрации рассеянного излучения от объекта осуществляется путем вращения платформы (6) вокруг осей кронштейнов (8) и (7), что обеспечивает установку угла наблюдения в меридиональном ( $2\Theta_m$ ) и сагитальном ( $2\Theta_s$ ) направлениях соответственно. Вращение осуществляют синусные механизмы (10) и (11), что позволяет отсчитывать углы наблюдения по линейной шкале.

На рисунке 3 приведены схемы рентгendifракционной станции для метода  $\lambda = \text{const}$ : а) обобщенная оптическая схема; б) структурная схема. На обобщенной схеме представлены главные плоскости рентгенооптических элементов и показан ход лучей в меридиональном и сагитальном сечениях от источника излучения (1) до его изображения на входе системы регистрации – детектора (2). Увеличение интенсивности и уменьшение размеров пучка обеспечивается его фокусировкой в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.



**Рисунок 2.** Принципиальная схема экспериментальной камеры для метода  $\Theta = \text{const}$

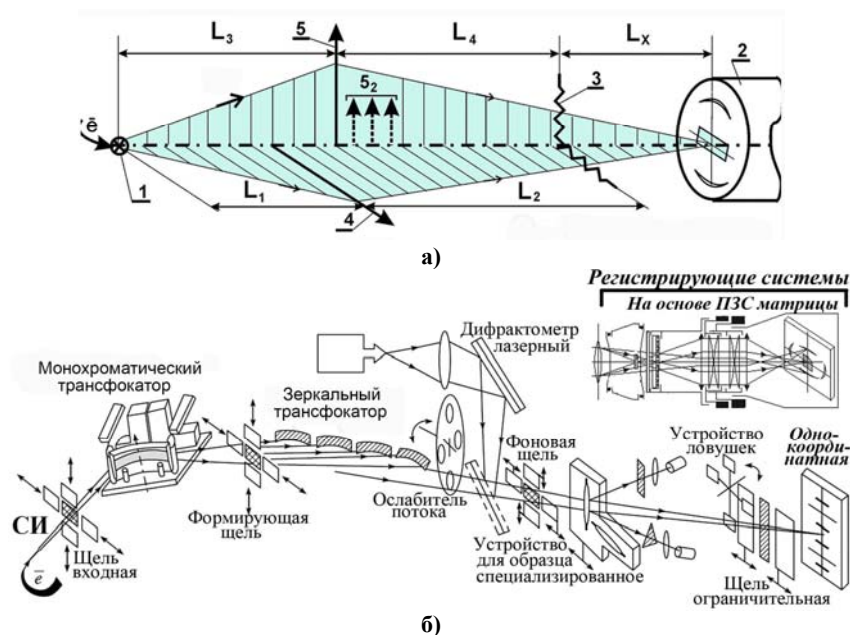


Рисунок 3. Схемы станции для метода  $\lambda = \text{const}$ : а) обобщенная оптическая схема и б) структурная схема

Условие плавной фокусировки обеспечено рентгенооптическими элементами, которые нами названы рентгенооптическими трансфокаторами: первый элемент – монохроматическим трансфокатором (4); второй – зеркальным трансфокатором (5). Фокусировка рентгеновского потока осуществляется за счет изгиба рентгенооптических элементов по форме кругового цилиндра переменного радиуса. Монохроматический трансфокатор (4) работает на принципе брэгговской дифракции от симметрично срезанного кристалла и обеспечивает две функции - выделение требуемой длины волны при заданной ширине спектра и фокусировку потока в сагиттальной плоскости.

Зеркальный трансфокатор (5) формирует рентгеновский поток в меридиональной плоскости и представляет полисекционную систему фокусирующих зеркал, установленных друг за другом. Каждое зеркало помещено в отдельный вакуумируемый корпус, который представляет собой самостоятельный модуль с дистанционным управлением тремя основными операциями: опусканием передней кромки зеркала на пучок СИ; поворотом зеркала на угол скольжения и изгибом зеркальной поверхности по цилиндру. Для создания светосильной полисекционной оптической системы, во-первых, необходимо настроить углы скольжения зеркал (сделанных из разных материалов) в первом  $\tau_1$  и последующих  $\tau_n$  модулях в соответствии с граничными условиями. Во-вторых, необходимо создать оптимальную протяженность зеркальной поверхности исходя из угла поля зрения системы  $\psi_n$  (угол захвата пучка СИ) [5, 10, 13] и сформировать «свертку» в плоскости детектора всех изображений от каждого устройства с зеркалом. Для формирования оптимальной геометрии сечения пучка СИ и уменьшения уровня фона от рентгенооптических элементов были созданы три комплекта специализированных четырехстворчатых щелей с независимо управляемыми шторками: входная щель располагается перед монохроматическим трансфокатором; формирующая щель установлена перед зеркальным трансфокатором; фоновая щель помещается вблизи перед исследуемым образцом [15].

На схеме представлен реверсированный вариант расположения кристалла и зеркал, который был предложен нами и реализован в Сибирском центре [4, 22, 23]. Это позволило решить три основные задачи – увеличить входную апертуру пучка, уменьшить радиационные и тепловые нагрузки на зеркала, являющиеся наименее устойчивыми в радиационном отношении элементами, и выполнить условия подавления гармоник основной длины волны за счет подбора оптимального угла скольжения пучка к зеркальным поверхностям разной плотности.

