

ISSN 2075-3810

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Біофізичний Вісник

1'16

Biophysical Bulletin

2016

ISSN 2075-3810

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF UKRAINE
V.N. Karazin Kharkiv National University

Біофізичний Вісник Biophysical Bulletin

Випуск 35 (1) Issue

Заснований 1998 р.

Founded in 1998

Харків 2016 Kharkiv

Журнал публікує статті, короткі повідомлення та огляди, які містять оригінальні результати розв'язання фізико-математичних проблем, що відносяться до біологічних систем різного рівня організації, методами сучасної біології, фізики та математичного моделювання.

Для науковців, викладачів, аспірантів, студентів, що працюють у галузі біофізики та суміжних областях.

Журнал є фаховим виданням у галузі фізико-математичних та біологічних наук (Наказ МОН України № 1328 від 21.12.2015 р.).

The journal publishes articles, short communications and reviews that contain original results of physical and mathematical problems related to biological systems of various complexity levels solved with the help of modern life sciences methods and computer simulation.

Затверджено до друку рішенням Вченої ради Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна (протокол № 13 від 31 жовтня 2016 р.).

Редакційна колегія:

головний редактор –

Горбенко Г.П. – д.ф.-м.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

заступник головного редактора –

Катрич В.О. – д.ф.-м.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

Баранник Є.О. – д.ф.-м.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

Бондаренко В.А. – д.б.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

Веселовський М.С. – д.б.н., проф., акад. НАН України,

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця, м. Київ

Говорун Д.М. – д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України,

ІМБГ НАН України, м. Київ

Делігеоргієв Т. – PhD., проф., Софійський університет,

Софія, Болгарія

Доманов Є.О. – PhD., завідувач відділу біофізики шкіри,

L'Oréal, Париж, Франція

Доран О. – PhD., проф., Університет Західної Англії,

Бристоль, Велика Британія

Карачевцев В.О. – д.ф.-м.н., проф., ФТІНТ

ім. Б.І. Веркіна НАН України

Кірілова Є. – PhD., доцент, Даугавпілський університет,

Даугавпілс, Латвія

Кнігавко В.Г. – д.б.н., проф., ХНМУ

Корнелюк О.І. – д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України,

ІМБІГ НАН України, м. Київ

Косевич М.В. – д.ф.-м.н., пров.н.с.,

ФТІНТ ім. Б.І. Веркіна НАН України

Малєєв В.Я. – д.ф.-м.н., проф., ІРЕ ім. О.Я. Усикова

НАН України

Мартиненко О.В. – д.ф.-м.н., проф.,

ХНУ імені В.Н. Каразіна

Осецький О.І. – д.ф.-м.н., проф., ІПКіК НАН України

Перський Є.Е. – д.б.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

Семенов М.О. – д.ф.-м.н., проф.,

ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАН України

Сибірний А.А. – д.б.н., проф., акад. НАН України,

Інститут біології клітини, м. Львів

Сорокін В.О. – д.ф.-м.н., проф.,

ФТІНТ ім. Б.І. Веркіна НАН України

Стойка Р.С. – д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України,

Інститут біології клітини, м. Львів

Суходуб Л.Ф. – д.ф.-м.н., проф., чл.-кор. НАН України,

Сумський державний університет

Толсторуків М.Є. – Ph.D., Масачусетський загально-

клінічний госпіталь, Бостон, США

Трусова В.М. – д.ф.-м.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

Шестопалова Г.В. – д.ф.-м.н., проф.,

ІРЕ ім. О.Я. Усикова НАН України

Шкорбатів Ю.Г. – д.б.н., проф., ХНУ імені В.Н. Каразіна

відповідальний секретар –

Берест В.П. – к.ф.-м.н., доц., ХНУ імені В.Н. Каразіна

Editorial Board:

Editor-in-Chief –

G.P. Gorbenko – Dr. Sci., Prof., V.N.Karazin KhNU

Vice Editor-in-Chief –

V.A. Katrich – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

E.A. Barannik – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

V.A. Bondarenko – Dr.Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

N.S. Veselovsky – Dr .Sci., Prof., academician of NASU,

Bogomoletz Institute of Physiology of NASU, Kiev

D.M. Govorun – Dr. Sci., Prof., corresponding member

of NASU, IMBG NASU, Kiev

T. Deligeorgiev – PhD., Prof., University of Sofia,

Sofia, Bulgaria

Ye.A. Domanov – PhD., Head of Skin Biophysics Unit

at L'Oréal R&I, Région de Paris, France

O. Doran – PhD., Professor, University of the West of

England, Bristol, UK

V.A. Karachevtsev – Dr.Sci., Prof.,

B. Verkin ILTPI NASU

E. Kirilova – PhD., Associate Prof., Daugavpils

University, Daugavpils, Latvia

V.G. Knigavko – Dr. Sci., Prof., KhNMU

A.I. Kornelyuk – Dr. Sci., Prof., corresponding member

of NASU, IMBG NASU, Kiev

M.V. Kosevich – Dr. Sci., Leading research fellow,

B. Verkin ILTPI NASU

V.Ya. Maleev – Dr. Sci., Prof., O.Ya. Usikov IRE NASU

A.V. Martynenko – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

A.I. Osetski – Dr. Sci., Prof., IPC&C NASU

Ye.E. Semskiy – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

M.A. Semenov – Dr. Sci., Prof., O.Ya. Usikov IRE NASU

A.A. Sybirny – Dr. Sci., Prof., academician of NASU,

Institute of Cell Biology, Lviv

V.A. Sorokin – Dr. Sci., Prof., B. Verkin ILTPI NASU

R.S. Stoika – Dr. Sci., Prof., corresponding member of

NASU, Institute of Cell Biology, Lviv

L.F. Sukhodub – Dr. Sci., Prof., corresponding member of

NASU, Sumy State University, Sumy

M.Ye. Tolstorukov – Ph.D., Assistant In Molecular

Biology, Massachusetts General

Hospital Instructor, Harvard Medical

School, Boston, USA

V.M. Trusova – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

A.V. Shestopalova – Dr. Sci., Prof.,

O.Ya. Usikov IRE NASU

Yu.G. Shkorbatov – Dr. Sci., Prof., V.N. Karazin KhNU

Executive Secretary –

V.P. Berest – PhD., Associate Prof., V.N. Karazin KhNU

Статті пройшли внутрішнє та зовнішнє рецензування.

Свідоцтво про державну реєстрацію КВ № 11007 від 17.02.2006

ЗМІСТ

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

- М.А. Бондаренко, В.Г. Книгавко, Н.А. Гордиенко, О.В. Зайцева, Т.Р. Кочарова** 5-9
 Математическое моделирование распределения в человеческой популяции генов, повреждение которых индуцирует онкологические заболевания

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

- К.А. Аверченко, Н.С. Кавок, С.Л. Єфімова** 10-20
 Щодо механізмів впливу редоксактивних наночастинок на основі рідкісноземельних елементів на редокс-процеси в мітохондріях

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

- D.M. Glibitskiy, G.M. Glibitskiy, M.A. Semenov, A.V. Shestopalova** 21-27
 Textures of BSA films with iron and copper ions
- О.О. Горобченко, Н.О. Шевченко, О.В. Ліпіна, О.Т. Ніколов, І.Б. Мусатова** 28-33
 Діелектрична проникність здатних до вітрифікації кріозахисних середовищ
- М.А. Popirny, O.T. Nikolov, E.V. Skrylnik** 34-45
 Effect of soil tillage intensity on the composition, physical and chemical properties of the second fraction of humic acids extracted from the typical black soil

ХРОНІКА

- Пам'яті Євгена Олександровича Гордієнка 46-47

Шановні автори, будь ласка, посилайтесь на статті з цього журналу таким чином:

1. Автор І.П. Назва статті / І.П. Автор // Біофізичний вісник. – 2016. – Вип. 1 (35). – С. 80-86.
2. Lastname N.M. Title / N.M. Lastname // Biophysical Bulletin. – 2015. – V. 1 (35). – P. 80-86.

CONTENTS**BIOPHYSICS OF COMPLEX SYSTEMS**

- M.A. Bondarenko, V.G. Knigavko, N.O. Gordiyenko, O.V. Zaytseva,
T.R. Kocharova** 5-9
Mathematical modelling of distribution of genes the damage of which leads to
oncologic diseases in human population

CELL BIOPHYSICS

- K.A. Averchenko, N.S. Kavok, S.L. Yefimova** 10-20
Concerning the mechanisms of influence of redox-active nanoparticles
based on rare-earth elements on the redox-processes in mitochondria

MOLECULAR BIOPHYSICS

- D.M. Glibitskiy, G.M. Glibitskiy, M.A. Semenov, A.V. Shestopalova** 21-27
Textures of BSA films with iron and copper ions
- O.A. Gorobchenko, N.O. Shevchenko, O.V. Lipina, O.T. Nikolov,
I.B. Musatova** 28-33
Dielectric permittivity of vitrification capable cryoprotective media
- M.A. Popirny, O.T. Nikolov, E.V. Skrylnik** 34-45
Effect of soil tillage intensity on the composition, physical and chemical
properties of the second fraction of humic acids extracted from
the typical black soil

CHRONICLE

- In memory of Yevhen Oleksandrovych Gordienko 46-47

УДК 577.3:616-006:575.17:519.22/25

**МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ В
ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ГЕНОВ, ПОВРЕЖДЕНИЕ КОТОРЫХ
ИНДУЦИРУЕТ ОНКОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ****М.А. Бондаренко, В.Г. Книгавко, Н.А. Гордиенко, О.В. Зайцева, Т.Р. Кочарова***Харьковский национальный медицинский университет, пр. Науки, 4, Харьков, 61022, Украина*e-mail: *vkng@mail.ru*

Поступила в редакцию 1 марта 2016 года

Принята 17 марта 2016 года

Объектом исследования является канцерогенез. Целью исследования является создание математической модели канцерогенеза, позволяющей оценить распределения в человеческой популяции числа тех генов, повреждение которых является причиной образования онкологических заболеваний (а-генов). Основной задачей является построение такой вероятностной математической модели, которая описывает квазистационарное равновесие двух противоположных процессов, а именно: 1) процесса сокращения в популяции числа вышеуказанных генов вследствие их мутационного повреждения; 2) увеличение в популяции числа этих генов за счет того, что индивиды, имеющие малое число таких генов в их генотипе, с большей вероятностью приобретают онкологические заболевания на ранних стадиях жизни и не успевают до смерти осуществить репродукцию, и поэтому рост общей численности популяции идет больше за счет репродукции индивидов с высоким числом а-генов. Оценка распределения таких генов в популяции проводилась путем определения вероятности того, что наугад выбранный из популяции индивид будет иметь одно из возможных значений (по литературным данным, от 0 до 8) числа вышеуказанных генов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: канцерогенез, стволовые клетки, повреждения генов, математическое моделирование, распределение генов в популяции.

**MATHEMATICAL MODELLING OF DISTRIBUTION OF GENES THE DAMAGE OF WHICH
LEADS TO ONCOLOGIC DISEASES IN HUMAN POPULATION****M.A. Bondarenko, V.G. Knigavko, N.O. Gordiyenko, O.V. Zaytseva, T.R. Kocharova***Kharkiv National Medical University, Nauky ave., 4, 61022 Kharkiv, Ukraine*

Carcinogenesis is subject of the research. The research aims at creating the mathematical model of carcinogenesis allowing assessing the distribution in human population of the genes which when damaged lead to oncology diseases. The main task is to build a probability mathematical model describing the quasistationary equilibrium of two contrary processes, and namely: 1) the process of reduction in population of the number of the aforesaid genes due to their mutative damage; 2) increase in population of the number of these genes due to the fact that persons with a few genes of the kind in their genotype acquire oncological diseases with higher probability at early stages of their lives and do not manage to reproduce themselves before they die, and so the growth of the total population size is more due to the reproduction of individuals with a high number of the a-genes. Assessment of the distribution of these genes in the population was carried out by determining the probability that a randomly selected individual from the population has one of the possible values (according to the literature, from 0 to 8) of the aforementioned genes.

KEY WORDS: carcinogenesis, stem cells, genes damage, mathematical modelling, distribution of genes in a population.

**МАТЕМАТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ РОЗПОДІЛУ В ЛЮДСЬКІЙ ПОПУЛЯЦІЇ ГЕНІВ,
ПОШКОДЖЕННЯ ЯКИХ ІНДУКУЄ ОНКОЛОГІЧНІ ЗАХВОРЮВАННЯ****М.А. Бондаренко, В.Г. Книгавко, Н.О. Гордієнко, О.В. Зайцева, Т.Р. Кочарова***Харківський національний медичний університет, пр. Науки, 4, Харків, 61022, Україна*

Об'єктом дослідження є канцерогенез. Метою дослідження є створення математичної моделі канцерогенезу, що дозволить оцінити розподіл в людській популяції кількості тих генів, пошкодження яких є причиною виникнення онкологічних захворювань. Основним завданням є побудова такої імовірнісної математичної моделі, яка описує квазістаціонарну рівновагу двох протилежних процесів, а саме: 1) процесу скорочення в популяції кількості вищевказаних генів внаслідок їх мутационного пошкодження; 2) збільшення в популяції кількості цих генів за рахунок

того, що індивіди, які мають малу кількість таких генів в їхньому генотипі, з більшою імовірністю набувають онкологічних захворювань на ранніх стадіях життя і не встигають до смерті здійснити репродукцію, і тому зростання загальної чисельності популяції йде більше за рахунок репродукції індивідів з високим числом а-генів. Оцінка розподілу таких генів в популяції проводилася шляхом визначення ймовірності того, що навмання вибраний з популяції індивід має одне з можливих значень (за літературними даними, від 0 до 8) числа вищевказаних генів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: канцерогенез, стовбурові клітини, пошкодження генів, математичне моделювання, розподіл генів в популяції.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧИ

В литературе [1] уже достаточно давно высказывается мнение о том, что необходимым условием возникновения онкологического заболевания индивида является образование стволовой клетки с нестабильным генотипом, что, в свою очередь связано с повреждением в этой клетке некоторых определенных генов. Предполагается также, что указанные гены – это гены, участвующие в репарации поврежденных ДНК клеток и число этих генов не более 8. Далее эти гены будем называть а-генами.

В работе [2], исходя из вышеуказанных соображений, была построена математическая модель процесса канцерогенеза, позволившая получить математические выражения для таких вероятностных характеристик этого процесса, как функция распределения времени образования опухоли, плотность вероятности времени образования опухоли, среднее и наиболее вероятное значения времени образования опухоли.

Вместе с тем, очевидно, что вследствие мутационного повреждения указанных генов, имеющего случайный характер, число а-генов в генотипах разных индивидов является разным, причем 8 – это максимально возможное значение числа а-генов. Очевидно также, что в процессе жизни индивида число его а-генов будет или уменьшаться, или (что менее вероятно) оставаться постоянным.

Учитывая, что в настоящее время наблюдается возрастание онкологической заболеваемости, весьма актуальной становится проблема оценки распределения в человеческой популяции индивидов с разными значениями числа а-генов. Говоря об оценке этого распределения, мы имеем в виду определение вероятностей того, что наугад выбранный из популяции индивид имеет в генотипе определенное количество (от нуля до восьми) а-генов. Это распределение, разумеется, изменяется со временем, но изменяется очень медленно, то есть является квазистационарным. Поэтому можно с достаточной точностью считать его стационарным, то есть считать, что вероятность обнаружения генотипа с определенным количеством а-генов является величиной постоянной.

Стационарность распределения определяется тем, что в популяции происходят одновременно два противоположно направленных процесса: 1) мутации уменьшают число а-генов в генотипе индивида; 2) у индивидов с исходно малым количеством а-генов в какой-то стволовой клетке достаточно рано повреждаются все а-гены, происходит малигнизация клетки, возникает онкологическое заболевание до репродукции (до рождения ребенка) и этот индивид элиминируется из популяции.

Дальнейшее изложение целесообразно проводить, анализируя изменения со временем числа а-генов в геноме индивида.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Поскольку максимальное количество а-генов у человека равно 8, то количество таких генов в гамете может принимать значения от 0 до 4.

Поскольку гаметы сохраняют свою индивидуальность в составе диплоидной клетки, в дальнейшем изложении можно, главным образом, анализировать процессы,

происходящие с гаметой в течение времени от предыдущей репродукции до следующей. Будем называть это время репродуктивным периодом.

Вероятность сохранения гаметы зависит как от времени репродукции (возраста родителей), так и от длительности жизни индивида. Факторы, влияющие на продолжительность жизни, можно подразделить на те, что связаны с онкологическими заболеваниями, и те, что с этими заболеваниями не связаны. В свою очередь, длительность жизни онкологического больного и возможность репродукции зависят от эффективности лечения. В дальнейшем изложении необходимо учитывать все эти факторы. Для построения вероятностной математической модели распределения числа а-генов в человеческой популяции введем следующие обозначения.

Пусть N – число стволовых клеток организма, t – время, прошедшее после образования гаметы, α – вероятность повреждения какого-либо а-гена в одном цикле деления; $\beta = 1 - \alpha$; n – число циклов деления от момента образования гаметы; k – начальное число а-генов в клетке; T – средняя продолжительность клеточного цикла. Пусть также m – начальное число а-генов в гамете, $\phi(m)$ – вероятность того, что при образовании гаметы в ней содержалось m а-генов; $\psi(m)$ – вероятность того, что к моменту следующей для данной гаметы репродукции в гамете содержатся m а-генов; $s(t)$ – функция распределения длительности жизни индивидов, не имеющих онкологического заболевания; $v(\tau)$ – плотность вероятности времени репродукции; $\Phi(m, t)$ – функция распределения времени появления злокачественного заболевания при изначальной наявности в гамете m а-генов; $F(k, t)$ – функция распределения времени появления злокачественного заболевания при исходном наличии в генотипе индивида k а-генов; L – вероятность излечения онкологического больного.

Проанализируем процессы сохранения числа а-генов и изменения этого числа в гаметах со временем.

Рассчитаем сначала вероятность того, что гамета, изначальное содержащая 4 а-гена, сохранила до следующей репродукции все эти 4 а-гена. Обозначим эту вероятность как $P_{4 \rightarrow 4}$. Для сохранности гаметы необходимо, чтобы в течение времени до следующей репродукции выполнялись такие условия: мутации в течение этого времени не повредили ни один из а-генов в гамете, продолжительность жизни индивида была больше этого же времени, индивид за это время не приобрел онкологическое заболевание, либо приобрел, но вылечился.

