

**ОБ ИНФОРМАТИВНЫХ ВОЗМОЖНОСТЯХ И РЕЗУЛЬТАТАХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ГРВ-ВИЗУАЛИЗАЦИИ
БЕЛОК-ИНДУЦИРОВАННЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ КОМПЛЕКСОВ В ВОДНЫХ
РАСТВОРАХ ТАБЛЕТИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ АНТИТЕЛА
К ИНТЕРФЕРОНУ- γ**

Масленникова О.М.¹, Сибирев А.Л.², Шипко М.Н.², Степович М.А.³

¹ Центральная государственная медицинская академия Управления делами Президента Российской Федерации
ул. Маршала Тимошенко, 19, стр. 1А, г. Москва, 121359, РФ

² Ивановский государственный энергетический университет им. В.И. Ленина
ул. Рабфаковская, 34, г. Иваново, 153003, РФ

³ Калужский государственный университет им. К.Э. Циолковского
ул. Степана Разина, 26, г. Калуга, 248023, РФ; e-mail: m.stepovich@rambler.ru
Поступила в редакцию 10.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0593

Аннотация. Методом газоразрядной визуализации изучен характер изменений позиционного порядка в расположении белок-индуцированных водных ассоциатов в водных растворах таблетированных лекарственных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ . В качестве объектов исследования использовали водные растворы таблетированных форм, которые были получены нанесением растворов антител (концентрацией 10^{-24} мг/мл) на носитель (89 % сырьевой лактозы, 10 % микрокристаллической целлюлозы, 1 % стеарата магния). Рассмотрены информативные возможности метода газоразрядной визуализации при анализе данных об энтропии, фрактальности и длине изолиний свечений, обусловленных киловольтными электронами, вышедшими из водных растворов таблетированных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ . Показано, что активация растворов антителами к интерферону- γ связана с интенсификацией ассоциативных процессов, сопровождающихся упорядочением белок-индуцированных молекулярных комплексов. В целом полученные результаты свидетельствуют о сохранении в растворах таблетированных образцов с антителами к интерферону водных ассоциатов, сформированных в процессе сверхвысокого разведения.

Ключевые слова: газоразрядная визуализация, антитела к интерферону- γ , сверхнизкая концентрация, водные ассоциаты.

ВВЕДЕНИЕ

Дисперсные системы, возникающие при разведении в водном растворе белковых наночастиц (в частности, антител к интерферону- γ), являются интересными объектами для наблюдения белок-индуцированных кластеров, а также трансформации их позиционного порядка под влиянием внешних воздействий при изменении концентрации раствора [1]. Существующие методы исследования позиционного порядка в таких средах зачастую малоэффективны, так как базируются на фиксации изменений их структурно-чувствительных свойств. Так как терапевтическая эффективность многих лекарственных средств лимитируется интенсивностью процессов переноса зарядов ионами и электронами, которые определяются особенностями ближнего порядка молекулярных комплексов, для их изучения может быть использован метод каналирования медленных ионов или электронов [2]. Метод позволяет изучать особенности каналов облегченного движения заряженных частиц и, как следствие, определить параметры состояния молекулярных комплексов, формирующих стенки таких каналов. Этот подход реализован в методе газоразрядной визуализации (ГРВ) [3]; см. также [4-6] и литературу там же. В этом методе киловольтные электроны (с энергией порядка единиц килоэлектронвольт) проходят через каплю изучаемого раствора (объемом порядка единиц кубического миллиметра), после чего выходят в воздушную среду и её ионизируют. Возникающее при этом рекомбинационное излучение воздушной среды регистрируется и свечение воздуха даёт картины стереографических проекций, анализируя которые, можно оценить характер движения электронов через объёмную часть капли раствора и её поверхность, а, значит, и получить возможность оценки геометрических параметров молекулярных комплексов, формирующих каналы облегченного движения, зарядового состояния водных ассоциатов, их ближнего порядка – см. [4-6] и литературу там же. Ранее методы ГРВ с использованием информации, основанной на анализе угловых распределений свечения, использовались для исследований следующих биомедицинских объектов: структурных особенностей компонентов крови [7], для оценки эффективности препаратов при лечении сердечно-сосудистой патологии [8], для оценки характера упорядочения белок-индуцированных молекулярных комплексов в водных растворах таблетированных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ [9]. В настоящей работе такие исследования продолжены, однако основное внимание уделено возможностям использования информативных возможностей метода ГРВ при анализе данных об энтропии, фрактальности и длине изолиний свечений, обусловленных киловольтными электронами, вышедшими из водных растворов таблетированных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ .

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе методом ГРВ изучен характер изменений позиционного порядка в расположении белок-индуцированных водных ассоциатов в водных растворах таблетированных лекарственных препаратов, содержащих антитела к интерферону- γ . В качестве объектов исследования использовали водные растворы таблетированных форм, которые были получены нанесением растворов антител (концентрацией 10^{-24} мг/мл) на носитель (89 % сырьевой лактозы, 10 % микрокристаллической целлюлозы, 1 % стеарата магния). Образцы предоставлены компанией ООО НПФ «Материя Медика Холдинг», Россия.

Исследования выполнены на приборе «ГРВ-камера» медицинского назначения [3,10]. ГРВ-изображения фиксировались чувствительной фото-видео камерой в диапазоне световых частот с расширением чувствительности в фиолетовой и ультрафиолетовой областях с использованием кварцевого стекла. Анализ параметров картин ГРВ-изображений растворов выполнялся с использованием программы GDV Scientific Laboratory. ГРВ-граммы в программе GDV Scientific Laboratory фиксировались в различных режимах псевдоокрашивания, что позволяло точнее изучить особенности развития газового разряда. При записи ГРВ-граммы сохранялись в исходной палитре из 256 оттенков серого. В энергетической палитре точки изображения окрашивались в один из девяти цветов (9 уровней интенсивности в логарифмической шкале). Самые яркие точки свечения (центральная часть ГРВ-грамм) окрашивались в оттенки голубого (уровни: 256-128, 128-64, 64-32, 32-16 бит), менее яркие точки окрашивались в оттенки фиолетового (16-8, 8-4) красного (4-2), и оранжевого (2-1, 1-0) цветов. Все точки изображения, удаленные алгоритмом фильтрации шума, отображались белым цветом. ГРВ-граммы позволяли определить следующие параметры, характеризующие особенности состояния каналов облегченного движения электронов и, как следствие, параметры молекулярных ассоциатов, образующих стенки каналов: энтропию (по Шенону) S , отображающую специфику пространственного расположения и конфигурацию ближнего порядка молекулярных ассоциатов; фрактальность по изолинии F , определяемую уровнем пространственного самоподобия, лимитируемого спецификой процессов самоорганизации в растворе; длину изолинии L , пропорциональную свободной энергии Гиббса. Изолинии рассчитывались для средней интенсивности свечения (находится в фиолетовой области энергетической палитры). Энтропия и фрактальность рассчитывались по изолинии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Усреднённая ГРВ-грамма для растворов (рис. 1, левая часть) и стереографическая проекция углового распределения электронов (рис. 1, правая часть), проходящих через каплю раствора таблетированного образца антител к интерферону- γ и вспомогательных веществ представлены на рисунке 1.

Концентрационные зависимости отклонений параметров ГРВ-грамм для растворов, содержащих белковые антитела, от аналогичных параметров для очищенной воды приведены на рисунке 2 (рис. 2, а-в).

