ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ORGANIC SUBSTANCES

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)
https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-6-517-533
УДК 548.03+53.092+539.26+535.375.54

CC BY

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Влияние добавления в маточный раствор технологически отработанных антител к интерферону-гамма на структурные особенности выращиваемых из этого раствора кристаллов триглицинсульфата

Г.О. Степанов[1], Н.Н. Родионова[1,✉], Р.Р. Константинов[1], К.А. Субботин[2,3]

[1]НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Москва, 129172 Россия
[2]Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН, Москва, 119991 Россия
[3]Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, 125047 Россия
✉Автор для переписки, e-mail: rodionovann@materiamedica.ru

Аннотация

Цели. *Сегнетоэлектрик триглицинсульфат (ТГС) относится к группе кристаллов, свойства которых чувствительны даже к незначительным изменениям условий получения. Механизм возникновения спонтанной поляризации в ТГС связан с упорядочением протонов, участвующих в образовании водородных связей, поэтому при формировании кристалла важна роль состояния маточного водного раствора. Цель работы — изучить структурные особенности кристаллов ТГС, выращенных с применением водно-спиртового раствора технологически обработанных антител*

© Степанов Г.О., Родионова Н.Н., Константинов Р.Р., Субботин К.А., 2023

к интерферону-гамма, по сравнению с таковыми у кристаллов, выращенных с применением контрольных растворов (технологически-обработанного раствора фосфатно-солевого буфера и интактного водно-спиртового раствора).

Методы. *Рентгеноструктурный анализ и спектроскопия комбинационного рассеяния света.*

Результаты. *Показано влияние растворов технологически обработанных антител к интерферону-гамма, применявшихся при изготовлении маточных растворов, использованных при выращивании кристаллов ТГС, на структурные особенности этих кристаллов. Данное влияние выражается в изменении заселенностей протонной подрешетки кристаллов, выращенных из раствора, содержащего технологически обработанные антитела к интерферону-гамма, по сравнению с кристаллами, выращенными из контрольных растворов, и проявляется в увеличении длины связей N2–C3.*

Выводы. *Добавление технологически обработанных антител к маточному раствору, используемому для выращивания кристаллов, способно оказывать влияние на структуру кристаллов ТГС.*

Ключевые слова: *технологически обработанные антитела, триглицинсульфат, кристалл, рентгеноструктурный анализ, спектроскопия комбинационного рассеяния света*

Для цитирования: Степанов Г.О., Родионова Н.Н., Константинов Р.Р., Субботин К.А. Влияние добавления в маточный раствор технологически отработанных антител к интерферону-гамма на структурные особенности выращиваемых из этого раствора кристаллов триглицинсульфата. *Тонкие химические технологии*. 2023;18(6):517–533. https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-6-517-533

RESEARCH ARTICLE

Effect of adding technologically processed antibodies to interferon-gamma into a parent solution on the structural features of triglycine sulfate crystals grown from this solution

German O. Stepanov[1], Natalia N. Rodionova[1,✉], Roman R. Konstantinov[1], Kirill A. Subbotin[2,3]

[1]*Materia Medica Holding, Moscow, 129172 Russia*
[2]*Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*
[3]*Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125047 Russia*
[✉]*Corresponding author, e-mail: rodionovann@materiamedica.ru*

Abstract

Objectives. *Ferroelectric triglycine sulfate (TGS) belongs to a group of crystals whose properties are sensitive even to minor changes in growth conditions. The mechanism of spontaneous polarization in TGS is associated with the adjustment of protons which participate in the formation of hydrogen bonds. Therefore, the state of the parent solution plays an important role in the crystal formation. The study aims to investigate the structural features of TGS crystals grown using aqueous alcoholic solutions of technologically processed antibodies to interferon-gamma, in comparison with those of the crystals grown using the control solutions (technologically processed phosphate-buffered saline and intact aqueous alcoholic solution).*

Methods. *X-ray diffraction assay and Raman spectroscopy.*
Results. *The effect of solutions of the technologically processed antibodies to interferon-gamma added to a parent solution on the growth of TGS single crystals is established. This effect manifests in the changing in occupancy of the proton sublattice of the crystal grown from the parent solution containing technologically processed antibodies to interferon-gamma, as compared with the crystals grown from the control solutions. In the case of the crystal grown from the solution containing technologically processed antibodies to interferon-gamma, this change in the occupancy of the proton lattice is expressed in an increase in the length of N2–C3 bonds.*
Conclusions. *Adding the technologically processed antibodies in the parent solution before the crystal growth can affect the structure of TGS crystals.*

Keywords: *technologically processed antibodies, triglycine sulfate, single crystal, X-ray diffraction assay, Raman spectroscopy*

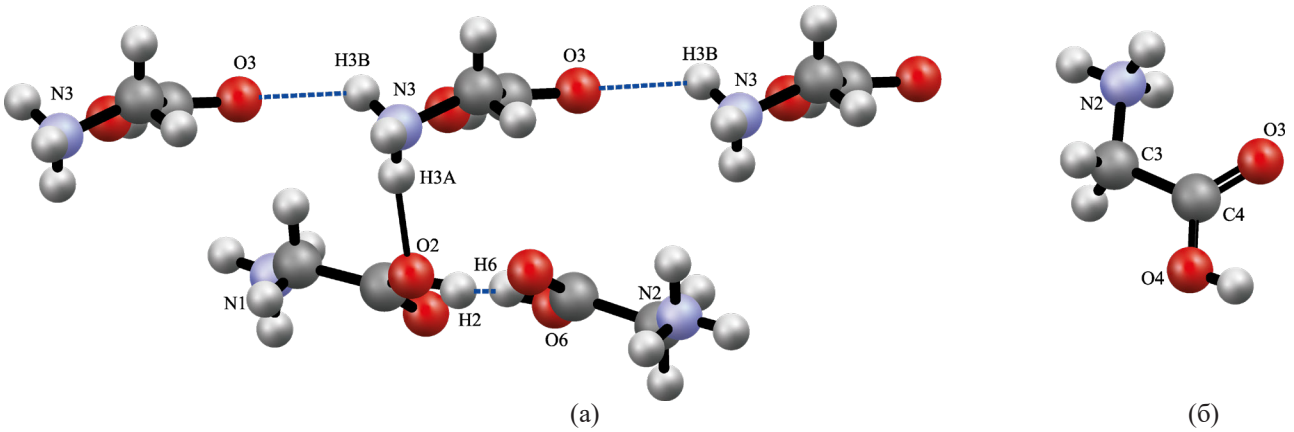
For citation: Stepanov G.O., Rodionova N.N., Konstantinov R.R., Subbotin K.A. Effect of adding technologically processed antibodies to interferon-gamma into a parent solution on the structural features of triglycine sulfate crystals grown from this solution. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol*. 2023;18(6):517–533. https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-6-517-533

ВВЕДЕНИЕ

Триглицинсульфат (ТГС) — известный сегнетоэлектрик, который находит широкое применение в электронике и других отраслях техники. Свойства сегнетоэлектриков чувствительны даже к незначительным вариациям условий синтеза [1]. ТГС состоит из трех молекул глицина и одного сульфат-аниона. Глицин, благодаря своей амфотерной природе, в кислых растворах представляет собой положительно заряженные катионы глициния $NH_3^+CH_2COOH$, в щелочных растворах — отрицательно заряженные анионы $NH_3CH_2COO^-$, в нейтральной среде — биполярные цвиттерионы $NH_3^+CH_2COO^-$. Таким образом, в структуре ТГС присутствуют два катиона глициния, химически связанные с сульфат-ионами, и один цвиттер-ион, а карбоксильные группы, аминогруппы и сульфат-ионы соединены между собой в кристалле сложной сеткой водородных связей [2] (рис. 1).

Поскольку механизм возникновения спонтанной поляризации в ТГС связан с упорядочением протонов, участвующих в образовании водородных связей [3], роль состояния водного или водно-спиртового раствора (ВСР) ТГС при выращивании кристалла из этого раствора переоценить невозможно. В частности, ранее было показано, что количество воды и ее способ включения в кристалл сегнетоэлектрика при низких и высоких температурах различаются: так, в кристаллах ТГС, выращенных при комнатной температуре (20 °C), содержится около 9 мас. % воды, тогда как при выращивании кристаллов при температуре ниже 0 °C содержание воды достигает почти 19 мас. %. При этом большая часть воды находится внутри кристалла в виде микрогетерогенных включений, а не в виде твердого раствора [1, 4–5].

