

6. Martinovich G.G., Martinovich I.V., Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Kandalintseva N.V., Cherenkevich S.N. Phenolic antioxidant TS-13 regulating ARE-driven genes induces tumor cell death by a mitochondria-dependent pathway. *Biophysics*, 2015, vol. 60, pp. 94-100.
7. Мартинович Г.Г., Черенкевич С.Н. *Окислительно-восстановительные процессы в клетках*. Минск: БГУ, 2008, 159 с. [Martinovich G.G., Cherenkevich S.N. *Redox processes in cells*. Minsk, BSU, 2008, 159 p. (In Russ.)]
8. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Черенкевич С.Н. Количественная характеристика редокс-состояния эритроцитов. *Биофизика*, 2008, т. 53, с. 618-623. [Martinovich G.G., Martinovich I.V., Cherenkevich S.N. Quantitative characteristic of the redox state of erythrocytes. *Biofizika*, 2008, vol. 53, pp. 618-623. (In Russ.)]
9. Martinovich G.G., Martinovich I.V., Cherenkevich S.N., Sauer H. Redox buffer capacity of the cell: theoretical and experimental approach. *Cell Biochem. Biophys.*, 2010, vol. 58, pp. 75-83.
10. Martinovich G.G., Martinovich I.V., Vcherashniaya A.V., Shadyro O.I., Cherenkevich S.N. Thymoquinone, a biologically active component of *Nigella sativa*, induces mitochondrial production of reactive oxygen species and programmed death of tumor cells. *Biophysics*, 2016, vol. 61, pp. 963-970.
11. Liberti M.V., Locasale J.W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem. Sci.*, 2016, vol. 41, pp. 211-218.
12. Milkovic L., Zarkovic N., Saso L. Controversy about pharmacological modulation of Nrf2 for cancer therapy. *Redox Biol.*, 2017, vol. 12, pp. 727-732.

ВЛИЯНИЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И РАЗЛИЧНЫХ ОБРАБОТОК НА СПЕКТРАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ СВИНИНЫ

Плотникова Л.В., Нечипоренко У.Ю., Подшивалов А.В., Плотников П.П., Успенская М.В., Ишевский А.Л.
Университет ИТМО
пр. Кронверкский 49. г. Санкт-Петербург. 197101, РФ.
e-mail: ljusja@mail.ru

Аннотация. Целью данной работы являлось сравнительное исследование влияния последовательных экстракций основных частей мышечной ткани животного происхождения и процесса лиофилизации на инфракрасный и электронный спектры отражения их поверхности. Объектом исследования являлись измельченная мышечная ткань свинины и ее основные составляющие – мышечное волокно, строма и белки стромы. Представленное исследование основано на способности составных частей мышечной ткани растворяться в «иерархической» последовательности и позволило отметить согласованность данных по изменению функционального состава используя метод ИК-НПВО спектроскопии поверхности исследуемых образцов и их компонентного состава с использованием метода электронной спектроскопии диффузного отражения (ЭСДО).

Ключевые слова: мышечная ткань, ИК-спектроскопия, электронная спектроскопия отражения

THE EFFECT OF LYOPHILIZATION AND VARIOUS TRTATMENTS ON THE ON THE SPECTRAL CHARACTERISTICS OF PORK MUSCLE TISSUE

Plotnikova L.V., Nechiporenko U.Yu., Podshivalov A.V., Plotnikov P.P., Uspenskaya M.V., Ishevskiy A.L.
ITMO University
Kronverksky Ave. 49. St. Petersburg, 197101. Russia
e-mail: ljusja@mail.ru

Abstract. The aim of this work was the comparative study of the effect of sequential extractions of the main parts of muscle tissue of animal origin and processes of lyophilization on infrared and electronic spectra of reflection of the tissue surface. The object of the study was to minced muscle tissue of pork and its main components - the muscle fiber, the stroma and the proteins of stroma. The study based on the ability of the constituent parts of muscle tissue to dissolve in a hierarchical sequence made it possible to note the consistency of the change in the functional composition using the method of ATR-FTIR spectroscopy of the samples surface and their component structure using the method of electronic spectroscopy of diffuse reflection (ESDR).

Keywords: muscle tissue of pork, infrared spectroscopy, electronic spectroscopy of diffuse reflection.