Вероятность того, что репродукция произойдет в момент времени t (точнее в интервале времени от t до $t + dt$), равна $v(t)dt$. Вероятность того, что индивид еще жив к этому моменту, равна $1 - s(t)$. Вероятность того, что за это время ни один из а-генов в гамете не будет поврежден, равна, как это показано в работе [2], такому выражению:

$\beta^{\frac{4t}{T}}$. Вероятность того, что индивид, имеющий эту гамету, к моменту t не приобретет онкологическое заболевание, равна $1 - \Phi(4, t)$. Вероятность же того, что к этому же моменту индивид приобретет онкологическое заболевание, но затем выздоровеет, равна $\Phi(4, t) \cdot L$. Отсюда:

$$\psi(4) = \phi(4)P_{4 \rightarrow 4} = \phi(4) \int_0^{\infty} \beta^{\frac{4t}{T}} v(t) \cdot (1 - s(t)) \cdot (1 - \Phi(4, t)) \cdot (1 - L) dt, \quad (1)$$

где

$$\Phi(m, t) = \sum_{i=0}^4 (\phi(i)F((i + m), t)), \quad (2)$$

а

$$F(t) = 1 - \left(1 - \left(1 - \beta^{\frac{t}{T}} \right)^k \right)^N. \quad (3)$$

Пусть

$$f(m, t) = v(t) \cdot (1 - s(t)) \cdot (1 - \Phi(m, t)) \cdot (1 - L). \quad (4)$$

Тогда формулу (1) можно записать в следующем виде:

$$\psi(4) = \phi(4)P_{4 \rightarrow 4} = \phi(4) \int_0^{\infty} \beta^{\frac{4t}{T}} f(4, t) dt. \quad (5)$$

Теперь определим вероятность того, что к моменту репродукции гамета содержит 3 а-гена. Такое случайное событие может быть следствием либо процесса $4 \rightarrow 3$, либо процесса $3 \rightarrow 3$.

Процесс $3 \rightarrow 3$ описывается формулой, подобной формуле (5):

$$P_{3 \rightarrow 3} = \int_0^{\infty} \beta^{\frac{3t}{T}} f(3, t) dt. \quad (6)$$

Процесс $4 \rightarrow 3$ описывается следующей формулой:

$$P_{4 \rightarrow 3} = \int_0^{\infty} 4\beta^{\frac{3t}{T}} \left(1 - \beta^{\frac{t}{T}} \right) f(3, t) dt. \quad (7)$$

Таким образом, вероятность обнаружить к началу следующей репродукции гамету, содержащую 3 а-гена, равна:

$$\psi(3) = \phi(4)P_{4 \rightarrow 3} + \phi(3)P_{3 \rightarrow 3} = \int_0^{\infty} \beta^{\frac{3t}{T}} \left(\phi(3) + 4\phi(4) \left(1 - \beta^{\frac{t}{T}} \right) \right) f(3, t) dt. \quad (8)$$

Аналогично можно получить выражения также для $\psi(2)$, $\psi(1)$ и $\psi(0)$.

В частности, $\psi(2) = \phi(2)P_{2 \rightarrow 2} + \phi(3)P_{3 \rightarrow 2} + \phi(4)P_{4 \rightarrow 2}$.

В общем случае можно записать:

$$\psi(m) = \int_0^{\infty} \beta^{\frac{mt}{T}} \chi(m, t) f(m, t) dt,$$

где

$$\chi(m, t) = \left(\sum_{i=0}^{4-m} \left(\phi(4-i) \frac{(4-i)!}{m!(4-m-i)!} \left(1 - \beta^{\frac{t}{T}} \right)^{4-m-i} \right) \right).$$

Очевидно, что $\sum_{m=0}^4 \phi(m) = 1$. Также очевидно, что $\sum_{m=0}^4 \psi(m) < 1$, поскольку в последней сумме не содержатся вероятности событий, приводящих к элиминации гамет. Вместе с тем, выражение $\frac{\phi(m)}{\psi(m)}$ должно быть одинаковым для всех возможных значений m . Поэтому связь между величинами $\phi(m)$ и $\psi(m)$ имеет вид:

$$\phi(m) = \frac{\psi(m)}{\sum_{m=0}^4 \psi(m)}.$$

Если известны значения величин $s(t)$, $v(t)$, $\Phi(m, t)$ и величины L , то последняя формула представляет собой систему уравнений, позволяющую рассчитать численные значения величин $\phi(m)$, что в свою очередь позволяет рассчитать искомые значения

величин $p(k)$, которые и являются вероятностями, определяющими распределение людей по количеству а-генов в их генотипах. При этом используются следующие формулы:

$$\begin{aligned} p_0 &= \phi(0)^2; & p_1 &= 2\phi(0)\phi(1); & p_2 &= 2\phi(0)\phi(2) + \phi(1)^2; \\ p_3 &= 2(\phi(0)\phi(3) + \phi(1)\phi(2)); & p_4 &= 2(\phi(0)\phi(4) + \phi(1)\phi(3)) + \phi(2)^2; \\ p_5 &= 2(\phi(1)\phi(4) + \phi(2)\phi(3)); & p_6 &= 2\phi(2)\phi(4) + \phi(3)^2; \\ p_7 &= 2\phi(3)\phi(4); & p_8 &= \phi(4)^2, \end{aligned}$$

где p_i – вероятность наличия i генов в генотипе индивида при рождении, а $\phi(j)$ – вероятность наличия j генов в гамете этого индивида при рождении.

Подводя итоги, можно сделать вывод о том, что вышеприведенная математическая модель может быть использована для определения распределения а-генов в человеческой популяции. Однако определение численного значения вероятности обнаружить индивида с определенным значением числа а-генов в генотипе требует знания численных значений ряда параметров модели, в частности, α , T , $s(t)$, $v(\tau)$, L , N . И, если значения параметров T , $s(t)$, $v(\tau)$ и L можно с неплохой точностью оценить, то значения остальных параметров в настоящее время оценить трудно, и для их оценки необходимы дополнительные исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гродзинський Д.М. Радіобіологія / Д.М. Гродзинський. - К.: Либідь, 2000. – 448 с. / Grodzins'kij D.M. Radiobiologija / D.M. Grodzins'kij. - K.: Libid', 2000. – 448 s.
2. Книгавко В.Г. Математическое моделирование канцерогенеза / В.Г. Книгавко, Е.Б. Радзишевская, М.А. Бондаренко // Біофізичний вісник. – 2010, № 25(2). – С. 93 -100. / Knigavko V.G. Matematicheskoe modelirovanie kancerogeneza / V.G. Knigavko, E.B. Radzishevskaja, M.A. Bondarenko // Biofizichnij visnik. – 2010, N 25(2). – S. 93 -100.

УДК 546.65-022.532:577.337

ЩОДО МЕХАНІЗМІВ ВПЛИВУ РЕДОКСАКТИВНИХ НАНОЧАСТИНОК НА ОСНОВІ РІДКІСНОЗЕМЕЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ НА РЕДОКС-ПРОЦЕСИ В МІТОХОНДРІЯХ

К.А. Аверченко*, Н.С. Кавок, С.Л. Єфімова

Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, пр. Науки 60, Харків, 61001, Україна

Тел: +380573410332

e-mail: averchenko@isma.kharkov.ua

Надійшла до редакції 26 травня 2016 року

Прийнята 9 червня 2016 року

За допомогою кінетичної обчислювальної моделі, що демонструє залежність генерації активних форм кисню (АФК) комплексами I і III дихального ланцюга мітохондрій (МХ) від величини мітохондріального потенціалу, рН матриксу, наявності різних дихальних субстратів та інгібіторів, а також даних, отриманих експериментально, запропоновані основні механізми впливу наночастинок (НЧ) на основі рідкісноземельних елементів (РЗЕ) на біоенергетичні процеси в МХ. Розглянуто такі показники, як мітохондріальний потенціал, процеси дихання та окислювального фосфорилування, рівень АТФ в МХ після дії частинок, а також здатність НЧ впливати на генерацію АФК в дихальному ланцюгу МХ. Запропоновано два основні механізми впливу редоксактивних НЧ на основі РЗЕ на редокс-процеси в МХ: перший механізм передбачає інгібування транспорту електронів і активацію утворення супероксиду та пероксиду водню, другий – інтеграцію НЧ в електрон-транспортні процеси в МХ у якості донорів або акцепторів електронів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: редоксактивні наночастинки, мітохондрії, активні форми кисню.

О МЕХАНИЗМАХ ВЛИЯНИЯ РЕДОКСАКТИВНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ НА РЕДОКС-ПРОЦЕССЫ В МИТОХОНДРИЯХ

К.А. Аверченко*, Н.С. Кавок, С.Л. Ефимова

Институт сцинтиляционных материалов НАН Украины, пр. Науки 60, Харьков, 61001, Украина

С помощью кинетической вычислительной модели, которая демонстрирует зависимость генерации активных форм кислорода (АФК) комплексами I и III дыхательной цепи митохондрий (МХ) от величины митохондриального потенциала, рН матрикса, наличия различных дыхательных субстратов и ингибиторов, а также данных, полученных экспериментально, предложены основные механизмы воздействия наночастиц (НЧ) на основе редкоземельных элементов (РЗЭ) на биоэнергетические процессы в МХ. Рассмотрены такие показатели, как митохондриальный потенциал, процессы дыхания и окислительного фосфорилирования, уровень АТФ в МХ после воздействия частиц, а также способность НЧ влиять на генерацию АФК в дыхательной цепи МХ. Предложены два основных механизма влияния редоксактивных НЧ на основе РЗЭ на редокс-процессы в МХ: первый механизм предполагает ингибирование транспорта электронов и активацию образования супероксидов и пероксида водорода, второй – интеграцию НЧ в электрон-транспортные процессы в МХ в качестве доноров или акцепторов электронов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: редоксактивные наночастицы, митохондрии, активные формы кислорода.

CONCERNING THE MECHANISMS OF INFLUENCE OF REDOX-ACTIVE NANOPARTICLES BASED ON RARE-EARTH ELEMENTS ON THE REDOX-PROCESSES IN MITOCHONDRIA

K.A. Averchenko¹, N.S. Kavok, S.L. Yefimova

Institute for Scintillation Materials National Academy of Sciences of Ukraine, 60 Nauky Ave., Kharkiv, 61001, Ukraine

Using the kinetic computation model, which demonstrates the dependence of generation of reactive oxygen species (ROS) by complexes I and III of mitochondrion respiration chain on the values of mitochondrial potential, pH of matrix, presence of different respiratory substrates and inhibitors, and data obtained experimentally, the basic mechanisms of the influence of nanoparticles (NPs) on the basis of rare earth elements on the bioenergetic processes in the mitochondria have been proposed. The mitochondrial potential, the processes of respiration and oxidative phosphorylation, as well as the ability

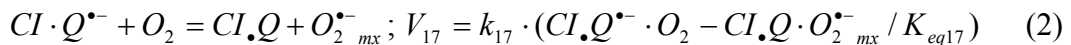
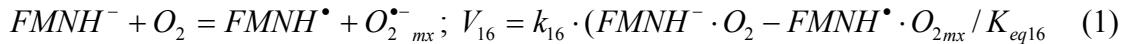
of NPs to have an influence on the generation of ROS in the respiratory chain of mitochondria have been investigated. We propose two main mechanisms of the influence of the redox-active NPs based on the rare earth elements on the redox-processes in the mitochondria: the first mechanism involves the inhibition of electron transport and activation of the formation of superoxide and hydrogen peroxide, the second - integration of NPs into the electron-transport processes in the mitochondria as donors or acceptors of electrons

KEY WORDS: redox-active nanoparticles, mitochondria, reactive oxygen species.

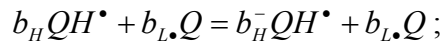
Де кілька останніх десятиріч супроводжуються підвищеним інтересом до нанотехнологій та наноматеріалів (НМ). В багатьох дослідженнях НМ розглядаються як потенційні лікарські засоби. Значна увага приділяється редоксактивним наночастинкам (НЧ) з антиоксидантними властивостями, які здатні до саморегенерації, у зв'язку з тим, що оксидативний стрес грає ключову роль у виникненні патологій та старінні організму. Одним з яскравих прикладів таких НЧ є діоксид церію, який у нанокристалічному стані характеризується суттєвою кисневою нестехіометрією і має велику концентрацію Ce^{3+} іонів, в тому числі і на поверхні частинки. Доступність Ce^{3+} іонів для активних форм кисню (АФК), здатність змінювати валентність (3^+ або 4^+), а також наявність великої кількості кисневих вакансій визначає редоксактивність та унікальні антиоксидантні властивості церія. Перспективними для антиоксидантної терапії також вважаються інші типи редоксактивних НЧ на основі рідкісноземельних елементів (РЗЕ). Завдяки наявності в кристалічній решітці іонів зі змінною валентністю, активовані європієм НЧ на основі ортованадатів РЗЕ, так само є редоксактивними і можуть залучатися до різних окислювально-відновних процесів та впливати на рівень АФК. В живих клітинах головним джерелом і мішенню для АФК є мітохондрії (МХ) [1]. Основними рисами оксидативного пошкодження із залученням мітохондріальної ланки є мітохондріальна недостатність внаслідок відкриття мітохондріальної пори, деполаризація мембрани МХ, гальмування синтезу АТФ, окислення відновленого глутатіону (GSH) та тіолових груп білків. Канцерогенез, нейродегенеративні та кардіоваскулярні захворювання, діабет асоціюються з порушенням мітохондріальної функції та підвищенням концентрації АФК. Питання щодо впливу редоксактивних НЧ на процеси генерації АФК та біоенергетичну функцію МХ нерозривно пов'язані між собою. Тому побудова адекватної фізичної моделі, яка описує вплив редоксактивних НЧ на процеси переносу електронів в мітохондріальному дихальному ланцюзі та генерацію АФК є актуальною задачею у фундаментальному і прикладному сенсі.

Дихальний ланцюг внутрішньої мембрани МХ є унікальною сукупністю білкових комплексів, які переносять електрони на молекулярний кисень, щоб сформувати протон-рушійну силу в якості основного джерела енергії для клітинного синтезу АТФ. Електрон-транспортний ланцюг (ЕТЛ) на внутрішній мембрані МХ є основним джерелом АФК. Так, наприклад, комплекси I і III ЕТЛ є основними джерелами супероксиду ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [2]. При цьому необхідно враховувати, що значення мітохондріального потенціалу, рН середовища, наявність або відсутність інгібіторів, які здатні порушувати функціонування комплексів, важливі для отримання достовірних даних. Так само одним з невирішених питань є генерація АФК при інгібуванні різних сегментів дихального ланцюга. З урахуванням застосування НМ і редоксактивних НЧ зокрема, це питання потребує вирішення. Оскільки тільки експериментальних даних для опису такої складної системи, як дихальний ланцюг, недостатньо, для дослідження всіх біоенергетичних процесів в МХ успішно застосовуються математичні комп'ютерні моделі, які описують теоретичні і експериментальні дані. Існують класичні моделі [3,4], які описують процеси, що відбуваються в дихальному ланцюзі МХ, і стандартні кінетичні моделі для опису найбільш важливих шляхів перенесення електронів в

комплексах I і III [5-11]. Так, наприклад, автори [12,13] експериментально показали, що при інгібуванні комплексу III антимиціном А (АА) основний внесок в генерацію $O_2^{\bullet-}$ належить Q_0 -сайту через перенесення електронів від окисненого цитохрому b_L до Q і зворотних реакцій в Q_0 -сайті. Автори [14] для ізольованого комплексу I припустили, що $O_2^{\bullet-}$ формується при перенесенні одного електрона від повністю окисненого флавіну на кисень згідно реакціям (1), (2) [5].



Кінетична схема, запропонована авторами [15, 16] описує етапи перенесення електронів в комплексі III. Також існує гіпотеза [17], що характеризує формування $O_2^{\bullet-}$ та перенос електронів в комплексі III дещо інакше. Автори [5] проаналізували і врахували раніше впроваджені моделі і запропонували свою обчислювальну модель, що одержала експериментальне підтвердження. Дана модель демонструє залежність генерації АФК комплексами I і III дихального ланцюга МХ від мітохондріального потенціалу, рН матриксу, наявності різних дихальних субстратів, а так само інгібітора АА. Можна припустити, що НЧ, інтеркалюючи в дихальний ланцюг і порушуючи перенесення електронів (за рахунок редоксактивності), або блокуючи взаємодію і роботу переносників, тобто виступаючи в ролі інгібіторів, подібно АА, який є інгібітором Q_i -сайту комплексу III в експериментальних [18] і модельних дослідженнях [6], можуть підсилювати генерацію АФК. За допомогою реакції (3) [5] також можна описати вплив НЧ на генерацію вільних радикалів, зокрема, супероксида, в комплексі III.



$$V_{34} = k_{34} \cdot (b_H \cdot QH^{\bullet} \cdot b_L^- \cdot Q - b_H^- \cdot QH^{\bullet} \cdot b_L \cdot Q \cdot \exp(F \cdot \delta_2 \cdot \Delta\Psi / R \cdot T) / K_{eq34}) \quad (3)$$

Інгібуючий ефект НЧ відповідно до даної реакції моделі [5] може бути результатом порушення перенесення електронів у всіх реакціях в Q_i -сайті. Інгібування Q_i -сайту НЧ може бути результатом пригнічення реакцій з перенесенням електронів в Q_0 -сайті в результаті порушення Q -циклу.

Супероксиддисмутіза-подібна активність НЧ, показана раніше в дослідженнях [19], вписується в рамки моделі [5], оскільки утворення перекису водню в реакціях за участю НЧ може служити причиною порушення роботи дихальних комплексів і зсуву в роботі тіолових антиоксидантів. Модель [5] демонструє за допомогою отриманих раніше даних [6,20], що утворення АФК в дихальному ланцюзі МХ дуже чутливе до флуктуацій мітохондріального потенціалу у випадках, коли субстратом дихання є сукцинат або NADH-пов'язані субстрати. Запропонована модель пов'язує зміни потенціалу МХ, синтезу АТФ, і безпосередньо генерацію АФК – процеси, динаміка яких залежить від безлічі електрокінетичних транспортних систем на внутрішній мембрані МХ як в нормальних умовах, так і за умов дії інгібіторів.