На рисунке 4 представлены: схема (а) и изображение (б) одного модуля. Зеркало (1) расположено на дополнительной плите (2) с возможностью изгиба от привода (3). Плита (2) снабжена механизмом (4) для поворота относительно платформы (5) вокруг оси  $O_1$ , с которой совмещена передняя кромка зеркальной поверхности. Платформа (5) размещена в корпусе (6) на трех телескопических опорах, причем передняя опора (7) с приводом (8) имеет шаровой скользящий контакт, а две задние опоры (9) и (10) установлены с силовым замыканием на точечные контакты  $O_2$  и  $O_3$ , которые расположены на линии перпендикулярно плоскости фокусировки. Опора (9) имеет ручное управление, а опора (10) снабжена приводом (11) для корректировки поперечного угла качания зеркала (1).

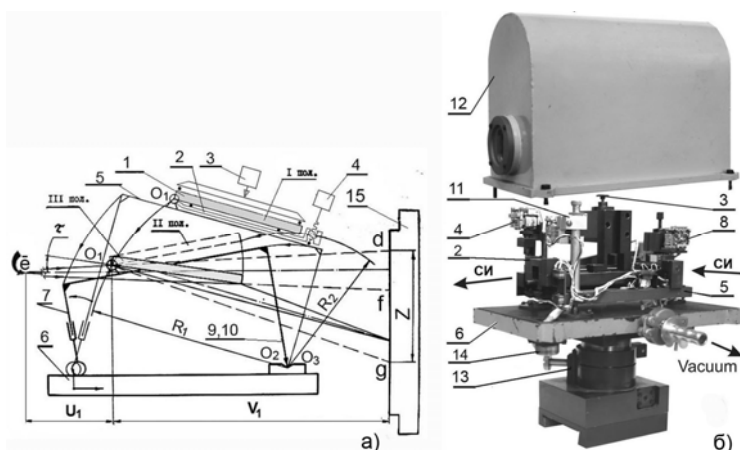


Рисунок 4. Модульный блок с фокусирующим зеркалом: схема установки зеркала на пучке СИ (а) и общий вид (б)

Корпус (6) герметично накрыт кожухом (12) с лавсановыми окнами для прохождения пучка СИ, что обеспечивает вакуумирование рабочего объема. Устройство может перемещаться механизмом (13) перпендикулярно пучку СИ в вертикальном и горизонтальном направлениях. Дистанционное управление приводами внутри рабочего объема осуществляется через вакуумный разъем (14) [5].

Методика рентгendifракционных исследований с высоким временным разрешением, так называемое «дифракционное кино», создана для решения задач по динамике структурных преобразований в процессе биологического функционирования, в первую очередь при мышечном сокращении. Были разработаны несколько версий данной методики с набором программ контроля за экспериментом, сбора и обработки полученных данных. Рентгенографическая станция оснащена системой регистрации на основе быстродействующего однокоординатного детектора ОД-3, а также специализированным устройством размещения и жизнеобеспечения портняжной мышцы лягушки во время длительного (несколько часов) рентгendifракционного эксперимента [21]. Разработана система управления исполнительными устройствами и регистрации рентгеновских и механических характеристик различных объектов (СУР), блок-схема которой представлена на рисунке 5а [24].

Представленная система управления и регистрации (СУР) позволяет с миллисекундным временным разрешением регистрировать физиологические параметры мышцы при сокращении: развиваемую силу, длину мышцы, а также изменения интенсивностей дифракционных рефлексов, обусловленных молекулярной структурой мышцы. В эксперименте регистрируется серия дифракционных картин (кадров) состояний структуры, соответствующих последовательным стадиям процесса мышечного сокращения. Время измерения разделяется на определенное число временных интервалов (длительности кадров), в каждом из которых производится одно измерение. На рисунке 5б приведена временная диаграмма эксперимента с примером управления шестью элементами: насосом для перекачки физиологического раствора из кюветы с мышцей (1); заслонкой рентгеновского пучка (2); датчиком силы (3); запуском ОД-3 (4); устройствами положительной (5) и отрицательной (6) электростимуляции мышцы. После старта одного цикла сокращения мышцы обеспечиваются следующие времена работы устройств: для насоса –  $T_1$ ; для заслонки –  $T_3$ ; для датчика силы –  $T_5$ ; время счета ОД-3 в одном цикле –  $T_7$  и в одном кадре –  $T_8$ .

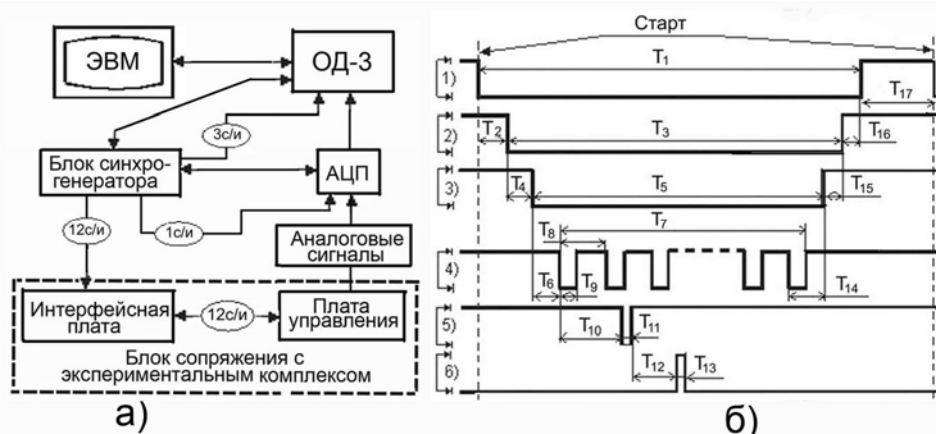


Рисунок 5. Система управления и регистрации параметров объектов: блок-схема (а) и временная диаграмма (б)

