

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

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

Кафедра Оптики и биофотоники
наименование кафедры

Молекулярное моделирование постдиффузионной стадии оптического
наименование темы выпускной квалификационной работы полужирным шрифтом
просветления кожи с помощью молекулы мочевины

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 4082 группы

направления 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»

код и наименование направления

Институт физики

наименование факультета

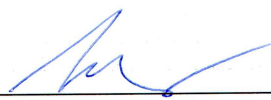
Давыдова Даниила Юрьевича

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

Профессор, д.ф.—м.н.

должность, ученая степень, уч. звание.


личная подпись, дата

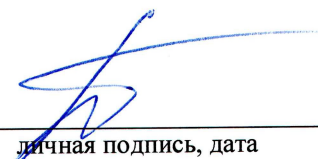
К. В. Березин
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой оптики и биофотоники

полное наименование кафедры

Профессор, д.ф.—м.н.

должность, ученая степень, уч. звание.


личная подпись, дата

В. В. Тучин
инициалы,
фамилия

Саратов 2025 г.

Введение. В последние годы методы оптического просветления (ОП) биологических тканей привлекают всё большее внимание в области фотомедицины и биомедицинской оптики благодаря их способности существенно увеличивать глубину и качество визуализации структуры кожи. В частности, использование иммерсионных агентов (ОПА), имеющих способность временно изменять внутренние оптические свойства тканей, выравнивая показатель преломления неровностей внутренних структур. Это позволяет уменьшить рассеяние света в дермальном слое и получить более чёткие изображения при оптической когерентной томографии (ОКТ) [1-2].

Актуальность данной работы определяется необходимостью детального исследования молекулярных механизмов, лежащих в основе ОП кожи, при помощи методов молекулярного моделирования. Основное внимание уделяется анализу взаимодействия иммерсионного агента (мочевина) с белком коллагеном, и выяснению того, как это способствует уменьшению рассеивания света.

Целью текущей выпускной квалификационной работы является исследование молекулярных механизмов ОП кожи под воздействием мочевины с помощью современных методов молекулярного моделирования.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи:**

1. Провести анализ литературных данных, связанных с методами ОП тканей, механизма действия мочевины и применении молекулярного моделирования для исследования биотканей.
2. Выполнить экспериментальные исследования *in vivo* с использованием ОКТ и оценить динамику изменения коэффициента рассеяния кожи под воздействием иммерсионного агента водного раствора (50%) мочевины;
3. Применить методы молекулярного докинга и квантовой механики для расчета энергий межмолекулярного взаимодействия;

4. Провести сравнительный анализ экспериментальных *in vivo* и теоретических данных по скорости изменения коэффициента рассеяния кожи человека.
5. Сформулировать рекомендации по предсказыванию эффективности ОП кожи человека различными ОПА и оптимизации применения иммерсионных агентов в оптической диагностике.

В качестве материала для исследования использовался 50 % водный раствор мочевины.

Дипломная работа состоит из заключения, списка литературы и 3 глав:

Глава 1. Экспериментальное исследование влияния мочевины на оптические свойства

1.1 Приготовление материалов

1.2 Методика ОКТ

1.3 Анализ и сравнение результатов

1.4 Интерпретация экспериментальных КР спектров

Глава 2. Молекулярное моделирование

2.1 Построение и оптимизация молекулярной модели коллагена

2.2 Моделирование и анализ структуры иммерсионного агента

2.3 Молекулярный докинг

2.4 Методика квантово-химических расчетов

Глава 3. Оценка эффективности оптического просветления и анализ полученных результатов

3.1 Анализ результатов

3.2 Расчет энергий межмолекулярных взаимодействий и термодинамических параметров

Основное содержание. Был приготовлен раствор посредством микроаналитических весов DA-225DC и вихревой мешалки. Так же был замерен показатель преломления раствора с помощью рефрактометра Аббе Atago DR-M2 1550 на длинах волн 589 нм и 930 нм при температуре 25.0 °С.

После замера параметров раствора был проведен эксперимент, где ОПА наносился на участок кожи тыльной стороны предплечья, предварительно очищенный от мертвых частей рогового слоя с помощью медицинского скотча.