Тож сумісне використання в даній роботі адекватної обчислювальної моделі і власних даних, отриманих експериментально, дозволяє побудувати та розглянути основні механізми впливу редоксактивних НЧ на основі РЗЕ з різними розмірами та формою на біоенергетичні процеси в МХ.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Водні колоїдні розчини наночастинок. В дослідженнях використані НЧ на основі РЗЕ з різними розмірами та формою: сферичні ($GdYVO_4:Eu^{3+}$ (1-2 нм)), веретеноподібні ($GdVO_4:Eu^{3+}$ (25×8 нм), усереднений розмір – 13 нм) и стрижнеподібні ($LaVO_4:Eu^{3+}$

(57×6-8 нм)) і сферичні НЧ CeO_{2-x} (з розмірами 1-2 нм і 8-10 нм). Синтез водних колоїдних розчинів НЧ виконано згідно з [19,21]. Були отримані прозорі безбарвні розчини НЧ з концентрацією твердої фази кожного типу – 1г/л. Розміри і морфологію НЧ оцінювали за допомогою просвічуючої електронної мікроскопії на електронному мікроскопі ПЕМ 125 К (Selmi, Україна), прискорюючи напруга – 100 кВ. Стандартне відхилення не перевищує $\pm 10\%$ від середнього розміру частинки. Склад сферичних НЧ був $\text{Gd}_{(0,6-0,8)}\text{Y}_{(0,1-0,3)}\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}_{(0,1)}$, веретеноподібних – $\text{Gd}_{(0,9)}\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}_{(0,1)}$ та стрижнеподібних – $\text{La}_{(0,9)}\text{VO}_4:\text{Eu}^{3+}_{(0,1)}$.

Препаративні методи. У роботі використовували гепатоцити і МХ, ізольовані з печінки щурів-самців з масою тіла 180-200 г. лінії Вістар, згідно методам, описаним раніше [22-24]. Всі маніпуляції з тваринами проходили під поверхневим ефірним наркозом. Експерименти проводили відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей».

Флуоресцентний аналіз клітин було виконано за допомогою JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolocarboxyanine iodide), як описано в [25,26]. Клітини (з концентрацією 5×10^5 кліт/мл) інкубувались з JC-1 (10^{-6}M) в середовищі ІГЛА з 10% ембріональною бичачою сироваткою, рН 7,4, при кімнатній температурі протягом 1,5 год. для досягнення урівноваження барвника в системі, після чого проводили наступні дії: 1) дослідження механізмів проникнення НЧ в клітини: спільна експозиція НЧ (концентрація вихідного розчину – 1 г/л) з інгібіторами ендоцитозу – нокодазолом (10 мкМ) і цитохалазіном D (10 мкМ); 2) експозиція з НЧ: 50 мкл вихідного розчину НЧ (1 г/л) додавали в кожну кювету, і клітини інкубувались з частинками протягом 24 год. Кінцева концентрація НЧ в зразках становила 0,05 г/л; 3) експозиція з 2 мМ GSH для оцінки його протекторного впливу: GSH вносили на 1 год. перед додаванням НЧ. Спостереження за змінами мітохондріального потенціалу проводили, як описано в [25].

Визначення рівня АТФ. Після впливу НЧ (інкубація з частинками протягом 25 хвил. при 25°C) на ізольовані МХ рівень АТФ визначали в реакційному середовищі наступного складу: 100 мМ трис-НСІ, 1 мМ ЕДТА, 2 мМ MgCl_2 , 4 мМ NADP натрієва соль за допомогою екзогенних гексогенази – 5 од/мл (+0,02% БСА або 72 мг/мл глюкоза) і глюкозо-6-фосфату (від 0,35 до 25 од/мл) по методу [27], описаному в [28]. Результати виражали у відсотках, за 100% (контроль) прийнято показники (інтенсивність флуоресценції, рівень АТФ) в системі без НЧ.

Результати виражені як середнє значення \pm стандартна похибка середнього з 4-5 незалежних експериментів. Результати статистично оброблені за допомогою програмного забезпечення Statistika v. 5.0 (StatSoft, США) і Origin 6.1 (Origin Lab Corporation, США), використовуючи t-критерій Стьюдента. Отримані результати статистично значимо відрізняються при $p < 0,05$.

Обчислювальна модель Маркевича та Хоека. Для аналізу даних та інтерпретації отриманих результатів ми використовували кінетичну схему переносу електронів і утворення супероксида, запропоновану авторами Маркевичем і Хоеком [5]. Дана схема описує основні шляхи перенесення електронів в ЕТЛ і в головних центрах утворення АФК – комплексах I і III і лежить в основі обчислювальної моделі для мітохондріального дихального ланцюга. Дана кінетична схема включає в себе наступні переносники електронів:

- 1) Для комплексу I: флавін мононуклеотид (ФМН), послідовність залізо-сірчаних кластерів, починаючи з N3 і N1A і закінчуються N2 кластером, і коензим Q.
- 2) Для комплексу III: коензим Q, цитохроми b_L , b , b_H , c_1 .

Комплекси II і IV в даній моделі не розглядаються як прямі джерела АФК.

Кінетична схема перенесення електронів і утворення супероксида в дихальному ланцюзі МХ та повна схема реакцій, що описують перенос електронів і утворення супероксиду відповідно до кінетичної схеми містить 40 реакцій, які наведені в [5]. За аналогією з даною моделлю, де застосовано АА, який є широко використовуваним інгібітором Q_i сайту в комплексі III в експериментальних і обчислювальних дослідженнях генерації АФК в дихальному ланцюгу МХ, запропоновані механізми дії НЧ на дихальний ланцюг МХ.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

В наших попередніх дослідженнях ми показали, що вплив НЧ на основі РЗЕ на інтенсивність генерації вільних радикалів в модельних біосистемах має свої особливості: прооксидантні та антиоксидантні ефекти НЧ залежать і від їх фізико-хімічних характеристик, і від мікрооточення; у біосистемах, що містять МХ, ми спостерігали зміну антиоксидантних ефектів НЧ на прооксидантні; з'ясували, що найбільш виражені прооксидантні властивості притаманні малим НЧ, а також отримали дані про те, що GSH грає ключову роль в регуляції інтенсивності генерації вільних радикалів у присутності НЧ [24, 28-30].

На сьогоднішній день механізми проникнення НЧ в клітини є предметом широкої дискусії. З використанням зонда JC-1, спостерігаючи за змінами трансмембранного потенціалу МХ, і використовуючи нокодазол і цитохолазін D – сполуки, які блокують ендоцитоз, ми встановили, що малі сферичні ортованадатні НЧ здатні безпосередньо проникати в клітини без участі механізмів ендоцитозу і пригнічувати функцію МХ (спостерігається зниження флуоресценції агрегатів зонда під впливом НЧ в порівнянні з контролем) (рис. 1).

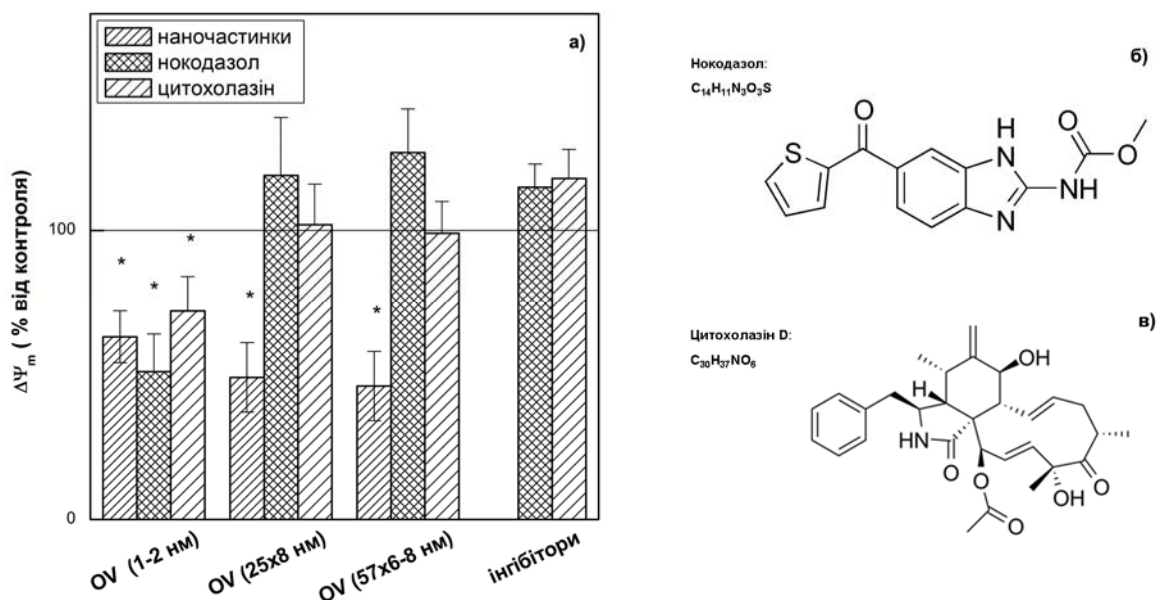


Рис. 1. а) оцінка механізмів проникнення НЧ різних розмірів в клітини: зміни мітохондріального потенціалу ($\Delta\Psi_m$) при пригніченні ендоцитозу інгібіторами (нокодазол, $C=10$ мкМ, цитохолазін D, $C=10$ мкМ) під впливом НЧ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем); структурні формули інгібіторів ендоцитозу – б) нокодазол, в) цитохолазін D.

Надходження інших ортованадатних НЧ з розмірами 25×8 і 57×6-8 нм відбувається за ендоцитозним механізмом (падіння мітохондріального потенціалу при дії НЧ і інгібіторів ендоцитозу не відбувається). При цьому самі інгібітори не чинили впливу на мітохондріальний потенціал (Рис. 1).

Відомо, що концентрація продуктів вільнорадикального пошкодження біомолекул в тканинах значною мірою визначається швидкістю генерації АФК мембранозв'язаними і розчинними ферментними системами. При цьому вважається, що основна кількість АФК утворюється в редокс-ланцюгах МХ [31]. Згідно з даними [32], швидкість генерації $O_2^{\bullet-}$, яка відбувається при випадкових збоях в роботі ЕТЛ, прямо пропорційна швидкості споживання кисню при диханні: $I = q \times V$, где q – коефіцієнт пропорциональності. Теоретично, при надійній роботі дихального ланцюга МХ, q може наблизитися до нуля, але практично будь-яка причина, що порушує нормальні умови її роботи (часткова або повна гіпоксія, стан забезпеченості субстратами дихання, температура, дія ксенобіотиків, НЧ та ін.), значно збільшує цей коефіцієнт, і, як наслідок, призводить до зростання потоку $O_2^{\bullet-}$ в МХ і в клітині в цілому. Дослідження впливу НЧ на рівень АТФ в ізольованих МХ показали, що при дії всіх типів НЧ ортованадатів і малих частинок SeO_{2-x} рівень АТФ в МХ знижений, причому найбільше це зниження виражено у разі малих сферичних частинок – ортованадатів і SeO_{2-x} (Таблиця 1).

Таблиця 1

Рівень АТФ в МХ після інкубації з НЧ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем)

	Концентрація АТФ, % від контролю
OV (1-2 нм)	38,94±4,4*
OV (25×8 нм)	82,24±1,5*
OV (57×6-8 нм)	79,44±1,5*
SeO_{2-x} (1-2 нм)	45,79±8*
SeO_{2-x} (8-10 нм)	84,27±12,7

Спостережувані ефекти можуть бути пов'язані з редоксактивністю НЧ і їх здатністю безпосередньо втручатися в електрон-транспортні процеси в якості донорів або акцепторів вільних радикалів. Подібність іонів фосфату і ванадату може бути причиною порушення синтезу АТФ [33]. Крім того, АТФ може витрачатися для підтримки мітохондріального потенціала. Подальше дослідження мітохондріального потенціалу показало, що при впливі всіх досліджуваних НЧ, крім SeO_{2-x} розміром 8-10 нм, відбувається падіння потенціалу (таблиця 2).

Отримані дані свідчать про те, що ресурсів ендогенної системи захисту недостатньо для запобігання мітохондріальній дисфункції, яку викликають НЧ. Однак НЧ можуть впливати на МХ не тільки через утворення АФК, а й безпосередньо взаємодіяти з мітохондріальними структурами, що характерно, зокрема, для малих НЧ [34]. Використання GSH нейтралізує негативні наслідки впливу НЧ на МХ (таблиця 2). GSH є одним з основних компонентів тіолової буферної окислювально-відновної системи в клітині. Виснаження пулу відновленого глутатіону і зміна співвідношення відновленого/окисленого глутатіону можуть бути опосередковані ферментативними процесами детоксикації НЧ [35].

Таблиця 2

Захисний вплив глутатіону (2 мМ) на мітохондріальний потенціал гепатоцитів щурів на тлі дії НЧ; (* $p < 0,05$ порівняно з відповідним контролем)

	Мітохондріальний потенціал, % від контролю
OV (1-2 нм)	63±9*
OV (25×8 нм)	49±12*
OV (57×6-8 нм)	46±12*
CeO _{2-x} (1-2 нм)	75±5*
CeO _{2-x} (8-10 нм)	98±15
GSH+OV (1-2 нм)	95±7
GSH+OV (25×8 нм)	101±8
GSH+OV (57×6-8 нм)	105±6

GSH здатний проникати в клітини в незмінному вигляді і таким чином захищати не тільки позаклітинні, але і внутрішньоклітинні структури. Таким чином, показано, що досліджувані НЧ ортованадатів РЗЕ та малі НЧ діоксиду церія (1-2 нм) викликають падіння потенціалу МХ, рівня АТФ в МХ, і викликають додаткову генерацію АФК. В наших експериментах тільки НЧ діоксиду церію розміром 8-10 нм, не мають негативного впливу на жоден з досліджених показників і стабільно демонструють антиоксидантні властивості.

Отримані дані служать підтвердженням наших попередніх досліджень. Використання моделі [5], що описує процеси перенесення електронів в комплексах I і III, збільшення генерації супероксидного радикала при пригніченні цих комплексів інгібіторами, враховує зміни рН і мітохондріального потенціалу в генерації АФК, надає можливість запропонувати механізми дії редоксактивних НЧ на біоенергетичні процеси в МХ.

Перший механізм – інгібування транспорту електронів НЧ.

Вбудова НЧ в мембрани, безпосередня взаємодія з переносниками електронів може приводити до пригнічення транспорту електронів і активації утворення супероксида і перекису водню. Молекулярний механізм даного процесу можна пояснити за допомогою ряду реакцій [5], що описують перенесення електронів від повністю відновленого флавіна на кисень (реакція 1) з утворенням супероксида, так само передбачається, що семіхінон в комплексі з *CI₂Q* (реакція 2) є джерелом генерації супероксиду в комплексі I. За аналогією з даною моделлю швидкість генерації супероксиду під впливом НЧ насамперед може бути пов'язана зі зміною констант і швидкості даних реакцій (1), (2).

Експериментальні та розрахункові результати моделювання показують, що зворотні реакції в Q_i сайті можуть відігравати важливу роль у формуванні АФК при інгібуванні комплексу III AA (реакція 3). Дана реакція обчислювальної моделі [5] передбачає, що AA повністю пригнічує перенесення електронів від цитохрому *b_L* до *b_H*, тобто в даному випадку константа $v_{34}=0$. Необхідно відзначити, що умови, при яких $v_{34}=0$, по суті є результатом пригнічення реакцій перенесення електронів від семіхінонів до цитохрому *b_L*, і від цитохрома *b_L* к *b_H* в Q₀ сайті. Інгібування Q_i сайту так само може бути результатом порушення перенесення електронів в Q₀ сайті в результаті

порушення Q-циклу. Такий же механізм можливий і при дії НЧ, що підтверджується результатами наших досліджень про пригнічення ФАД-залежного дихання ізольованих МХ в присутності малих ортованадатних НЧ (дані не представлені).

За допомогою розрахунків автори [5] продемонстрували, що зростання загальної кількості АФК залежить від величини мітохондріального потенціалу при інгібуванні Q_1 сайту АА при окисленні NADH і сукцинату. Це відбувається через значне збільшення продукції $O_2^{\bullet -}$ окисленим флавінмононуклеотидом в комплексі I при інгібуванні комплексу III, і так само може бути одним з механізмів впливу НЧ на процеси в МХ.

Другий механізм – інтеграція НЧ в електрон-транспортні процеси в якості донорів або акцепторів електронів.

НЧ діоксиду церію відповідно до редокс-потенціалу пари $Ce^{4+}/Ce^{3+} = +1440$ мВ здатні перехоплювати електрони з дихального ланцюга і переносити їх на гідроксильний радикал з його нейтралізацією ($OH^{\bullet}/HO^- = +1900$ мВ). Однак виведення електронів з дихального циклу впливає на ефективність фосфорилування. Для НЧ ортованадатів виведення електронів з дихального циклу менш ймовірно, оскільки значення редокс-потенціалу допуючої пари Eu^{3+}/Eu^{2+} нижче значень для переносників дихального ланцюга МХ. Але нейтралізація гідроксильного радикала також можлива, що підтверджується результатами аналізу в безклітинній системі [24].

Під впливом ортованадатних НЧ також можливе утворення супероксиду в МХ без пригнічення дихального ланцюга за механізмом редокс-ціклінга, з переносом електрона на кисень відповідно до значень редокс потенціалів пари $O_2/O_2^{\bullet -} = -137$ мВ і допуючого іона $Eu^{3+}/Eu^{2+} = -350$ мВ.

Схематичне зображення можливих шляхів генерації/нейтралізації АФК в дихальному ланцюзі МХ представлено на рисунку 2.

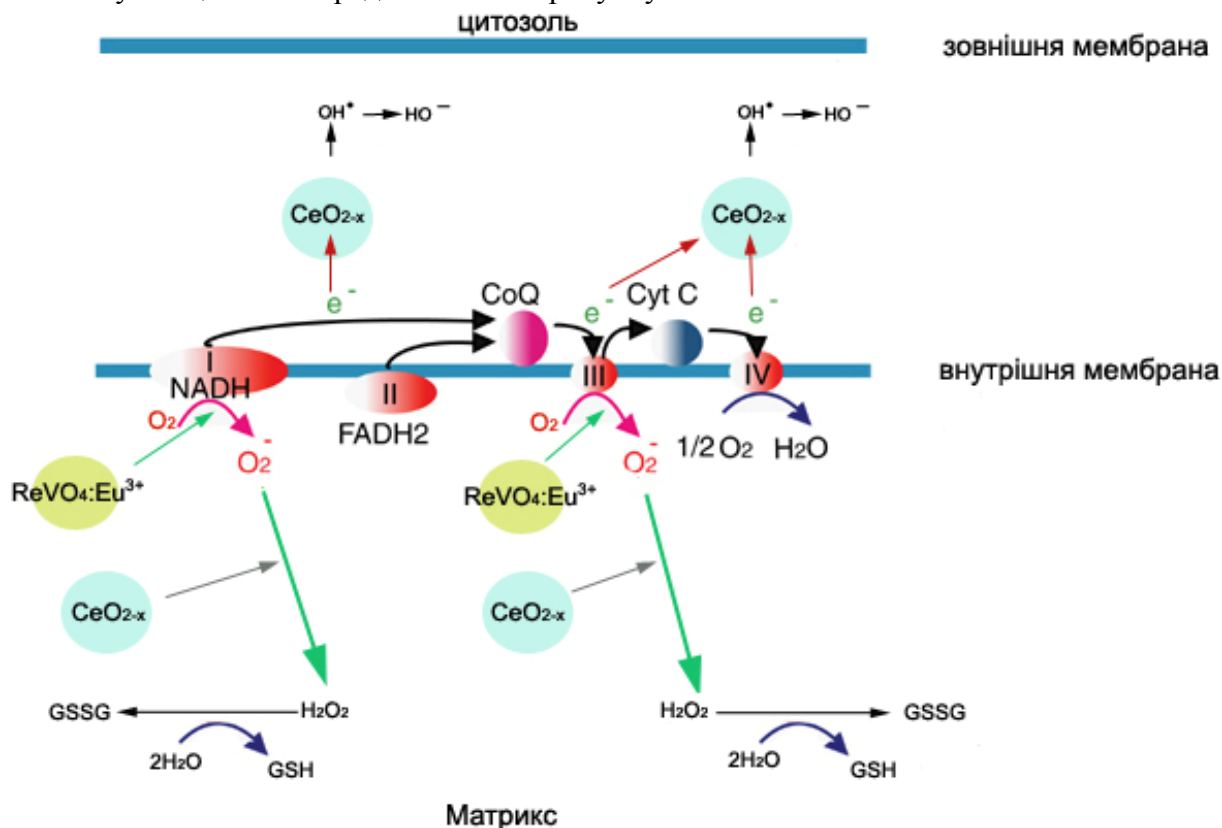


Рис. 2. Імовірна модель механізмів дії НЧ на біоенергетичні процеси в МХ.