Классическая инфракрасная спектроскопия и ее современный вариант – ИКС нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) являются ведущими методами в аналитической практике научных и производственных лабораторий различных отраслей промышленности при исследовании твердофазных и жидких систем различного происхождения [1,2]. Физические особенности колебательной спектроскопии обеспечивают ей возможность проводить анализ состава широкого спектра функциональных группировок, одноименные из которых проявляются в одном и том же частотном интервале [3], независимо от того к какому классу веществ относятся компоненты. Существенную роль в ИК спектроскопии играет вода, маскирующая большую часть функционалов. Это вносит определенные сложности при расшифровке и интерпретации спектров биологических тканей. Устранению помех со стороны воды способствует лиофилизация исследуемых образцов.

Возможности электронной спектроскопии диффузного отражения (ЭСДО) значительно скромнее, но, относясь к способам тестирования компонентного состава биологических систем, в ряде случаев, ЭСДО позволяет получать информацию, недоступную другим методам. Широко используемый в исследовании поверхности неорганических материалов, метод пока не нашел должного применения при исследовании компонентного состава материалов биологического происхождения. Отсутствие помех со стороны воды, поглощающей в диапазоне вакуумного ультрафиолета (< 200 нм) – привлекательная особенность метода при исследовании биологических тканей, содержащих, как правило, много воды. УФ-спектр органического вещества характерен. Появление полосы в его спектре объяснено, в основном, $\pi \rightarrow \pi^*$ и $n \rightarrow \pi^*$ электронным переходам хромофора – структурной группе, которая обуславливает избирательное поглощение света (C=O, C=C, C \equiv C, N=N, N=O, системы C=C–C=O, ароматическое ядро, кислород эфирных группировок) и ее ближайшему окружению [4]. Вся желаемая информация по идентификации строительных блоков основных биомолекул (белков, липидов, углеводов) содержится в средней и ближней ультрафиолетовых областях (200–400 нм) электромагнитного спектра. Аналитические особенности метода, высокое разрешение, чувствительность и информативность предопределяются дискретностью энергий возбуждения преимущественно электронов не поделенных пар кислорода карбонильных (C=O) и эфирных (>O) групп, принадлежащих разным, но практически всем классам веществ всех составных частей биологических тканей. В связи с этим представляло интерес сопоставление данных, полученных двумя спектральными методами отражения как инструментами, обладающими разными функциональными возможностями и работающими в разных энергетических диапазонах.

В рамках исследования составных частей, мышечную ткань свинины подвергли 4-х стадийной обработке:

- I) препарирование свежееохлажденной мышечной ткани и измельчение через круглые фильеры ($\varnothing = 2,5$ мм);
- II) получение мышечного волокна – экстракция саркоплазмы (водорастворимой части мышечной ткани, содержащей вещества всех классов) дистиллированной водой;
- III) получение стромы – удаление из мышечного волокна актомиозинового комплекса (контрактильных белков актина, миозина, тропомиозина) солевым раствором Вебера (NaCl 10 %);
- IV) выделение белков стромы – экстракция мукополисахаридов (углеводного структурного элемента соединительной ткани) раствором NaOH 0,6 М на холоде [5].

После каждой стадии обработки полученные образцы анализировались методом ИК-спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения (ИК-НПВО) с использованием Фурье-спектрометра Tensor 37 (Bruker, Германия) с программным пакетом управления OPUS и стандартными градуировочными возможностями в диапазоне частот $4000\text{--}600$ см $^{-1}$ в формате поглощения. Для сравнительного анализа данных ИК-спектроскопии в работе применен метод электронной спектроскопии диффузного отражения (ЭСДО) с использованием спектрофотометра Specord M-200 (AIZ Engineering GmbH, Германия) в диапазоне длин волн 200–700 нм. Для повышения дифференцируемости спектров образцы ткани подвергались лиофилизации после каждой стадии обработки с использованием сублимационной сушки Triad 7400030 (Labconco, США) при температуре -30 °C и давлении вакуума 165 Па в течение 72 ч.

Рисунок 1 иллюстрирует ИК-НПВО спектры образцов, полученных в результате последовательных водной, солевой и щелочной стадий обработки мышечной ткани свинины. Интенсивные высокочастотные полосы в спектре исходной измельченной мышечной ткани с максимумом при 3350 см $^{-1}$ могут быть сформированы валентными колебаниями $-\text{NH}_n$ и $-\text{OH}$ - группировок всех нерастворимых и водорастворимых компонентов саркоплазмы, мышечного волокна, стромы, белков стромы, а также гидроксильных групп связанных молекул воды [3].