Изменения показателя рассеяния регистрировались спектральным ОКТ GAN930V2-BU: двумерные В-сканы записывались каждые 5 минут в течение 60 минут, после чего по усреднённым А-сканам рассчитывался коэффициент рассеяния μ_s методом обратного рассеяния в глубинном диапазоне 350–700 мкм, и, строилась аппроксимирующая кривая на основе модели однократного рассеяния [3].

На рис. 1 представлены ОКТ-изображения (В-скан) кожи сразу после нанесения на него водного раствора мочевины, усредненный А-скан ОКТ-сигнала дермального слоя кожи человека, а также аппроксимирующая кривая.

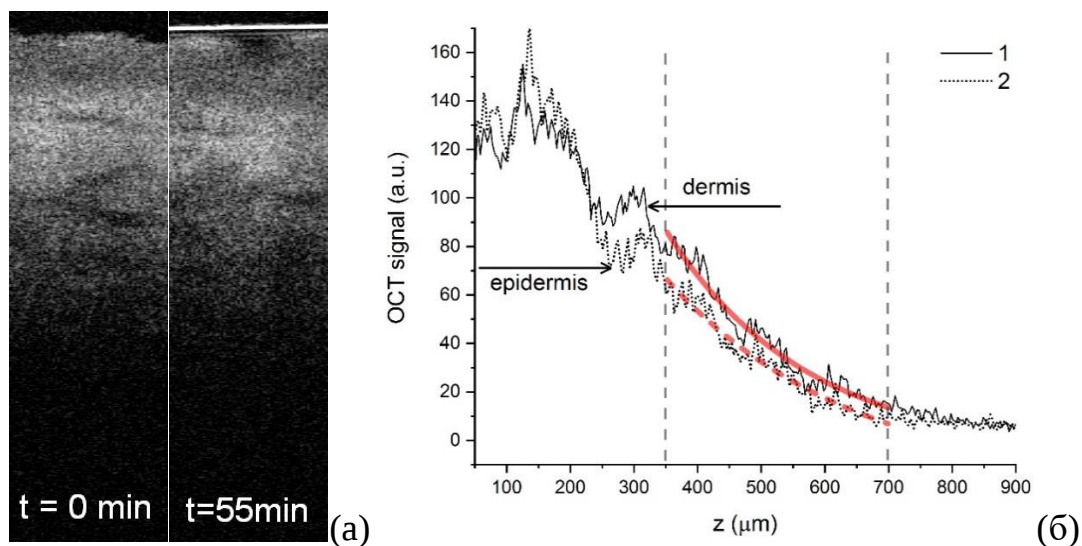


Рисунок 1 – Измерения коэффициента рассеяния μ_s на участке дермы после нанесения на поверхность раствора мочевины на основе анализа распределения ОКТ-сигнала, усреднённого по глубине с помощью модели однократного рассеяния. (а) – изображения В-скана кожи *in vivo*, по фрагменту которого проводилось усреднение ОКТ-сигнала сразу

после нанесения и после 55 минут воздействия. (б) – распределение усреднённых ОКТ-сигналов по глубине (тонкая кривая) и результат аппроксимации согласно модели однократного рассеяния (толстые кривые): 1 – сразу после нанесения 50% водного раствора мочевины, 2 – через 55 минут действия мочевины. Штриховыми прямыми обозначены границы участков (от 350 до 700 мкм), на которых оценивалось значение μ_s . Стрелками обозначены слои кожного покрова: эпидермис и дерма.

Визуально из рисунка 4 (а) видно, что с течением времени изображение верхних слоев кожи становится более темным, а более глубоких немного более светлым, что говорит о том, что под действием раствора мочевины рассеяние света верхними слоями кожи уменьшается и свет проходит в нижние слои, где более интенсивно отражается от неоднородностей, что несет информацию о глуболежащих объектах внутри ткани. Количественно это хорошо отражается на рис. 4 (б).

Численные значения коэффициента рассеяния, полученные с помощью усредненного А-скана, использовались и для оценки эффективности ОП кожи *in vivo*. Зависимость коэффициента рассеяния под действием раствора мочевины от времени наблюдения представлена на рис. 2.