Технологическая обработка (ТО) растворов различных веществ включает в себя многократные последовательные разведения, сопровождающиеся интенсивным вибрационным воздействием, и приводит к изменению различных физико-химических свойств ТО веществ. Большое количество этапов разведения приводит к тому, что теоретическое снижение концентрации исходного вещества в растворе составляет как минимум 10^{24} (т.е., полученный



(а) (б)

Рис. 1. (а) Глициновые группы и межмолекулярные водородные связи (изображены линиями-точками) в молекуле ТГС и (б) схематическое изображение катиона глициния.
Одинаковыми номерами обозначены структурно-эквивалентные атомы.
Рисунки выполнены в программе Mercury (Cambridge Crystallographic Data Center, Великобритания).
Fig. 1. Glycine groups and intermolecular hydrogen bonds (represented by lines-dots) in the triglycine sulfate (TGS) molecule (a) and a schematic representation of the glycine cation (b).
Structurally equivalent atoms are indicated by the same numbers.
Figures are created in Mercury soft (Cambridge Crystallographic Data Center, United Kingdom).

раствор может содержать лишь единичные молекулы растворенного вещества или не содержать их вовсе). Несмотря на это, такой раствор по своим физико-химическим характеристикам отличается от характеристик растворителя — воды или ВСР [7–13]. Также показано изменение характера водородных связей между молекулами воды в веществе, прошедшем данную обработку, по сравнению с обычной водой [13–20].

На примере ТО-антител (ТО-Ат) к интерферону-гамма (ИФН-γ) было показано, что их биологические эффекты основаны на модифицирующем действии ТО-Ат на свою мишень [6, 21], которое реализуется через влияние на гидратные оболочки, окружающие белок в водном растворе [22]. Таким образом, поскольку ТО влияет на свойства раствора путем изменения водородных связей, которые, в свою очередь, вовлечены в процесс возникновения спонтанной поляризации в ТГС, можно предположить, что ТО-раствор будет оказывать влияние и на структуру кристалла, выращенного в таком водном растворе, чьи новые свойства могут оказаться принципиальными для реализации эффекта.

Целью данной работы стало изучение структурных особенностей кристаллов ТГС, выращенных в присутствии ТО-Ат к ИФН-γ, по сравнению с таковыми у кристаллов, выращенных в присутствии технологически обработанного раствора фосфатно-солевого буфера (ФСБ) или интактного раствора. Изучение проводили методами рентгеноструктурного анализа (РСА) и спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) света.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растворители для приготовления кристаллов

В процессе выращивания кристаллов в качестве растворителя при приготовлении маточного раствора использовались следующие виды ВСР.

1) ВСР Ат к ИФН-γ, которые подверглись процессу постепенного снижения их начальной концентрации — ТО-Ат к ИФН-γ. Методика получения ТО-Ат к ИФН-γ состоит в следующем: препарат раствора Ат к ИФН-γ (2.5 мг/мл) смешивали с водным раствором этилового спирта (36 об. %) в соотношении 1:100 с интенсивной вибрационной обработкой для получения первого сотенного разведения. Все последующие разведения содержали одну часть предыдущего раствора и 99 частей водного раствора этилового спирта, и при каждом последующем разведении применялось интенсивное вибрационное воздействие. В итоге получали образец, представляющий собой смесь сотенных разведений: 12-го, 30-го и 50-го. Более подробно методика приготовления ТО-Ат к ИФН-γ изложена в работе [7].

Исходя из общей степени разведения, теоретическая концентрация Ат в конечном растворе должна была бы составлять не более $2.5 \cdot 10^{-24}$ мг/мл. Однако, согласно физико-химическим исследованиям, для образцов, изготовленных с использованием технологии приготовления высоких разведений, такая оценка может быть неверной из-за нелинейного снижения концентрации растворенного вещества. Действительно, было показано, что даже при разведениях ниже, чем в 10^{24} раз,

молекулы растворенного вещества могут сохраняться благодаря эффекту флотации [23, 24]. Исходное вещество — Ат к ИФН-γ было произведено в соответствии с действующими в Европейском союзе требованиями надлежащей производственной практики для исходных материалов[1] компанией *AB Biotechnology* (Эдинбург, Великобритания).

2) Плацебо — контрольный раствор был получен по аналогичной процедуре, но применной к раствору ФСБ, приготовленному из таблетки ФСБ производства *Sigma-Aldrich* (США), pH = 7.2.

3) Интактный контрольный раствор — ВСР, не подвергавшейся никакой дополнительной обработке.

Все образцы были приготовлены с использованием воды, полученной с помощью системы очистки Milli-Q (*Millipore*, Дармштадт, Германия) и проверены на предмет возможного наличия примесей методами флуоресцентной спектроскопии и измерения удельной электропроводности. Производитель образцов имеет сертификат GMP (Good Manufacturing Practice), который гарантирует строгое соблюдение протоколов пробоподготовки. Все образцы были приготовлены в чистых условиях (класс чистоты D) в вытяжном шкафу с ламинарным потоком с использованием стерильных автоматических пипеток со стерильными наконечниками в один и тот же день одним и тем же сотрудником и в одних и тех же условиях, насколько это возможно. Протокол приготовления учитывает любое загрязнение флаконов из другой стеклянной посуды, партий растворителя или атмосферы. Это также позволяет компенсировать возможное влияние колебаний атмосферного давления и температуры.

Выращивание кристаллов ТГС

Кристаллические образцы ТГС выращивали из растворов с использованием вышеуказанных растворителей методом постепенного снижения температуры. Ростовые эксперименты проводили в два этапа. На первом этапе готовили затравочные кристаллы (размерами до 3 мм) путем спонтанной кристаллизации в лабораторном стакане. Далее, для получения более крупных кристаллических образцов с использованием затравочных кристаллов управляемое снижение температуры маточного раствора проводили в специальной лабораторной программируемой кристаллизационной установке (кристаллизаторе), с принципиальным описанием которой можно ознакомиться в [25].

[1] Europea U. Directive 2004/27/EC of the European Parliament and of the Council of March 31, 2004 Amending Directive 2001/83/EC on the Community Code Relating to Medicinal Products for Human Use. Official Journal of the European Union. L 2004;136:34–57. URL: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004L0027. Дата обращения 01.11.2023. / Accessed November 01, 2023.

Приготовление затравочных кристаллов

В начале в кристаллизаторе готовились маточные растворы с использованием растворителей, содержащих ТО-Ат к ИФН-γ, ТО-ФСБ и ВСР с концентрацией ТГС 42 мас. %. Такие растворы имели температуру насыщения около 40–45 °C, что было установлено в результате предварительного перегрева раствора до температур, несколько превышающих температуры насыщения. Такой перегрев производился, чтобы предотвратить спонтанную кристаллизацию раствора в момент заливки в кристаллизатор [25].

Для приготовления маточных растворов использовался ТГС квалификации ч. (*Шосткинский завод химреактивов*, Украина), прошедший дополнительную очистку. Дополнительная очистка заключалась в фракционной перекристаллизации в два этапа. На первом этапе готовился насыщенный горячий раствор (приготовленный с использованием тридистиллированной воды), который отфильтровывался от осадка на фильтре Шотта № 3. После этого проводилась спонтанная массовая кристаллизация в течение суток с перемешиванием. На втором этапе полученный кристаллический осадок вновь растворялся в тридистиллированной воде, и повторялась процедура первого этапа. Были приготовлены три маточных раствора объемом 350 мл каждый.

От каждого маточного раствора отбиралась аликвота объемом 50 мл при температуре, превышающей температуру насыщения, и переносилась в отдельный лабораторный стакан, в котором она спонтанно кристаллизовалась в течение 8 ч при естественном снижении температуры до комнатной (20 °C) без перемешивания. После остывания аликвоты маточный раствор декантировался от образовавшихся затравочных кристаллов.

Приготовление кристаллов для исследования

В приготовленный в кристаллизаторе маточный раствор при вышеуказанной температуре насыщения помещался затравочный кристалл. Затем кристаллизатор герметизировался, и после 72 ч выдержки маточного раствора с затравочным кристаллом при температуре насыщения начиналось перемешивание со снижением температуры. Снижение температуры проводилось в течение 14 суток по специальному графику (скорость снижения температуры постепенно увеличивалась от примерно 0.1 °C/сут в 1-ые сутки до 4 °C/сут в 14-ые сутки охлаждения, аналогично [26]). После этого кристаллизатор вскрывался, маточный раствор декантировался от кристаллов; кристаллы вынимали из кристаллизатора, промакивали на фильтровальной бумаге и сушили на воздухе.

Выращенные кристаллы имели выраженную естественную огранку. После получения образцы кристаллов хранились в пластиковых пробирках при комнатной температуре. Из маточного раствора с ТО-Ат к ИФН-γ было выращено 4 крупных ТГС кристалла (с размером в одном из направлений более 5 мм); из маточного раствора с ТО-ФСБ выращено 5 крупных ТГС кристаллов (более 5 мм) и 5 мелких (менее 5 мм); из маточного раствора с ВСР выращено около 20 мелких кристаллов (менее 3 мм).