Ще одним імовірним механізмом пригнічення МХ процесів НЧ є те, що малі частинки схильні до агрегації при накопиченні у внутрішньоклітинних структурах. Тому в разі малих НЧ може відбуватися механічне пошкодження мембран через безпосереднє проникнення в МХ.

Пояснюючи молекулярний механізм дії НЧ на біоенергетичні процеси в МХ шурів різного віку, згідно з авторами [36], які за допомогою модельних розрахунків і експериментально показали, що вихід перекису водню з МХ і ступінь генерації АФК при диханні залежить від активності глутатіон/тіоредоксін – захисної системи, також можна припустити, що утворення перекису водню в МХ в присутності НЧ може безпосередньо відбуватися в ферментних комплексах дихального ланцюга, а також за рахунок дисмутації вже утвореного супероксиду завдяки власній супероксиддисмутаза-подібної активності НЧ діоксиду церію. Дані процеси призводять до підвищеного витрачання GSH. Це підтверджується тим, що експериментально ми спостерігаємо захисну дію GSH, який необхідний для роботи ферментів, відповідальних за утилізацію перекису водню. Також треба враховувати, що помірною генерацією АФК здатна запускати внутрішньоклітинні антиоксидантні системи, що і є одним з базових механізмів захисту клітин від оксидативного стресу. На рівні клітин і організму ефект НЧ може проявлятися не як пряма антирадикальна дія, а як активація внутрішньоклітинних сигнальних процесів для відновлення окислювального балансу, але ці припущення потребують подальших досліджень.

ВИСНОВКИ

Таким чином, експериментально доведено, що малі НЧ ортованадатів та діоксиду церію проникають в клітини за механізмом адсорбції-дифузії, на відміну від великих НЧ, для яких основним шляхом є ендоцитоз. Показано, що здатність НЧ впливати на інтенсивність генерації радикалів корелює з їх здатністю порушувати мітохондріальний потенціал, процеси дихання і окисного фосфорилування, що свідчить про те, що біоенергетичними процеси в МХ є мішенню для редоксактивних НЧ. На основі кінетичної моделі Маркевича та Хоека запропоновано два основні механізми впливу НЧ ортованадатів РЗЕ та діоксиду церію на редокс-процеси в МХ. Перший механізм пов'язаний з інгібуванням транспорту електронів і активацією утворення супероксиду та пероксиду водню, другий – з інтеграцією НЧ в електрон-транспортні процеси в МХ у якості донорів або акцепторів електронів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Aluminium oxide nanoparticles induce mitochondrial-mediated oxidative stress and alter the expression of antioxidant enzymes in human mesenchymal stem cells / A. A. Alshatwi, P. V. Subbarayan, E. Ramesh [et al.] // *Food Addit. Contam. Part A: Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* – 2013. – V. 30, № 1. – P. 1-10.
2. Superoxide production by cytochrome bc1 complex: a mathematical model / F. Guillaud, S. Dröse, A. Kowald [et al.] // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – V. 1837, № 10. – P. 1643-52.
3. Bistability of mitochondrial respiration underlies paradoxical reactive oxygen species generation induced by anoxia / V.A. Selivanov, T.V. Votyakova, J.A. Zeak [et al.] // *PLoS Comput. Biol.* – 2009. – V. 5: e1000619
4. Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain // V.A. Selivanov, T.V. Votyakova, V.N. Pivtoraiko [et al.] // *PLoS Comput. Biol.* – 2011. – V. 7: e1001115.
5. Markevich N.I. Computational modeling analysis of mitochondrial superoxide production under varying substrate conditions and upon inhibition of different segments of the electron transport chain / N.I. Markevich, J.B. Hoek // *Biochimica et Biophysica Acta.* – 2015. – V. 1847. – P. 656–679.
6. A model of O₂-generation in the complex III of the electron transport chain / O.V. Demin, B.N. Kholodenko, V.P. Skulachev // *Mol. Cell. Biochem.* – 1998. – V. 184. – P. 21–33.

7. Orii Y. Oxidation process of bovine heart ubiquinol-cytochrome c reductase studied by stopped-flow rapid-scan spectrophotometry and simulations based on the mechanistic Q cycle model / Y. Orii, T. Miki // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 17594–17604
8. A computational model of reactive oxygen species and redox balance in cardiac mitochondria / L.D. Gauthier, J.L. Greenstein, S. Cortassa [et al.] // *Biophys. J.* – 2013. – V. 105. – P. 1045–1056.
9. Analysis of the kinetics and bistability of ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase / J.N. Bazil, K.C. Vinnakota, F. Wu [et al.] // *Biophys. J.* – 2013. – V. 105. – P. 343–355.
10. Korzeniewski B. A model of oxidative phosphorylation in mammalian skeletal muscle / B. Korzeniewski, J.A. Zoladz // *Biophys. Chem.* – 2001. – V. 92. – P. 17–34.
11. Beard D.A. A biophysical model of the mitochondrial respiratory system and oxidative phosphorylation / D.A. Beard // *PLoS Comput. Biol.* – 2005. – V. 1: e36.
12. The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle / C.L. Quinlan, A.A. Gerencser, J.R. Treberg [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – P. 31361–31372.
13. Drose S. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc₁ complex / S. Drose, U. Brandt // *J. Biol. Chem.* – 2008. V. 283. – P. 21649–21654.
14. Kussmaul L. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria / L. Kussmaul, J. Hirst // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – V. 103. – P. 7607–7612.
15. Proton pumping in the bc₁ complex: a new gating mechanism that prevents short circuits / A.R. Crofts, S. Lhee, S.B. Crofts [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1757 (8). – P. 1019–1034.
16. The mechanism of ubihydroquinone oxidation at the Qo-site of the cytochrome bc₁ complex / A.R. Crofts, S. Hong, C. Wilson, [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – V. 1827. – P. 1362–1377.
17. Domain conformational switch of the iron-sulfur protein in cytochrome bc₁ complex is induced by the electron transfer from cytochrome b_L to b_H / C.A. Yu, X. Cen, H.W. Ma [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1777. – P. 1038–1043.
18. Cadenas E. Enhancement of hydrogen peroxide formation by protophores and ionophores in antimycin-supplemented mitochondria / E. Cadenas, A. Boveris // *Biochem. J.* – 1980. – V. 188. – P. 31–37.
19. The influence of agglomeration of nanoparticles on their superoxide dismutase-mimetic activity / V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh [et al.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineering Aspects.* – 2012. – V. 409 – P. 176 – 182.
20. Lambert A.J. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane / A.J. Lambert, M.D. Brand // *Biochem. J.* – 2004. – V. 382. – P. 511–517
21. Характеристики зольей nReVO₄:Eu³⁺ (Re = La, Gd, Y, Sm) с наночастицами разной формы и размеров. В.К. Клочков, А.В. Григорова, О.О. Седых [и др.] // *ЖПС.* – 2012. – 79(5). – С. 738-742. / *Harakteristiki zolej nReVO₄:Eu³⁺ (Re = La, Gd, Y, Sm) s nanochasticami raznoj formy i razmerov.* V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh, [i dr.] // *ZhPS.* – 2012. – 79(5). – S. 738-742.
22. Kamatch S.A. Interaction of Ca²⁺ with endoplasmic reticulum of rat liver: a standart procedure for the isolation of microsomes / S.A. Kamatch, K.A. Narayan // *Anal. Biochem.* – 1972. – V. 48, № 1. – P. 53 – 61.
23. Возрастные перестройки структурно-функционального состояния мембранных редокс-систем: автореф. дис. на соиск. уч. степени докт. биол. наук: спец. 03.00.02 «Биофизика» / В. В. Лемешко. – Минск, 1983. – 36 с. / *Vozrastnye perestrojki strukturno-funkcional'nogo sostojanija membrannyh redoks-sistem: avtoref. dis. na soisk. uch. stepeni dokt. biol. nauk: spec. 03.00.02 «Biofizika»* / V. V. Lemeshko. – Minsk, 1983. – 36 s.
24. Хемилюминесцентная диагностика свободнорадикальных процессов в абiotической системе и в клетках печени в присутствии наночастиц на основе редкоземельных элементов nReVO₄:Eu³⁺ (Re = Gd, Y, La) и CeO₂ / Е.А. Аверченко, Н.С.Кавок, В.К. Клочков [и др.] // *Журнал прикладной спектроскопии.* – 2014. Вып. 81 (5). – С. 754-760. / *Hemiljuminiscentnaja diagnostika svobodnoradikal'nyh processov v abioticheskoj sisteme i v kletkah pecheni v prisutstvii nanochastic na osnove redkozemel'nyh jelementov nReVO₄:Eu³⁺ (Re = Gd, Y, La) i CeO₂* / Е.А. Averchenko, N.S.Kavok, V.K. Klochkov [et al.] // *Zhurnal prikladnoj spektroskopii.* – 2014. V. 81 (5). – S. 754-760.
25. Mitochondrial potential ($\Delta\Psi_m$) changes in single rat hepatocytes: The effect of orthovanadate nanoparticles doped with rare-earth elements / N.S. Kavok, K.A. Averchenko, V.K. Klochkov, [et al.] // *European Physical Journal: E Soft Matter and Biological Physics.* – 2014. – V. 37 (12). – P. 127.
26. The energy-state of the hepatocytes of satiated rats, isolated with the use of EDTA and vibratory / A.Yu. Petrenko, V.P. Grishuk, A.N. Sukach [et al.] // *Biochemistry (Moscow).* – 1989. – V. 54, № 12. – P. 1952-1955.
27. Lamprecht W. Adenosine-5'-triphosphate, determination with hexokinase and glucose 6-phosphatodehydrogenase / W. Lamprecht, I. Trautshold // *Methods of enzymatic analysis* / Bergmyer H.U. (ed.) - New York: Acad. Press., 1965. – P. 543-551.

28. Методы биохимических исследований / [под ред. М.И. Прохоровой]. – Л.: ЛГУ, 1982. – 272 с. /Metody biohimicheskikh issledovanij / [pod red. M.I. Prohorovoj]. – L.: LGU, 1982. – 272 s.
29. Effect of inorganic nanoparticles and organic complexes on their basis on free-radical processes in some model systems / K.A. Awerchenko, N.S. Kavok, V.K. Klochkov [et al.] // Biopolimers and Cell. – 2015. – V. 31, № 2. – P. 138–145.
30. Pro-oxidant and antiradical properties of rare-earth based nanoparticles evaluated by chemiluminometry / K.A. Awerchenko N.S. Kavok, V.K. Klochkov [et al.] // Book of Abstracts of XXI Galyna Puchkovska International School-Seminar “Spectroscopy of Molecules and Crystals”. – Beregove (Crimea), 2013. – P. 173-174.
31. Skulachev V. P. Mitochondria, reactive oxygen species and longevity: some lessons from the Barja group / V. P. Skulachev // Aging Cell. – 2004. – V. 3, № 1. – P. 17–19.
32. Кольтовер В.К. Свободнорадикальная теория старения: исторический очерк / В.К. Кольтовер // Успехи геронтол. – 2000. – Вып. 4. – С. 33 – 40. /Koltover V.K. Svobodnoradikalnaja teorija starenija: istorichskij ocherk / V.K. Koltover // Yspexi gerontol. – 2000. – V. 4. – P. 33-40.
33. Byczkowski J.Z. Interaction of vanadate with respiratory chain of rat liver and wheat seedling mitochondria / J.Z. Byczkowski, L. Zychlinski, J. Tluczkiwicz // Int. J.Biochem. – 1979. – V. 10. – P. 1007-1011.
34. A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells / Y. Wang, W.G. Aker, H.M. Hwang [et al.] // Sci Total Environ. – 2011. – V. 409, № 22. – P. 4753-4762.
35. Абрамова Ж.И. Человек и противooksидлительные вещества / Ж.И. Абрамова, Г.И. Оксенгендлер; ред. Н.В. Саватеев – Ленинград: Наука, 1985. – 230 с. / Abramova G.I. Chelovek i protivooksislitelnie vewestwa // Abramova J.I., G.I. Okcengendler; red. N.V. Savateev – Leningrad: Nayka, 1985. – 230 s.
36. Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H₂O₂ emission: an experimental-computational study / M.A. Aon, B.A. Stanley, V. Sivakumaran [et al.] // J. Gen. Physiol. – 2012. – V. 139. – P. 479–491.

UDC 573.3

TEXTURES OF BSA FILMS WITH IRON AND COPPER IONS**D.M. Glibitskiy, G.M. Glibitskiy, M.A. Semenov, A.V. Shestopalova***O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine,
12, Acad. Proskura St., 61085, Kharkov, Ukraine*e-mail: dima.glib@gmail.com

Submitted May 23, 2016

Accepted June 10, 2016

Analysis of the patterns on the dried films of biological fluids is a promising avenue of medical diagnostics and biosensors development. The aim of this work was to study the effect of iron and copper ions on the quantitative characteristics of textures and zigzag patterns (Z-structures) observed on the films of saline solutions of bovine serum albumin (BSA). In the experiment, 0.5 mg/ml BSA, 20 mM/l NaCl, 0.05 mM/l CuCl₂ and 0.2±0.05 mM/l FeCl₃ were used. For textures, the area and fractal dimension were estimated, and for zigzag patterns, area and the specific length of the Z-structures were estimated. The effect of iron and copper ions on the geometrical parameters of Z-structures was analyzed. Spatial distributions of the fractal dimension of texture and the specific length of Z-structures were analyzed. It was shown that using the product of all four parameters increases the sensitivity of the method compared to using only one of the parameters. The method can be used in pharmacology and medical biochemistry for screening drugs and chemical compounds by their degree of influence on biopolymers.

KEY WORDS: solution, film, texture, biopolymer, fractals, biologically active substances.**ТЕКСТУРИ ПЛІВОК БСА З ІОНАМИ ЗАЛІЗА ТА МІДІ****Д.М. Глибицький, Г.М. Глибицький, М.О. Семенов, Г.В. Шестопалова***Національна академія наук України, Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова,
вул. Ак. Проскури 12, м. Харків, 61085, Україна*

Аналіз патернів на висушених плівках біологічних рідин є перспективним напрямком медичної діагностики і розробки біосенсорів. Метою цієї роботи було вивчення впливу іонів заліза і міді на кількісні характеристики текстур і зигзагоподібних патернів (Z-структур), які спостерігаються на плівках сольових розчинів бичачого сироваткового альбуміну (БСА). У роботі були використані 0,5 мг/мл БСА, 20 мМ/л NaCl, 0,05 мМ/л CuCl₂ і 0,05±0,2 мМ/л FeCl₃. Для текстур оцінювалися площа і фрактальна розмірність, а для зигзагоподібних патернів – площа і питома довжина Z-структур. Були проаналізовані відмінності геометричних параметрів Z-структур при впливі іонів заліза і міді. Були проаналізовані просторові розподіли фрактальної розмірності текстур і питомої довжини Z-структур. Було показано, що використання добутку всіх чотирьох параметрів підвищує чутливість методу в порівнянні з використанням тільки одного з параметрів. Цей метод може застосовуватись у фармакології та медичній біохімії для визначення ступеня впливу препаратів та хімічних речовин на біополімери.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: розчин, плівка, текстура, біополімер, фрактали, біологічно активні речовини.**ТЕКСТУРЫ ПЛЕНОК БСА С ИОНАМИ ЖЕЛЕЗА И МЕДИ****Д.М. Глибицкий, Г.М. Глибицкий, М.А. Семенов, А.В. Шестопалова***Национальная академия наук Украины, Институт радиофизики и электроники им. А. Я. Усикова,
ул. Ак. Проскуры 12, г. Харьков, 61085, Украина*

Анализ паттернов на высушенных пленках биологических жидкостей является перспективным направлением медицинской диагностики и разработки биосенсоров. Целью данной работы было изучение влияния ионов железа и меди на количественные характеристики текстур и зигзагоподобных паттернов (Z-структур), наблюдаемых на пленках солевых растворов бычьего сывороточного альбумина (БСА). В работе были использованы 0,5 мг/мл БСА, 20 мМ/л NaCl, 0,05 мМ/л CuCl₂ и 0,05±0,2 мМ/л FeCl₃. Для текстур оценивались площадь и фрактальная размерность, а для зигзагоподобных паттернов – площадь и удельная длина Z-структур. Были проанализированы различия геометрических параметров Z-структур при воздействии ионов железа и меди. Были проанализированы пространственные распределения фрактальной размерности текстур и удельной длины Z-структур. Было показано, что использование произведения всех четырех параметров повышает чувствительность метода по сравнению с

использованием только одного из параметров. Этот метод может применяться в фармакологии и медицинской биохимии для определения степени влияния препаратов и химических веществ на биополимеры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: раствор, пленка, текстура, биополимер, фракталы, биологически активные вещества.

Methods of analysis of film textures obtained from solutions of biological fluids are used to create new medical technologies [1] and for diagnosis of various diseases. For example, the authors of [1] and [2] provide an overview of medical research methods for qualitatively assessing the morphology of the solid phase of biological fluids. On the other hand, methods for quantitative analysis of texture are also being developed. For example, in [3] the main types of structural elements observed in the course of dehydration are analyzed, which are then used for quantitative evaluation based on pattern recognition. In [4], the authors investigate the textures of films obtained from chitosan solution in the presence of copper and silver ions, using fractal dimension calculations to evaluate the observed patterns. This lets one compare the observed structures with some well-known aggregation models.