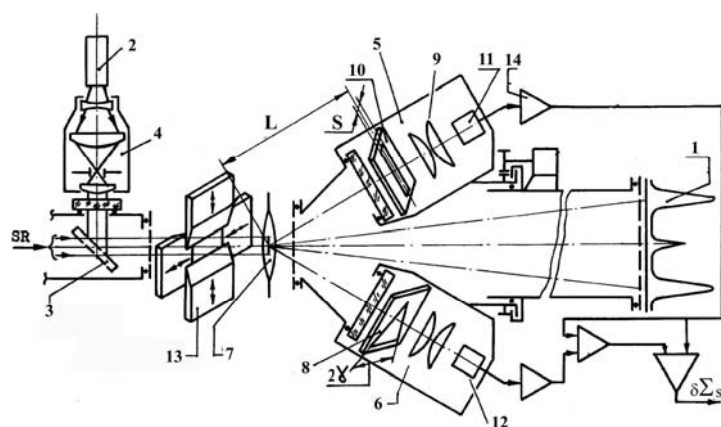


Рисунок 6. Схема лазерного дифрактометра

На рисунке 6 представлена схема лазерного дифрактометра, который введен в рентгендифракционную станцию для регистрации размеров молекулярных и субклеточных структур мышцы в процессе функционирования. Обеспечена одновременная регистрация дифракционных картин как в рентгеновском диапазоне  $1_s$ , так и при контроле за изменением длины саркомера мышцы, который представляет повторяющиеся элементы структуры размером в несколько микрометров [4, 12, 18]. Используется гелий-неоновый лазер (2) ( $\lambda = 632,8$  нм). Специальное зеркало (3) для совмещения рентгеновского и оптического пучков расположено в телецентрическом ходе лучей, сформированных оптической системой (4) от лазера (2).

Система регистрации оптической дифракции реализована по двухканальному варианту. Один канал является опорным (5) и основан на (+1)-ом дифракционном порядке спектра разложения. Во втором канале (6), основанном на (-1)-ом порядке, осуществлена пространственная модуляция дифрагированного потока от объекта (7) (например, при сокращении мышцы) с помощью диафрагм различной формы (8) (показана форма треугольника с углом  $2\gamma$ ). Опорный канал (5) имеет оптическую систему (9), в передней фокальной плоскости которой установлена щелевая диафрагма (10), что позволяет при изменении положения дифрагированного потока от объекта (7) иметь на выходе оптической системы постоянное сечение потока, регистрируемого фотоприемником (11).

На рисунке 7 приведены результаты исследования портняжной мышцы лягушки, полученные по методу «дифракционное кино». На рисунке 7а представлена дифрактограмма и временной ход интенсивности наиболее сильного меридионального рефлекса 14,3 нм сокращающейся мышцы при единичной (1) и парной (2) стимуляции. В активной мышце нами зарегистрировано короткоживущее (около 20 мс) состояние структуры, сформированной взаимодействием миофибриллярных и актиновых нитей. Выдвинута оригинальная гипотеза механизма генерации силы на основе принципа динамического сопряжения разноразмерных наноструктур с несоизмеримыми периодами. На рисунке 7б демонстрируются временная зависимость интенсивностей экваториальных рефлексов в процессе изометрического сокращения, инициированного парным стимулированием.

Иллюстрируется временной ход интенсивностей рефлексов от плоскостей (10) и (11) гексагональной решетки, сформированной толстыми и тонкими нитями саркомера мышцы. При нормальном состоянии мышцы (поз. 1) наблюдается совпадение максимума развиваемой силы с минимумом рефлекса (10), раньше которого (на  $\approx 20$  мс) наблюдается максимум рефлекса (11). По мере значительного утомления (поз. 2) наблюдается падение силы более чем в два раза и почти неизменяемые интенсивности рефлексов. Второй стимул, приложенный в фазе релаксации, не меняет поведения рефлекса (11). Однако при подборе оптимальной длительности межимпульсного интервала и подаче второго стимула в фазе нарастания напряжения наблюдается процесс реанимации мышцы (поз. 3) за счет резкого увеличения рефлекса (11), превышающего по абсолютной величине изменения рефлекса (10). Таким образом, второй стимул можно рассматривать как инструмент направленного изменения характера сокращения в разных фазах активного состояния мышцы [25].

На рисунке 8 приведены обобщенные результаты, полученные на канале накопителя Сибирь-2 методами SAXS/WAXS дифрактометрии от объектов: бегената серебра  $\text{AgC}_{22}$  ( $\text{C}_{22}\text{H}_{43}\text{O}_2\text{Ag}$ ) и коллагена сухожилия хвоста крысы. Показано, что при монохроматическом излучении с энергией  $\sim 8$  КэВ осуществлена регистрация рефлексов в диапазоне углов  $2\theta$  от 800 мрад до 2,5 мрад.