Подготовка кристаллов для РСА

Для каждого вида растворителя методом РСА исследовалось три кристаллических образца. Подготовка образцов для исследования методом РСА проводилась откалыванием от основного кристалла осколка размером не менее 0.1 × 0.1 × 0.1 мм^3. Выбранный с помощью оптического микроскопа прозрачный визуально совершенный кристаллический осколок крепился на стеклянную нить с помощью вакуумной смазки (рис. 2).

Рис. 2. Фотографии образцов кристаллов ТГС, наклеенных на стеклянную нить для проведения РСА.
ТО-Ат к ИФН-γ — технологически обработанные антитела (ТО-Ат) к интерферону-гамма (ИФН-γ);
ТО-ФСБ — технологически обработанный раствор фосфатно-солевого буфера; ВСР — водно-спиртовой раствор.
Fig. 2. Photos of TGS crystals pasted on a glass thread for conducting X-ray diffration analysis.
TP-Abs to IFN-γ — technological processed antibodies (TP-Abs) to interferon gamma (IFN-γ);
TP-PBS — technologically treated phosphate-buffered saline; AAS — aqueous alcoholic solution.

Для определения качества образца проводилось предварительное экспресс-сканирование с помощью встроенной функции, входящей в пакет программного обеспечения для управления рентгеновским дифракционным экспериментом CrysAlis^{Pro} (*Rigaku*, США)[2].

РСА

Для проведения исследований методом РСА использовался монокристальный дифрактометр Xcalibur, Sapphire 3, Gemini (*Rigaku*, Япония), излучение MoK_α (λ = 0.71073 Å). В эксперименте применялось ω-сканирование с шагом 1°. Экспозиция составляла 15 с на шаг. Угловое положение CCD-детектора (54.25°) выбиралось для регистрации рефлексов с наилучшим разрешением $\sin\theta/\lambda \approx 0.5 Å^{-1}$.

Обработка дифрактограмм (поиск пиков, определение параметров элементарной ячейки, интегрирование интенсивностей рефлексов) проводилась в автоматическом режиме в программном комплексе CrysAlisPro (*Rigaku*, США). Решение и уточнение атомной структуры кристаллов производилось в комплексе программ Shelx с использованием графической оболочки ShelxLe (*Shelx*, Германия)[3].

Методика определения атомов водорода

Кристаллы ТГС при нормальных условиях находятся в сегнетоэлектрической фазе (точка Кюри (T_c) составляет 49 °C). Это обеспечивает разбиение кристалла на домены, обладающие спонтанной поляризацией. В связи с этим, без дополнительных мер (например, наложения внешнего электрического поля), недоступных для используемой конфигурации приборов, результаты РСА такого материала могут содержать артефакты, связанные с двойникованием. Поэтому положение только некоторых атомов водорода в структуре было определено из разностного синтеза электронной плотности. Затем недостающие атомы водорода были добавлены на основании геометрических расчетов характерных валентных углов в органических соединениях. Однако, в окончательном варианте решения каждой структуры во избежание флуктуаций все атомы водорода были локализованы и уточнены по так называемой модели наездника (riding model). При этом фиксировались длины связей N–H, O–H, C–H, а также валентные углы и тепловые параметры. Точные координаты являются уточняемыми параметрами и рассчитываются по стандартной схеме. Указанный подход является общепринятым и позволяет избежать проблем с возникновением искажений, противоречащих принципиальным кристаллохимическим подходам (например, нереально короткие или нереально длинные связи между атомами) [3].

Спектроскопия КР света

Измерения КР-спектров кристаллов проводили на микро КР-спектрометре Интегра Спектра (*НТ-МДТ*, Зеленоград, Россия). Кристалл помещали на покровное стекло и позиционировали на предметном столике инвертированного микроскопа таким образом, чтобы пробный лазерный луч (лазер MSL-III-532 50 мВт, *Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co.*, China) падал на выбранные грани. Параметры измерений: длина волны возбуждающего света 532 нм, мощность на образце примерно 5 мВт, решетка 600, объектив 5×, время записи одного спектра 60 с.

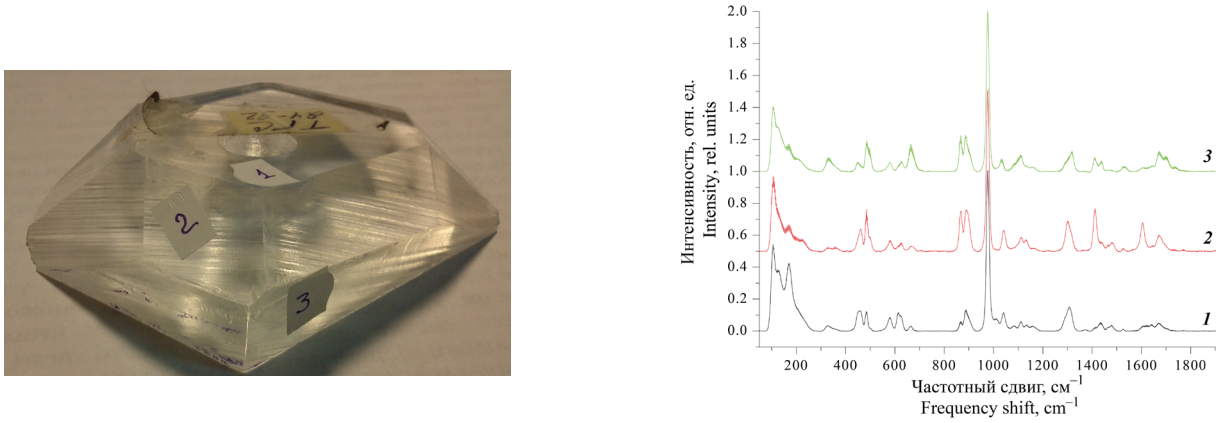
Было проанализировано 4 кристалла, выращенных из маточного раствора, содержащего ТО-Ат к ИФН-γ, и 2 кристалла, выращенных из маточного раствора, содержащего ТО-ФСБ. У каждого кристалла было проанализировано по 3 естественные грани. От каждой грани было измерено по три спектра при небольшом перемещении кристалла по предметному столику.

Кроме того, были измерены спектры граней эталонного кристалла ТГС (рис. 3а), который ранее выращивался по методике, описанной в [26]. Рассматриваемый эталонный кристалл ТГС относится к моноклинной сингонии с точечной группой 2/m. Для данной точечной группы свойственны открытые простые формы: пинокоиды и ромбические призмы. Измеренные спектры различных граней эталонного кристалла приведены на рис. 3б, в зависимости от формы спектра грани кристалла условно обозначили как тип ***1***, ***2*** или ***3***. Опираясь на данные работы [26] с описанием основной равновесной огранки кристалла ТГС, можно отнести грани типа ***1***, ***2*** и ***3*** к следующим простым формам. Грань типа ***1*** по своей форме и расположению (а также по следу от держателя столбиковой затравки) относится к грани пинокоида, принадлежащего семейству {001}. Грань типа ***2*** относится к семейству граней ромбической призмы {−111}. Грань типа ***3*** (соседствуя между гранями *a* и *b* с индексами (100) и (010) соответственно) относится к граням ромбической призмы {110}.

Грани исследуемых кристаллов (выращенных из маточного раствора, содержащего ТО-Ат к ИФН-γ или ТО-ФСБ) были соотнесены с гранями эталонного кристалла ТГС на основании соответствия

[2] https://www.rigaku.com/products/crystallography/crysalis. Дата обращения 01.11.2023. / Accessed November 01, 2023.

[3] https://www.shelxle.org/shelx/eingabe.php. Дата обращения 01.11.2023. / Accessed November 01, 2023.



(а) (б)

Рис. 3. (а) Эталонный кристалл ТГС и (б) КР-спектры от характерных граней этого кристалла.
Цифрами отмечены грани, с которых были зарегистрированы соответствующие спектры.
Все КР-спектры здесь и далее представлены в виде среднего значения ± ошибка среднего.
Fig. 3. Standard crystal of TGS (a) and the RAMAN spectra from the characteristic facets of this crystal (b).
The numbers indicate the facets from which the corresponding spectra were recorded.
All Raman spectra are presented here and further as average value ± error of the average.

КР-спектров. Для этого визуально оценивали соотношение спектральных полос в областях 860–930, 1060–1140, 1360–1440 и 1560–1700 см$^{-1}$. Сравнение исследуемых кристаллов ТГС проводили по спектрам граней, соответствующих спектрам грани типа ***2*** (семейства граней ромбической призмы {−111}) стандартного кристалла ТГС.

При обработке измеренных спектров проводили вычитание фонового значения, полученного подбором базовой линии полиноминальной функцией, совпадающей с точками минимума спектра. Затем полученные спектры нормировали на интенсивность полосы с частотой ν = 975 см$^{-1}$ (самой интенсивной полосы спектра, обусловленной колебаниями группы SO_4). После этого проводили определение интенсивности пиков с ν = 1671 см$^{-1}$ и 1604 см$^{-1}$.

