

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С увеличением задержки между вторым и первым импульсами очевидна тенденция к увеличению концентрации легирующего элемента (меди, алюминия). Хотя по существу соотношения компонентов в образце и плазме не имеют резко выраженных различий, тем не менее, следует отметить, что фракционный характер легирующих добавок, поступающих в плазму, увеличивается с увеличением задержки. Такое проявление процессов фракционирования с увеличением задержки между двойными импульсами, скорее всего, объясняется переходом от взрывчатого к тепловому механизму поступления вещества.

## ЛИТЕРАТУРА

1. V.S. Burakov, N.V. Tarasenko, A.V. Butsen, V.A. Rozantsev and M. . Nedel'ko // *Eur. Phys. J. Appl. Phys.*, 2005. – V. 30. – P. 107–111.
2. V.S. Burakov (et al.) // *Spectrochimica Acta B*, – 2009. – № 64/2 – P. 141–146.
3. A. Ciucci [et al.]. *Appl. Spectroscopy*, – 1999. – № 53/8. – P 960–964.

УДК 577.3

П.П. Филиппова, преп.-стажер, (БГТУ, г. Минск);  
Д.В. Григорьева, доц., канд. биол. наук,  
И.В. Горудко, д-р биол. наук, проф.,  
(БГУ, г. Минск)

## ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГИБРИДНЫХ МИКРОЧАСТИЦ ВАТЕРИТА С КАТАЛАЗОЙ В МОДЕЛЬНЫХ КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ

В настоящее время отмечается интерес к использованию в качестве средств доставки неорганических носителей, в том числе карбонатов кальция, характеризующихся биоразлагаемостью, биосовместимостью, низкой токсичностью. Ватерит является одним из изоморфов карбоната кальция, характеризующийся идеальными механическими, физическими и химическими свойствами для включения лекарственных препаратов. Недостатком ватерита является небольшое включение и быстрое высвобождение положительно заряженных целевых молекул, низкая стабильность и перекристаллизация в более термодинамически устойчивый кальцит. Однако данные недостатки могут быть устранены дополнительным введением в ватерит различных биополимеров, в том числе природных полисахаридов с образованием

гибридных микрочастиц ватерита. В качестве целевой молекулы-мишени может быть использована каталаза, разлагающая пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), что особенно важно при терапии заболеваний, ассоциированных с окислительным стрессом и воспалением. Целью работы явилась оценка антиоксидантной активности каталазы в составе нативных (СС) и функционализированных фукоиданом (ССФ) или пектином (ССР) микрочастиц ватерита, а также сравнительный анализ эффектов нативных и гибридных микрочастиц ватерита с и без каталазы на функциональную активность нейтрофилов крови человека.

Карбонат кальция ( $CaCO_3$ ) занимает важное место среди используемых в медицине биосовместимых неорганических соединений. Существуют три полиморфные модификации карбоната кальция – кальцит, арагонит и ватерит, которые различаются между собой кристаллической структурой и свойствами. В частности, только поликристаллические частицы ватерита могут обладать сферической формой, развитой поверхностью и высокой пористостью. Эти свойства необходимы для эффективной адсорбции широкого спектра целевых молекул частицами, что важно с точки зрения эффективности многослойных полиэлектролитных капсул [1].

Ватерит – минерал, полиморфная форма  $CaCO_3$ . Как правило, ватерит бесцветен, имеет сферическую форму и пористую внутреннюю структуру. Диаметр частиц ватерита колеблется от 0,05 до 5 мкм. Как и арагонит, ватерит представляет собой метастабильную фазу  $CaCO_3$  в условиях окружающей среды на поверхности земли. Ватерит – наименее стабильная разновидность  $CaCO_3$  и очень быстро превращается в воде либо в кальцит, либо в арагонит, причем температуры ниже 60 °С способствуют образованию кальцита, а при более высоких температурах происходит перекристаллизация в арагонит.

