

МИНОБРАЗОВАНИЯ РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра общей, теоретической и компьютерной физики

**Молекулярное моделирование процессов
иммерсионного оптического просветления биотканей**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 4022 группы
направления подготовки 03.03.02 «Физика» Института физики
Кальжановой Татьяны Сергеевны

Научный руководитель,
д.ф.-м.н., профессор

К. В. Березин

Заведующий кафедрой
общей, теоретической и компьютерной физики
д.ф.-м.н., профессор

В. М. Аникин

Саратов 2022

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. В настоящее время оптические методы играют важную роль в развитии диагностики и лечении различных заболеваний. Диагностика и терапия заболеваний сопряжены с трудностями, которые возникают из-за того, что кожа и многие другие биоткани обладают сильным рассеянием света в видимой и ближней инфракрасной области. Это рассеяние возникает за счет неоднородностей показателей преломления на границах различных макромолекулярных структур, в основном на коллагеновых волокнах, которые преимущественно ответственны за рассеяние света в коже [1].

Эти трудности преодолеваются путем введения в ткань биосовместимых молекулярных агентов, которые в той или иной степени способствуют ее оптическому просветлению. Механизмы оптического просветления на молекулярном уровне до сих пор однозначно не определены, а изучению молекулярных процессов, ответственных за оптическое просветление кожи, посвящены единичные работы [1, 2].

Известно, что иммерсионное оптическое просветление биотканей является сложным и многостадийным процессом. При моделировании было показано, что не существует корреляции между экспериментально наблюдаемой степенью оптического просветления и такими параметрами, как осмолярность и показатель преломления иммерсионного агента. При этом была обнаружена корреляция с таким параметром межмолекулярного взаимодействия, как время нахождения иммерсионного агента в водородосвязанном состоянии с коллагеном.

В работе [4] представлены результаты исследований дегидратирующих свойств просветляющих агентов и отмечается, что дегидратация – это только один из возможных механизмов, приводящих к просветлению биотканей. Проведение исследований в этой области открывает путь к пониманию сути процессов оптического просветления на молекулярном уровне, что в свою очередь позволит применять новые эффективные просветляющие агенты с заданными свойствами.

В связи с этим в настоящей работе с целью установления корреляции между степенью (эффективностью) оптического просветления биологической ткани и параметром межмолекулярного взаимодействия (энергией образования комплексов) проведены исследования взаимодействия ряда просветляющих иммерсионных агентов с миметическими пептидом коллагена (GPH)₃ с использованием методов молекулярного докинга и квантовой химии (PM6 и DFT/B3LYP).

Целью выпускной квалификационной работы (ВКР) стало установление влияния 60 % водного раствора сахаров, спиртов и пропиленгликолей на оптические свойства кожи *in vivo* измерений. Для

осуществления данной задачи были проведены *in vivo* исследования влияния растворов сахаров, спиртов и пропиленгликолей на добровольцах, используя оценку изменения коэффициента ослабления света проходящего через кожу, путем анализа сканов полученных с помощью Оптической когерентной томографии.

Структура работы. ВКР включает в себя краткий обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и список литературы. Работа представлена на 57 страницах. Содержит 20 рисунков, 4 таблицы и 45 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы и материалы. В течение последних десятилетий просветляющие агенты были глубоко исследованы и в основном использовались для очистки тканей, способствуя более глубокому проникновению света в оптически мутные среды. Одна из основных целей всех исследований, проведенных до сих пор в этой области, состоит в том, чтобы перевести эту методологию на клинический уровень и сделать возможным оптическое просветление биологических тканей *in vivo*. При переходе от просветления тканей *ex vivo* к просветлению *in vivo* необходимо учитывать несколько моментов. В частности, проблемы безопасности и биосовместимости резко ограничивают круг очищающих агентов, которые можно использовать *in vivo* на людях. Фактически необходимость обратимого процесса очистки ткани ограничивает выбор водными растворами глицерина, сахаров, спиртов, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля или уксусной кислоты, исключая другие соединения из-за токсичности и/или химической агрессивности. Первым органом, на который нацелены методы оптического просветления, является кожа, поскольку это самый большой орган в человеческом теле, являющийся также самым оптически доступным. Цель состоит в том, чтобы обеспечить просветление кожи для оптического доступа к структуре и компонентам дермы, таким как кровеносные сосуды, железы и т.д.