Интенсивности максимумов на спектрах, полученных с одной грани одного кристалла, усредняли, приводили среднее значение и ошибку среднего в каждой точке, характеризующую статистический разброс данных.

Статистический анализ

Анализ и визуализация полученных данных проводились с использованием среды для статистических вычислений R версии 4.0.2 (*R Foundation for Statistical Computing*, Вена, Австрия).

По результатам КР-спектроскопии были рассчитаны данные описательной статистики, сравнение групп проведено с помощью t-критерия Стьюдента. Нормальность распределения оценивалась по тесту Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий — по тесту Бартлетта. Данные РСА сравнивали с помощью параметрического критерия Тьюки.

Различия между анализируемыми группами считали статистически значимыми при значении вероятности ошибки $p < 0.05$ (т.е. вероятности получить такие или более сильные различия при условии, что между сравниваемыми группами различий нет, составляет менее 5%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

РСА

По данным РСА все кристаллы обладали симметрией, отвечающей пространственной группе $P2_1$ моноклинной сингонии, то есть не содержали центра инверсии. Во всех экспериментах значение отношения сигнал/шум $(\Delta/\sigma)_{max}/(\Delta/\sigma)_{av}$ близко или строго равно нулю. Это говорит о том, что найденные модели отвечают реальному минимуму метода наименьших квадратов, то есть модель атомно-молекулярного состава кристаллов выбрана верно. О высоком качестве кристалла и соответствии найденной модели экспериментальным данным говорят следующие значения:

• Максимальное значение углов рассеяния θ превышает 36°, что говорит о хорошей интенсивности отражения кристаллами на дальних углах рассеяния. Также это соответствует высокому числу измеренных интенсивностей рефлексов (более 12000).

• Минимальная и максимальная остаточная электронная плотность в большинстве экспериментов

не превышает по абсолютному значению 0.5 e/A^3, что соответствуют высокой степени соответствия модели экспериментальным данным.

• Все рассчитанные R-факторы (факторы несоответствия) достаточно малы, что также соответствуют высокой степени соответствия модели экспериментальным данным.

Структура ТГС сложна и представляет собой сетку молекул глицина NH_2CH_2COOH и тетраэдров SO_4, связанных между собой водородными связями типа O–H...O и N–H...O (рис. 1). По данным РСА для выращенных образцов ТГС были вычислены длины валентных связей (табл. 1), а также валентные углы (табл. 2).

При статистическом анализе полученных результатов выявлены статистически значимые различия по значениям длинны связи N2–C3 между образцами ТГС, выращенными из растворов, содержащих ТО-Ат к ИФН-γ, и ТО-ФСБ (рис. 4).

Данный параметр отвечает расстоянию между аминогруппой $–NH_2$ и метиленовым мостиком $–CH_2–$ молекулы глицина. Ближайшее окружение функциональной группы $–NH_2$, не связанное с ней жесткой ковалентной связью, представлено двумя $SO_4^{2–}$ анионами и аналогичной группировкой соседней молекулы глицина. Так как в состав данных группировок атомов входят электроотрицательные элементы (O, N) и электроположительный водород, соблюдаются все условия для образования водородных связей между этими группировками. В связи с этим наблюдаемую разницу в длинах связей N2–C3 можно объяснить различиями в степени заселенности протонами позиций водородных связей, в которых участвуют атомы N2.

КР-спектроскопия

Результаты измерений КР-спектров кристаллов, полученных из растворов, содержащих ТО-Ат к ИФН-γ и ТО-ФСБ, представлены в табл. 3, а КР-спектры для каждого типа кристаллов представлены на рис. 5. Спектры, представленные на рис. 5а, по форме (а именно по соотношению спектральных полос в областях 860–930, 1060–1140, 1360–1440 и 1560–1700 см$^{–1}$) соответствуют форме спектра грани эталонного кристалла ТГС, условно обозначенной ***2*** (рис. 3б). Интенсивность пика 1671 см$^{–1}$ различается в кристаллах различного типа (рис. 5б), поэтому далее было проведено сравнение интенсивностей данного максимума с помощью статистических методов.

Таблица 1. Длины межатомных связей в кристаллах ТГС, выращенных из различных маточных растворов, Å (в скобках приведены погрешности измерений)
Table 1. Lengths of interatomic bonds in TGS crystals grown from various parent solutions, Å (measurement errors are given in parentheses)

Связь Bond	ТО-Ат к ИФН-γ TP-Abs to IFN-γ			ТО-ФСБ TP-PBS			BCP AAS		
	1	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*
C1–N1	1.466(4)	1.466(3)	1.465(3)	1.465(3)	1.476(7)	1.470(3)	1.467(3)	1.472(4)	1.467(3)
C1–C2	1.503(4)	1.507(3)	1.504(3)	1.504(3)	1.512(8)	1.505(3)	1.500(3)	1.500(4)	1.505(3)
S1–O9	1.4647(13)	1.4664(9)	1.4654(10)	1.4652(10)	1.464(2)	1.4651(9)	1.4602(10)	1.4665(11)	1.4668(10)
S1–O8	1.466(2)	1.4674(15)	1.4668(18)	1.4681(16)	1.468(3)	1.4670(15)	1.4637(15)	1.4683(19)	1.4690(17)
S1–O10	1.4765(19)	1.4794(14)	1.4800(17)	1.4773(16)	1.477(3)	1.4777(15)	1.4732(14)	1.4775(18)	1.4788(17)
C3–C4	1.512(4)	1.514(3)	1.513(3)	1.511(3)	1.500(8)	1.514(3)	1.510(3)	1.518(4)	1.513(3)
N3–C5	1.466(3)	1.470(2)	1.470(3)	1.470(3)	1.473(6)	1.470(3)	1.465(3)	1.470(3)	1.470(3)
C6–O5	1.201(3)	1.205(2)	1.201(2)	1.202(2)	1.202(5)	1.201(2)	1.197(2)	1.205(2)	1.206(2)
C6–O6	1.303(2)	1.3026(18)	1.304(2)	1.304(2)	1.298(4)	1.302(2)	1.3013(19)	1.303(2)	1.302(2)
C6–C5	1.511(3)	1.5102(19)	1.512(2)	1.511(2)	1.509(4)	1.515(2)	1.508(2)	1.512(2)	1.514(2)
S1–O7	1.4833(13)	1.4847(9)	1.4838(11)	1.4832(10)	1.484(2)	1.4840(10)	1.4799(10)	1.4852(11)	1.4864(11)
O1–C2	1.230(4)	1.229(3)	1.231(3)	1.232(3)	1.218(7)	1.229(3)	1.229(3)	1.234(3)	1.229(3)
O2–C2	1.284(4)	1.287(2)	1.285(3)	1.286(3)	1.280(6)	1.286(3)	1.282(3)	1.285(3)	1.285(3)
N2–C3	1.470(4)	1.468(3)	1.467(3)	1.466(3)	1.460(7)	1.461(3)	1.461(3)	1.463(4)	1.467(3)
O3–C4	1.209(4)	1.216(3)	1.216(3)	1.212(3)	1.223(7)	1.216(3)	1.209(3)	1.212(3)	1.216(3)

Таблица 2. Значения валентных углов связей в кристаллах ТГС выращенных из различных маточных растворов, градусы (в скобках приведены погрешности измерений)
Table 2. Values of valence bond angles in TGS crystals grown from various parent solutions, degrees (measurement errors are given in parentheses)