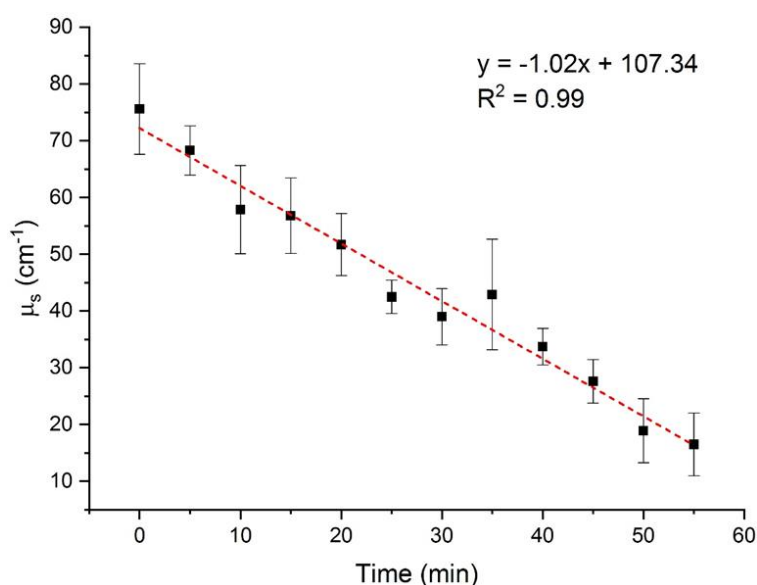


Рисунок 2 – Временные зависимости коэффициента рассеяния μ_s в дермальном участке (350–700 мкм) кожи человека при воздействии на него *in vivo* 50% раствора мочевины. Линейная аппроксимация отмечена пунктирной линией и выражена в виде уравнения.

Из рис. 2 видно, что для используемого в работе ОПА, значение коэффициента рассеяния μ_s на большом интервале времени воздействия хорошо описывается моделью линейной регрессии (коэффициент корреляции R^2 составляет 99%).

Для численной оценки эффективности ОП кожи человека использовалось значение модуля средней скорости снижения коэффициента рассеяния. Это значение представляет собой величину наклона, определенное из уравнений линии регрессии, и для мочевины оно равно $0.96 \pm 0.05 \text{ см}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Для сравнения аналогичные параметры для других иммерсионных агентов приведены на рис. 3.

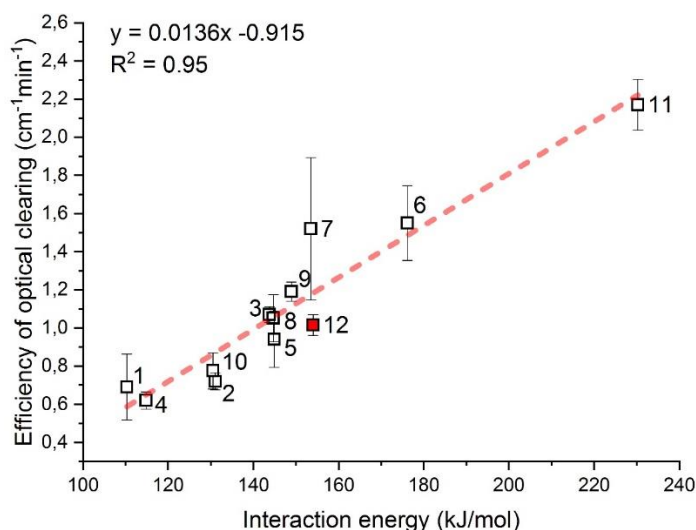


Рисунок 3 – Зависимость величины эффективности оптического просветления кожи человека *in vivo* от энергии межмолекулярного взаимодействия между просветляющими агентами и фрагментом пептида коллагена((GPH)3)2. Цифрами обозначены различные виды просветляющих агентов: 1 – глицерин, 2 – ксилитол, 3 – сорбитол, 4 – ксилоза, 5 – рибоза, 6 – глюкоза, 7 – фруктоза, 8 – сахароза, 9 – глюкозамин, 10 – йогексол, 11 – ДМСО, 12 – мочевина. Линейная аппроксимация отмечена пунктирной линией и выражена в виде уравнения.