Видно, что с ростом концентрации вещества таблетированных образцов наблюдается изменение энтропии (рис. 2а). При этом относительные изменения энтропий dS для образцов с антителами больше изменения dS для растворов, их не содержащих, а сами зависимости для обеих кривых довольно близки к линейным. Это указывает на специфическое влияние антител на пространственное расположение водных ассоциатов в растворах, что находится в согласии с концентрационным изменением параметра фрактальности по изолинии dF (рис. 2б). Повышение концентрации антител в растворе (кривая 1) обеспечивает интенсификацию кооперативных

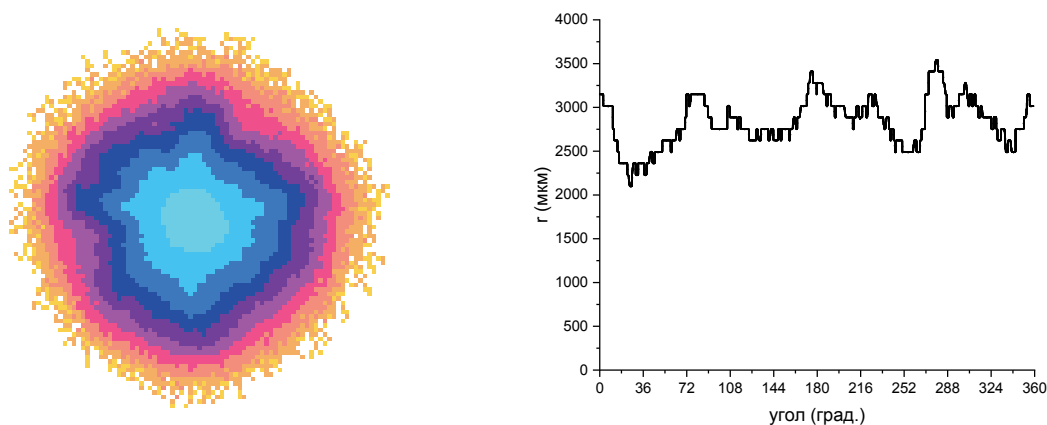


Рисунок 1. Усреднённая ГРВ-грамма для растворов (левый рисунок) и стереографическая проекция углового распределения электронов (правый рисунок), проходящих через каплю раствора таблетированного образца антител к интерферону- γ и вспомогательных веществ