Кожа состоит из двух отдельных слоев: верхнего эпидермиса, содержащего клетки и интерстициальную жидкость и подкожной тканью, состоящей из сети коллагеновых и желтых волокон, заполненных гиалуроновой кислотой и гликозаминогликанами [5]. При рассмотрении эпидермиса первым барьером, который необходимо преодолеть, является роговой слой-тонкий (10-20 микрон) слой мертвых ороговевших клеток, образующих водонепроницаемый барьер, препятствующий проникновению экзогенных агентов в кожу. Преодоление этого барьера

позволяет агенту проникать сквозь эпидермис через интерстициальное пространство между клетками и диффундировать дальше в дерму.

Оптическое просветление дермы в основном состоит из выравнивания показателя преломления коллагеновых волокон, которые представляют собой наиболее распространенный компонент кожи. Просветления можно добиться с помощью водных растворов сахаров, спиртов, моно и полисахаридов или пропиленгликоля в низкой концентрации.

Для исследования оптического просветления кожи в работе использовались водные растворы (60%) следующих иммерсионных агентов: ряда моносахаридов (рибоза, глюкоза и фруктоза), а также, для сравнения, трехатомный спирт – глицерол. Оптическая когерентная томография (ОКТ) использовалась для оценки влияния просветляющих свойств иммерсионных жидкостей на кожу в экспериментах *in vivo*. Визуализация проводилась с помощью оптического когерентного томографа Thorlabs OCP930SR (Thorlabs, США) со следующими параметрами: центральная длина волны излучения 930 ± 5 нм, аксиальное и латеральное разрешение 6.2 и 9.6 мкм соответственно (на воздухе), длина области сканирования 2 мм.

Измерения проводились на участке кожи с внутренней стороны предплечья. Запись сканов с исследуемой области проводилась до воздействия иммерсионных агентов, затем с интервалом в 1 минуту во время действия агентов на протяжении 40 минут. В измерениях участвовало 4 добровольца, было проведено по 5 экспериментов для каждого иммерсионного агента.

На основе модели однократного рассеяния по наклону ОКТ-сканов оценивался коэффициент ослабления. В соответствии с моделью однократного рассеяния мощность регистрируемого ОКТ-сигнала $R(z)$ пропорциональна $\exp(-\mu_c z)$. Поскольку в исследуемом спектральном диапазоне коэффициент поглощения кожи много меньше коэффициента рассеяния [3], то коэффициент ослабления можно считать приблизительно равным коэффициенту рассеяния, поэтому величина $R(z)$ может быть аппроксимирована зависимостью, учитывающей мощность пучка, падающего на поверхность биоткани, локальной способностью биоткани рассеивать свет назад, зависящей от локальной вариации показателя преломления; фонового сигнала. Подбор коэффициентов для аппроксимации экспериментальной кривой позволяет оценить усредненный по глубине (эффективный) коэффициент рассеяния света образцом ткани.

В качестве молекулярной структуры коллагена был использован пептид-миметик коллагена ((GPH)₉)₃, составляющего основу большей части регулярных элементов третичной структуры коллагена человека. Такие относительно небольшие искусственные пептиды нередко

используются для молекулярного моделирования коллагенов. Молекулярное моделирование взаимодействия просветляющих агентов с коллагеном проводилось в три этапа.