В диапазоне 200-2000 см^{-1} были так же зарегистрированы экспериментальные КР спектры (рис. 4) молекулы мочевины в кристаллической фазе и в виде 50% водного раствора. Регистрация проводилась с помощью КР спектрометра QEPRO-RAMAN.

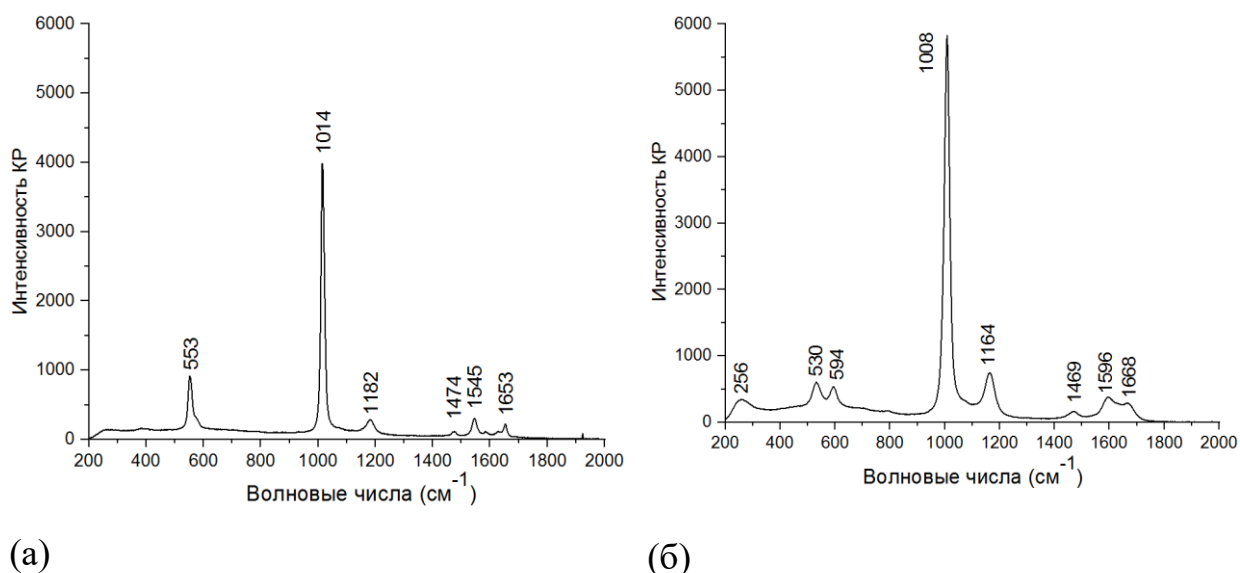


Рисунок 4 – Экспериментальные КР спектры мочевины в кристаллической фазе (а) и в 50% водном растворе (б).

Молекулярное моделирование. Для моделирования была выбрана и построена структура пептида-миметика коллагена $((\text{GPH})_3)_9$ [4] и ее сокращенный вариант $((\text{GPH})_3)_2$ (рис.5 (в)), зачастую являющиеся важной частью человеческого коллагена. Так же в модели были добавлены атомы водорода с последующей оптимизацией их геометрических структур методом молекулярной механики [5]. Структура, представленная на рис.5 (в), имеет структурно молекулярный карман размером порядка 10 на 15 ангстрем, который содержит в себе четыре функциональные группы: две гидроксильные (O1H1 , O2H2) и две карбонильные (C3O3 , C4O4), которые образуют водородные связи с молекулами ОПА.

Дальше с помощью метода DFT/B3LYP/6-311+G (d,p) [6] в программе Gaussian [7] была смоделирована молекула мочевины, после чего с помощью

конформационного анализа структуры модели мочевины было определено, что она может иметь два вида конфигурации: первая конфигурация с симметрией C_s (рис.3(а)) и вторая с симметрией C_2 (рис.3(б)). Анализ показал, что наименьшую энергию имеет симметрия C_s .