В последние годы наблюдается развитие структурных методов на основе СИ для целей медицинской диагностики и терапии. Ткань волоса является перспективным биологическим материалом для решения прикладных задач в качестве диагностического материала для массового мониторинга экологического и санитарно-гигиенического риска. Неинвазивный способ выделения биоплатов, возможность неограниченно продолжительного хранения без консервации сделали волос уникальным материалом в экспериментальных исследованиях. В ряде медицинских центров широко используется элементный анализ волос с целью выявления

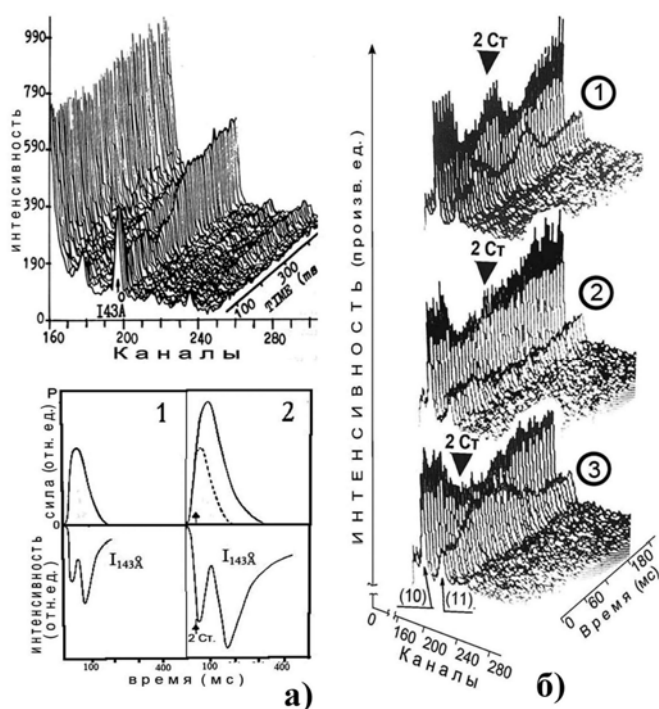


Рисунок 7. Дифрактограммы, полученные по методу высокого временного разрешения «дифракционное кино»

дисбаланса элементного содержания в организме человека, и даются рекомендации о его коррекции. Рентгендифракционный анализ волос настойчиво предлагался даже для диагностики патологии онкологического характера и оценки эффективности примененной терапии [26, 27].

Рентгенограммы волос дают характерную дифракционную картину. Имеется слабый след дуг поперек экватора, соответствующий молекулярному параметру 4,5 нм; периодичность этого рефлекса не меняется, но угловой размер этой дуги (текстура) и ширина дуги может увеличиваться так, что диффузная дуга будет трансформироваться в полное диффузное кольцо с высокими порядками. Рентгенограммы со слабой дугой были названы как рентгенограммы «без кольца», рентгенограммы с кольцами были названы как рентгенограммы «с кольцом».

На рисунке 9 представлена выборка из набора рентгенограмм длинного волоса (около 1 м) от индивидуального донора. Показан переход от рентгенограммы типа «без кольца» (а) к рентгенограмме типа «с кольцом» (б). Многие изменения на рентгенограммах ткани волоса обусловлены нарушениями защитной кислотно-жировой мантии. Многие детергенты могут разрушать защитную мантию кожи и волос, позволяя агрессивному внешнему окружению атаковать незащищенную ткань. Замена традиционных средств ухода за волосами на современные моющие средства может приводить к появлению на рентгенограммах кольца 4,5 нм. Таким образом, методики рентгендифракционного и флуоресцентного анализа волос могут быть рекомендованы в качестве критерия при выработке санитарных норм при сертификации новых медицинских и косметических средств ухода за волосами.

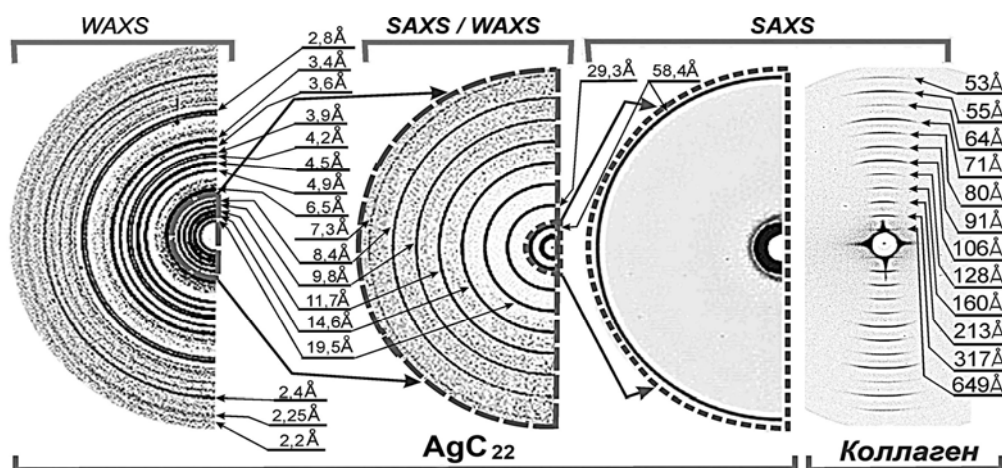
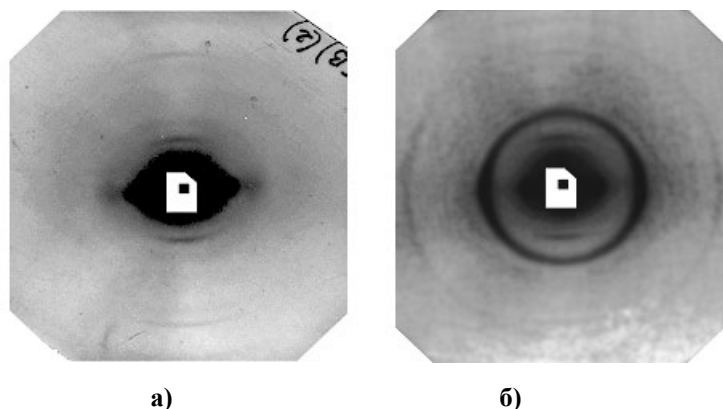