На правой ее ветви в области $3050\text{--}2850$ см $^{-1}$ присутствует группа мало интенсивных полос, обусловленных валентными колебаниями $-\text{CH}_n$ группировок, также от всех компонентов составных частей мышечной ткани. Во всех спектрах деформационные колебания $-\text{OH}$ групп воды проявляются в виде полосы средней интенсивности при 1637 см $^{-1}$. На спаде обеих ее ветвей слабо проявлены полосы карбоксильных $-\text{COOH}$ (1743 см $^{-1}$) и карбоксилатных $-\text{COO}^-$ (1553 см $^{-1}$) карбонил (C=O). В диапазоне < 1500 см $^{-1}$ регистрируются деформационные колебания $-\text{CH}_n$, $-\text{NH}_n$, $-\text{OH}$ группировок и валентные колебания связей C–O, C–C, C–N и др.

Экстракция водорастворимых компонентов саркоплазмы (стадия II) приводит к снижению интенсивности полос валентных и деформационных колебаний связанных $-\text{OH}$ групп молекул воды. Солевая экстракция белкового актомиозинового комплекса (стадия III) и щелочная – мукополисахаридной (стадия IV) составляющей стромы, напротив, вызывают увеличение интенсивности полос 3350 см $^{-1}$ и небольшой их высокочастотный сдвиг.

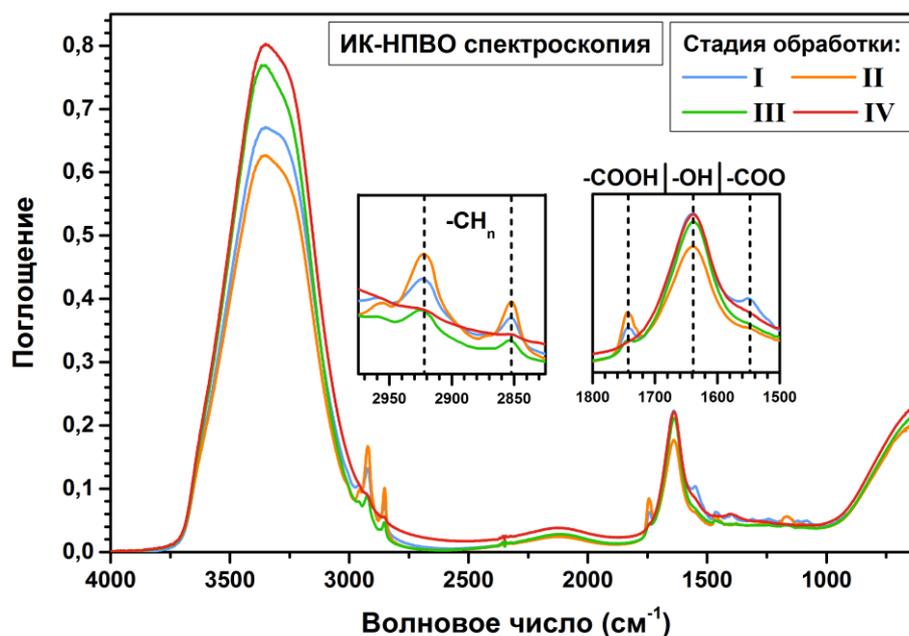


Рисунок 1 – ИК-спектры поверхности основных составляющих измельченной мышечной ткани (I) свинины: II – мышечное волокно, III – строма, IV – белки стромы

О характере изменения интенсивности полос поглощения карбонильных и $-CH_n$ группировок позволяют судить их увеличенные фрагменты спектров. В спектре исходной мышечной ткани (стадия I) достаточно выражена слабая полоса карбоксилатных карбониллов – 1553 см^{-1} . После удаления водорастворимых веществ саркоплазмы (стадия II) ее интенсивность резко падает. Полоса карбоксильных карбониллов (1743 см^{-1}) при этом несколько увеличивается. Однако удаление солевой обработкой белков актомиозинового комплекса (стадия III) снова приводит к снижению полосы 1731 см^{-1} в спектре стромы. После извлечения из структуры стромы липидных и углеводных (мукополисахариды) компонентов щелочным раствором (стадия IV) ИК-спектр белков стромы – биологических полимеров (преимущественно коллагена и эластина) практически представляет собой спектр дистиллированной воды с максимумами 3339 и 1637 см^{-1} , маскирующей сигнал от функциональных групп, что обусловлено повышенной водоабсорбционной способностью коллагена. Аналогичным образом в процессе последовательных обработок мышечной ткани свинины изменяется интенсивность полос поглощения, за появление которых ответственны $-CH_n$ группы.