Угол Angle	ТО-Ат к ИФН-γ TP-Abs to IFN-γ			ТО ФСБ TP-PBS			ВСР AAS		
	1	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*	*1*	*2*	*3*
N1–C1–C2	111.4(3)	111.42(17)	111.6(2)	111.5(2)	110.9(5)	111.31(18)	111.25(18)	111.3(2)	111.5(2)
O9–S1–O8	111.01(15)	111.28(11)	111.15(12)	111.12(12)	111.0(3)	111.13(11)	111.27(11)	111.10(13)	111.12(12)
O9–S1–O10	110.22(15)	110.06(11)	110.21(13)	110.27(12)	110.5(3)	110.30(11)	110.19(11)	110.29(13)	110.18(12)
O8–S1–O10	109.72(8)	109.78(6)	109.70(7)	109.65(7)	109.68(12)	109.72(6)	109.59(6)	109.74(7)	109.81(7)
O9–S1–O7	110.26(8)	110.24(6)	110.27(7)	110.29(7)	110.27(12)	110.25(6)	110.26(6)	110.21(7)	110.29(6)
O8–S1–O7	108.11(14)	108.02(10)	108.07(12)	108.00(11)	107.8(2)	107.99(10)	108.09(10)	108.11(13)	108.00(12)
O10–S1–O7	107.43(14)	107.35(10)	107.34(12)	107.41(12)	107.5(3)	107.36(11)	107.35(10)	107.30(13)	107.35(12)
O1–C2–O2	126.2(3)	126.12(19)	126.2(2)	126.1(2)	127.1(6)	126.2(2)	126.1(2)	125.7(3)	126.2(2)
O1–C2–C1	120.4(2)	120.49(17)	120.5(2)	120.52(19)	120.6(4)	120.68(18)	120.62(17)	120.8(2)	120.5(2)
O2–C2–C1	113.4(3)	113.40(19)	113.3(2)	113.3(2)	112.3(5)	113.1(2)	113.2(2)	113.5(2)	113.3(2)
N2–C3–C4	110.8(3)	110.79(16)	111.0(2)	110.8(2)	111.7(5)	111.01(18)	110.81(18)	111.1(2)	111.0(2)
O5–C6–O6	125.2(2)	125.10(14)	125.04(17)	125.09(16)	125.3(3)	125.19(15)	124.99(15)	124.99(17)	125.07(16)
O5–C6–C5	121.6(2)	121.59(14)	121.71(17)	121.76(16)	121.2(3)	121.64(16)	121.72(15)	121.62(17)	121.51(16)
O6–C6–C5	113.24(17)	113.30(12)	113.25(15)	113.14(14)	113.4(3)	113.17(13)	113.28(13)	113.39(15)	113.43(14)
N3–C5–C6	112.17(18)	111.84(13)	111.92(15)	111.97(14)	111.8(3)	111.80(14)	111.87(13)	111.88(16)	111.85(15)
O3–C4–O4	126.2(3)	126.5(2)	126.2(2)	126.1(2)	125.0(6)	126.2(2)	126.3(2)	126.6(3)	126.2(2)
O3–C4–C3	122.2(3)	121.81(17)	121.8(2)	122.1(2)	122.1(5)	121.77(19)	121.98(18)	121.7(2)	121.9(2)
O4–C4–C3	111.5(3)	111.71(19)	111.9(2)	111.8(2)	112.8(5)	112.0(2)	111.7(2)	111.6(3)	111.9(2)

В результате статистического анализа с помощью критерия Манна–Уитни показано, что интенсивность полосы на 1671 $см^{-1}$ для образцов, полученных в присутствии ТО-Ат к ИФН-γ, статистически значимо превышала интенсивность одноименной полосы для образцов, выращенных в присутствии ТО-ФСБ ($p < 0.05$) (рис. 5в). Колебательная мода на 1671 $см^{-1}$ в КР-спектрах кристаллов ТГС соответствует валентным колебаниям C=O группы (колебания растяжения-сжатия) [27]. Данные группы атомов задействованы в водородном связывании отдельных молекул глицина в цепочки (известно, что глициновая группа G3 упорядочивается в цепочки с помощью связей N3–H3B…O3, а глициновые группы G1 и G2 образуют димеры с помощью связей O2–H2…H4–O4) [28]. Более активное связывание молекул глицина (со степенью заселенности водородных связей протонами, близкой к единице по данной позиции) приводит к уменьшению интенсивности валентных колебаний двойной связи C=O и к уменьшению интенсивности соответствующей колебательной моды КР-спектра. Соответственно, в случае уменьшения степени заселенности позиций водородных связей в глициновых димерах и цепочках наблюдается увеличение интенсивности колебательной

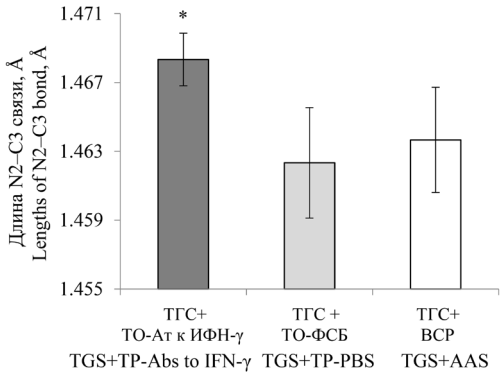


Рис. 4. Среднее значение длин валентной связи N2–C3 для кристаллов ТГС, выращенных из раствора, содержащего ТО-Ат к ИФН-γ, а также из контрольных растворов (среднее ± стандартное отклонение (M ± Sd)). * $p < 0.05$ относительно интенсивности для кристаллов ТГС из раствора, содержащего ТО-ФСБ.

Fig. 4. Average value of the N2–C3 valence bond lengths for TGS crystals grown from a solution containing TP-Abs to IFN-γ, as well as from control solutions (Mean ± Standard deviation (M ± Sd)). * $p < 0.05$ relative to the intensity for TGS crystals from a solution containing the TP-PBS.

моды на 1671 см$^{-1}$. Таким образом, данный параметр позволяет косвенно сравнивать между собой группы образцов кристаллов ТГС по степени заселенности позиций водородных связей. Различия интенсивности колебаний и поляризуемости, вероятные в данном случае, могут быть вызваны небольшим изменением микроокружения данных связей в молекуле глицина, стабилизация цвиттер-ионного конформера которого вероятнее всего происходит с участием одной молекулы воды [29].

Таким образом, по результатам исследований кристалла методом КР-спектроскопии показано, что в образце кристалла ТГС, полученного в присутствии ТО-Ат к ИФН-γ, формируется меньшее количество водородных связей.

По данным РСА мы наблюдаем изменение длины связи N2–C3 внутри одной молекулы. Известно, что в кристаллах группы ТГС имеет место прыжковый протонный механизм перемещения протонов по сетке водородных связей OH—O [30]. Различия в степени заселенности

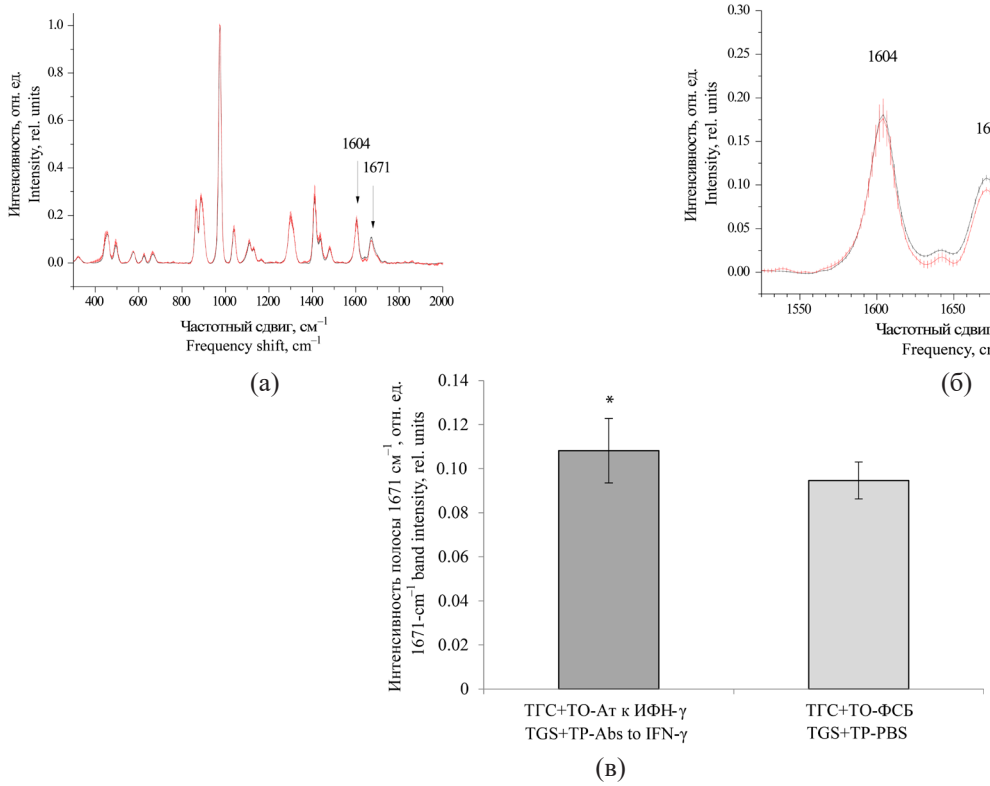


Рис. 5. (а) КР-спектры, полученные с грани типа ***2*** кристаллов, выращенных в присутствии ТО-Ат к ИФН-γ (черная линия) и ТО-ФСБ (красная линия). (б) Участок спектров в более крупном масштабе. (в) Интенсивность КР-полосы с ν = 1671 см$^{-1}$ для кристаллов ТГС, выращенных из раствора, содержащего ТО-Ат к ИФН-γ (M ± Sd); * $p < 0.05$ относительно интенсивности для кристаллов ТГС из раствора, содержащего ТО-ФСБ.