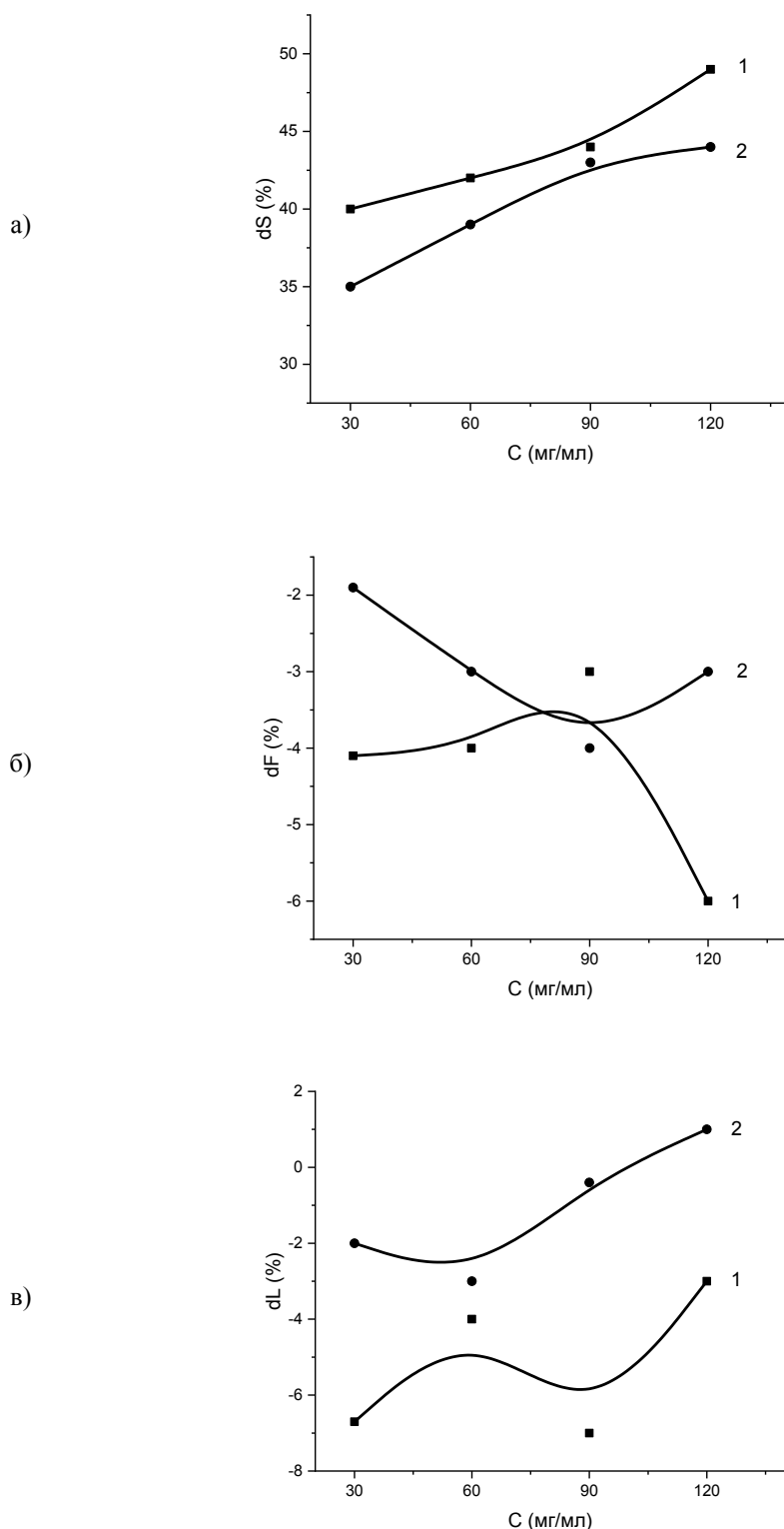


Рисунок 2. Экспериментальные значения и соответствующие им кривые зависимостей относительных значений отклонений параметров картин ГРВ растворов таблетированных образцов с различной концентрацией вещества от аналогичных параметров для очищенной воды: а – энтропия dS , б – фрактальность dF , в – длина изолинии dL . Кривые 1 – содержащие антитела; кривые 2 – не содержащие антитела

межмолекулярных взаимодействий между водными ассоциатами. Это может быть связано со специфической структурной организацией раствора на микроуровне, лимитирующей процессы самоорганизации [11]. Следовательно, несмотря на низкую концентрацию антител в растворах (около 10^{-24} мг/мл), недостаточную для существенных изменений в его материально-энергетическом балансе, наличие молекулярных комплексов растворителя обеспечили формирование специфических водных ассоциатов, изменяющих свободную энергию Гиббса dL (рис. 2в). С учетом изменений энтропии активация растворов антителами к интерферону- γ связана с

интенсификацией ассоциативных процессов, сопровождающихся упорядочением белок-индуцированных молекулярных комплексов [12]. Полученные результаты подтверждают данные о сохранении в растворах таблетированных образцов с антителами к интерферону водных ассоциатов, сформированных в процессе сверхвысокого разведения [9].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активация растворов антителами к интерферону- γ связана с интенсификацией ассоциативных процессов, сопровождающихся упорядочением белок-индуцированных молекулярных комплексов. В целом полученные результаты свидетельствуют о сохранении в растворах таблетированных образцов с антителами к интерферону водных ассоциатов, сформированных в процессе сверхвысокого разведения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда и Правительства Калужской области № 23-21-10069, <https://rscf.ru/project/23-21-10069/>, <https://rscf.ru/en/project/23-21-10069/>.