Лиофилизация мышечной ткани и ее основных составляющих существенным образом изменяет спектральные характеристики их поверхности, в целом, достаточно ярко отражая характер процессов, имеющих место при проведении последовательных водно-солевой и щелочной экстракций. На рисунке 2 представлены ИК-спектры лиофилизованных образцов мышечной ткани после каждой стадии обработки, из которых видно, что удаление влаги во всех случаях приводит к резкому увеличению интенсивности и дифференциации основных характеристических полос поглощения. После экстракции саркоплазмы (стадия II), в состав которой входит и группа водорастворимых глобулярных белков, наблюдается понижение полос, ответственных за проявление $-NH$ (3280 см^{-1}), $-CH_n$ ($3010\text{--}2853\text{ см}^{-1}$) и $-COOH$ (1743 см^{-1}) группами белковых и липидных структурных блоков. При этом в спектре мышечного волокна несколько возрастает поглощение белковых структур, обусловленное симметричными валентными колебаниями (ν_s) карбонила Амида I (1642 см^{-1}) и асимметричными валентными колебаниями (ν_{as}) Амида II (более чувствительного к конформационным изменениям протеинов), со смещением его полосы в область более низких частот ($1535 \rightarrow 1526\text{ см}^{-1}$).

Солевая обработка (стадия III), в связи с извлечением белков актомиозинового комплекса, вызывает понижение спектра во всем исследуемом диапазоне частот с небольшим низкочастотным сдвигом полосы поглощения карбонильных группировок Амида II в положение 1522 см^{-1} . Напротив, удаление полисахаридной компоненты стромы щелочью (стадия IV), частично маскирующей сигнал от функциональных группировок белков соединительной ткани, приводит к увеличению интенсивности основных полос, описывающих суммарный спектр белков стромы – коллагена и эластина. Кроме того, усиление сигнала и высокочастотный сдвиг мобильной полосы $C=O$ Амида II (1560 см^{-1}) могут говорить о процессах агрегации белков стромы, а уширение полосы и появление плеча в области 3500 см^{-1} – о наличии химически прочно связанной воды в ячейках сформированной матричной сетки коллагена. На это указывают – очень интенсивный максимум деформационных колебаний связанных $-OH$ групп при 1427 см^{-1} и консистенция образца, представляющего плотную, но пластичную желированную массу.

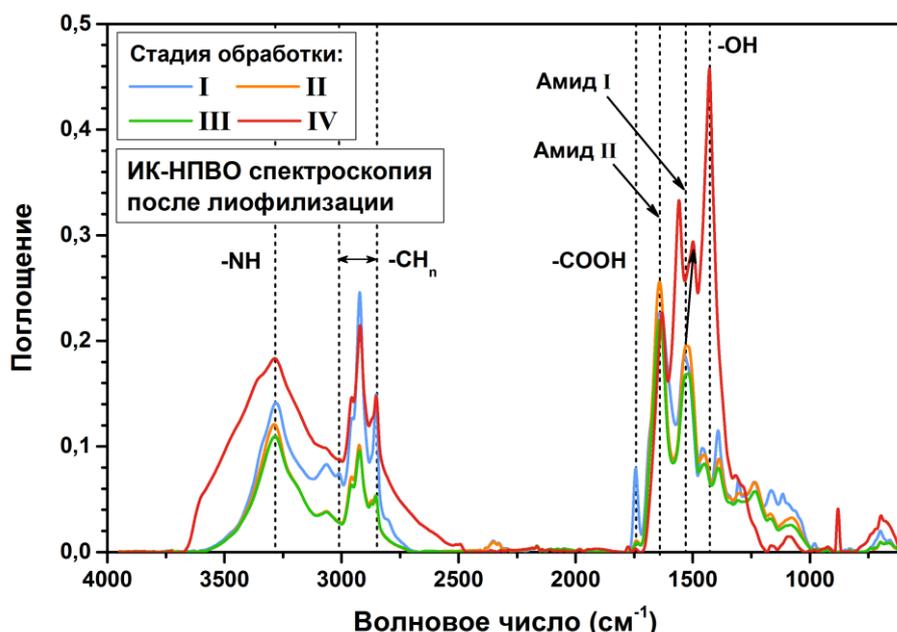


Рисунок 2 – ИК-НПВО спектры лиофилизованных образцов: I – измельченная мышечная ткань, II – мышечное волокно, III – строма, IV – белки стромы