Вычисленные структурные параметры молекулярной модели мочевины использовались дальше при молекулярном докинге в программе AutoDockVina [8], где были построены модели водородосодержащих комплексов упомянутых ранее, и выбраны пять наиболее энергетически стабильных конфигураций межмолекулярных комплексов.

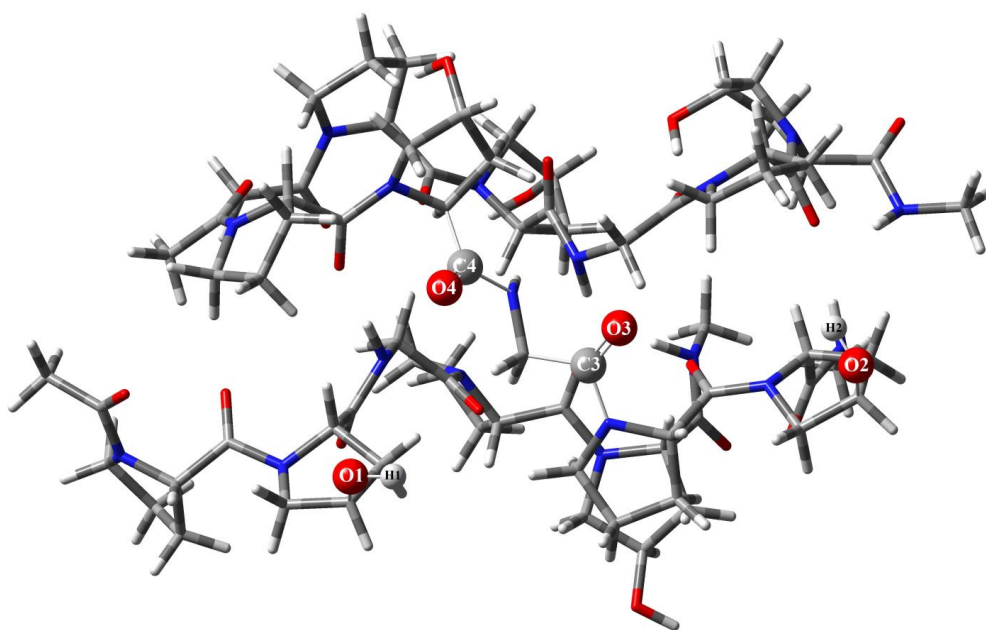
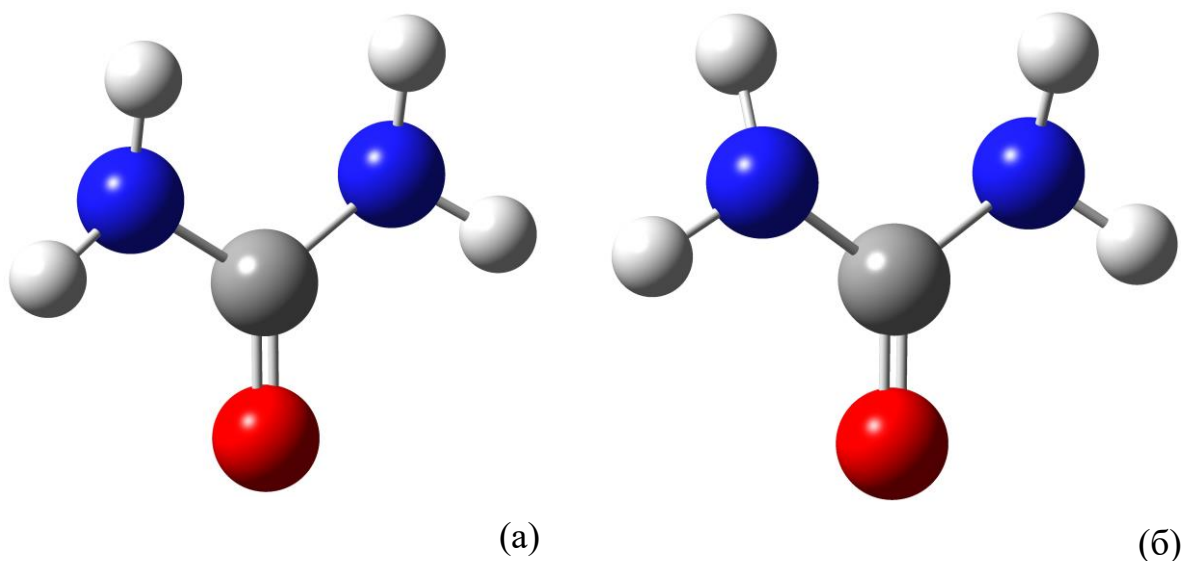