Fig. 5. (a) RAMAN spectra obtained from the type ***2*** facet of crystals grown in the presence of TP-Abs to IFN-γ (black line) and TP-PBS (red line). (b) Spectral region on a larger scale. (c) Intensity of the Raman band with ν = 1671 cm^{-1} for TGS crystals grown from a solution containing TP-Abs to IFN-γ (M ± Sd); * $p < 0.05$ relative to the intensity for TGS crystals from a solution containing the TP-PBS.

Таблица 3. Интенсивность характерных полос на 1671 и 1604 см$^{-1}$
Table 3. Intensity of characteristic bands at 1671 and 1604 cm^{-1}

Интенсивность полосы 1671 см$^{-1}$ Band intensity at 1671 cm^{-1}		Интенсивность полосы 1604 см$^{-1}$ Band intensity at 1604 cm^{-1}	
Кристаллы ТГС, полученные из раствора, содержащего ТО-Ат к ИФН-γ TGS crystals obtained from a solution containing TP-Abs to IFN-γ	Кристаллы ТГС, полученные из раствора, содержащего ТО-ФСБ TGS crystals obtained from a solution containing TP-PBS	Кристаллы ТГС, полученные из раствора, содержащего ТО-Ат к ИФН-γ TGS crystals obtained from a solution containing TP-Abs to IFN-γ	Кристаллы ТГС, полученные из раствора, содержащего ТО-ФСБ TGS crystals obtained from a solution containing TP-PBS
0.11095	0.08676	0.17695	0.10601
0.12549	0.08759	0.22240	0.09830
0.10790	0.09273	0.17639	0.10012
0.11084	0.10294	0.14632	0.20799
0.07034	0.11127	0.08469	0.24110
0.11334	0.09324	0.13901	0.22482
0.10890	0.08996	0.13426	0.21202
0.13704	0.09287	0.28414	0.22250
0.12293	–	0.25905	–
0.12321	–	0.25545	–
0.12234	–	0.22994	–
0.12176	–	0.22812	–
0.11706	–	0.22272	–
0.09194	–	0.17393	–
0.10321	–	0.11153	–
0.09831	–	0.18336	–
0.09902	–	0.17805	–
0.10156	–	0.17666	–
0.09457	–	0.17712	–
0.10626	–	0.14743	–
0.09664	–	0.14155	–
0.09604	–	0.13451	–

протонами позиций водородных связей могут обуславливать наблюдаемую разницу в длинах связей N2–C3. В кристалле, выращенном в присутствии ТО-Ат к ИФН-γ, данная связь оказывается длиннее, чем в кристаллах, выращенных из контрольных растворов (ТО-ФСБ и ВСР). Это означает уменьшение количества водородных связей. Данный вывод подтверждается результатами, полученными в исследованиях с помощью КР-спектроскопии.

Резюмируя полученные данные, мы можем сделать вывод, что обоими методами показано, что в образце кристалла ТГС, полученного в присутствии ТО-Ат к ИФН-γ, формируется меньшее количество водородных связей, по сравнению с кристаллами, выращенными из контрольных растворов (ТО-ФСБ и ВСР). Действие ТО-Ат к ИФН-γ, направленное не на свою мишень, вероятно, связано с влиянием на рост ТГС водного раствора, обретшего в процессе технологической обработки новые по сравнению с контрольными растворами свойства. Это соответствует полученным ранее данным о реализации эффекта технологически обработанных белков через влияние на гидратные оболочки молекулы мишени [22].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резюмируя полученные экспериментальные результаты, можно сделать вывод, что основное проявление влияния раствора ТО-Ат, применявшегося при выращивании кристаллов ТГС, на свойства этих кристаллов выражается в изменении свойств протонной подрешетки кристалла как структурной составляющей кристалла, наиболее чувствительной к влияниям внешних факторов. Ранее показана высокая важность воды в реализации электрических свойств кристаллов, поэтому в дальнейшем интерес представляет изучение не только структуры, но и свойств кристаллов, выращенных с применением ВСР, подвергнувшихся различным видам технологической обработки.

Благодарности

Работа финансировалось НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ», Москва, Россия.

Acknowledgments

The work was financially supported by Materia Medica Holding, Moscow, Russia.

Вклад авторов

Г.О. Степанов – анализ данных, концептуализация, написание первоначальной версии статьи;

Н.Н. Родионова – анализ данных, концептуализация, написание первоначальной версии статьи;

Р.Р. Константинов – анализ данных, редактирование статьи;

К.А. Субботин – научное консультирование, редактирование статьи.

Authors' contributions

G.O. Stepanov – data analysis, conceptualization, writing the text of the initial draft;

N.N. Rodionova – data analysis, conceptualization, writing the text of the initial draft;

R.R. Konstantinov – data analysis, editing the article;

K.A. Subbotin – counseling, editing the article.

Конфликт интересов

Авторы заявили о следующих потенциальных конфликтах интересов в связи с авторством и/или публикацией этой статьи: Степанов Г.О., Родионова Н.Н., Константинов Р.Р. являются сотрудниками *НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ»*. *НПФ «МАТЕРИА МЕДИКА ХОЛДИНГ»* приняла решение опубликовать работу и покрыла расходы, связанные с публикацией статьи, оплачивала проведение экспериментальных работ, принимала участие в написании рукописи.

Conflict of interest

The authors declared the following potential conflicts of interest in connection with the authorship and/or publication of this article: G.O. Stepanov, N.N. Rodionova, and R.R. Konstantinov are employees of *Materia Medica Holding*. *Materia Medica Holding* decided to publish the work and covered the costs associated with the publication of the article, paid for the experimental work, participated in the writing of the manuscript.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яценко О.Б., Чудотворцев И.Г., Стеханова Ж.Д., Миловидова С.Д., Рогазинская О.В. Плотность и содержание воды в кристаллах *триглицинсульфата*. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация*. 2006;(2):117–121.

2. Епифанов Г.И. *Физика твердого тела.* М.: Высшая школа; 1977. 288 с.

3. Лайнс М., Гласс А. *Сегнетоэлектрики и родственные им материалы*: пер. с англ. М.: Мир; 1981. 736 с.

REFERENCES

1. Yacenko O.B., Chudotvortsev I.G., Stekhanova G.D., Milovidova S.D., Rogazinskaya O.V. Density and contents of water in triglycinesulfate crystals. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2006;(2):117–121 (in Russ.).

2. Epifanov G.I. *Fizika tverdogo tela* (*Solid State Physics*). Moscow: Vysshaya shkola; 1977. 288 p. (in Russ.).

4. Стеханова Ж.Д., Яценко О.Б., Миловидова С.Д., Сидоркин А.С., *Рогазинская* О.В., Юрьев А.Н. Диэлектрические свойства кристаллов *триглицинсульфата*, выращенных из водных растворов при температурах ниже 0°С. *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация.* 2004;(2):46–49.

5. Стеханова Ж.Д., Яценко О.Б., Миловидова С.Д., Сидоркин А.С., Рогазинская О.В. Свойства кристаллов триглицинсульфата, выращенных из водных растворов. *Журн. прикладной химии.* 2005;78(1):45–51.

6. Epstein O. The spatial homeostasis hypothesis. *Symmetry.* 2018;10(4):103. https://doi.org/10.3390/sym10040103

7. Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Киселева Ю.В., Коновалов А.И. Самоорганизация и физико-химические свойства водных растворов антител к интерферону-гамма в сверхвысоком разведении. *Доклады Академии наук.* 2015;462(2):185–189. https://doi.org/10.7868/S0869565215140170

8. Ryzhkina I., Murtazina L., Gainutdinov K., Konovalov A. Diluted aqueous dispersed systems of 4-aminopyridine: The relationship of self-organization, physicochemical properties, and influence on the electrical characteristics of neurons. *Front. Chem.* 2021;9:623860. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.623860

9. Коновалов А.И., Мальцева Е.Л., Рыжкина И.С., Муртазина Л.И., Киселева Ю.В., Каспаров В.В., Пальмина Н.П. Образование наноассоциатов – фактор, определяющий физико-химические и биологические свойства высокоразбавленных водных растворов. *Доклады Академии наук.* 2014;456(5):561–564. https://doi.org/10.7868/S0869565214170174

10. Лобышев В.И. Биологическая активность малых и сверхмалых концентраций. *Биофизика.* 2022;67(4):658–670. https://doi.org/10.31857/S0006302922040044

11. Lobyshev V.I. Dielectric characteristics of highly diluted aqueous diclofenac solutions in the frequency range of 20 Hz to 10 MHz. *Phys. Wave Phen.* 2019;27(2):119–127. https://doi.org/10.3103/S1541308X19020067

12. Lobyshev V.I. Evolution of high-frequency conductivity of pure water samples subjected to mechanical action: effect of a hypomagnetic filed. *Phys. Wave Phen.* 2021;29(2):98–101. https://doi.org/10.3103/S1541308X21020084

13. Yablonskaya O., Buravleva E., Novikov K., Voeikov V. Peculiarities of the physicochemical properties of hydrated C60 fullerene solutions in a wide range of dilutions. *Front. Phys.* 2021;9:627265. https://doi.org/10.3389/fphy.2021.627265

14. Белов В.В., Беляева И.А., Шматов Г.П., Зубарева Г.М., Пальмина Н.П. ИК-спектроскопия тонких слоев воды и механизм действия α-токоферола в малых дозах. *Доклады Академии наук*. 2011;439(1):68–71.