Спектры ЭСДО исходной свежееохлажденной мышечной ткани свинины и ее основных составляющих представлены в работе [6]. На рисунке 3 приведены спектры лиофилизованных образцов. Электронный спектр поверхности мышечной ткани животного происхождения может быть описан четырьмя достаточно дифференцированными областями. В видимом диапазоне регистрируется дублет пигментного белка – миоглобина (540/580 нм) и полоса его окисленной формы – метмиоглобина (635 нм). Мукополисахариды дают интенсивный максимум при 400-425 нм. Серией полос средней интенсивности в области ближнего ультрафиолета (320-380 нм) проявляются строительные блоки липидных компонентов – ненасыщенные жирные кислоты: олеиновая, линолевая, линоленовая и арахидоновая. В средней части УФ-области (240-300 нм, [7]) поглощают хромофоры четырех аминокислотных остатков (тирозина, триптофана, фенилаланина, гистидина), дисульфидные связи – 230/235 нм, а также моносахариды, олигосахариды и их разнообразные гибриды (260-315 нм) [8]. Пептидная связь дает полосу при 220-225 нм.

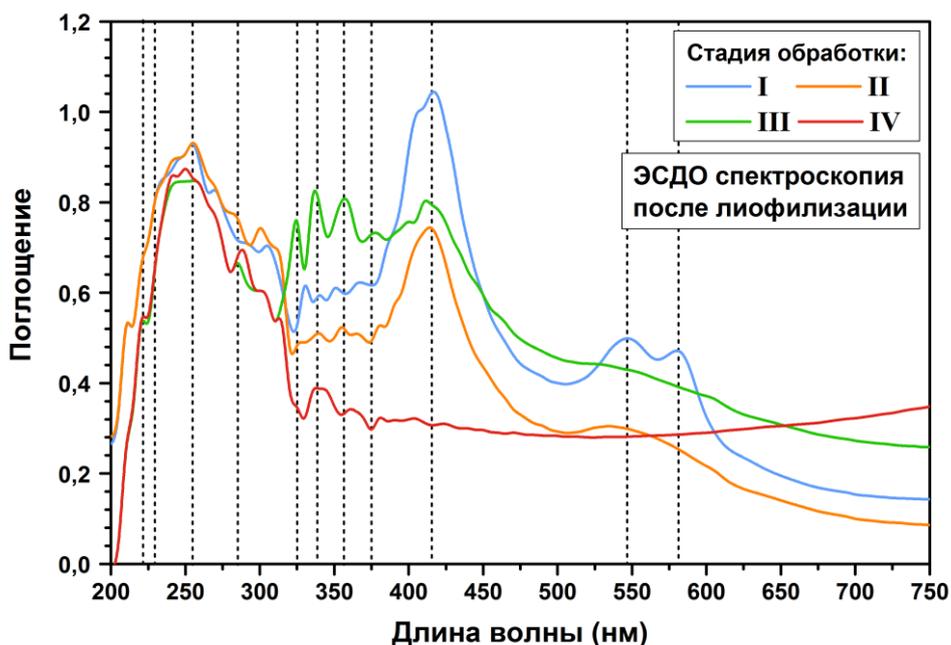


Рисунок 3 – ЭСДО спектры лиофилизованных образцов: I – измельченная мышечная ткань, II – мышечное волокно, III – строма, IV – белки стромы

Лиофилизация образцов мышечной ткани после обработки водой, солевым и щелочным растворами позволяет увидеть изменения в оптических характеристиках поверхности при последовательном извлечении

компонентов ее составных частей. Экстракция саркоплазмы (рис. 3) приводит к вымыванию водорастворимых веществ всех классов, что выражается в снижении кривой светопоглощения мышечного волокна, особенно заметному в диапазоне ниже 300 нм (стадия II). С извлечением актомиозиона (стадия III), после солевой обработки, полностью уходит дублет миоглобина, связанного с фибриллами контрактильных белков, снижается поглощение белково-углеводного комплекса, но сохраняются полосы липидных компонентов (320-380 нм) и мукополисахаридов (415-420 нм). Их удаление происходит после щелочной обработки стромы (стадия IV). В результате всех обработок, полученная кривая светопоглощения представляет собой спектральный образ белков стромы мышечной ткани свинины в ультрафиолетовом диапазоне электромагнитного спектра.