Previously, we have analyzed the impact of biologically active substances (BAS) on biopolymers in relation to the changes to the area and the fractal dimension of the film texture [5-7]. Another criterion for estimating the impact of BAS was proposed in [8], based on the relative area occupied by zigzag patterns (Z-structures). However, this method has insufficient sensitivity, since the area calculations cannot easily discern densely-packed Z-structures from each other or from other types of patterns which lie in close proximity. To mitigate the issue, a direct calculation of the specific density of Z-structures was employed, which was used in [9] to show that Z-structures do not form in case of thermal denaturation of bovine serum albumin (BSA).

The aim of this work is to apply the Z-structure based methods of quantitative evaluation to investigate the film textures obtained from the solutions of BSA and iron or copper ions.

MATERIALS AND METHODS

The films were prepared from solutions of bovine serum albumin ("Sigma-Aldrich") at a concentration of 0.5 mg/ml in the presence of NaCl at a concentration of 20 mM. Chemically pure reagents (CuCl_2 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) were used. The setup for the production of films and the method of texture formation on the film at 0% relative humidity are described in [10].

For a biopolymer film obtained from the solution of the biopolymer and the studied BAS, an influence coefficient K_T representing the area of textures on the film is determined [5]:

$$K_T = S_T / S, \quad (1)$$

where S_T is the area of textures on the film, and S is the area of the entire film.

One of the parameters used for the analysis of textures is the fractal dimension D , which characterizes the degree of branching or irregularity of the texture. Generally, D is expressed as:

$$D = \lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} \frac{\log N(\varepsilon)}{\log(\varepsilon)}, \quad (2)$$

where N is the number of elements (squares, circles, etc.) sufficient to cover the Z-structures, and ε is the linear element size.

If it is impossible to clearly separate the background from the structures, a variant of fractal dimension is used which takes the "intensity" of the image into account:

$$D = \lim_{\varepsilon \rightarrow \infty} \frac{\log X(\varepsilon)}{\log(\varepsilon)}, \quad (3)$$

where X is a quantitative characteristic of the element content.

For the calculation of fractal dimension, the "differential volume variation" box counting method was used. For each value of ε (from a predetermined set of scales), the image is covered with an ε -sized square grid. For each square, an intensity is calculated:

$$I_\varepsilon = \sum_{i,j} (1 + \partial I_{i,j,\varepsilon}), \quad (4)$$

where $\partial I_{i,j,\varepsilon}$ is the difference between the maximum and minimum "intensity" of the image within a given square. I_ε corresponds to the "volume" $V_\varepsilon = I_\varepsilon \cdot \varepsilon^2$. For the plot of $\log(V)$ against $\log(\varepsilon)$, the slope of the regression line is calculated as

$$S = \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\ln V_\varepsilon}{\ln 1/\varepsilon}, \quad (5)$$

and the fractal dimension is calculated as

$$D = 3 - (S/2). \quad (6)$$

The coefficient K_{Z_S} accounts for the area occupied by the Z-structures:

$$K_{Z_S} = S_Z / S, \quad (7)$$

where S_Z is the area of Z-structures on the film.

The coefficient K_{Z_L} accounts for the length of the individual Z-structures:

$$K_{Z_L} = \frac{\sum (L_{(z)i} / S_{(z)i})}{n} \quad (8)$$

where $L_{(z)i}$ is the total length of Z-structures in the i -th sample (micrograph) of the film; n is the number of the taken samples, and $S_{(z)i}$ is the area of the i -th sample. The micrographs are taken at the locations uniformly distributed over the film area in a grid fashion.

The effect P of the substance is defined as the product of all the calculated coefficients:

$$P = K_T \cdot D \cdot K_{Z_S} \cdot K_{Z_L}. \quad (9)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Examples of film micrographs are presented in Fig. 1a (BSA and 20 mM NaCl), Fig. 1b (BSA, 20 mM NaCl and 0.05 mM FeCl₃), Fig. 1c (BSA, 20 mM NaCl and 0.05 mM CuCl₂) and Fig. 1d (BSA, 20 mM NaCl and 0.1 mM FeCl₃). The values of specific length L_S ($L_{(z)i} / S_{(z)i}$), average edge length L_E and average angle A of Z-structures for the example micrographs are: $L_S = 18.5 \text{ mm}^{-1}$, $L_E = 0.08 \pm 0.06 \text{ mm}$, $A = 116 \pm 23^\circ$ for Fig. 1a (control film); $L_S = 17.2 \text{ mm}^{-1}$, $L_E = 0.04 \pm 0.01 \text{ mm}$, $A = 117 \pm 15^\circ$ for Fig. 1b (0.05 mM FeCl₃); $L_S = 10.3 \text{ mm}^{-1}$, $L_E = 0.07 \pm 0.03 \text{ mm}$, $A = 118 \pm 12^\circ$ for Fig. 1c (0.05 mM CuCl₂); $L_S = 20.4 \text{ mm}^{-1}$, $L_E = 0.04 \pm 0.02 \text{ mm}$, $A = 118 \pm 20^\circ$ for Fig. 1d (0.1 mM FeCl₃). Z-structures with the parameters similar to those of Fig. 1a (control film) are also present in the central regions of the films with copper and iron ions.

Fig. 1a is characterized by the longest zigzag edges and a high amount of side-branches; Fig. 1b-1d show a more hexagonal layout of zigzags with little to no side-branching; finally, for Fig. 1c, Z-structures appear to be larger and more sparse than for Fig. 1b and 1d. As the

concentration of FeCl_3 increases, the film becomes increasingly dominated by DLA patterns, dense branching patterns and disordered thread-like patterns (not shown).

The area occupied by Z-structures was calculated as the area of a minimum bounding polygon which contains the visible elements of Z-structures. An example is shown in Fig. 1a, where label 1 marks the bounding polygon, label 2 marks the Z-structures and label 3 marks non-Z-structures. As such, these area calculations do not take into account the density of Z-structures and the presence of different types of patterns inside the area.

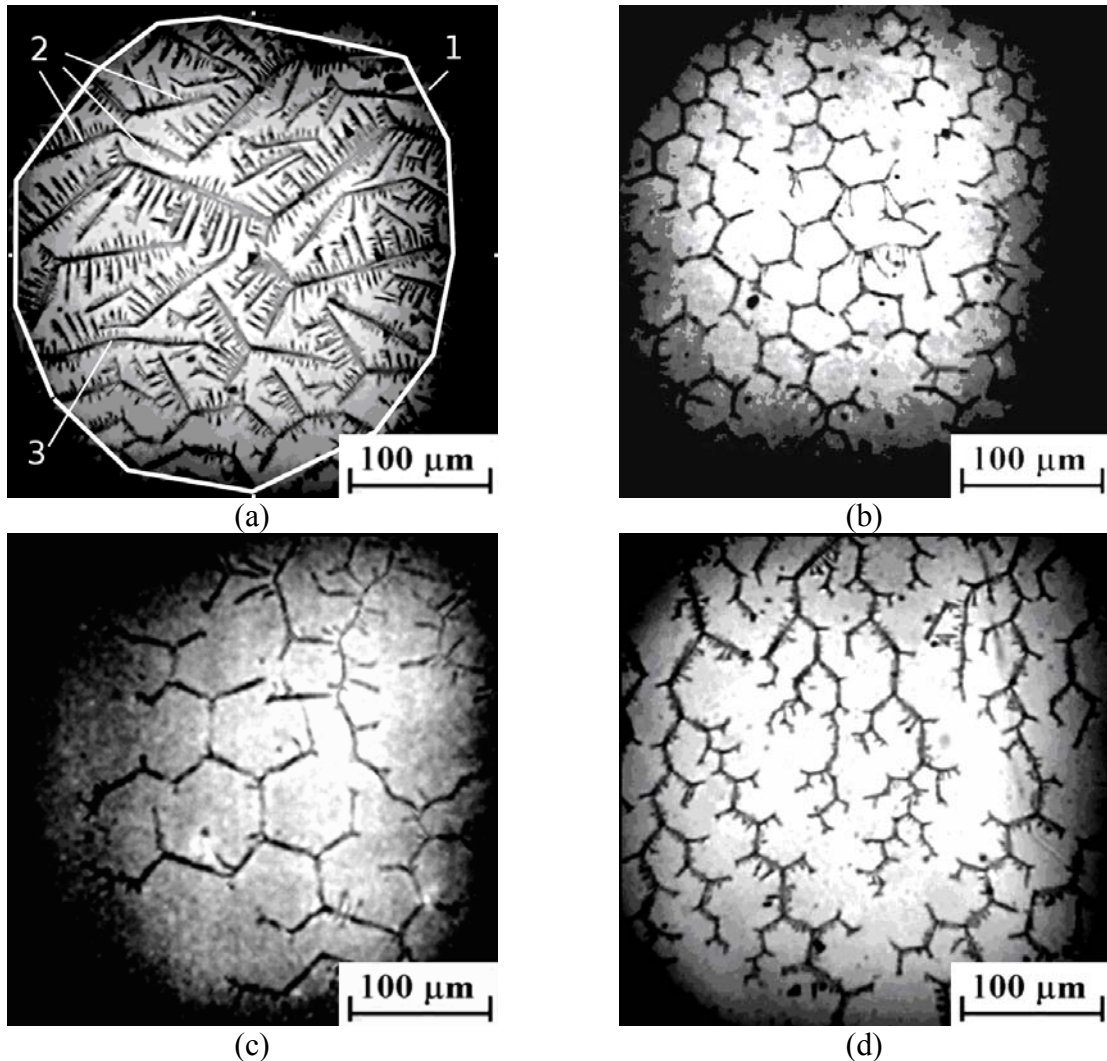
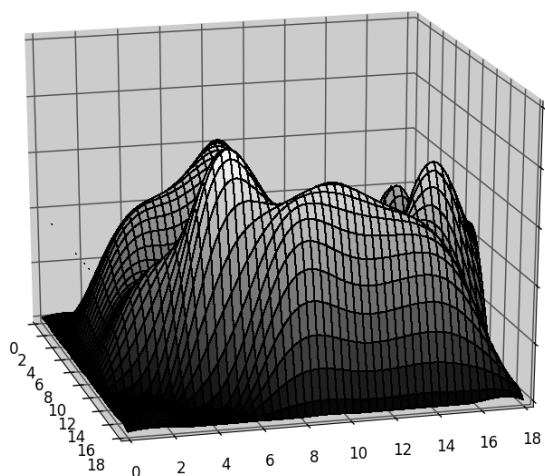
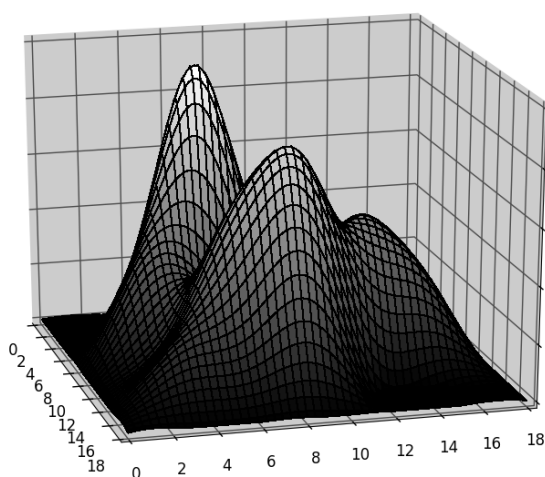


Fig. 1. Example micrographs of films corresponding to the solutions of: (a) BSA and 20 mM NaCl; (b) BSA, 20 mM NaCl and 0.05 mM FeCl_3 ; (c) BSA, 20 mM NaCl and 0.05 mM CuCl_2 ; (d) BSA, 20 mM NaCl and 0.1 mM FeCl_3 .

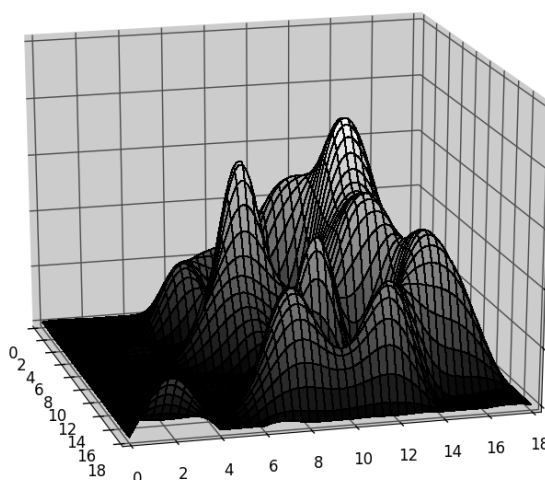
The distributions of specific length (L_s) of Z-structures and fractal dimension (D) of the textures are shown in Fig. 2a and Fig. 3a (control film), Fig. 2b and Fig. 3b (0.05 mM FeCl_3), Fig. 2c and Fig. 3c (0.05 mM CuCl_2), respectively. It can be observed that zigzag patterns tend to only appear at approximately 3 mm distance from both the center and the borders of the cell. This might be due to local anisotropy and the distribution of salt and BSA (determined by the interplay of diffusion, radial flow, DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey, and Overbeek) force and Marangoni recirculation loop, as well as the hydrodynamic effects during the late-stage drying) [11-18] creating the necessary conditions for Z-structure formation only at a 3–7 mm distance from the cell borders.



(a)

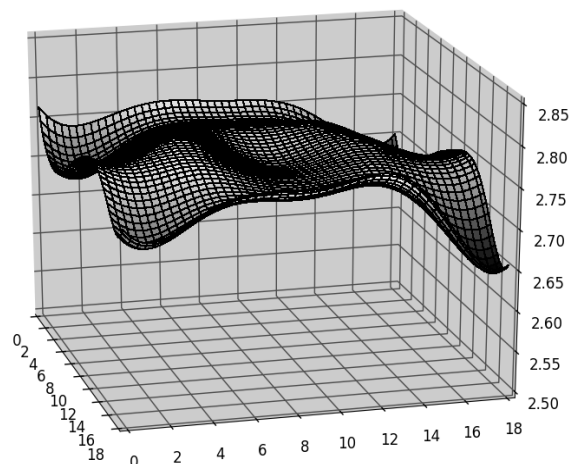


(b)

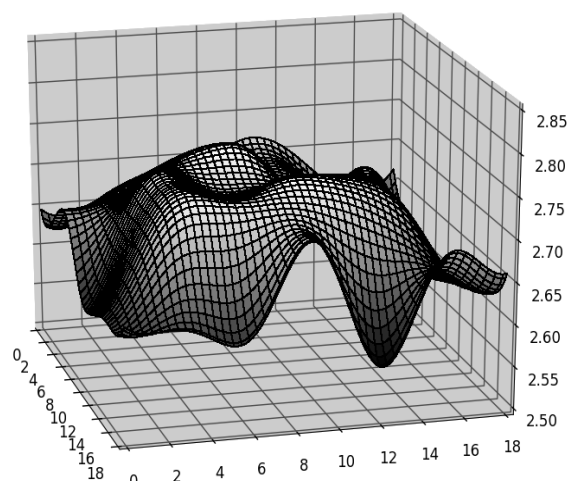


(c)

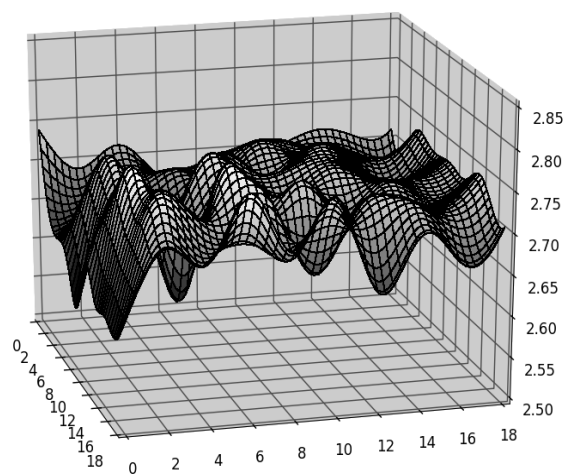
Fig. 2. Averaged distributions of specific lengths of Z-structures on films corresponding to the solutions of: (a) BSA and 20 mM NaCl; (b) BSA, 20 mM NaCl and 0.05 mM FeCl_3 ; (c) BSA, 20 mM NaCl and 0.05 CuCl_2 .



(a)



(b)



(c)

Fig. 3. Averaged distributions of texture fractal dimension on films corresponding to the solutions of: (a) BSA and 20 mM NaCl; (b) BSA, 20 mM NaCl and 0.05 mM FeCl_3 ; (c) BSA, 20 mM NaCl and 0.05 CuCl_2 .

The fractal dimension for 0.05 mM CuCl₂ films shows little difference between the center and the borders, whereas for 0.05 mM FeCl₃ film, less complex aggregation patterns tend to appear at the cell borders.

The mean values of each evaluated parameter are provided in Table 1 for each of the investigated solutions. For comparison, the P values calculated using our current method (P_{new}) and the previous method (P_{prev}), which considered only K_T , D and K_{Z_S} , are provided.

Table 1

The individual coefficients and the resulting effect estimation of each solution

Solution	K_T $\Delta=5\%$	D $\Delta=5\%$	K_{Z_S} $\Delta=10\%$	K_{Z_L} , mm ⁻¹ $\Delta=10\%$	P_{prev} , mm ⁻¹ $\Delta=16\%$	P_{new} , mm ⁻¹ $\Delta=16\%$
BSA+20 mM NaCl	0,98	2,71	0,53	7,2	1,41	10,1
BSA+20 mM NaCl +0,05 mM FeCl ₃	0,90	2,68	0,34	6,3	0,82	5,2
BSA+20 mM NaCl +0,05 mM CuCl ₂	0,95	2,70	0,34	7,1	0,87	6,2
BSA+20 mM NaCl +0,10 mM FeCl ₃	0,84	2,67	0,46	7,2	1,03	7,4
BSA+20 mM NaCl +0,20 mM FeCl ₃	0,95	2,74	0,15	2,9	1,34	1,1

The table shows that the coefficients K_T and D change very little for the Fe³⁺ concentration range of 0 to 0.20 mM (the variation is within the bounds of error), while the coefficients K_{Z_S} and K_{Z_L} decrease by more than a factor of 3 and 2, respectively, and P_{new} decreases by about a factor of 9. The use of all the coefficients in the formula (9) results in an increased sensitivity compared to the use of only one of the coefficients, as well as compared to the use of the previous formula.

As was shown in [10], the formation of fractal patterns on the surface of biopolymer films can be explained by the formation of crystal hydrate complexes of water, protein and salt. It can be assumed that the addition of copper or iron ions disturbs the conditions of crystal hydrate formation, which reduces the amount of Z-structures on the film surface. A detailed explanation of the mechanism of Z-structure formation is the subject of a separate study.