На первом этапе моделирования трехмерная модель пептида создавалась по данным из Protein Data Bank (PDB) с последующим присоединением атомов водорода и оптимизации структуры методом молекулярной механики. Затем методом теории функционала плотности DFT/B3LYP/6-311+G(d,p) с использованием программы Gaussian определялись и рассчитывались самые низкоэнергетические стереоизомерные структуры рассматриваемых иммерсионных агентов в обособленном состоянии. Вычисленные геометрические параметры и значения зарядов на атомах по Малликену в дальнейшем использовались при моделировании этих систем в рамках классической молекулярной динамики. Также рассчитывались волновые числа колебательных переходов, которые должны оказаться положительными, что свидетельствует о нахождении молекулярных систем в локальных минимумах.

На второй стадии моделирования, методами классической молекулярной динамики, изучалась вероятность образования водородной связи между пептидом коллагена ((GPH)₉)₃ и выбранными молекулярными агентами. Также анализировалось время их пребывания в водородосвязанном состоянии с коллагеном и воздействие которое они оказывают на его структуру. Молекулярное моделирование взаимодействия этих агентов с коллагеном проводилось с помощью пакета классической молекулярной динамики GROMACS с силовым полем AMBER-03. Модельная сцена представляет собой трехмерную ячейку в форме прямоугольного параллелепипеда со следующими длинами сторон: 3 нм × 3 нм × 9 нм. Границы ячейки выбирались периодическими (в случае столкновения с границей молекула проходит через нее, появляясь со стороны противоположной границы). Перед началом каждого моделирования 20 молекул агента размещаются случайным образом в пределах ячейки. Начальные скорости атомов задавались с помощью случайного генератора чисел пакета GROMACS и имели Максвелловское распределение, соответствующее выбранной температуре. Для моделирования системы использовались термостат и баростат Берендсена, обеспечивающие сходимость температуры и давления системы к установленным значениям 300 К и 1 бар. Временной шаг моделирования был выбран равным 0.0001 пс, а полное время моделирования составило 100 пс. Состояние системы конспектировалось каждую 0.1 пс. Законспектированные траектории движения молекул обрабатывались средствами пакета GROMACS и с помощью программы VMD (Visual Molecular Dynamics). Для каждой изучаемой системы моделирование повторялось 30 раз, полученные результаты усреднялись. Также

рассчитывалась стандартная ошибка полученных арифметических средних.

Далее для моделирования состояния близкого к нативному, модельная сцена заполнялась водным раствором выбранных просветляющих агентов. Их концентрация в водном растворе изменялась от 0 % (чистый растворитель вода — модель SPC/E) до 60-70 % в зависимости от вида агента. Все стартовые параметры для молекулярного моделирования аналогичны предыдущему этапу за исключением времени моделирования – оно составляло 50 пс. На данном этапе оценивалось влияние введенных в водное окружение коллагена просветляющих агентов на геометрические параметры α -цепей пептида.

На третьей фазе молекулярного моделирования для определения энергии межмолекулярного взаимодействия выбранных просветляющих агентов с коллагеном был использован минимальный фрагмент миметического пептида, сохраняющий регулярную структуру – ((GPH)₂)₃ состоящий из 231 атома, структура которого предварительно оптимизировалась в рамках полуэмпирического метода PM6. Эта оптимизированная структура модели коллагена применялась для проведения молекулярного докинга с просветляющими агентами в рамках программы AutoDockVina. После проведения молекулярного докинга для каждой взаимодействующей системы выбирались первые десять наиболее выгодных положений, которые далее оптимизировались полуэмпирическим методом PM6. Затем путем проведения однократной SCF процедуры методом DFT/B3LYP/6-31G(d) вычислялись полная электронная энергия комплексов. Подобная процедура была использована для получения значений полной электронной энергии просветляющих агентов и пептидного фрагмента. Энергия межмолекулярного взаимодействия рассчитывалась, как разница полных энергий комплекса и суммы энергий отдельных его составляющих. При построении корреляции с потенциалом оптического просветления были выбраны наибольшие значения энергий межмолекулярного взаимодействия, соответствующие наиболее вероятным структурам комплексов.