Рисунок 8. Обобщенные результаты по методикам SAXS/WAXS



**Рисунок 9.** Выборка дифракционных картин от волоса индивидуального донора: а) начало косы и б) конец косы

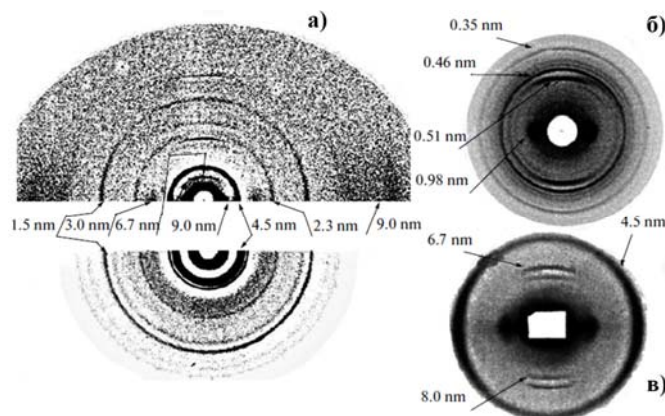
Наша группа стремилась исследовать происхождение специфических изменений в рентгенограммах волос. Также имелись доноры, чьи волосы не давали рентгенограмму «с кольцом» от области корня волоса до кончиков. Мы изучали волосы от пациентов с раком молочной железы и от здоровых субъектов и сделали следующее заключение: возможность использования синхротронной дифракции волос для выявления патологических состояний типа рака молочной железы не подтвердилась [28, 29].

На рисунке 10а представлены совмещенные рентгенограммы – ткани волоса (вверху) и от опухолевой ткани молочной железы (внизу). На рисунке 10б представлена картина в диапазоне больших углов. Характерными рефлексами являются: кольцевой рефлекс  $\sim 4,5$  нм, обусловленный периодичностью внеклеточных протеогликановых структур; меридиональный рефлекс  $\sim 6,7$  нм и экваториальный рефлекс  $\sim 9$  нм, обусловленные внутриклеточным белком кератином. Подобные дифракционные картины были получены от различных эпителиальных тканей человека и животных. Выявлено, что период повторяемости  $4,65(\pm 0,15)$  нм является наноразмерным инвариантом структуры и слизи, и биологических тканей.

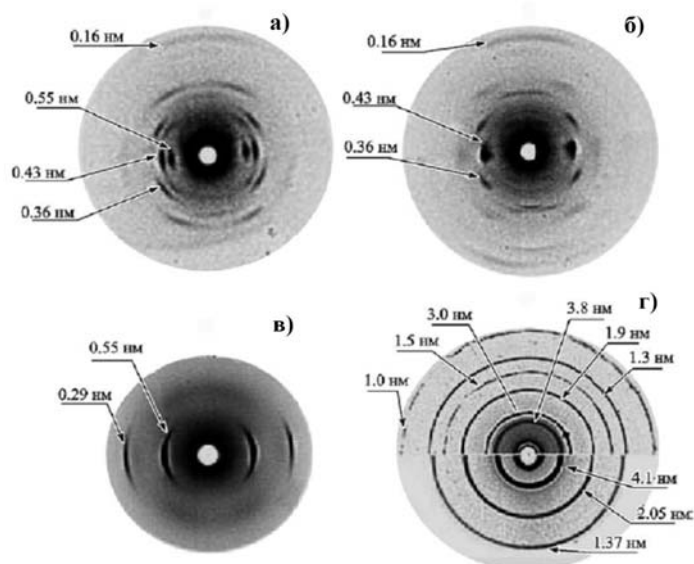
Была изучена структурная динамика волос в ходе растяжения (рис. 10в), которая проявляется как отчетливое смещение меридионального рефлекса  $6,7$  нм в сторону малых углов вплоть до  $8,0$  нм (при растяжении  $\sim 50\%$ ). Показательно, что величина сдвига остается неизменной вдоль всей длины даже очень длинного волоса (до  $\sim 1$  м), при этом положение экваториального рефлекса  $4,5$  нм остается неизменным.

Методами SAXS/WAXS дифрактометрии с использованием СИ проведены структурные исследования широкого спектра образцов природного шелка, полученных из шелкопрядов *Antheraea mylitta* и *Bombix mori*, а также различных шелковых наноконструкций, включая тканево-инженерные скефолды. На рисунке 11 представлены рентгенодифракционные картины различных природных и биоинженерных конструкций (скефолдов) природного шелка шелкопрядов *A. mylitta* (а) и *B. mori* (б). Выявлено различие степени текстурированности шелковых волокон при использовании различных методик получения нитей. В зависимости от степени натяжения нитей шелка в приготовленном образце в области больших углов дифракции были зарегистрированы картины с четкими дифракционными рефлексами, распределенными по слоевым линиям, или размытыми, дебаевского типа.