Рисунок 5 – Структура сокращенного варианта пептида-миметика коллагена ((GPH)₃)₂ оптимизированная методом HF/STO-3G (а) и две возможные пространственные структуры молекулы мочевины: б) тип симметрии C_s, в) тип симметрии C₂, рассчитанные методом B3LYP/6-311G+(d,p). Буквами отмечены атомы функциональных групп, с которыми образуются водородные связи.

В процессе молекулярного моделирования, проводимого с помощью молекулярного докинга, было замечено, что молекула мочевины мала, и заняла только одну часть молекулярного кармана. Поэтому было решено рассматривать взаимодействие с двумя молекулами мочевины, а не с одной.

Была проведена структурная оптимизация всех полученных посредством молекулярного докинга комплексов методом HF/STO3G с последующим уточнением их электронной энергии с помощью однократной SCF (Self-Consistent Field) процедуры методом B3LYP/6-311G(d). Далее вычислялась энергия межмолекулярного взаимодействия комплексов по формуле:

$$\Delta E = E_{\text{комп.}} - E_{\text{GPH}} - E_{\text{моч}}, \quad (1)$$

На рис. 6 представлен межмолекулярный комплекс ((GPH)₃)₂-мочевина с максимальной энергией взаимодействия

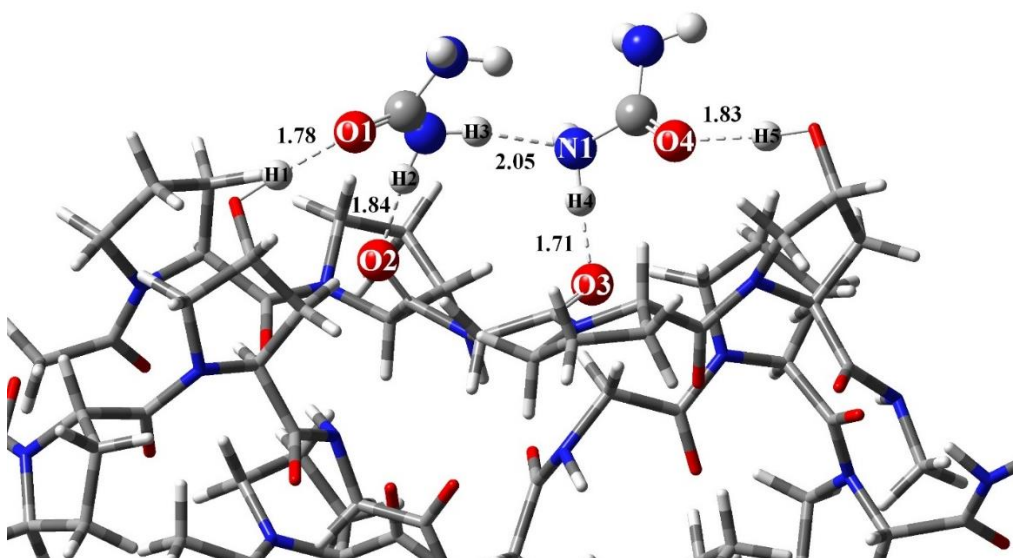


Рисунок 6 – Фрагмент молекулярной модели комплекса пептида коллагена ((GPH)₃)₂ с молекулой мочевины, оптимизированный методом HF/STO-3G. Пунктирными линиями на

рисунке показаны межмолекулярные водородные связи. Цифрами на рисунке показаны длины водородных связей в ангстремах.

Были проведены дополнительные исследования межмолекулярного взаимодействия с применением функционала wB97XD [9]. При этом использовался расширенный базисный набор 6-311+G(d,p), чтобы исключить ошибку связанную с ограниченным базисом STO-3G.