Результаты. Спирты. На рис.1 показаны зависимости величины потенциала оптического просветления кожи крысы и человека, а также рассчитанной методом PM6/B3LYP/6-31G энергии взаимодействия, от типа просветляющего агента. Видно, что все зависимости хорошо коррелируют между собой. Вычисленные значения коэффициентов корреляции составили 0.89 и 0.97 для кожи человека и крысы, соответственно. Такие высокие значения коэффициентов корреляции позволяют говорить о принципиальной важности последиффузионного этапа, в котором происходит взаимодействие коллагена с просветляющими агентами и его влияние на оптическое просветление биотканей. Результаты исследования позволяют говорить о том, что в

процессе такого взаимодействия происходит частичное замещение связанной с коллагеном воды. Это приводит к нарушению связующей сетки водородных связей и как следствие к обратимому процессу растворения коллагеновых фибрилл, что в свою очередь уменьшает их показатель преломления и выравнивает его с межколлагеновой средой. Чем выше сродство просветляющего агента к коллагену, тем эффективнее идет этот процесс. Мы вычислили для кожи человека и крысы значения коэффициента численного соответствия между энергией межмолекулярного взаимодействия просветляющего агента с коллагеном и потенциалом оптического просветления, которые оказались равными 0.0069 и 0.0041 соответственно. Чтобы проверить предсказательные возможности установленной корреляции мы рассчитали энергию межмолекулярного взаимодействия молекулы декстрозы с выбранной моделью коллагена, которая оказалась равной – 94.5 кДж/моль. Предсказанное значение потенциала оптического просветления декстрозы для кожи крысы составило 0.388, что хорошо согласуется экспериментальными данными 0.387 [6].

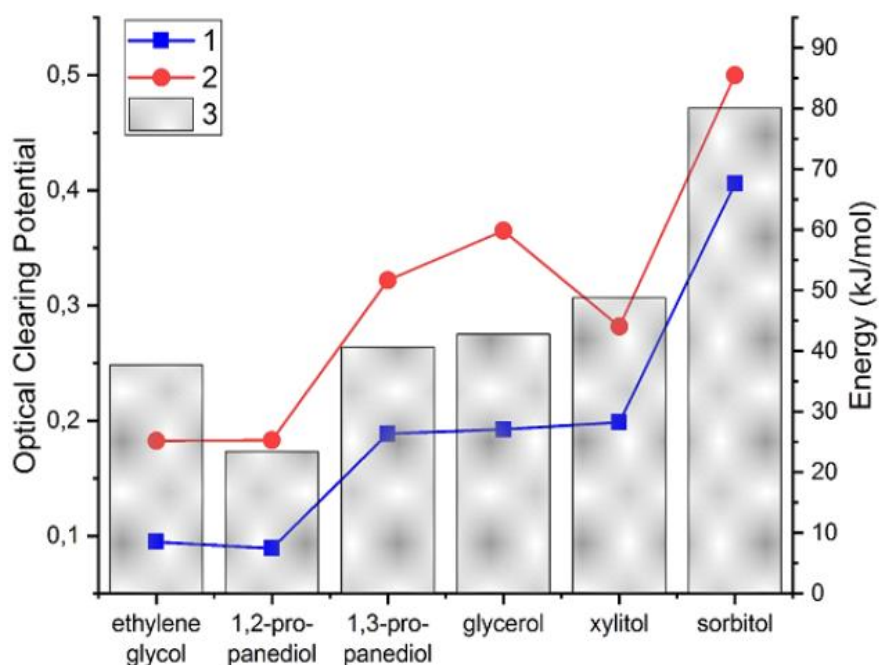


Рис.1. Зависимость величины потенциала оптического просветления кожи крысы (1) и человека (2) [4], а также энергии взаимодействия молекулы пептида коллагена с молекулой просветляющего агента (3), от типа агента

Результаты. Сахара. На рис. 2 представлены анализируемые области ОКТ-изображения, усредненный А-скан ОКТ-сигнала дермального слоя кожи человека *in vivo* (через 5 min после нанесения на

поверхность 60%-раствора рибозы) и аппроксимирующая кривая, построенная с использованием модели однократного рассеяния. ОКТ-сигналы усреднялись по А-скану на всей области сканирования. Значения коэффициента рассеяния определялись на участке усредненного А-скана на глубине от 350 до 700 μm .