15. Бревик И., Шаповалов А.В. Эффекты низкой концентрации в водных растворах в рамках фрактального подхода. *Известия высших учебных заведений. Физика.* 2022;65(2):3–13. https://doi.org/10.17223/00213411/65/2/3

16. Shishkina A.V., Ksenofontov A.A., Penkov N.V., Vener M.V. Diclofenac ion hydration: experimental and theoretical search for anion pairs. *Molecules.* 2022;27(10):3350. https://doi.org/10.3390/molecules27103350

17. Slatinskaya O.V., Pyrkov Yu.N., Filatova S.A., Guryev D.A., Penkov N.V. Study of the effect of europium acetate on the intermolecular properties of water. *Front. Phys.* 2021;9:641110. https://doi.org/10.3389/fphy.2021.641110

18. Penkov N.V. Peculiarities of the perturbation of water structure by ions with various hydration in concentrated solutions of $CaCl_2$, CsCl, KBr, and KI. *Phys. Wave Phen.* 2019;27(2):128–134. https://doi.org/10.3103/S1541308X19020079

3. Lines M., Glass A. *Segnetoelektriki i rodstvennye im materialy* (*Ferroelectrics and Related Materials*). Transl. from. Engl. Moscow: Mir; 1981. 736 p. (in Russ.).

[Lines M.E., Glass A.M. *Principles and Application of Ferroelectrics and Related Materials*. Oxford: Clarendon Press; 1977. 680 p.]

4. Stekhanova Zh.D., Yatsenko O.B., Milovidova S.D., Sidorkin A.S., Rogazinskaya O.V., Yur'ev A.N. Dielectric properties of crystals triglycine sulfate, grown from aqueous solutions at the temperatures below 0°C. *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya = Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*. 2004;(2):46–49 (in Russ.).

5. Stekhanova Z.D., Yatsenko O.B., Milovidova S.D., *et al.* Properties of Triglycine Sulfate Crystals Grown from Aqueous Solutions. *Russ. J. Appl. Chem.* 2005;78(1):42–49. https://doi.org/10.1007/s11167-005-0228-9

[Original Russian Text: Stekhanova Z.D., Yatsenko O.B., Milovidova S.D., Sidorkin A.S., Rogazinskaya O.V. Properties of Triglycine Sulfate Crystals Grown from Aqueous Solutions. *Zhurnal Prikladnoi Khimii*. 2005;78(1):45–51 (in Russ.).]

6. Epstein O. The spatial homeostasis hypothesis. *Symmetry.* 2018;10(4):103. https://doi.org/10.3390/sym10040103

7. Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Ju.V., *et al*. Self-organization and physicochemical properties of aqueous solutions of the antibodies to interferon gamma at ultrahigh dilution. *Dokl. Phys. Chem.* 2015;462(1):110–114. https://doi.org/10.1134/S0012501615050048

[Original Russian Text: Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Ju.V., Konovalov A.I. Self-organization and physicochemical properties of aqueous solutions of the antibodies to interferon gamma at ultrahigh dilution. *Doklady Akademii Nauk.* 2015;462(2):185–189 (in Russ.). https://doi.org/10.7868/S0869565215140170]

8. Ryzhkina I., Murtazina L., Gainutdinov K., Konovalov A. Diluted aqueous dispersed systems of 4-aminopyridine: The relationship of self-organization, physicochemical properties, and influence on the electrical characteristics of neurons. *Front. Chem.* 2021;9:623860. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.623860

9. Konovalov A.I., Mal'tseva E.L., Ryzhkina I.S., *et al*. Formation of nanoassociates is a factor determining physicochemical and biological properties of highly diluted aqueous solutions. *Dokl. Phys. Chem.* 2014;456(2):86–89. https://doi.org/10.1134/S0012501614060050

[Original Russian Text: Konovalov A.I., Ryzhkina I.S., Murtazina L.I., Kiseleva Y.V., Mal'tseva E.L., Kasparov V.V., Pal'mina N.P. Formation of nanoassociates is a factor determining physicochemical and biological properties of highly diluted aqueous solutions. *Doklady Akademii Nauk.* 2014;456(5):561–564 (in Russ.). https://doi.org/10.7868/S0869565214170174]

10. Lobyshev V.I. Biological activity of solutions of substances at low and ultra low concentrations. *Biophysics.* 2022;67(4):523–533. https://doi.org/10.1134/S0006350922040145

[Original Russian Text: Lobyshev V.I. Biological activity of solutions of substances at low and ultra low concentrations. *Biofizika.* 2022;67(4):658–670 (in Russ.). https://doi.org/10.31857/S0006302922040044]

11. Lobyshev V.I. Dielectric characteristics of highly diluted aqueous diclofenac solutions in the frequency range of 20 Hz to 10 MHz. *Phys. Wave Phen.* 2019;27(2):119–127. https://doi.org/10.3103/S1541308X19020067

19. Penkov N., Fesenko E. Development of terahertz time-domain spectroscopy for properties analysis of highly diluted antibodies. *Appl. Sci.* 2020;10(21):7736. https://doi.org/10.3390/app10217736

20. Penkov N. Antibodies processed using high dilution technology distantly change structural properties of IFNγ aqueous solution. *Pharmaceutics.* 2021;13(11):1864. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111864

21. Tarasov S.A., Gorbunov E.A., Don E.S., Emelyanova A.G., Kovalchuk A.L., Yanamala N., Schleker A.S.S., Klein-Seetharaman J., Groenestein R., Tafani J-P., van der Meide P., Epstein O.I. Insights into the mechanism of action of highly diluted biologics. *J. Immunol*. 2020;205(5):1345–1354. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000098

22. Woods K.N. Modeling of protein hydration dynamics is supported by THz spectroscopy of highly diluted solutions. *Front. Chem.* 2023;11:1131935. https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1131935

23. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Ninham B.W., Chirikov S.N., Chaikov L.L., Penkov N.V., Kozlov V.A., Gudkov S.V. Shaking-induced aggregation and flotation in immunoglobulin dispersions: differences between water and water-ethanol mixtures. *ACS Omega.* 2020;5(24):14689–14701. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01444

24. Chikramane P.S., Kalita D., Suresh A.K., Kane S.G., Bellare J.R. Why extreme dilutions reach non-zero asymptotes: a nanoparticulate hypothesis based on froth flotation. *Langmuir*. 2012;28(45):15864–15875. https://doi.org/10.1021/la303477s

25. Вайнштейн Б.К. *Современная кристаллография*: в 4 т. Т. 3. *Образование кристаллов*. М.: Наука; 1980. 408 с.

26. Колдобская М.Ф., Гаврилова И.В. Выращивание крупных ограненных кристаллов ТГС в лабораторных условиях. В сб.: *Рост кристаллов*. М.: АН СССР; 1961. Т. 3. С. 278–282.

27. Malekfar R., Daraei A. Raman scattering and electrical properties of TGS:PCo (9%) crystal as ambient temperature IR detector. *Acta Physica Polonica A.* 2008;114(4):859–867. http://doi.org/10.12693/APhysPolA.114.859

28. Zheludev I.S. *Physics of Crystalline Dielectrics.* V. 1. *Crystallography and Spontaneous Polarization*. New York: Springer; 1971. 346 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8076-4

29. Крауклис И.В., Тулуб А.В., Головин А.В., Челибанов В.П. Спектры комбинационного рассеяния света глицина и их моделирование в дискретно-континуальной модели сольватной оболочки воды. *Оптика и спектроскопия*. 2020;128(10):1488–1491. https://doi.org/10.21883/OS.2020.10.50019.161-20

30. Гаврилова Н.Д., Малышкина И.А. Влияние изменений в структуре сетки водородных связей воды на электрофизические свойства систем «матрица-вода» при ступенчатом нагреве. *Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия*. 2018;(6):74–80. URL: http://vmu.phys.msu.ru/file/2018/6/18-6-074.pdf

12. Lobyshev V.I. Evolution of high-frequency conductivity of pure water samples subjected to mechanical action: effect of a hypomagnetic filed. *Phys. Wave Phen.* 2021;29(2):98–101. https://doi.org/10.3103/S1541308X21020084

13. Yablonskaya O., Buravleva E., Novikov K., Voeikov V. Peculiarities of the physicochemical properties of hydrated C60 fullerene solutions in a wide range of dilutions. *Front. Phys.* 2021;9:627265. https://doi.org/10.3389/fphy.2021.627265

14. Belov V.V., Belyaeva I.A., Shmatov G.P., *et al.* IR spectroscopy of thin water layers and the mechanism of action α-tocopherol in ultra low concentrations. *Dokl. Phys. Chem.* 2011;439(1):123–126. https://doi.org/10.1134/S0012501611070013

[Original Russian Text: Belov V.V., Belyaeva I.A., Shmatov G.P., Zubareva G.M., Palmina N.P. IR spectroscopy of thin water layers and the mechanism of action α-tocopherol in ultra low concentrations. *Doklady Akademii Nauk.* 2011;439(1):68–71 (in Russ.).]