Рентгенограмма синтетических нитей представлена на рисунке 11в. На совмещенных рентгенограммах биоинженерных конструкций – скефолдов (рис. 11г) из шелкопряда *A. mylitta* (внизу) зарегистрирована серия острых интенсивных дебаевских колец с периодами  $4,1$ ,  $2,05$  и  $1,37$  нм, которые локализованы в позиционном отношении  $3:2:1$ , что характерно для линейной периодичности цепных молекул. Рентгенограмма аналогичных скефолдов из *B. mori* (вверху) демонстрирует гораздо больше дебаевских колец, которые можно сгруппировать



**Рисунок 10.** Двумерные рентгенограммы ткани волоса и опухолевой ткани молочной железы



**Рисунок 11.** Двумерные рентгенограммы различных природных и биоинженерных конструкций природного шелка

в две серии с линейной периодичностью: 3,8, 1,9, 1,3 нм и 3,0, 1,5, 1,0 нм, и атрибутировать к двум компонентам цепных молекул, формирующих 3D конструкцию скеффолда.

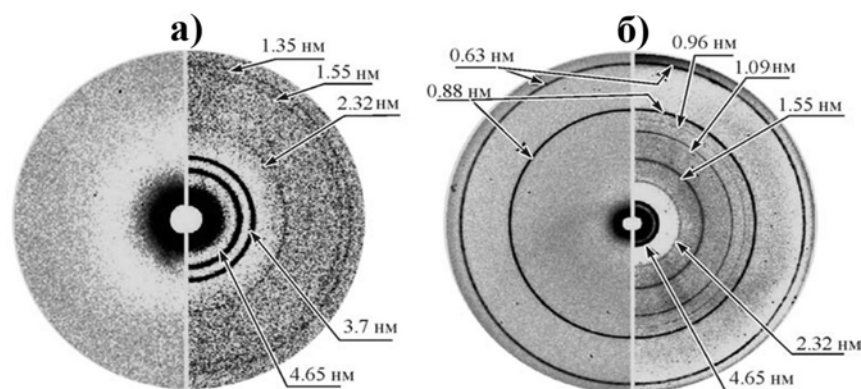
Изучение наноструктурной динамики фибриллярных структур шелка в широком диапазоне температур может дать неожиданные и крайне существенные результаты для решения прикладных задач для целей медицинской диагностики и разработки ряда технологических процессов. Композиты на основе природного шелка в силу его высокой прочности, биосовместимости и биodeградеability, могут быть уникальным материалом, пригодным для биотехнологических и медицинских целей [30].

Исследовался структурный механизм модификационной адаптации под синергическим воздействием различных параметров высокочастотной электрохирургической сварки (ВЧ-сварки): изменение температуры, геометрия инструментария, давление, модуляция электромагнитного поля [31, 32]. Модификационная адаптация, обусловленная изменением физико-химических параметров среды, – это обратимое изменение термодинамических свойств функциональных систем биологических организмов при неизменном генотипе. В работе проведены молекулярные и наноструктурные исследования двух биологических систем, активно контактирующих с внешней средой: (1) эпителиальные ткани желудочно-кишечного тракта, который является открытой динамической системой, обеспечивающей поступление в организм энергии и вещества из пищевой цепочки в результате синергического взаимодействия наноструктурной упорядоченности протеогликановых систем с внешней средой; (2) природные конструкции кокона шелка, локализованные вне клетки или даже вне организма. Структуре кокона присуща динамическая реактивность, благодаря которой экономно организованные системы оперативно реагируют на сигнальные воздействия, удерживая живую систему в диапазоне физиологически допустимых границ на весь период метаморфозы независимо от генного контроля организма шелкопряда.

На рисунке 12 представлены совмещенные двухмерные рентгенограммы ткани кишки (а) и кокона шелка (б) в норме (левая часть) и после воздействия на них ВЧ-сваркой (правая часть). Рентгенограммы различных интактных образцов ткани кишки мало информативны, они характеризуются интенсивным малоугловым диффузным рассеянием, индикатриса которого имеет радиальную симметрию. Дифракционные линии на рентгенограмме тонкой кишки практически не выявляются (рис. 12а, левая часть), что, возможно, обусловлено незначительной концентрацией рассеивающих компонентов и значительным поглощением большей толщиной образца.

После ВЧ-воздействия (рис. 12а, правая часть) зарегистрировано существенное изменение дифракционной картины: рентгенограмма сварного шва в области малых углов буквально «набита» острыми дифракционными кольцами, зарегистрированы четкие одиночные дебаевские рефлексы (3,7, 1,35 нм); можно выделить и серию рефлексов: 4,65, 2,32, 1,55 нм, которые расположены с позиционными отношениями 3:2:1, что характерно для линейной периодичности с основным периодом 4,65 нм. Серия острых дебаевских колец с основным периодом 4,65 нм атрибутирована нами ранее как период идентичности, обусловленный регулярным прикреплением в процессе пост-трансляционной модификации олигосахаридных цепей к белковому кору гигантской молекулы протеогликанов слизи и межклеточного матрикса тканей. Протеогликаны являются компонентами основного вещества межклеточного матрикса эпителиальных тканей и продуцируемых ими слизей.