Список литературы/References:

1. Epstein O. The Spatial Homeostasis Hypothesis. *Symmetry*, 2018, vol. 10, iss. 4, art. no. 103, doi: 10.3390/sym10040103.
2. Высоцкий В.И., Карлаш А.Ю. Особенности селективного транспорта и каналирования ионов в водной среде в каналах биологических мембран. *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейронные исследования*, 2010, № 12, с. 64-71 [Vysotsky V.I., Karlash A.Yu. Features of selective transport and channeling of ions in the aquatic environment in the channels of biological membranes. *Journal of Surface Investigation. X-ray, Synchrotron and Neutron Techniques*, 2010, no. 12, pp. 64-71 (In Russ.)].
3. Коротков К.Г., Орлов Д.В., Величко Е.Н. Применение метода газоразрядной визуализации для анализа различных жидкостей. *Изв. вузов, Приборостроение*, 2011, т. 54, № 12, с. 40-46 [Korotkov K.G., Orlov D.V., Velichko E.N. Application of the gas discharge imaging method for the analysis of various liquids. *Izv. vuzov, Priborostroyeniye*, 2011, vol. 54, no. 12, pp. 40-46 (In Russ.)].
4. Шипко М.Н., Усольцева Н.В., Сибирев А.Л., Масленникова О.М., Смирнова А.И., Степович М.А., Габдулсадыкова Г.Ф. Влияние импульсных электромагнитных полей на позиционный и ориентационный порядок в водных растворах цетилтриметиламмония бромистого. *Жидкие кристаллы и их практическое использование*, 2018, т. 18, № 1, с. 47-54, doi: 10.18083/LCAppl.2018.1.47 [Shipko M.N., Usol'tseva N.V., Sibirev A.L., Maslennikova O.M., Smirnova A.I., Stepovich M.A., Gabdulsadykova G.F. Influence of pulsed electromagnetic fields on positional and orientational ordering in aqueous solutions of cetyltrimethylammonium bromide (СТАВ). *Liquid Crystals and their Application. Russian Journal*, 2018, no. 18, no. 1, pp. 47-54 (In Russ.)].
5. Шипко М.Н., Степович М. А., Сибирев А.Л., Мельникова О.С., Смирнова А.И., Усольцева Н.В. Ориентационные эффекты при каналировании киловольтных электронов в жидких средах. *Известия РАН. Серия физическая*, 2020, т. 84, № 7, с. 994-997, doi: 10.31857/S0367676520070273 [Shipko M.N., Stepovich M.A., Sibirev A.L., Melnikova O.S., Smirnova A.I., Usoltzeva N.B. Orientational Effects of Kilovolt Electron Channeling in Liquid Media. *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*, 2020, vol. 84, no. 7, pp. 820-823 (In Russ.)].
6. Масленникова О.М., Сибирев А.Л., Криштоп В.В., Шипко М.Н., Степович М.А., Ленчер О.С. Исследование эффективности транспорта ионов K^+ по каналам ионных обменников в присутствии лекарственных средств – активаторов калиевых каналов. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2021, т. 6, № 2, с. 269-274 [Maslennikova O.M., Sibirev A.L., Krishtop V.V., Shipko M.N., Stepovich M.A., Lencher O.S. Study of the efficiency of K^+ ion transport through ion exchanger channels in the presence of drugs-potassium channel activators. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2021, vol. 6, no. 2, pp. 269-274 (In Russ.)].
7. Stepovich M.A., Maslennikova O.M., Shipko M.N., Sibirev A.L., Chrishtop V.V. The Use of Gas Discharge Visualization for Identifying Structured Peculiarities of Blood Components: Plasma, Platelets, and Erythrocytes. *Journal of Cardiology and Cardiovascular Therapy*, March 2018, vol. 9, iss. 4, art. no. 555770.
8. Масленникова О.М., Шипко М.Н., Сибирев А.А., Степович М.А., Никонорова В.Г. О диагностическом потенциале метода газоразрядной визуализации в оценке эффективности препаратов для лечения сердечно-сосудистой патологии. *Кремлевская медицина. Клинический вестник*, 2021, № 4, с. 91-96 [Maslennikova O.M., Shipko M.N., Sibirev A.L., Stepovich M.A., Nikonorova V.G. On a diagnostic potential of gas-discharge imaging technique in evaluating the effectiveness of pharmpreparations in cardiovascular diseases. *Kremlin medicine journal*, 2021, no. 4, pp. 91-96 (In Russ.)].
9. Масленникова О.М., Сибирев А.Л., Шипко М.Н., Степович М.А. Особенности белок-индуцированных ассоциатов при сверхвысоком разведении антител к интерферону- γ . *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2022, т. 7, № 3, с. 467-475, doi: 10.29039/rusjbpс.2022.0546 [Maslennikova O.M., Sibirev A.L., Shipko M.N., Stepovich M.A. Features of protein-induced associates at superhigh dilution of antibodies to interferon- γ . *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2022, vol. 7, no. 3, pp. 467-475 (In Russ.)].
10. Коротков К.Г. *Принципы анализа ГРВ биоэлектрографии*. Санкт-Петербург: Реноме, 2007, 286 с. [Korotkov K.G. *Principles of analysis of GDV bioelectrography*. St. Petersburg: Renome, 2007, 286 p. (In Russ.)].