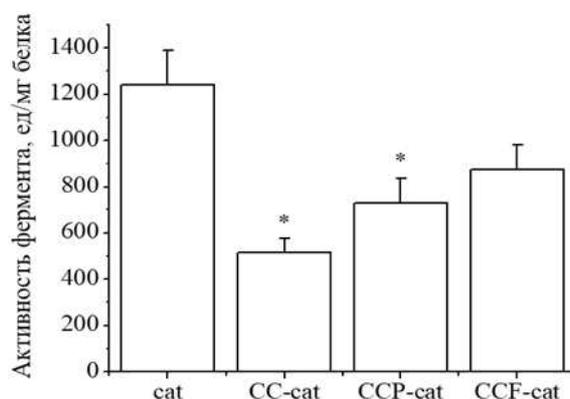
В природе ватерит встречается в минеральных источниках, возникает как второстепенный компонент более крупной структуры или в результате патологических процессов в организме человека и животных. Так, ватерит обнаружен в отолитах рыб, пресноводном жемчуге, зарубцевавшихся рубцах раковин некоторых моллюсков, желчных и мочевых камнях. В этих условиях некоторые примеси (ионы металлов или органические вещества) могут стабилизировать ватерит и предотвратить его превращение в кальцит или арагонит [2].

Наиболее распространенной точкой зрения является то, что ватерит имеет гексагональную кристаллическую симметрию и пространственную группу  $R\bar{6}3/mmc$  [3] с единичными параметрами элементарной псевдоячейки  $a' = b' = 4,13 \text{ \AA}$ ,  $c' = 8,49 \text{ \AA}$ .

В работе нейтрофилы выделяли из венозной крови, стабилизи-

рованной цитратом натрия, в градиенте плотности гистобака (1,077 г/мл). Активность каталазы оценивали по скорости убыли  $H_2O_2$ , концентрацию которого определяли по реакции с молибдатом аммония спектрофотометрическим методом, регистрируя изменение оптической плотности на длине волны 405 нм. Внеклеточную генерацию  $H_2O_2$  нейтрофилами оценивали флуоресцентным методом с использованием системы «скополетин – пероксидаза хрена» (длина волны возбуждения флуоресценции – 350 нм, регистрации – 460 нм). Внутриклеточную генерацию активных форм кислорода (АФК) и галогенов (АФГ) нейтрофилами оценивали методом проточной цитометрии с использованием флуоресцентных зондов  $H_2DCFDA$  и APF, соответственно (длина волны возбуждения флуоресценции 488 нм, регистрация – фильтр  $530\pm 30$  нм).

Вначале нами было исследовано – сохраняется ли ферментативная активность каталазы в составе микрочастиц ватерита. Было показано, что способность каталазы катализировать реакцию разложения  $H_2O_2$  до воды в составе СС, а также в составе ССР и ССФ снижается в ~2,4, 1,7 и 1,4 раза по сравнению с активностью свободного фермента (рис. 1).

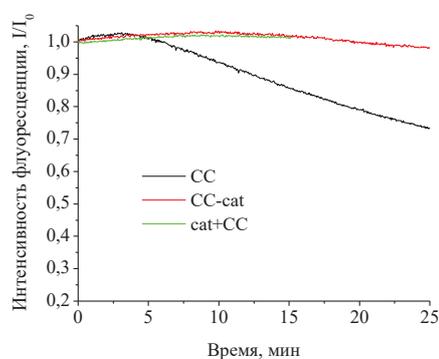


**Рисунок 1 – Активность свободной каталазы, а также фермента в составе СС, ССР и ССФ**

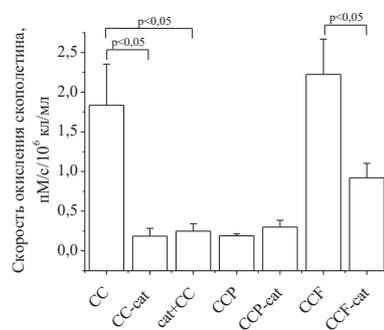
Далее было исследовано влияние нативных и гибридных микрочастиц ватерита с и без каталазы на внеклеточную продукцию АФК нейтрофилами. Было показано, что сами по себе СС вызывают сборку и активацию НАДФН-оксидазы с последующей продукцией  $H_2O_2$  (рис. 2а). Свободная каталаза, а также каталаза в составе СС ингибировала данный эффект самих СС (рис. 2а). Продукция  $H_2O_2$  нейтрофилами при действии ССР была достоверно ниже по сравнению с эффектом СС, что, вероятно, обусловлено антиоксидантной активностью