**Рисунок 12.** Совмещенные двумерные рентгенограммы ткани кишки (а) и кокона шелка (б) в норме (слева) и после ВЧ электрохирургического воздействия (справа)

Феномен появления новых дифракционных линий после ВЧ-электрохирургического воздействия был выявлен нами также на образцах кокона шелка шелкопряда *Bombyx mori* (рис. 12б): зарегистрированы многочисленные тонкие дебаевские кольца, обусловленные наноструктурной упорядоченностью, молекулярная структура при этом оставалась стабильной. Под действием ВЧ-сварки на рентгенограмме стенки кокона регистрируется серия дебаевских колец (4,65, 2,32 и 1,55 нм), которые могут быть атрибутированы к наноструктурной упорядоченности, характерной для сетки протеогликановых фибрилл, сформированной при взаимодействии катионов кальция с анионными группами олигосахаридов протеогликана. Наличие протеогликанового компонента в структуре кокона вполне допустимо, поскольку компоненты шелка – фиброин и серицин – продуцируются шелковой glandой, дифракционная картина которой [32, 33] демонстрирует наличие серии дифракционных колец с основным периодом 4,8 нм, характерной для протеогликановых систем эпителиальных тканей. Добавление третьего фибриллярного протеогликанового компонента к известным белковым компонентам шелка позволяет предложить исполнительный механизм адаптации природной конструкции кокона шелка к широкому спектру внешних воздействий.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что протеогликановые системы являются универсальным компонентом биологических тканей, слизи и других биологических конструкций, обеспечивающим широкий спектр адаптационных свойств. По-видимому, механизмы модификационной адаптации к изменению многочисленных факторов внешней среды в широком диапазоне параметров лежат в основе длительной структурной и функциональной устойчивости гетерогенных комплексов, а при синергическом воздействии контролируемых параметров ВЧ-сварки на поврежденную ткань – в основе ее репарации.

Количественно измеряемые параметры рентгеновских дифракционных данных могут быть использованы в качестве маркера физиологического статуса биологической ткани при вариации синергических воздействий среды на организм.

#### Список литературы / References:

1. Kulipanov G.N. The status of SR Research in the Soviet Union. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 1987, vol. A261, pp. 1-7.
2. Belyaev S.T., Stankevitch V.G. Kurchatov Synchrotron Radiation Source status report. *Review of Scientific Instruments*, 1995, vol. 66, no. 2, pp. 2358-2361.
3. Vazina A.A. Biological application of synchrotron radiation: from Artem Alikhanyan to nowadays. *Brilliant Light in Life and Material Sciences. NATO Security through Science – B: Physics and Biophysics*, 2007, pp. 121-131.
4. Корнеев В.Н., Герасимов В.С. Автор. свид. № 883725, заявка № 2890450, 1980. [Korneev V.N., Gerasimov V.S., Author's certif. no. 883725, request no. 2890450, 1980 (in Russ.)]
5. Корнеев В.Н., Герасимов В.С. Автор. свид. № 883726, заявка № 2890452, 1980. [Korneev V.N., Gerasimov V.S., Author's certif. no. 883726, request no. 2890452, 1980 (in Russ.)]
6. Корнеев В.Н. Автор. свид. № 915098, заявка № 2974857, 1980. [Korneev V.N. Author's certif. no. 915098, request no. 2974857, 1980 (in Russ.)]
7. Корнеев В.Н. Автор. свид. № 1073803, заявка № 3509672, 1982. [Korneev V.N. Author's certif. no. 1073803, request no. 3509672 (1982) (in Russ.)]
8. Корнеев В.Н. и др. Автор. свид. № 1167484, заявка № 3659145, 1983. [Korneev V.N. et al. Author's certif. no 1167484 (USSR), Bull. Isobr., 1985, no. 26 (in Russ.)]
9. Корнеев В.Н. и др. Автор. свид. № 1289269, заявка № 3849209, 1985. [Korneev V.N. et al. Author's certif. no. 1289269, request no. 3849209, 1985 (in Russ.)]
10. Корнеев В.Н., Герасимов В.С. Автор. свид. № 1327717, заявка № 3947700, 1985. [Korneev V.N., Gerasimov V.S. Author's certif. no. 1289269, request no. 3947700, 1985 (in Russ.)]
11. Корнеев В.Н., Герасимов В.С. Автор. свид. № 1245969, заявка № 3849208, 1985. [Korneev V.N., Gerasimov V.S. Author's certif. no. 1289269, request no. 3849208, 1985 (in Russ.)]