11. Эпштейн О.И. Феномен релиз-активности и гипотеза «пространственного» гомеостаза. *Успехи физиологических наук*, 2013, т. 44, № 3, с. 54-76. [Epstein O.I. The phenomenon of release activity and the hypothesis of “spatial” homeostasis. *Uspexhi fiziologicheskikh nauk*, 2013, vol. 44, no. 3, pp. 54-76 (In Russ.)].

12. Don E., Van der Meide N., Egorov V., Putilovskiy M., Tarasov S. The level of natural anionantibodies to IFN-gamma in varicella infection treated with antiviral drug Anaferon for children: A pilot Study. *Immunology Letters*, 2020, vol. 222, pp. 90-94, doi: 10.1016/j.imlet.2019.10.015.

ABOUT INFORMATIONAL OPPORTUNITIES AND RESULTS OF EXPERIMENTAL STUDIES OF GDV VISUALIZATION PROTEIN-INDUCED MOLECULAR COMPLEXES IN AQUEOUS SOLUTIONS OF TABLETS, CONTAINING ANTIBODIES TO INTERFERON- γ

Maslennikova O.M.¹, Sibirev A.L.², Shipko M.N.², Stepovich M.A.³

¹ Central State Medical Academy of Department of Presidential Affairs
st. Marshal Timoshenko, 19, bld. 1A, Moscow, 121359, Russia

² Lenin Ivanovo State Power Engineering University
Rabfakovskaya st. 34, Ivanovo, 153025, Russia

³ Tsiolkovsky Kaluga State University

Stepan Razin st. 26, Kaluga, 248023, Russia; e-mail: m.stepovich@rambler.ru

Received 10.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0593

Abstract. The character of changes in the positional order in the arrangement of protein-induced water associates in aqueous solutions of tableted drugs containing antibodies to interferon- γ was studied by the method of gas-discharge visualization. As objects of study, we used aqueous solutions of tablet forms, which were obtained by applying antibody solutions (with a concentration of 10–24 mg/ml) onto a carrier (89% raw lactose, 10% microcrystalline cellulose, 1% magnesium stearate). The informative possibilities of the gas-discharge visualization method in the analysis of data on the entropy, fractality, and length of emission isolines caused by kilovolt electrons released from aqueous solutions of tablet preparations containing antibodies to interferon- γ are considered. It has been shown that the activation of solutions by antibodies to interferon- γ is associated with the intensification of associative processes accompanied by the ordering of protein-induced molecular complexes. In general, the obtained results indicate the preservation of water associates formed in the process of ultrahigh dilution in solutions of tableted samples with antibodies to interferon.

Key words: *gas discharge imaging, antibodies to interferon- γ , ultra-low concentration, water associates.*