CONCLUSIONS

A method for the analysis of BAS influence on biopolymers is proposed, based on the property of biopolymer solutions with different composition to form different textures during the evaporation. The experimental study was conducted using bovine serum albumin as the biopolymer, and iron and copper salts as the BAS. Four parameters of the textures were analyzed: the texture area, the fractal dimension, the area of Z-structures and the specific length of Z-structures. Using the product of all four parameters increased the sensitivity of the method compared to using only one of the parameters. The method can be used in pharmacology and medical biochemistry for screening drugs and chemical compounds by their degree of influence on biopolymers.

REFERENCES

1. Shabalin V.N. The markers of malignant growth in the morphological picture of human biological fluids / V.N. Shabalin, S.N. Shatokhina // Questions of Oncology. – 2010. – V. 56(3). – P. 293–300.

2. Chen R. Blood drop patterns: Formation and applications / R. Chen, L. Zhang, D. Zang, W. Shen // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2016. – V. 231. – P. 1-14.
3. Zablotskaya T.U. Analysis of the main processes and types of structures in the dehydration of biological fluids / T.U. Zablotskaya // *Electromechanical and energy-saving systems*. – 2010. – V. 4(12). – P. 92–95.
4. Self-assembly and fractal feature of chitosan and its conjugate with metal ions: Cu (II)/Ag (I) / Y. Hu, Y. Wu, J. Cai [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2007. – V. 8(1). – P. 1–12.
5. Glibitskiy G.M. Na-DNA films with ions of metals / G.M. Glibitskiy // *Bioph. Bull.* – 2008. – V. 21(2). – P. 29–34.
6. Glibitskiy D.M. Fractal properties of DNA film textures / D.M. Glibitskiy, G.M. Glibitskiy // *Nanobiophysics: fundamental and applied aspects. Second international conference*. – 6-9 October 2011, Kiev. – P. 50.
7. Effect of silver and calcium ions on formation of the Na-DNA dendritic textures in films / G.M. Glibitskiy, D.M. Glibitskiy, M.A. Semenov [et al.] // *IV Congress of Russian biophysicists, Symposium I. 20-06 August 2012, Nizhny Novgorod*. – P. 73.
8. Patent 110130 Ukraine, IPC¹² C09K 19/38, G01N 33/48, G01N 21/956. Method for the estimation of substance effect on biopolymers / G. M. Glibitskiy, D. M. Glibitskiy ; owner is A.Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the National Academy of Sciences of Ukraine. – №201312123, appl. 16.10.2013 ; publ. 25.11 2015, bull. № 22. – 6 p.
9. Textures on the surface of BSA films with different concentrations of sodium halides and water state in solution / G.M. Glibitskiy, D.M. Glibitskiy, O.A. Gorobchenko [et al.] // *Nanoscale Res Lett.* – 2015. – V. 10. – P. 155–165.
10. Interaction of DNA with silver nanoparticles / G.M. Glibitskiy, V.V. Jelali, M.O. Semenov [et al.] // *Ukr J Phys.* – 2012. – V. 57 (7). – P. 695–699.
11. Effect of evaporation conditions on the spatial redistribution of components in an evaporating liquid drop on a horizontal solid substrate / Yu.Yu. Tarasevich, O.P. Isakova, V.V. Kondukhov [et al.] // *Technical Physics*. – 2010. – V. 55(5). – P. 636–644.
12. Tarasevich Yu.Yu. Drying of a multicomponent solution drop on a solid substrate: Qualitative analysis / Yu.Yu. Tarasevich, D.M. Pravoslavnova // *Technical Physics*. – 2007. – V. 52(2). – P. 159–163.
13. Modeling of spatial–temporal distribution of the components in the drying sessile droplet of biological fluid / Yu.Yu. Tarasevich, I.V. Vodolazskaya, O.P. Bondarenko // *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. – 2013. – V. 432. – P. 99–103.
14. Self-Assembly of Colloidal Particles from Evaporating Droplets: Role of DLVO Interactions and Proposition of a Phase Diagram / R. Bhardwaj, X. Fang, P. Somasundaran [et al.] // *Langmuir*. – 2010. – V. 26 (11). – P. 7833–7842.
15. Sessile nanofluid droplet drying / X. Zhong, A. Crivoi, F. Duan // *Adv Colloid Interface Sci.* – 2015. – V. 217. – P. 13–30.
16. Spontaneous Growth of Two-Dimensional Complex Patterns of Nanoparticles at Model Molecular Surfaces / H. Haidara, K. Mougín, J. Schultz // *Langmuir*. – 2001. – V. 17. – P. 659–663.
17. Complex Aggregation Patterns in Drying Nanocolloidal Suspensions: Size Matters When It Comes to the Thermomechanical Stability of Nanoparticle-Based Structures / S. Darwich, K. Mougín, H. Haidara // *Langmuir*. – 2010. – V. 26 (22). – P. 16928–16933.
18. From highly ramified, large scale dendrite patterns of drying "alginate/Au NPs" solutions to capillary fabrication of lab-scale composite hydrogel microfibers / S. Darwich, K. Mougín, H. Haidara // *Soft Matter*. – 2012. – V. 8. – P. 1155–1162.

УДК 577.3:57.043:547.42:57.08

ДИЕЛЕКТРИЧНА ПРОНИКНІСТЬ ЗДАТНИХ ДО ВІТРИФІКАЦІЇ КРІОЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ

О.О. Горобченко*, Н.О. Шевченко, О.В. Ліпіна, О.Т. Ніколов*, І.Б. Мусатова

*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23,
Харків, 61016, Україна*

e-mail: shevchenko_nadyusha@ukr.net

**Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків 61022, Україна*

e-mail: gorobchenko@karazin.ua

Надійшла до редакції 9 червня 2016 року

Прийнята 15 червня 2016 року

Метою роботи було визначення діелектричних характеристик і стану води у здатних до вітрифікації кріозахисних середовищах PVS2, 88%-й PVS3 та PVSN, до складу яких входять такі проникаючі криопротектори як гліцерин, диметилсульфоксид, етиленгліколь та непроникаючий криопротектор сахароза. Ці середовища широко використовуються при кріоконсервуванні меристем, ембріодів, калюсу, що дозволяє зберігати генетичні ресурси рослин в умовах рідкого азоту впродовж тривалого часу. Діелектричні характеристики зразків кріозахисних середовищ, їх дійсну ϵ' і уявну ϵ'' частини, вимірювали при температурі 20°C за допомогою НВЧ-діелектрометра резонаторного типу на частоті 9,2 ГГц. Величини статичної діелектричної проникності ϵ_s середовищ на нижній ділянці області релаксації молекул води та частоти діелектричної релаксації молекул води f_d розраховували з використанням рівнянь Дебая. Встановлено, що найменші значення діелектричних параметрів характерні 88%-му кріозахисному середовищу PVS3, до складу якого входять такі криопротектори як гліцерин та сахароза. Це середовище має найбільшу здатність зв'язувати та впорядковувати воду. За даними визначення цитотоксичності та впливу низькотемпературного зберігання на життєздатність меристем картоплі, винограду та часнику усі досліджені кріозахисні середовища можна використовувати при розробці ефективних режимів кріоконсервування.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: кріозахисні середовища, меристема, гліцерин, диметилсульфоксид, етиленгліколь, сахароза, НВЧ-діелектрометрія.

ДИЕЛЕКТРИЧЕСКАЯ ПРОНИЦАЕМОСТЬ СПОСОБНЫХ К ВИТРИФИКАЦИИ КРИОЗАЩИТНЫХ СРЕД

О.А. Горобченко*, Н.А. Шевченко, О.В. Липина, О.Т. Николов*, И.Б. Мусатова

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23,
Харьков, 61016, Украина*

**Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина*

Целью работы было определение диэлектрических характеристик и состояния воды в способных к витрификации криозащитных средах PVS2, 88%-й PVS3 и PVSN, в состав которых входят такие проникающие криопротекторы как глицерин, диметилсульфоксид, этиленгликоль и непроникающий криопротектор сахароза. Эти среды широко используются при кріоконсервировании меристем, эмбрионидов, каллуса, что позволяет сохранять генетические ресурсы растений в условиях жидкого азота в течение длительного времени. Диэлектрические характеристики образцов криозащитных сред, их действительную ϵ' и мнимую ϵ'' части, измеряли при температуре 20 °C с помощью СВЧ-диэлектromетра резонаторного типа на частоте 9,2 ГГц. Величины статической диэлектрической проницаемости ϵ_s сред на нижнем участке области релаксации молекул воды и частоты диэлектрической релаксации молекул воды f_d рассчитывали с использованием уравнений Дебая. Установлено, что наименьшие значения диэлектрических параметров характерны 88%-й криозащитной среде PVS3, в состав которой входят такие криопротекторы как глицерин и сахароза. Эта среда имеет наибольшую способность связывать и упорядочивать воду. По данным определения цитотоксичности и влияния низкотемпературного хранения на жизнеспособность меристем картофеля, винограда и чеснока все исследованные криозащитные среды можно использовать при разработке эффективных режимов кріоконсервирования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: криозащитные среды, меристема, глицерин, диметилсульфоксид, этиленгликоль, сахароза, СВЧ-диэлектromетрия.

DIELECTRIC PERMITTIVITY OF VITRIFICATION CAPABLE CRYOPROTECTIVE MEDIA**O.A. Gorobchenko*, N.O. Shevchenko, O.V. Lipina, O.T. Nikolov*, I.B. Musatova***Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya Str., 61016 Kharkiv, Ukraine***V.N. Karazin Kharkiv National University, 4, Svobody Sq., 61022 Kharkiv, Ukraine*

The research aim was to determine dielectric parameters and state of water in capable of vitrification media PVS2, 88% PVS3 and PVSN, the components of those are glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and non-penetrating cryoprotectant sucrose. These media are widely used to cryopreserve meristems, embryoids, callus, allowing the preservation of plant genetic resources under liquid nitrogen conditions for a long time period. Dielectric characteristics of the samples of cryoprotective media, their real ϵ' and imaginary ϵ'' components were measured at 20 °C using resonant type UHF-dielectrometer at 9.2 GHz frequency. The values of static dielectric permittivity ϵ_s of the media on the low-frequency side of the water relaxation and dielectric relaxation frequency of water molecules f_d were counted using the Debye equations. It has been shown that the least values of dielectric parameters are characteristic for 88% cryoprotective medium PVS3, which comprises such cryoprotectants as glycerol and sucrose. This medium has the highest ability of binding and ordering the water. When determining the cytotoxicity and effect of low temperature storage on viability of potato, grape, garlic meristems all the studied cryoprotective media can be used when developing the efficient protocols of cryopreservation.

KEY WORDS: cryoprotective, meristems, glycerol, dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, sucrose, UHF-dielectrometer.

Глобальне погіршення екологічної ситуації призводить до втрати видового різноманіття та зменшення ємності генофонду місцевих сортів культурних рослин і, таким чином, обумовлює необхідність збереження генетичних ресурсів рослин [1]. Створення банків рослинних об'єктів потребує забезпечення стабільності генома рослин, які зберігаються протягом тривалого часу. Таку можливість дає використання низькотемпературного консервування, зокрема меристем рослин [2]. До переваг зберігання рослинних генетичних ресурсів шляхом кріоконсервування меристем можна віднести те, що рослина безпосередньо розвивається з меристеми без утворення калюсу, тим самим забезпечує генетичну стабільність. Найбільш ефективним методом кріоконсервування біологічних об'єктів на теперішній час вважається метод вітрифікації, який базується на дегідратації клітин перед заморожуванням, а також на здатності кріопротекторів при високих концентраціях та швидкостях охолодження модифікувати процеси кристалізації води [3, 4]. Формування склоподібного стану рідини (вітрифікація) дозволяє на досить високому рівні зберегти життєздатність об'єктів з різним ступенем складності біологічної організації. Найчастіше для кріоконсервування рослин, які розмножуються вегетативним шляхом, використовують здатні до вітрифікації кріозахисні середовища, до складу яких входять як проникаючі (гліцерин, диметилсульфоксид (ДМСО), етиленгліколь (ЕГ)), так і непроникаючі кріопротектори (сахароза) [5]. При кріоконсервуванні меристем винограду та картоплі була показана висока ефективність використання складного кріозахисного середовища PVS2 (plant vitrification solution 2) [6], для кріоконсервування часнику – середовища PVS3 (plant vitrification solution 3) [7], для кріоконсервування меристем картоплі, винограду і часнику – середовища PVSN (plant vitrification solution new) [8, 9].

Звертаючи увагу на те, що майже усі кріопротектори, які застосовують при кріоконсервуванні біологічних об'єктів, є ксенобіотиками, то їхня цитотоксичність являється суттєвою перешкодою для досягнення основної мети – забезпечення високого рівня життєздатності зразку після циклу низькотемпературного консервування. Пошкодження клітин на етапі взаємодії об'єкту, який кріоконсервують, з розчинами кріопротекторів виникають з цілого ряду причин. Кріопротектори, які мають високу осмотичну активність, але низьку здатність до проникнення через плазмолему, у високих молярних концентраціях можуть стати причиною гибелі клітин

у результаті гіпертонічного стресу [4, 10]. Довгий час токсична дія кріопротекторів на клітини пояснювалася тим, що їхнє додавання викликає осмотичний шок. У основі осмотичного пошкодження клітин при введенні і видаленні кріопротекторів лежать наслідки швидкої зміни клітинного об'єму, які продукують деформацію складноорганізованих тривимірних структурно-функціональних систем, що включають комплекс клітинна стінка – плазматична мембрана – цитоскелет [5]. Це у свою чергу призводить до зміни механічної міцності цитоплазматичних мембран, їх проникності для води і іонів, що може спричинити зміну кінетики окремих біохімічних реакцій чи метаболізму вцілому. Однак не виключена і пряма токсична дія кріопротекторів на клітини [4, 11]. Хімічна цитотоксичність віддзеркалює здатність кріопротекторів викликати структурно-функціональні порушення у результаті взаємодії з макромолекулами живої біологічної системи. Кріопротектори можуть впливати на фізико-хімічні властивості мембран, на структурну підпорядкованість ліпідного бішару, на фізичну структуру цитоплазми (агрегатний і структурний стан білків цитоскелета). При цьому реалізується здатність хімічних сполук до утворення водневих зв'язків і гідрофобних взаємодій, внаслідок чого кріопротектори впливають, у першу чергу, на властивість внутрішньоклітинної осмотично активної води. Не виключена можливість впливу на зв'язану гідратну воду. Біохімічний аспект цитотоксичної дії речовин – це результат їхнього впливу на хід біохімічних реакцій, які призводять до порушення процесів життєдіяльності клітин [10]. Отже, незважаючи на ефективність PVS2 та PVS3, пошук нових кріозахисних середовищ продовжується з метою зменшення їх токсичної дії. Для цього використовують як варіювання складу середовищ PVS2 та PVS3 [12], так і менш концентровані розчини, наприклад 88%-й PVS3 [13].

Вважається, що захисна дія складних середовищ, що вітрифікуються, базується на здатності кріопротекторів створювати водневі зв'язки з водою як всередині, так і ззовні клітини, запобігаючи кристалізації. Але залишається нез'ясованим вплив складу і співвідношення проникаючих і непроникаючих кріопротекторів у досліджених кріозахисних середовищах на здатність кріопротекторів зв'язувати воду, на стан води і, відповідно, на здатність кріозахисних середовищ до вітрифікації і зменшення процесів кристалоутворення.

Метою цієї роботи є з'ясування діелектричних характеристик і стану води у здатних до вітрифікації середовищах PVS2, 88%-му PVS3 та PVSN, які використовуються при кріоконсервуванні меристем рослин.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Для приготування зразків використовували препарати виробництва фірми Merck (Германія).

Для досліджень використовували здатні до вітрифікації розчини кріопротекторів у наступних співвідношеннях:

- PVS2: 30 % гліцерину (w/v), 15 % ДМСО (w/v), 15 ЕГ (w/v), 13,7 % сахарози (w/v);
- PVS3 88%: 44 % гліцерину (w/v), 44 % сахарози (w/v);
- PVSN: 18,5 % гліцерину (w/v), 15 % ЕГ (w/v), 34 % сахарози (w/v) (експериментальна модифікація середовища).

Розчини готували об'ємно-ваговим методом на живильному середовищі MS (Murashige-Scoog) без фітогормонів і сахарози [15].

Діелектричну проникність зразків кріозахисних середовищ, їхню дійсну ϵ' і уявну ϵ'' частини, вимірювали при температурі 20°C за допомогою НВЧ-діелектрометра резонаторного типу на частоті 9,2 ГГц [16].

Токсичну дію кріозахисних середовищ визначали на меристемах картоплі, часнику та винограду за кількістю життєздатних апексів (меристем), які після відмивання від кріопротекторів мали позитивну динаміку росту та розвитку в культурі *in vitro* протягом місяця. Обробку меристем розчинами, здатними до вітрифікації, та відмивання від них проводили згідно розроблених протоколів для кріоконсервування [2, 6-9] без етапу занурення у рідкий азот. За цим самим методом визначали кількість життєздатних меристем після низькотемпературного зберігання у рідкому азоті.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

На рис. 1 представлені значення дійсної (ϵ') та уявної (ϵ'') частин комплексної діелектричної проникності досліджуваних зразків. Показано, що значення діелектричних параметрів живильного середовища MS (зразок 5) не відрізняються від таких для води (зразок 1), але для розчинів, здатних до вітрифікації (зразки 2-4), вони суттєво знижуються. Таке зниження діелектричних параметрів є наслідком зменшення у зразках кількості вільних молекул води за рахунок присутності кріопротекторів у розчинах, які мають низькі значення діелектричних параметрів (для гліцерину при 25°C $\epsilon_s=40,1$ [17]) та за рахунок їхньої гідратації.

Величиною, пропорційною кількості вільних молекул води у розчині, є статична діелектрична проникність ϵ_s (діелектрична проникність на нижній ділянці релаксації молекул води), яку розраховують за рівнянням Дебая в припущенні дебаївського характеру релаксації молекул води в розчинах кріопротекторів. Чим менше її значення, тим менше у зразку вільних молекул води, що беруть участь в процесі діелектричної релаксації. При порівнянні між собою середовищ, здатних до вітрифікації (2-4), за параметром статичної діелектричної проникності ϵ_s (рис. 2) можна зробити висновок, що найбільше вільної води міститься в середовищі PVSN (2), а найменше – в середовищі 88% PVS3 (4). Використовуючи значення ϵ_s водного розчину певного кріопротектору за умови його низької концентрації можна розрахувати кількість молекул зв'язаної води на молекулу кріопротектора (ступінь гідратації). Хоч для багатокомпонентних кріозахисних середовищ з високою концентрацією складових компонентів такі розрахунки зробити важко. Але можна оцінити здатність кріопротекторів зв'язувати воду за допомогою декременту статичної діелектричної проникності:

$$\Delta\epsilon_s = \frac{\epsilon_s^0 - \epsilon_s}{C},$$

де ϵ_s^0 – статична діелектрична проникність розчинника, ϵ_s – статична діелектрична проникність розчину, C – концентрація розчинених речовин. За декрементом статичної діелектричної проникності найбільшу здатність зв'язувати воду має зразок 88%-й PVS3 ($\Delta\epsilon_s=0,7 \cdot 100 \text{ см}^3/\text{г}$), меншу – PVSN ($\Delta\epsilon_s=0,6 \cdot 100 \text{ см}^3/\text{г}$), ще меншу – PVS2 ($\Delta\epsilon_s=0,5 \cdot 100 \text{ см}^3/\text{г}$).