пектина. ССР с каталазой не отменяли антиоксидантного эффект самого пектина, однако синергичного эффекта пектина и каталазы в составе таких частиц также не было выявлено. ССF подобно нативным СС также вызывали респираторный взрыв нейтрофилов, однако каталаза в составе таких микрочастиц эффективно расщепляла  $H_2O_2$ , образующийся при активации клеток самими ССF (рис. 2б). На основании полученных данных можно предположить, что связывание каталазы с пектином в составе СС приводит к изменению конформации активного центра фермента и снижению ее ферментативной активности, в то время как в составе ССF каталитическая активность каталазы сохраняется.

Нами также была проведена аналогичная серия экспериментов, но в присутствии ингибитора каталазы – азид натрия. Как и ожидалось, свободная каталаза была не способна ингибировать респираторный взрыв нейтрофилов в ответ на СС в среде, содержащей азид натрия. Тем не менее, при действии СС или ССF, содержащих каталазу, скорость окисления скополетина в суспензии нейтрофилов была ниже, чем в присутствии самих СС и ССF. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что в составе микрочастиц ватерита каталаза дополнительно защищена от ингибиторов ее ферментативной активности (рис. 3).

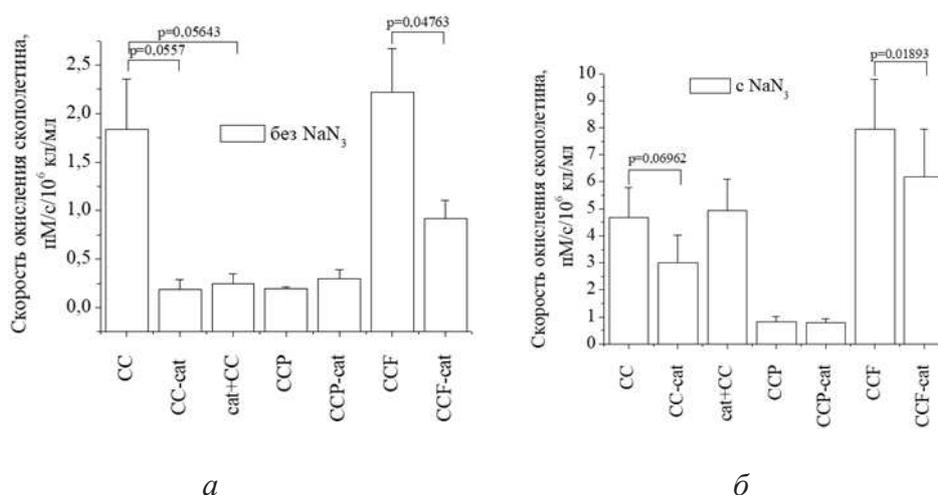


а



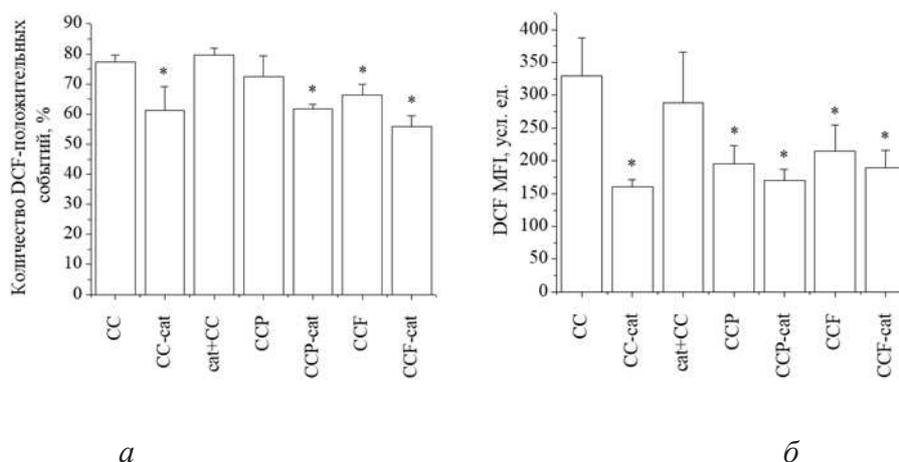
б