Из-за того, что обе молекулы мочевины присоединяются к определенной части цепи пептида, была вырезана эта часть и рассмотрен комплекс GRH-мочевина, структура которого показана на рис. 7 (а). Помимо этого, был рассмотрен комплекс GRH...H₂O для сравнения мочевины с водой.

Для оценки термодинамических параметров были еще рассчитаны два вида моногидратов мочевины, которые отличаются структурой водородных связей, димер молекулы воды и первая гидратная оболочка мочевины (рис. 7(б)).

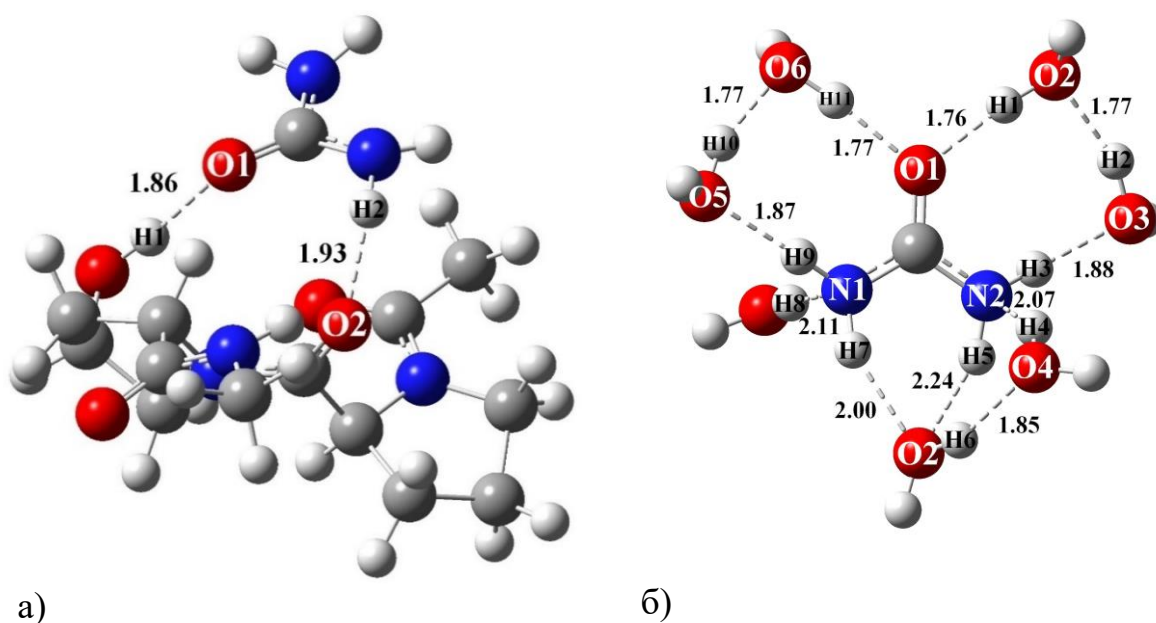


Рисунок 7 – Молекулярные модели комплексов: а) мочевина с цепочкой из трех аминокислотных остатков пролина, гидроксипролина и глицина (GRH), б) 7H₂O...мочевина, рассчитанные методом wB97XD/6-311G+(d,p). Пунктирными линиями показаны водородные связи. Цифрами на рисунки показаны длины водородных связей в ангстремах.

Оценка эффективности оптического просветления и анализ полученных результатов.

Энергии межмолекулярного взаимодействия рассчитывалась с учетом базисной суперпозиционной ошибки (BSSE) [10].

Были рассчитаны термодинамические параметры всех комплексов для температур $T=0\text{K}$ и $T=310.15$ и занесены в таблицу 1.

Таблица 1 – Термодинамические параметры межмолекулярных комплексов в единицах кДж/моль и константы равновесия, вычисленные с учетом BSSE методом wB97XD/6-311+G(d,p).