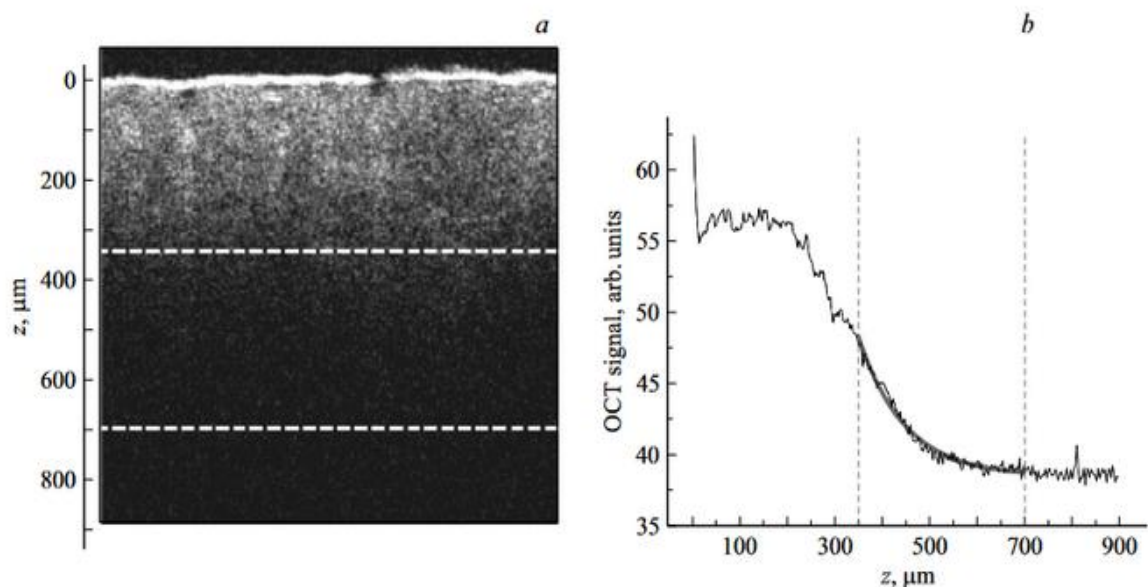


Рис. 2. Измерения коэффициента рассеяния μ_s на участке дермы с глубиной от 350 до 700 μm на основе анализа распределения усредненного ОКТ-сигнала по глубине с помощью модели однократного рассеяния: а —фрагмент В-скана кожи *in vivo*, по которому проводилось усреднение ОКТ-сигнала; б — распределение усредненного ОКТ-сигнала по глубине (тонкая кривая) и результат аппроксимации согласно модели однократного рассеяния (толстая кривая). Штриховыми прямыми обозначены границы участка оценивания

В рамках данной работы в качестве численного выражения эффективности оптического просветления кожи были применены значения модуля средней скорости изменения коэффициента рассеяния при воздействии водного раствора иммерсионного агента средней концентрации (60 %).

Из рис.3 видно, что оба этих параметра хорошо коррелируют между собой. Поэтому в дальнейших исследованиях значение скорости просветления можно использовать как способ анализа эффективности оптического просветления иммерсионными агентами.

Из рис.3 также видно, что просчитанные методом РМ6/В3LYP/6-31G энергии взаимодействия молекулы пептида коллагена с молекулами различных просветляющих агентов хорошо коррелирует как с потенциалом оптического просветления кожи крысы и человека, так и с экспериментально полученными в рамках данной работы величинами

скорости изменения коэффициента рассеяния кожи человека. Значения коэффициентов линейной корреляции составляют соответственно 0.94 и 0.88. Это говорит о важности последиффузионного этапа, в котором происходит взаимодействие коллагена с просветляющими агентами и его воздействие на оптическое просветление биотканей.