Величина частоти діелектричної релаксації молекул води f_d , яка розраховується з рівнянь Дебая, характеризує ступінь упорядкованості структури вільної води у зразках. Істотне зниження величини f_d в середовищах, здатних до вітрифікації (2-4), порівняно з водою і живильним середовищем MS (5) свідчить про збільшення середньої кількості водневих зв'язків між молекулами води в цих середовищах, в результаті чого структура вільної води в них стає більш упорядкованою.

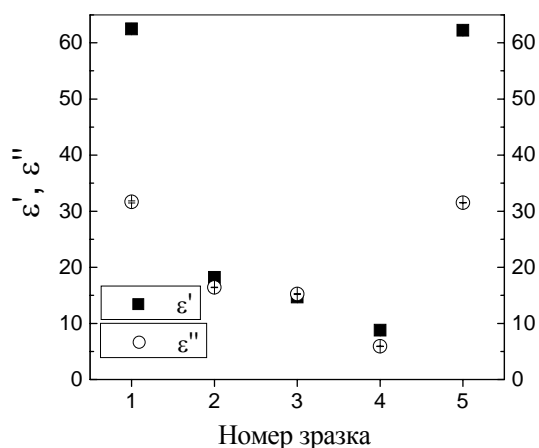


Рис. 1. Дійсна (ϵ') та уявна (ϵ'') частини комплексної діелектричної проникності зразків: 1 – H₂O; 2 – PVSN; 3 – PVS2; 4 – 88%-й PVS3; 5 – живильне середовище MS.

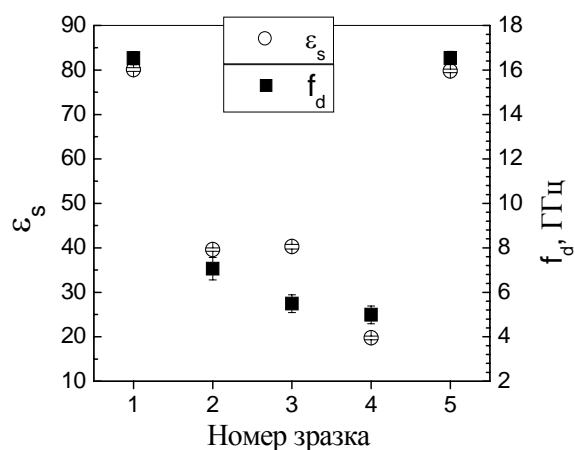


Рис. 2. Статична діелектрична проникність (ϵ_s) і частота діелектричної релаксації молекул води (f_d) зразків: 1 – H₂O; 2 – PVSN; 3 – PVS2; 4 – 88%-й PVS3; 5 – живильне середовище MS.

Оскільки найменші значення діелектричних параметрів характерні 88%-му кріозахисному середовищу PVS3, можна зробити висновок, що кріопротектори, які входять до складу цього середовища, мають найбільшу здатність зв'язувати та впорядковувати воду. Цей результат цілком узгоджується з калориметричними дослідженнями [14]. Було показано, що на термограмах усіх кріозахисних середовищ спостерігається стрибок теплопоглинання, що відповідає процесу переходу склоподібної частини зразка з твердоаморфного стану в стан переохолодженої рідини. Аналіз термограм показав, що максимальна кількість речовини в аморфному стані присутня у зразку 88%-й PVS3, кількість аморфної фази у зразках PVS2 і PVSN менша. В усіх кріозахисних середовищах відсутні термічні ефекти, які відповідають процесам докristалізації льоду та плавлення евтектики, а у середовищі 88%-й PVS3 відсутній процес кристалізації з аморфної фази; при цьому термічний процес, що відповідає процесу повного плавлення усіх досліджених зразків, має незначну інтенсивність [14].

Для визначення ефективності кріозахисного середовища проводили визначення збереженості та життєздатності біооб'єктів за результатами токсичної дії середовища та впливу кріоконсервування. Нами було показано, що використання PVS 2 дозволяє отримати життєздатність меристем картоплі на рівні 75%, винограду – 80%. При кріоконсервуванні цей показник складає 70% та 75% відповідно. Після взаємодії 88%-го розчину PVS 3 з меристемами часнику ми отримали 60 % життєздатних апексів, після кріоконсервування – 53%. Застосування модифікованого нами розчину, здатного до вітрифікації (PVSN), дозволяє одержати біля 95% життєздатних меристем картоплі, винограду та часнику. Після кріоконсервування цей показник знижується до 80% для меристем картоплі і винограду та до 73% для часника.

Отже, незважаючи на те, що найменші значення діелектричних параметрів характерні 88%-му PVS3, за даними визначення життєздатності меристем усі досліджені кріозахисні середовища можна використовувати при розробці ефективних режимів кріоконсервування.

ВИСНОВКИ

Встановлено, що найменші значення діелектричних параметрів характерні кріозахисному середовищу PVS3, до складу якого входять такі кріопротектори як гліцерин та сахароза у 44,4%-х концентраціях. Це середовище має найбільшу здатність зв'язувати та впорядковувати воду.

За даними визначення цитотоксичності та впливу низькотемпературного зберігання на життєздатність меристем картоплі, винограду та часнику усі досліджені кріозахисні середовища можна використовувати при розробці ефективних режимів кріоконсервування.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Екологічна безпека держави: матеріали Всеукр. наук. конф. студ. і асп., 21-24 квітня 2009 р., Київ / Нац. авіац. ун-т. - К., 2009. - 232 с. / *Ekologichna bezpeka derzhavi: materiali Vseukr. nauk. konf. stud. i asp., 21-24 kvitnja 2009 r., Kiiiv / Nac. aviac. un-t. - K., 2009. - 232 s. /*
2. Кріозберігання зразків генофонду часнику / Т.І. Віценя, Т.В. Івченко, Т.Ф. Стрибуль, Н.О. Шевченко // Генетичні ресурси рослин. – 2010. – № 8. – С. 200-208. / *Kriozberigannja zrazkiv genofondu chasniku / T.I. Vichenja, T.V. Ivchenko, T.F. Stribul', N.O. Shevchenko // Genetichni resursi roslin. – 2010. – № 8. – S. 200-208. /*
3. Baudot A. Glass-forming tendency in the system water – dimethyl sulfoxide / A. Baudot, L. Algel, P. Boutron // *Cryobiology.* – 2000. – V. 41, N 1. – P. 151-158.
4. Fahy G.M. Principles of cryopreservation by vitrification / G.M. Fahy, B. Wowk // *Methods Mol Biol.* – 2015. – Vol. 1257. – P. 21-82.
5. Volk G.M., Walters C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection / G.M. Volk, C. Walters // *Cryobiology.* – 2006. – V. 52. – P. 48-61.
6. Sakai A. Development of cryopreservation techniques / A. Sakai // *Cryopreservation of tropical plant germplasm. Current research progress and application. JIRCAS, Tsukuba & IPGRI. – Rome, 2000. – P. 1–7.*
7. Keller E.R.J. Cryopreservation of *Allium sativum* L (Garlic) / E.R.J. Keller // *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* – 2002. – V. 50. – P. 37–47.
8. Stribul T.F. Optimizing method for potato meristem vitrification / T.F. Stribul, N.A. Shevchenko, L.F. Rozanov // *Problems of Cryobiology.* – 2005. – Vol. 15, N4. – P. 657–654.
9. Shevchenko N.A. Integrity of grape and potato meristems using rapid freezing regimens / N.A. Shevchenko // *Problems of Cryobiology.* – 2004. – №4. – P. 30–33.
10. Best B.P. Cryoprotectant toxicity: facts, issues, and questions / B.P. Best // *Rejuvenation Research.* – 2015. – V. 18 (5). – P. 422-436.
11. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity / G.M. Fahy, B. Wowk, J. Wu, S. Paynter // *Cryobiology.* – 2004. – Vol. 48, 1. – P. 22-35.
12. Development of alternative plant vitrification solutions in droplet-vitrification procedures / H.H. Kim, Y.G. Lee, D.J. Shin [et al.] // *Cryo Letters.* – 2009. – V. 30 (5). – P. 320-334.
13. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification / S. Nishizawa, A. Sakai, Y. Amano, T. Matsuzawa // *Plant Science.* – 1993. – V. 91, Iss. 1. – P. 67-73.
14. Мусатова И.Б. Фазовые переходы и стеклование в защитных средах для криоконсервирования меристем растений / И.Б. Мусатова, Н.А. Шевченко // *Биофизика живой клетки.* – 2014. – Т. 10. – С. 129-130. / *Musatova I.B. Phase transitions and vitrification in protective media for cryopreservation of plant meristems / I.B. Musatova, N.O. Shevchenko // Biofizika zhivoj kletki – 2014. – T. 10. – P. 129-130. /*
15. Murashige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473–497.
16. СВЧ-діелектрометрия біотехнологічних жидкостей / Т. А. Жилякова, О. А. Горобченко, О. Т. Николов, Г. В. Голубничая. — Киев: Наукова думка, 2015. — 112 с. / *SVCh-dijelektrometrija biotehnologicheskikh zhidkостей / T. A. Zhiljakova, O. A. Gorobchenko, O. T. Nikolov, G. V. Golubnichaja. — Kiev: Naukova dumka, 2015. — 112 s. /*
17. Sadek H. Conductance of KIO₃ in glycerol-water mixtures / H. Sadek, A.M. Haber, F.X. Khalil // *Electrochim. Acta.* – 1969. – V. 14 (11). – P. 1089-1096.

UDC 631.417.2 + 54.061: 54.062

**EFFECT OF SOIL TILLAGE INTENSITY ON THE COMPOSITION,
PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF THE SECOND FRACTION
OF HUMIC ACIDS EXTRACTED FROM THE TYPICAL BLACK SOIL****M.A. Popirny¹, O.T. Nikolov², E.V. Skrylnik¹**¹*National Scientific Center «O. N. Sokolovsky Institute for Soil Science and Agrochemistry Research»,
4 Chaikovska St., 61024, Kharkiv, Ukraine*e-mail: pochva@meta.ua²*V. N. Karazin Kharkiv National University, 4 Svobody Sq., 61022, Kharkiv, Ukraine*

Submitted June 8, 2016

Accepted June 22, 2016

The purpose of this work lies in studying the composition, physical and chemical properties of the second fraction of the humic acid (HA2) extracted from the typical black soil, depending on the intensity of the soil tillage. Physical and chemical properties of HA2 have been studied by using ultraviolet (UV) spectroscopy, infrared (IR) spectroscopy and electron spin resonance spectroscopy (ESR). It has been demonstrated that increase of the tillage intensity of the typical black soil leads to decrease in the total carbon content and the HA2 content due to displacement of balance between the conjugated processes of humus synthesis and decay towards destruction. UV spectroscopy indicates intense absorption of humic acids in the near UV region, that corresponds to the donor-acceptor mechanisms π - π^* electrons of double bonds. Maximum absorption has been observed for the HA2 isolated from the black soil tilled by plowing. Moreover, the highest content of oxygen-containing functional groups and low quantity of aliphatic structures has been observed in the same sample. It has been shown that the nature of paramagnetic centers of the HA2 represented by chelate paramagnetic Fe^{3+} -complex formed by rearrangement π -electron system of double bonds, depending on the tillage intensity of the typical black soil. It has been found that plowing of the typical black soil enhances the number of paramagnetic centers in HA2.

KEYWORDS: organic soil matter, humic acid, soil tillage, supramolecular structure of the humic acid, aromatic system, carboxyl groups, chelate complexes.

**ВПЛИВ ІНТЕНСИВНОСТІ ОБРОБІТКУ ҐРУНТУ НА СКЛАД, ФІЗИЧНІ ТА
ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДРУГОЇ ФРАКЦІЇ ГУМІНОВИХ КИСЛОТ,
ЕКСТРАГОВАНИХ З ЧОРНОЗЕМУ ТИПОВОГО****М.А. Попірний¹, О.Т. Ніколов², Є.В. Скрильник¹**¹*Національний науковий центр «Інститут ґрунтознавства та агрохімії імені О. Н. Соколовського»,
вул. Чайковського, 4, 61024, Харків, Україна*²*Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, м. Свободи, 4, 61022, Харків, Україна*

Метою даної роботи було вивчення складу, фізичних та хімічних властивостей другої фракції гумінових кислот (ГК2), виділеної з типового чорнозему, в залежності від інтенсивності обробітку ґрунту. Фізичні та хімічні властивості ГК2 вивчено за допомогою ультрафіолетової (УФ) спектроскопії, інфрачервоної (ІК) спектроскопії і спектроскопії електронного парамагнітного резонансу (ЕПР). Було показано, що збільшення інтенсивності обробітку чорнозему типового призводить до зниження загального вмісту вуглецю і вмісту ГК2 через зсув рівноваги між сполученими процесами синтезу та розпаду гумусу в напрямку розпаду. УФ-спектроскопія вказує на інтенсивну адсорбцію гуміновими кислотами в ближній УФ-області, що відповідає донорно-акцепторним механізмам π - π^* електронів подвійних зв'язків. У зразку ГК2, виділеному з чорнозему після оранки, спостерігалось максимальне поглинання в ближній УФ-області. До того ж, в тому ж самому зразку ГК2 спостерігається найбільший вміст кисневмісних функціональних груп з низькою кількістю аліфатичних структур. Було показано, що природа парамагнітних центрів ГК2 представлена хелатними парамагнітними Fe^{3+} -комплексами, що утворюються за рахунок перегрупування π -електронної системи подвійних зв'язків, яке залежить від інтенсивності обробітку чорнозему типового. Було встановлено, що оранка типового чорнозему збільшує кількість парамагнітних центрів в ГК2.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: органічна речовина ґрунту, гумінові кислоти, обробіток ґрунту, супрамолекулярна структура гумінових кислот, ароматична система, карбоксильні групи, хелатні комплекси.

**ВЛИЯНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ОБРАБОТКИ ПОЧВЫ НА СОДЕРЖАНИЕ,
ФИЗИЧЕСКИЕ И ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВТОРОЙ ФРАКЦИИ
ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ, ЭКСТРАГИРОВАННЫХ ИЗ ЧЕРНОЗЕМА ТИПИЧНОГО**

М.А. Попирный¹, О.Т. Николов², Е.В. Скрьльник¹

¹*Национальный научный центр «Институт почвоведения и агрохимии имени А. Н. Соколовского»,
ул. Чайковского, 4, 61024, Харьков, Украина*

²*Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, 61022, Харьков, Украина*

Целью данной работы было изучение состава, физических и химических свойств второй фракции гуминовых кислот (ГК2), выделенной из типичного чернозема, в зависимости от интенсивности обработки почвы. Физические и химические свойства ГК2 изучали с помощью ультрафиолетовой (УФ) спектроскопии, инфракрасной (ИК) спектроскопии и спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Было показано, что увеличение интенсивности обработки чернозема типичного приводит к снижению общего содержания углерода и содержания ГК2 через смещение равновесия между сопряженными процессами синтеза и распада гумуса в сторону распада. УФ-спектроскопия указывает на интенсивную адсорбцию гуминовыми кислотами в ближней УФ-области, что соответствует донорно-акцепторным механизмам π - π^* электронов двойных связей. В образце ГК2, выделенном из чернозема после вспашки, наблюдалось максимальное поглощение в ближней УФ-области. К тому же, в том же образце ГК2 наблюдается наибольшее содержание кислородсодержащих функциональных групп с низким количеством алифатических структур. Было показано, что природа парамагнитных центров ГК2 представлена хелатными парамагнитными Fe^{3+} -комплексами, образующимися за счет перегруппировки π -электронной системы двойных связей, которое зависит от интенсивности обработки чернозема типичного. Было установлено, что вспашка типичного чернозема увеличивает количество парамагнитных центров в ГК2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: органическое вещество почвы, гуминовые кислоты, обработка почвы, супрамолекулярная структура гуминовых кислот, ароматическая система, карбоксильные группы, хелатные комплексы.

The humic acids (HA) are a major component of the soil organic matter (humus substances) playing multifunctional role due to variable composition of the HA structure that results in a wide range of biotic and abiotic factors [1]. Physicochemical properties of the HA reflect the structural features of the HA. In the HA structure, the central structure (core) and peripheral parts are identified, each part has a variable composition depending on the type of soil and external environment. The variable composition of the HA depends on extracting methods from the soil (or another source of natural organic matter) and future purification, modification. The central structure (core) is formed by aromatic rings with various functional groups (the most important are carboxyl, phenol hydroxide, ketone, amide ones) and the peripheral parts by aliphatic polypeptide chains [2, 3]. Due to functional groups reactivity of HA is determined. Such structural features determine the chemical, physical and biological properties of the HA, specifying their redox activity, etc. [3]. The HA actively interact with different mineral components of the soil making complexes with mono-, di- and trivalent metals, thereby transforming the elements inaccessible to plants into the available state. In a certain range of pH, the humic organometallic complexes acquire high mobility and can be absorbed by the plant root hairs [2, 4]. It has been found that increasing complexation with the two- and trivalent metals (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) is associated with increase of proportion of the oxygen-containing functional groups and decrease of the nitrogen-containing groups [5]. Iron ions can displace hydrogen in the carboxyl groups of the HA and form complexes such as chelates [1, 2, 4].

Current comprehension of the structural and functional features of the HA is based on the notions of self-organization of supramolecular complexes from smaller molecular associates of the HA. The main aspect of humic supramolecular structure is its stabilization by weak intermolecular interactions, such as hydrophobic, van der Waals, and hydrogen bonds, the formation of complex macrostructures providing for multifunctional properties of the soil

humic substances [6, 7, 8]. The HA are formed due to conjugated biosynthetic processes (decomposition and synthesis in bioorganic soils matter), mainly of the products of biodegradation of plant organisms, accumulating and stabilizing the HA, protecting the soil organic matter from total mineralization (destruction of organic soil matter to carbon dioxide and water) [6].