**Рисунок 2 – Типичные кинетические кривые окисления скополетина в суспензии нейтрофилов, активированных нативными микрочастицами ватерита (250 мкг/мл) без (СС) и с каталазой (СС-cat), а также смесью каталазы (100 мкг/мл) и СС (а); влияние нативных (СС) и гибридных (ССР или ССF) микрочастицы ватерита без и с каталазой (СС-cat, ССР-cat, ССF-cat), а также смеси каталазы и СС на скорость окисления скополетина в суспензии нейтрофилов**



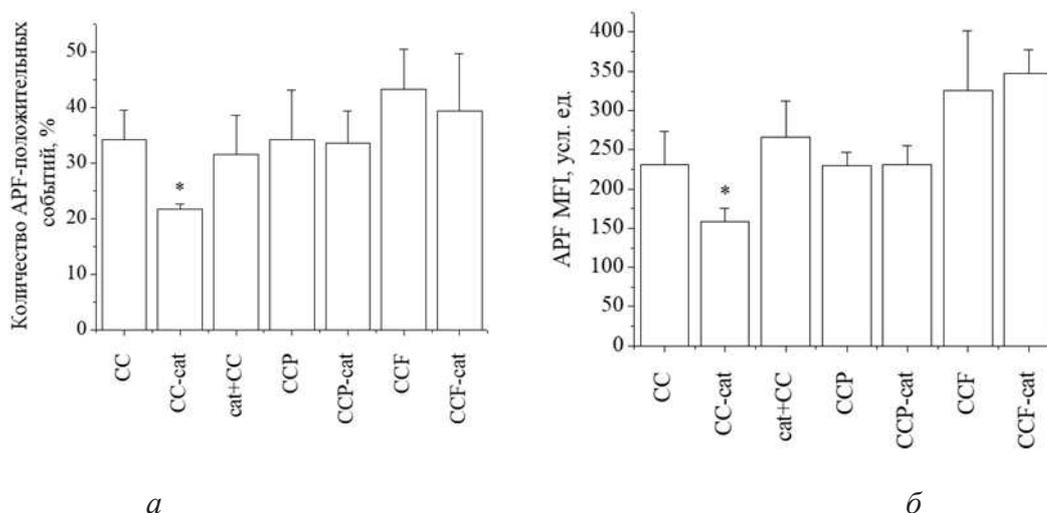
**Рисунок 3 – Влияние CC, CC-cat, cat+CC, CCP, CCP-cat, CCF и CCF-cat на скорость окисления скополетина в суспензии нейтрофилов без NaN<sub>3</sub> (а) и с NaN<sub>3</sub> (б)**

Далее нами было исследовано влияние нативных и гибридных микрочастиц ватерита с каталазой или без нее на внутриклеточную генерацию АФК в нейтрофилах. Нативные CC вызывали внутриклеточную генерацию АФК в нейтрофилах, однако после инкубации клеток с CC с каталазой число положительных по DCF событий и интенсивность флуоресценции DCF в клетках достоверно снижались (с  $77,3 \pm 2,4$  % до  $61,3 \pm 3,0$  % и с  $330,0 \pm 57,1$  усл. ед. до  $160,5 \pm 11,0$  усл. ед.). Полученные данные позволяют предположить, что CC эндоцитируются клетками, и каталаза в составе CC расщепляет генерируемый внутриклеточно H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Эффекты CCP и CCF были ниже по сравнению с эффектом нативных CC, каталаза в составе CCP или CCF несколько снижала эффекты от самих гибридных микрочастиц ватерита (рис. 4).