Анализ данных, полученных двумя методами, позволяет отметить определенную аналогию в характере изменения спектральных характеристик исследуемых образцов. В обоих случаях удаление водорастворимых веществ саркоплазмы приводит к общему снижению спектров, за исключением областей, где проявляются карбонилы белковых компонентов мышечного волокна. При этом из спектра ЭСДО (рис. 3) видно, что в состав водорастворимых веществ саркоплазмы, кроме глобулярного пигментного белка входят липиды и полисахариды. При извлечении белков актомиозионного комплекса соевым раствором Вебера в электронном спектре очень четко дифференцируются области проявления всех трех компонентов стромы: белки, мукополисахариды и липидные компоненты, вкрапленные в виде гранул в структуру углеводной составляющей. При этом ИК-спектр стромы заметно снижается только в области поглощения карбонильных группировок. Липидные и углеводные составляющие могут проявляться в нем в виде слабых двойных-тройных полос в области 1200-990 см⁻¹. Освобождение белков стромы от углеводной составляющей в обоих случаях сопровождается увеличением поглощения. Для электронного спектра это область 200-300 нм, для инфракрасного спектра – области поглощения –NH, –CH_n и C=O группировок.

Список литературы / References:

1. Stuart В.Н. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. N.-Y.: Wiley, 2004, 242 p.
2. Гордеев А.С. Инфракрасная спектроскопия биологических жидкостей и тканей. *Современные технологии в медицине*, 2010, № 1, с. 84-97. [Gordetsov A.C. Infrared spectroscopy of biological fluids and tissues. *Modern technology in medicine*, 2010, no. 1, pp. 84-97. (In Russ.)]
3. Тарасевич Б.Н. *ИК спектры основных классов органических соединений. Справочные материалы*. М.: МГУ, 2012, 55 с. [Tarasevich B.N. *The IR spectra of the main classes of organic compounds. Reference materials*. Moscow: MGU, 2012, 55 p. (In Russ.)]
4. Вязьмин С.Ю., Рябухин Д.С., Васильев А.В. *Электронная спектроскопия органических соединений*. СПб.: СПбЛТА, 2011, 43 с. [Vyaz'min S.Y., Ryabuhin D.S., Vasilev A.V. *Electronic spectroscopy of organic compounds*. St. Petersburg: SPbLTA Publ., 2011, 43 p. (In Russ.)]
5. Антипова Л.В., Глотова И.А., Рогов И.А. *Методы исследования мяса и мясных продуктов*. М.: Колос, 2001, 376 с. [Antipova L.V., Glotova I.A., Rogov I.A. *Research methods of meat and meat products*. Moscow: Kolos Publ., 2001, 376 p. (In Russ.)]
6. Орехова С.М. *Радиационно-химическое консервирование мышечной ткани свинины*. Дисс.... к.т.н. СПб.: НИУ ИТМО, 2014, 175 с. [Orehova S.M. *Radiation-chemical preserving muscle tissue of pork*. Diss. ... cand. tech. scien. St. Petersburg, NIU ITMO Publ., 2014, 175 p. (In Russ.)]
7. Демченко А.П. *Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков*. К.: Наук. думка, 1981, 208 с. [Demchenko A.P. *Ultraviolet spectrophotometry and protein structure*. Kiev, Naukova dumka Publ., 1981, 208 p. (In Russ.)]
8. Элиас П.С., Кохен А.Д. *Радиационная химия основных компонентов пищевых продуктов*. М.: Легкая и пищевая промышленность, 1983, 221 с. [Elias P.S., Kohen A.D. *Radiation chemistry of major food components*. Moscow, Legkaya i pishchevaya promyshlennost' Publ., 1983, 221 p. (In Russ.)]