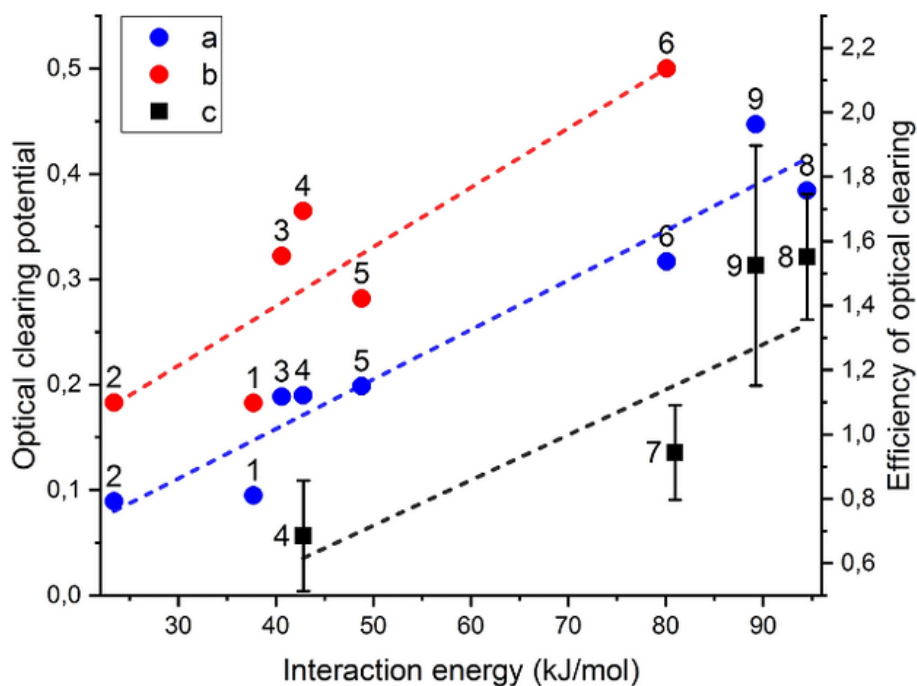


Рис. 3. Зависимость величины потенциала оптического просветления (ось слева) кожи крысы (a) и человека (b), а также величины эффективности оптического просветления кожи человека (ось справа) и их средние квадратичные отклонения (c) от энергии взаимодействия молекулы пептида коллагена с молекулами просветляющих агентов. Цифрами на графиках обозначены иммерсионные агенты: 1 - этиленгликоль; 2 – 1,2-пропандиол; 3 – 1,3-пропандиол; 4 – глицерол; 5 – ксилитол; 6 – сорбитол; 7 – рибоза; 8 – глюкоза и 9 – фруктоза. Пунктирными линиями обозначены линейные аппроксимации этих зависимостей

Результаты. Полиэтиленгликоли. На рис.4 показаны зависимость эффективности оптического просветления кожи белых лабораторных крыс *ex vivo* хорошо коррелирует с рассчитанной методом PM6/V3LYP/6-31G энергии взаимодействия, для взятых просветляющих агентов. Вычисленный коэффициент корреляции составил 0.96. Такие высокие значение коэффициентов корреляции говорят о существенной значимости последиффузионного этапа, в котором происходит контакт коллагена с просветляющими агентами и его воздействие на оптическое просветление биотканей.