**Рисунок 4 – Количество DCF-положительных событий (а) и MFI DCF в популяции DCF-положительных нейтрофилов (б) при действии CC, CC-cat, cat+CC, CCP, CCP-cat, CCF и CCF-cat**

Далее нами было исследовано влияние нативных и гибридных микрочастиц ватерита с каталазой или без нее на внутриклеточную генерацию АФГ в нейтрофилах. Было выявлено, что нативные СС инициировали внутриклеточную генерацию АФГ в нейтрофилах, регистрируемую по увеличению интенсивности флуоресценции АРФ ( $364,0 \pm 29,0$  усл. ед.) в популяции АРФ-положительных событий. Однако каталаза в составе СС снижала интенсивность флуоресценции АРФ до  $184,8 \pm 27,8$  усл. ед., что свидетельствует о расщеплении образующегося внутриклеточно  $H_2O_2$ , тем самым лишая миелопероксидазу ее основного субстрата для ускорения реакций образования АФГ. Сам пектин, а также пектин в комплексе с каталазой одинаково эффективно (на  $\sim 37\%$ ) препятствовали СС-индуцированной внутриклеточной генерации АФГ в нейтрофилах. ССF подобно нативным СС инициировали внутриклеточную генерацию АФГ в нейтрофилах, каталаза в составе ССF достоверно снижала этот эффект (на  $\sim 26\%$ ) (рис. 5).



**Рисунок 5 – Количество АРФ-положительных событий (а) и MFI АРФ в популяции АРФ-положительных нейтрофилов (б) при действии СС, СС-cat, cat+СС, CCP, CCP-cat, CCF и CCF-cat**

В заключении отметим, что каталитическая активность каталазы в составе нативных и гибридных СС снижается по сравнению с активностью свободного фермента. Однако, несмотря на это, каталаза в составе СС и ССF обладает способностью расщеплять  $H_2O_2$ , генерируемый нейтрофилами в ответ на сами микрочастицы ватерита. Установлено, что инкорпорирование каталазы в такие микрочастицы ватерита является дополнительным защитным механизмом от действия на нее низкомолекулярных ингибиторов ферментативной активности. Сниженная генерация АФК и АФГ нейтрофилами в ответ на ССР с каталазой обусловлена антиоксидантной активностью самого пектина.

Таким образом, для максимального сохранения каталитической активности каталазы лучше использовать в качестве систем ее доставки СС и ССФ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Zámocký M., Koller F. Understanding the structure and function of catalase: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis // *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. – 1999. – V. 72, № 1. – P. 19–66.

2. Trushina D.B., Bukreeva T.V., Kovalchuk M.V., Antipina M.N. CaCO<sub>3</sub> vaterite microparticles for biomedical and personal care applications // *Mater Sci. Eng.* – 2014. – P. 10–15.

3. Трушина Д. Б. Структура и свойства частиц ватерита с регулируемым размером и их применение в качестве носителей для доставки лекарственных веществ: диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук 01.04.07 // Д. Б. Трушина; МГУ им. М. В. Ломоносова. – 2016. – С. 6–33.

УДК 543.42.062, 681.586.5

С.Б. Бушук, канд. физ.-мат. наук., зав. лаб.,  
И.Н. Пучковский, науч. сотр.,  
С.С. Шавель, науч. сотр.,  
(ГНПО «ОЭЛТ», Минск);  
П.А. Куликовская, мл. науч. сотр.,  
М.А. Ходасевич, д-р физ.-мат. наук, гл.н.с.,  
(ИФ НАН Беларуси, г. Минск)

### **ОДНОВРЕМЕННАЯ КАЛИБРОВКА МЕХАНИЧЕСКОГО НАПРЯЖЕНИЯ И ТЕМПЕРАТУРЫ С ПОМОЩЬЮ ОДИНОЧНОЙ ИЗОТРОПНОЙ ВОЛОКОННОЙ БРЭГГОВСКОЙ РЕШЕТКИ И ЛИНЕЙНЫХ И НЕЛИНЕЙНЫХ МЕТОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ**

Волоконно-оптические датчики на основе брэгговских решёток широко применяются для мониторинга температуры и механических деформаций в инженерных и строительных конструкциях благодаря высокой чувствительности, компактности и возможности мультиплексирования в одном оптическом волокне [1]. Спектральный отклик таких датчиков определяется положением и формой отражённого брэгговского пика, которые изменяются под действием внешних тепловых и механических воздействий.

Ранее было показано [2], что одновременное измерение темпе-