12. Корнеев В.Н. и др. Автор. свид. № 1245970, заявка № 3850412, 1985. [Korneev V.N. et al Author's certif. no. 1245970, request no. 3850412, 1985 (in Russ.)]
13. Корнеев В.Н., Герасимов В.С. Автор. свид. № 1322889, заявка № 3947566, 1985. [Korneev V.N., Gerasimov V.S. Author's certif. no. 1322889, request no. 3947566, 1985 (in Russ.)]
14. Корнеев В.Н., Матюшин А.М. Автор. свид. № 1322799, заявка № 3947565, 1985. [Korneev V.N., Matyushin A.M. Author's certif. no. 1322799, request no. 3947565, 1985 (in Russ.)]
15. Корнеев В.Н. и др. Автор. свид. № 1521134, заявка № 4385519, 1988. [Korneev V.N. et al. Author's certif. no. 1521134, request no. 4385519, 1988 (in Russ.)]
16. Герасимов В.С. и др. Малоугловая рентгеновская камера с использованием синхротронного излучения. *Приборы и техника эксперимента*, 1976, т. 3, с. 217. [Gerasimov V.S. et al. Pribory i Tekhnika Eksperimenta, 1976, vol. 3, p. 217. (in Russ.)]
17. Корнеев В.Н. и др. Камера ФРАКС для малоугловой монохроматической дифрактометрии на синхротронном рентгеновском излучении. *Приборы и техника эксперимента*, 1984, т. 5, с. 180. [Korneev V.N. et al. Camera FRAKS for monochromatic small-angle diffraction of synchrotron x-rays. Pribory i Tekhnika Eksperimenta, 1984, vol. 5, p. 180. (in Russ.)]
18. Gadzhiev A.M. et al. Combination of optical and small-angle X-ray scattering diffractometers in the high-time-resolution method for structural studies. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 1989, vol. A289, p. 728.
19. Gerasimov V.S. et al. Search for biological objects by refraction radiography using synchrotron radiation of the VEPP-3 storage ring. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 1998, vol. A405, no. 2-3, p. 525.
20. Aul'chenko V.M. et al. Status of method of time-resolved X-ray diffraction studies of biological objects at the Siberian SR Centre. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 2000, vol. A448, p. 245.
21. Korneev V.N. et al. The role of instrumental-methodical developments with the use of synchrotron radiation for researching the transformation of nanostructural parametres in biological objects. *Advances in biosensors and bioelectronics (ABB)*, 2013, vol. 2, no. 4, p. 65.
22. Aul'chenko V.M. et al. A small-angle X-ray diffractometry station using a synchrotron radiation sources: design and adjustment modes. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 1995, vol. A359, p. 216.
23. Aul'chenko V.M. et al. The station for time-resolved investigation in wide and small angles of diffraction. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 1998, vol. A405, no. 2-3, p. 487.
24. Korneev V.N. et al. X-ray stations based on cylindrical zoom lenses for nanostructural investigations using synchrotron radiation. *J. of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 2012, vol. 6, no. 5, p. 849.
25. Aul'chenko V.M. et al. Current status of the studies of biological objects by the time resolved X-ray diffraction technique. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 2005, vol. A543, p. 143.
26. James V., Kearsley J., Irving T., Amemiya Y., Cookson D. Using hair to screen for breast cancer. *Nature*, 1999, vol. 398, p. 33.
27. Corino G.L. and French P.W. Diagnosis of breast cancer by X-ray diffraction of hair. *Int. J. Cancer*, 2008, vol. 122, p. 847.
28. Aksirov A.M. et al. Biological and medical application of SR from storage rings VEPP-3 and "Siberia-2". The origin of specific changes of small-angle X-ray diffraction pattern of hair and their correlation with the elemental contain. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 2001, vol. A470, p. 380.
29. Vazina A.A. et al. X-ray diffraction study of the nanostructural dynamics of fibrillar systems of hair tissue. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2015, vol. 79, no. 1, p. 75.
30. Vazina A. A. et al. Study of molecular and nanostructural dynamics of biological tissues under the influence of high-frequency electrosurgical welding. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2013, vol. 77, no. 2, p. 146.
31. Vazina A.A. et al. Synergistic influence of HF-welding on nanostructural orderliness of epithelial tissues of gastrointestinal tract. "Synchrotron and Free electron laser Radiation: generation and application (SFR-2016)". *Book of abstracts*. Novosibirsk, Russia, 2016, p.41.
32. Vazina A.A. et al. Nanostructural mechanism of modifying adaptation of proteoglycan systems of biological tissues and mucus. *Crystallography Reports*, 2018, vol. 63, no. 7, pp. 1063-1070.
33. Vazina A.A. et al. X-ray diffraction study of structural stability of giant proteoglycan molecules of mucus. *Nuclear Instruments and Methods in Phys. Res.*, 2009, vol. A603, p. 90.

**INSTRUMENTAL AND METHODOLOGICAL DEVELOPMENTS FOR THE STUDY OF BIOLOGICAL STRUCTURES USING SYNCHROTRON RADIATION****Korneev V.N.<sup>1</sup>, Shlektarev V.A.<sup>2</sup>, Zabelin A.V.<sup>3</sup>, Lanina N.F.<sup>2</sup>, Tolochko B.P.<sup>4</sup>, Vazina A.A.<sup>2</sup>**<sup>1</sup> Institute of cell biophysics, FRC PSCBR of RAS*Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: kvn\_40@mail.ru*<sup>2</sup> Institute of theoretical and experimental biophysics of RAS, Pushchino<sup>3</sup> National research center "Kurchatov Institute"*Moscow, Russia*<sup>4</sup> Budker Institute of nuclear physics, SB of RAS*Novosibirsk, Russia*

**Abstract.** The major elements involved in instrumental and methodical developments for biological tissue studying by means the structural biology methods based on using synchrotron radiation (SR) from VEPP-3 and Siberia-2 storage rings from two Russian centres of collective using - in the Siberian and Moscow regions are considered. Our basic concern is to study mechanisms of structural and functional stability of native and transformed human and animal tissues under various physicochemical influences. Possibilities of produced equipment and methods, as well as the experimental data on biological polymers having different degrees of order at the molecular or nanoscale level are presented.

**Key words:** *synchrotron radiation, system of primary collimators, high time-resolved X-ray diffraction.*