15. Brevik I., Shapovalov A.V. Effects of low concentration in aqueous solutions within the fractal approach. *Russ. Phys. J.* 2022;65(2):197–207 (in Russ.). https://doi:10.1007/s11182-022-02623-3

[Original Russian Text: Brevik I., Shapovalov A.V. Effects of low concentration in aqueous solutions within the fractal approach. *Izvestiya Vysshikh Uchebnykh Zavedenii. Fizika.* 2022;65(2):3–13 (in Russ.). https://doi.org/10.17223/00213411/65/2/3]

16. Shishkina A.V., Ksenofontov A.A., Penkov N.V., Vener M.V. Diclofenac ion hydration: experimental and theoretical search for anion pairs. *Molecules.* 2022;27(10):3350. https://doi.org/10.3390/molecules27103350

17. Slatinskaya O.V., Pyrkov Yu.N., Filatova S.A., Guryev D.A., Penkov N.V. Study of the effect of europium acetate on the intermolecular properties of water. *Front. Phys.* 2021;9:641110. https://doi.org/10.3389/fphy.2021.641110

18. Penkov N.V. Peculiarities of the perturbation of water structure by ions with various hydration in concentrated solutions of $CaCl_2$, CsCl, KBr, and KI. *Phys. Wave Phen.* 2019;27(2):128–134. https://doi.org/10.3103/S1541308X19020079

19. Penkov N., Fesenko E. Development of terahertz time-domain spectroscopy for properties analysis of highly diluted antibodies. *Appl. Sci.* 2020;10(21):7736. https://doi.org/10.3390/app10217736

20. Penkov N. Antibodies processed using high dilution technology distantly change structural properties of IFNγ aqueous solution. *Pharmaceutics.* 2021;13(11):1864. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111864

21. Tarasov S.A., Gorbunov E.A., Don E.S., Emelyanova A.G., Kovalchuk A.L., Yanamala N., Schleker A.S.S., Klein-Seetharaman J., Groenestein R., Tafani J-P., van der Meide P., Epstein O.I. Insights into the mechanism of action of highly diluted biologics. *J. Immunol*. 2020;205(5):1345–1354. https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000098

22. Woods K.N. Modeling of protein hydration dynamics is supported by THz spectroscopy of highly diluted solutions. *Front. Chem.* 2023;11:1131935. https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1131935

23. Bunkin N.F., Shkirin A.V., Ninham B.W., Chirikov S.N., Chaikov L.L., Penkov N.V., Kozlov V.A., Gudkov S.V. Shaking-induced aggregation and flotation in immunoglobulin dispersions: differences between water and water-ethanol mixtures. *ACS Omega.* 2020;5(24):14689–14701. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01444

24. Chikramane P.S., Kalita D., Suresh A.K., Kane S.G., Bellare J.R. Why extreme dilutions reach non-zero asymptotes: a nanoparticulate hypothesis based on froth flotation. *Langmuir*. 2012;28(45):15864–15875. https://doi.org/10.1021/la303477s

25. Vainshtein B.K. *Sovremennaya kristallografiya*: v 4 t. T. 3. *Obrazovanie kristallov* (*Modern Crystallography*: in 4 v. Vol. 3. *Formation of Crystals*). Moscow: Nauka; 1980. 408 p. (in Russ.).

26. Koldobskaya M.F., Gavrilova I.V. Growing large faceted TGS crystals in laboratory conditions. In: *Rost kristallov* (*Crystal Growth*). Moscow: AN USSR; 1961. V. 3. P. 278–282 (in Russ.).

27. Malekfar R., Daraei A. Raman scattering and electrical properties of TGS:PCo (9%) crystal as ambient temperature IR detector. *Acta Physica Polonica A.* 2008;114(4):859–867. http://doi.org/10.12693/APhysPolA.114.859

28. Zheludev I.S. *Physics of Crystalline Dielectrics.* V. 1. *Crystallography and Spontaneous Polarization*. New York: Springer; 1971. 346 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8076-4

29. Krauklis I.V., Tulub A.V., Golovin A.V., *et al*. Raman spectra of glycine and their modeling in terms of the discrete–continuum model of their water solvation shell. *Opt. Spectrosc.* 2020;128(10):1598–1601. https://doi.org/10.1134/S0030400X20100161

[Original Russian Text: Krauklis I.V., Tulub A.V., Golovin A.V., Chelibanov V.P. Raman spectra of glycine and their modeling in terms of the discrete–continuum model of their water solvation shell. *Optika i Spektroskopiya.* 2020;128(10):1488–1491 (in Russ.). https://doi.org/10.21883/OS.2020.10.50019.161-20]

30. Gavrilova N.D., Malyshkina I. A. The influence of changes in the structure of hydrogen bonds of water on the electrophysical properties of matrix-water systems in stepwise heating. *Moscow Univ. Phys.* 2018;73(6):651–658. https://doi.org/10.3103/S0027134918060127

[Original Russian Text: Gavrilova N.D., Malyshkina I. A. The influence of changes in the structure of hydrogen bonds of water on the electrophysical properties of matrix-water systems in stepwise heating. *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 3. Fizika. Astronomiya.* 2018;(6):74–80 (in Russ.). URL: http://vmu.phys.msu.ru/file/2018/6/18-6-074.pdf]

Об авторах:

Степанов Герман Олегович, к.б.н., ведущий научный сотрудник, ООО «НПФ «Материа Медика Холдинг» (129272, Россия, Москва, ул. Трифоновская, д. 47, стр. 1). E-mail: stepanovgo@materiamedica.ru. Scopus Author ID 15046034100, https://orcid.org/0000-0002-8576-9745

Родионова Наталья Николаевна, к.б.н., руководитель физико-химических исследований, ООО «НПФ «Материа Медика Холдинг» (129272, Россия, Москва, ул. Трифоновская, д. 47, стр. 1). E-mail: rodionovann@materiamedica.ru. https://orcid.org/0009-0001-7138-9063

Константинов Роман Романович, научный сотрудник, ООО «НПФ «Материа Медика Холдинг» (129272, Россия, Москва, ул. Трифоновская, д. 47, стр. 1). E-mail: konstantinovrr@materiamedica.ru. https://orcid.org/0009-0000-6692-2583

Субботин Кирилл Анатольевич, к.т.н., заведующий отделом лазерных кристаллов и твердотельных лазеров, ФГБУН ФИЦ «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук» (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 38); доцент кафедры химии и технологии кристаллов, ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» (125047, Россия, Москва, Миусская пл. д. 9). E-mail: soubbot1970@gmail.com. Scopus Author ID 6701562918, SPIN-код РИНЦ 7976-1488, https://orcid.org/0000-0001-9590-7403

About the authors:

German O. Stepanov, Cand. Sci. (Biol.), Senior Research, Materia Medica Holding, (47-1, Trifonovskaya ul., Moscow, 129272, Russia). E-mail: stepanovgo@materiamedica.ru. Scopus Author ID 15046034100, https://orcid.org/0000-0002-8576-9745

Natalia N. Rodionova, Cand. Sci. (Biol.), Head of Physicochemical Research, Materia Medica Holding, (47-1, Trifonovskaya ul., Moscow, 129272, Russia). E-mail: rodionovann@materiamedica.ru. https://orcid.org/0009-0001-7138-9063

Roman R. Konstantinov, Researcher, Materia Medica Holding, (47-1, Trifonovskaya ul., Moscow, 129272, Russia). E-mail: konstantinovrr@materiamedica.ru. https://orcid.org/0009-0000-6692-2583

Kirill A. Subbotin, Cand. Sci. (Eng.), Head of the Department of Laser Crystals and Solid-State Lasers, Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences (38, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia); Associate Rofessor, Department of Chemistry and Technology of Crystals, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (9, Miusskaya pl., Moscow, 125047, Russia). E-mail: soubbot1970@gmail.com. Scopus Author ID 6701562918, RSCI SPIN-code 7976-1488, https://orcid.org/0000-0001-9590-7403

Поступила: 06.10.2023; получена после доработки: 03.11.2023; принята к опубликованию: 24.11.2023.
The article was submitted: October 06, 2023; approved after reviewing: November 03, 2023; accepted for publication: November 24, 2023.