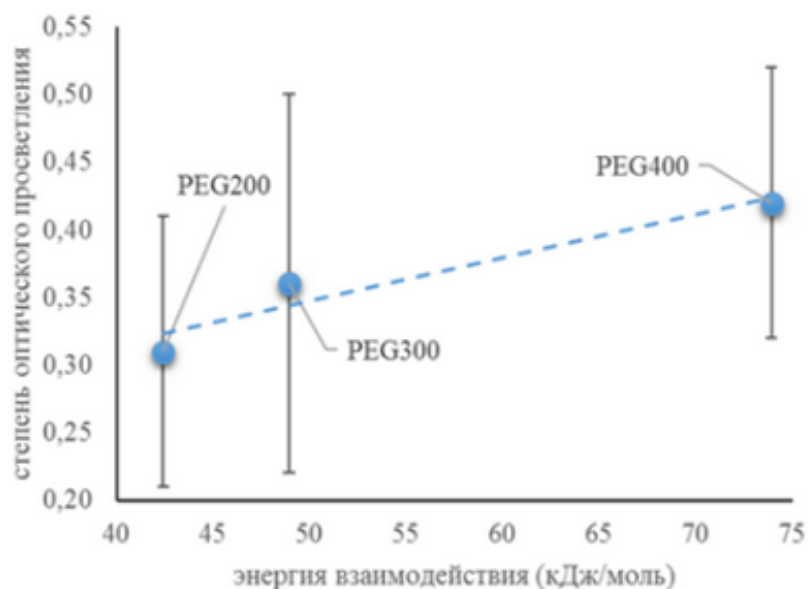


Рис. 4. Зависимость величины степени (эффективности) оптического просветления кожи крысы от энергии взаимодействия молекулы пептида коллагена с молекулами просветляющих агентов

ВЫВОДЫ

В результате работы была изучена методика оптического просветления и рассмотрены различные статьи по настоящей теме. В данной работе была показана эффективность применения ряда просветляющих иммерсионных просветляющих агентов: трёх двухатомных спирта (этиленгликоль, 1, 2 и 1,3 пропандиол) и 3 многоатомных спирта (глицерол, ксилитол и сорбитол), водного раствора (60%) моносахаридов (рибозы, глюкозы, фруктозы), трёх молекул полиэтиленгликоля с молекулярной массой 200, 300 и 400 даль. Были установлены корреляции между степенью оптического просветления и энергией межмолекулярного взаимодействия просветляющих агентов с фрагментом пептида коллагена.

Предстоящим основополагающим шагом для усиления эффективности взаимодействия может быть выбор молекулярного агента с такими структурными характеристиками, которые обеспечивали бы ему взаимодействие сразу с двумя или более молекулярными карманами коллагена. Таким действенным просветляющим агентом может быть молекулярная система полимерного типа, состоящая, скажем, из шестичленных моносахаридов, соединенных подвижной углеродно-

кислородной цепочкой такой длины, чтобы насыщенные кольца сахара попадали в зоны молекулярных карманов коллагена и взаимодействовали с ними при помощи своих гидроксильных групп. Стоит отметить, что существенное увеличение размера молекул, используемых как просветляющие агенты, приведет к росту вязкости вещества и, стало быть, к уменьшению коэффициента диффузии его в биоткани, а также к увеличению времени его вымывания из биотканей.

Список использованной литературы

1. Hirshburg J.M. Chemical agent induced reduction of skin light scattering: doctoral dissertation / Texas A&M University, 2009.
2. Hirshburg J.M., Ravikumar K.M., Hwang W., Yeh A.T. // Journal of Biomedical Optics. 2010. V. 15. № 5. Paper 055002.
- 3 Tuchin V. V. Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues. Taylor & Francis Group LLC, CRC Press, 2009.
- 4 Genina E.A., Bashkatov A.N., Sinichkin Yu.P. et al. // J. Biomed. Photonics & Eng., 2015, Vol. 1, no. 1. P. 22-58.
5. Berezin K.V., Dvoretzki K.N., Chernavina M.L., Likhter A.M., Smirnov V.V., Shagautdinova I.T., Antonova E.M., Stepanovich E.Yu., Dzhalambetova E.A., Tuchin V.V. // J. Mol. Modeling. 2018. V. 24, no 2. P. 45.
6. Hirshburg J., Choi B., Nelson J.S., Yeh A.T. // Lasers in Surgery and Medicine. 2007. V. 39/ no2. P. 140-144.