Молекулярный комплекс	$BSSE$	ΔZPE	ΔE	ΔH_0^0	$\Delta H_{310.15}^0$	$T\Delta S$	$K_{310.15}$
ГРН...H ₂ O	7.3	12.0	-79.0	-59.6	-63.2	-45.0	1.2E+03
ГРН...мочевина	6.0	6.8	-73.5	-60.7	-60.6	-54.8	9.4E+00
Димер H ₂ O	3.4	10.0	-26.4	-13.0	-15.4	-28.0	7.6E-03
Мочевина... H ₂ O*	2.7	9.7	-45.6	-33.2	-35.6	-37.3	5.2E-01
Мочевина... H ₂ O**	3.5	6.6	-31.8	-21.6	-21.6	-32.0	1.8E-02
Мочевина... 7(H ₂ O)	14.8	72.9	-316.4	-228.8 -32.7***	-	-	-

*- структура моногидрата мочевины (рис.7 (в));

** - структура моногидрата мочевины (рис.7 (г));

***- значение в расчете на одну молекулу воды.

Из таблицы видно, что в термодинамическом отношении коллаген гораздо сильнее взаимодействует с водой, чем с мочевиной, и это видно по значениям энтальпии и константам равновесия. При этом мочевина образует более стабильные комплексы с молекулами воды, чем вода сама с собой. Это указывает на высокую способность мочевины разрушать сетку водородных связей воды (деструкция водной структуры). Несмотря на то, что мочевина хуже связывается с коллагеном, она эффективно конкурирует за воду,

разрушая её структуру и ослабляя гидратационную оболочку коллагена. Это ведёт к косвенному разрушению структуры коллагена, поскольку вода важный стабилизатор его структуры

В заключении, из полученных экспериментальных данных была определена эффективность оптического просветления 50% водного раствора мочевины, а также выяснено, что мочевина проявляет обратимое денатурирующее действие не за счёт более прочного связывания с коллагеном, а за счёт разрушения водной структуры и дестабилизации системы коллаген–вода. Это термодинамически подтверждается как по энтальпиям взаимодействия, так и по константам устойчивости. Таким образом, влияние на структуру коллагена в результате приводит к изменению его показателя преломления и выравнивая его с показателем преломления межклеточной жидкости, смешанной с ОПА, что сказывается на процессе ОП кожи человека.

Список литературы

1. Tuchin, V. V. Tissue optics: Light scattering methods and instruments for medical diagnostics/V.V. Tuchin. – 3rd ed. – Bellingham, WA: SPIE Press, 2015. – 988 p. – (PM; 254).
2. Tuchin, V. V. Handbook of tissue optical clearing: New prospects in optical imaging / V. V. Tuchin; ed. by V. V. Tuchin, D. Zhu, E. A. Genina. – Boca Raton, FL: CRC Press, 2022. – 688 p.
3. Faber D. J. Quantitative measurement of attenuation coefficients of weakly scattering media using optical coherence tomography //Optics express. – 2004. – T. 12. – №. 19. – C. 4353-4365. DOI: 10.1364/OPEX.12.004353
4. Okuyama K. Crystal structure of (Gly-Pro-Hyp) 9: Implications for the collagen molecular model //Biopolymers. – 2012. – T. 97. – №. 8. – C. 607-616. DOI: 10.1002/bip.22048
5. Cornell W. D. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules //Journal of the American Chemical Society. – 1995. – T. 117. – №. 19. – C. 5179-5197. DOI: 10.1021/ja00124a002
6. Becke A. D. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange / A. D. Becke //The Journal of chemical physics. – 1993. – T. 98. – №. 7. – C. 5648-5652. - DOI: 10.1063/1.464913
7. Frisch, M. gaussian 09, Gaussian / M. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, H. B. Scuseria, G. E. Robb. - Wallingford CT. Gaussian Inc. – 2009. – T. 121. – C. 150-166.
8. Duan Y. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations //Journal of computational chemistry. – 2003. – T. 24. – №. 16. – C. 1999-2012. DOI: 10.1002/jcc.10349
9. Chai J. D. Systematic optimization of long-range corrected hybrid density functionals //The Journal of chemical physics. – 2008. – T. 128. – №. 8. DOI: 10.1063/1.2834918

10. Simon i Rabasseda S. How does basis set superposition error change the potential surfaces for hydrogen-bonded dimers? //Journal of Chemical Physics, 1996, vol. 105, núm. 24, p. 11024-11031. – 1996.
DOI:10.1063/1.472902