Biodegradation of plants crop residues and their subsequent participation in synthesis of the HA occurs by enzymatic activity of the soil microbial community, without which processes of humic acids formation and formation of the fertile humus layer of soil [1] are not possible. Soil fertility is determined by the content of humus, which, in its turn, is stipulated by the quantitative and qualitative features of the HA. The black soils, forming agronomically valuable soil structure, are the richest in organic soil matter content [1, 2, 8].

It is known that the intensive use of black soils of Ukraine gives rise to a significant deterioration of their fertility [8]. One of the most important diagnostic signs of the soil degradation is decrease of content of the soil organic matter, and its main component - humus substances [9]. Reduction of the amount of the soil organic matter and deterioration of its quality characteristics may be subject to a lack of constant compensation of organic compounds, and result in change of the ratio between mineralization of the soil organic matter and formation of the stabilized soil humic substances [9, 10]. An informational indicator of the agrogenic load on the soil quality is features of the HA fractions [10, 11].

According to the modern concepts, based on the results of the long-term field experiments with application of different agricultural technologies, the transformation of soil organic matter following the agronomic activity is observed predominantly in the labile fraction of the humic soil acids (the first fraction of the HA1) [12, 13]. Experiments on different soils have revealed a close correlation between the productivity of agricultural ecological systems and contents of labile fraction of the HA1 [10, 13]. Deviation from the optimal soil ecosystem (for example, from the virgin soil) is subject to increases of the process of the organic matter mineralization and impaired fertility, causing lower yields [11, 12]. Pursuant to some authors, for assessment of soil fertility it is important to consider not only the labile fraction of the HA1, but also a more stable and biochemically mature component of humus – the second fraction of the HA2 [10, 13]. Despite a vast amount of information on changes in the content of fractions of humic acid under the influence of the agricultural use of soil, the attention of researchers is attracted by mechanisms of responses at the molecular level of the HA. In our opinion, to establish responses at different levels to anthropogenic load it is necessary to study physical and chemical properties of the isolated HA fractions. Among the physical and chemical research methods UV/IR/ESR spectroscopy provides valuable information about the molecular structure of the HA. The main advantage of the above methods is to carry out an analysis without any prior sample preparation and the HA modifications bringing about to irreversible structural changes of the native nature of macromolecules.

The purpose of this work has been to study the content and physicochemical properties of the second fraction of the unmodified HA2 extracted from the typical black soil depending on intensity of the tillage technologies.

MATERIALS AND METHODS

Selection and laboratory-analytical analysis of soil samples

The samples of soil have been collected in the experimental field of the V.V. Dokuchayev Kharkiv National Agrarian University, the Department of Agriculture. The aim of experiments has been to determine the effect of intensity of the tillage technologies on

soil organic matter characteristics of the typical black soil (chernozem). The field experiment was started in 2006. The variants of the tillage investigated in the field experiment are as follows: 1) 40 year non-tilled typical black soil - virgin soil (control); 2) soil intensively tilled (traditional plowing depth of 20-22 cm); 3) minimally tilled soil (disks at the depth of 10-12 cm); 4) Non-tilled soil (provided by direct seeding into the non-tilled soil). Soil samples have been collected from the surface soil layer of 0-10 cm. The total carbon content in the soil has been determined by Tyurin [14], total nitrogen – by Kjeldahl method [14]. Mineralization (rate of biodegradation of the soil organic matter) has been calculated by the ratio of the total soil carbon content to the content of total nitrogen (C/N); increase of the parameter indicates a decrease in the degree of mineralization of the soil organic matter. The content of agronomically valuable fractions of HA in the soil has been determined by the method of humus fractionation [15].

Extraction of second fraction of the HA from the soil samples

Collected soil samples have been dried to the air-dry condition, crop residues have been removed and then the soil samples have been sieved through a sieve with 1 mm pore diameter. Extraction of HA2 fraction has been carried out by the method of Orlov [16]. The prepared soil samples have been subjected to decalcification by sulfuric acid, cleaned from calcium, and then washed with distilled water. Humic acid has been then dissolved in 0.1 N NaOH. After sedimentation for 24 hours, the centrifugation (3000 rpm, 10 min) for separation of clay minerals has been performed. Precipitation of humic acids has been carried out with 10% HCl, adjusting the solution to pH 1. Then the HA fractions have been washed with distilled water. The obtained gel of the HA has been crystallized in the water bath and dried in the oven at 80 C° (2 hours) to the air-dry state. A black crystalline powder – preparation of the second fraction of the HA of typical black soil has been the result.

Physicochemical methods of analysis of the second fraction of the HA

The Fourier Infrared Spectroscopy (FT-IR) of the second fraction of humic acids has been performed by the Agilent Technologies Cary Spectrometer 630 supplied with Diffuse Reflectance and Fourier Transformation in the standard measurement area of 1000-4000 cm⁻¹ (in a potassium bromide compressed tablet). Interpretation of the spectra has been performed on the characteristic absorption spectra of humic substances [1, 11, 16].

The electron spectra in the UV absorption of humic acids of the second fraction have been measured on the spectrometer Stellarnet BLACK-Comet in the range of 90 nm – 445 nm. To perform spectroscopic analysis, the HA have been dissolved in 0.1 N NaOH [16].

Analysis of the electron spin resonance (ESR) characteristics has been performed using spectrometer JES-ME-3x, which operates in the three-centimeter wavelength range (X-band) with a frequency modulation of 100 kHz. The weight of samples of humic acids for ESR spectroscopy is 100 mg, as placed in a quartz ampoule produced by JEOL Company. The sample of polycrystalline of diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) has been used as a standard for assessment of the g-factors and intensities of the ESR spectra; the average value of the g-factor has equaled to 2.0036 ± 0.0003 . The samples in quartz ampoules have been placed in the antinode of the microwave magnetic field of the resonator of the ESR spectrometer. ESR has been performed at room temperature 12 hours after sample preparation. Concentration of paramagnetic centers in the HA2 samples has been determined by comparing the relative intensities of the signals (Tesla) with the value by the equation $S=(\Delta H)^2 I$, where ΔH is the width, and I is the amplitude of the line. The statistical error in assessment of the concentration of paramagnetic centers by ESR method is 10-20 %.

RESULTS AND DISCUSSION

Content of the fractions of humic acids and biological activity of the black soil

The total carbon content in the soil sample from virgin soil has been 3.1% (Table 1). It has been found that the total carbon content of the typical black soil has been significantly reduced with the intensive tillage (plowing) to 2.8%. The minimum tillage (disking) has reduced it to 2.9% and zero tillage (direct seeding) to 2.8% (Table 1). Therefore, the minimal tillage results in conservation of organic soil matter.

It has been shown that the intensive tillage results in an increase in the content of HA1 (18.8%) in the soil, at the same time the direct seeding results in reduction of the movable HA1 (7.0%) (Table 1). The minimal tillage (disking) results in the HA1 content (16.1%) that is close to the value of HA1 after plowing (18.8%). It has been found that minimization of processing (disking and direct seedling) results in accumulation of the HA2 on the level close to its content in the virgin typical black soil (39.8%). Plowing causes a significant reduction in the HA2 (22.7%).

Table 1

Total carbon content (%) in the first fraction of humic acids (HA1) and the second fraction of humic acids (HA2) in the typical black soil depending on the soil tillage intensity

Values	Variants of tillage technology			
	Virgin soil (Control)	Intensive tillage (Plowing)	Minimal tillage (Disking)	No tillage (Direct seeding)
C _{total} , %	3.1±0.5	2.8±0.4	2.9±0.5	2.8±0.4
HA1, %	12.4±2.0	18.8±3.2	16.1±5.3	7.0±1.6
HA2, %	39.8±6.2	22.7±5.4	33.9±5.9	39.9±6.3

The biological parameters of the typical black soil of the experimental field show that the tillage of the typical black soil causes changes in the diversity of the soil microbial populations (Table 2), [18].

Table 2

Indexes of biodegradation (C/N) assessed in our work, and biochemical activity of organic soil matter of the typical black soil [18]

Values	Plowing	Disking	Direct seeding
C/N	10.5	11.9	11.7
Biogenic diversity, % [18]	31.6±1.6	26.30±1.2	98.0±4.0
Invertase (mg/100 g of soil) [18]	290.0±5.0	305.0±5.0	435.0±6.5
Polyphenoloxidase (mg/100 g of soil) [18]	4250±80	4317±75	4342±75

The total index of biogenic diversity shows that the typical black soil, after direct sowing, is less susceptible to changes in the microbial community [18]. In our work, the rate of biodegradation of humus in the typical black soil by microbial populations has been estimated (Table 2, C/N index). It has been found that the minimal tillage reduces the intensity of decay of soil organic matter in the typical black soil. The intensive tillage, on the contrary, increases it, thereby shifting the conjugated processes of synthesis and decay of humus towards

destruction (Table 2). The indicators of biochemical activity of the typical black soil depend on the intensity of tillage in the experimental field (Table 2), [18]. It is known that content of the soil humic acids correlates with the activity of enzyme invertase that hydrolyzes carbohydrates, peptides and aliphatic structures, and with the polyphenoloxidase activity, that is involved directly in the oxidative polycondensation of the aromatic system of the humic acids [1]. It has been shown that the activity of invertase and polyphenoloxidase is reduced with the intensification of the typical black soil tillage (Table 2), [18]. We have used physicochemical methods to investigate processes of formation and change of the HA2 of the typical black soil, depending on the tillage intensity.

UV spectroscopy of the second fraction of humic acid (HA2), depending on intensity of the typical black soil tillage

Fig. 1 shows results of the analysis of UV spectroscopy of the HA2 isolated from the typical black soil under different tillage intensities. The HA2 of the typical black soil absorb in the near UV range (275 nm – 350 nm). After the intense plowing, the intense absorption at bands 280 nm, 310 nm, 340 nm is observed.

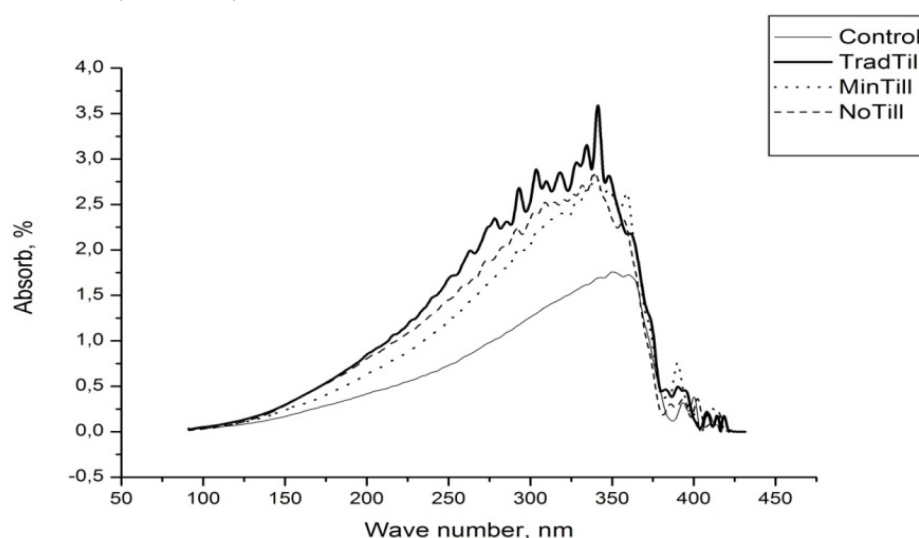


Fig. 1. UV absorption spectra of HA2, depending on the tillage intensity of the typical black soil: Control – virgin soil; No Till – direct seeding; Min Till – disking; Trad Till – plowing.

It is known that intense absorption and appearance of the "shoulders" at the spectra of the HA (in the area of 270 nm – 300 nm) are caused by quinones and chromophore functional groups (oxygen and nitrogen-containing) – polyconjugated bonds of aromatic system of HA2, having $\pi-\pi^*$ electronic transitions. The intense absorption band (at 310 and 340 nm) of the HA2 isolated from the typical black soil after plowing corresponds to the donor-acceptor mechanisms as caused by $\pi-\pi^*$ electronic transitions in the ring system of the conjugated bonds, in chelate complexes with transition metals.

FT-IR spectroscopy of the second fraction of humic acids (HA2)

In the FT-IR spectra of the humic acids similar characteristic absorption bands that show similar structural elements and functional groups co-existing in these macromolecules are identified (Fig 2).

The hydroxyl group (-OH), hydrogen bonds (H-bonds) absorb in range of 3600 cm^{-1} – 3400 cm^{-1} ; doublet of aliphatic structural components (-CH₂, -CH₃) – at 2900 cm^{-1} and 2800 cm^{-1} ; oxygenated aromatic carboxyl group of (-COOH) and ketone (C=O) at 1710 cm^{-1} ,

1715 cm^{-1} and given by quinon $-\text{OH}$ group; aromatic double bond system with $\text{C}=\text{C}$ – at 1625 cm^{-1} , and an absorption band corresponding oxygen-containing groups substituted with metal ions – at 1333 cm^{-1} . The appearance of 3137 cm^{-1} band is based on the interaction of the OH -group with metals (for example Fe^{3+} or Al^{3+}) forming the various complex compounds. This wave number is also associated with presence of the H-bonds, stabilizing individual macromolecular structure of the HA2 depending on the dimensional configuration of such structures [4].

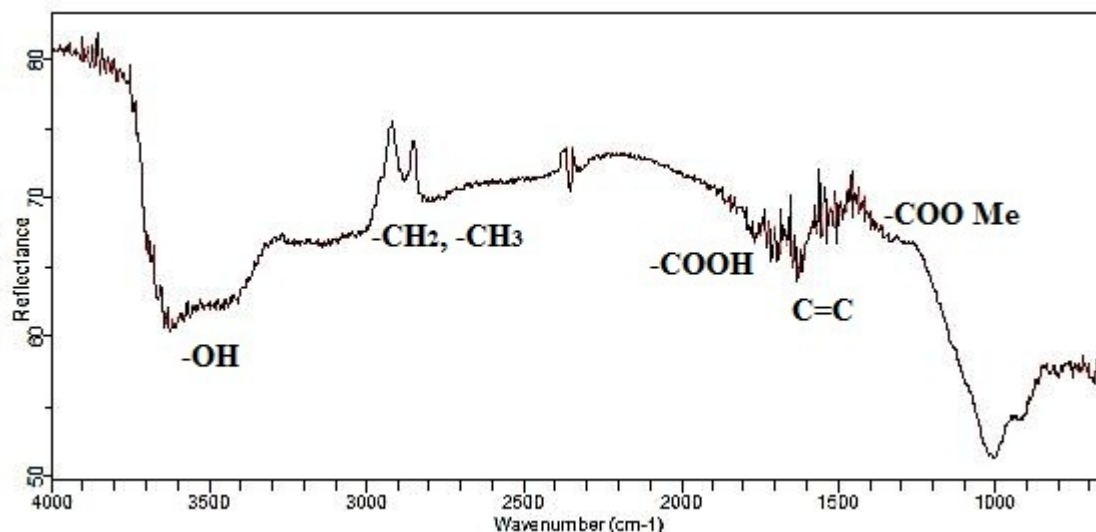


Fig. 2. FT-IR spectrum of HA2 isolated from the typical black soil under intensive tillage (plowing).

Analysis of the structural elements in the HA2 isolated from virgin soil indicates a high content of aliphatic and aromatic structures. Intense absorption of the carboxyl group is shown in aromatic system of the HA2 as extracted from the black soil after plowing. The intense band 1333 cm^{-1} corresponds to formation of metal complex, which is caused by a complete replacement of the carboxyl group and a greater degree of ionization of the oxygen-containing functional groups. The HA2 fractions isolated from the disked black soil are characterized by a greater degree of aliphatic groups and a lower degree of oxygen-containing groups in the aromatic system. The HA2 fractions isolated from the typical black soil under zero tillage technology are characterized by a lower diversity in the structural and functional elements.

ESR spectroscopy

Results of examining the HA2 through ESR are shown in Fig. 3. The resulting ESR spectra have the g -factor of 2.0036 close to the g -factor of DPPH, and the broad line between the wide range of absorption curves (inflection points of the absorption curve are distanced from antinodes approximately at 0.1 Tesla). Components of the fine and hyperfine structure are not available in the obtained spectra. In the area of the g -factor of DPPH 2.0036 there is a slight narrow "shoulder", corresponding to the signal of semiquinone radicals of the HA2 as a result of imposition of the broad line of signal that has been shown in some studies by ESR spectroscopy of humic acid [2, 11, 17, 19]. Availability of the narrow signal indicates to the HA2 aromatic structure being formed due to oxidative condensation of quinones (lignin of the plant tissue residue) by semiquinone radicals. Formation of the aromatic structures is catalyzed by the enzyme polyphenoloxidase.

Form of lines of all the ESR spectra is independent from the tillage technology. The said spectra differ only by intensity, and accordingly to the number of paramagnetic centers (Fig. 4). We have found that plowing causes a significant increase in paramagnetic signal of the HA2, due to increase in the number of paramagnetic centers (paramagnetic chelate complexes) (Fig. 4).

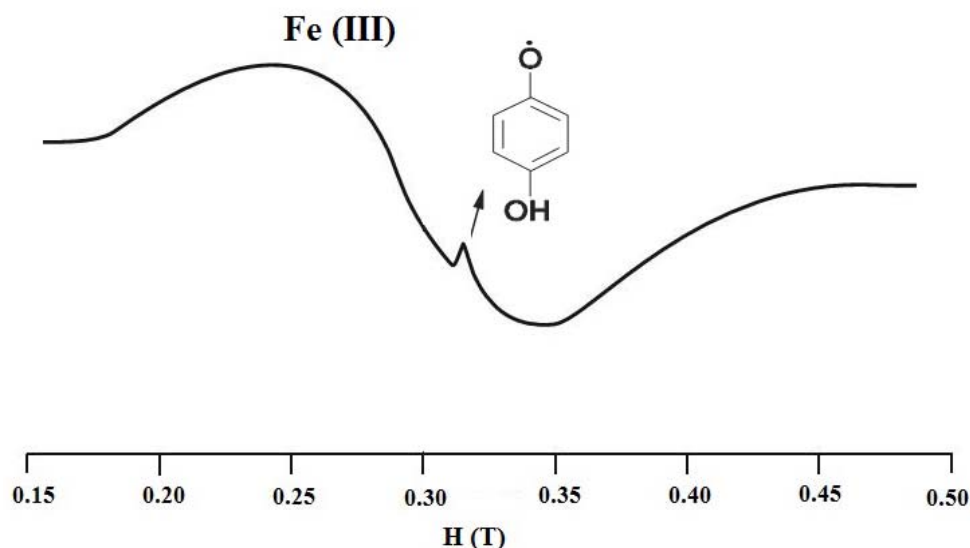


Fig. 3. ESR spectrum of HA2 from virgin soil. H(T) is measured in Tesla.

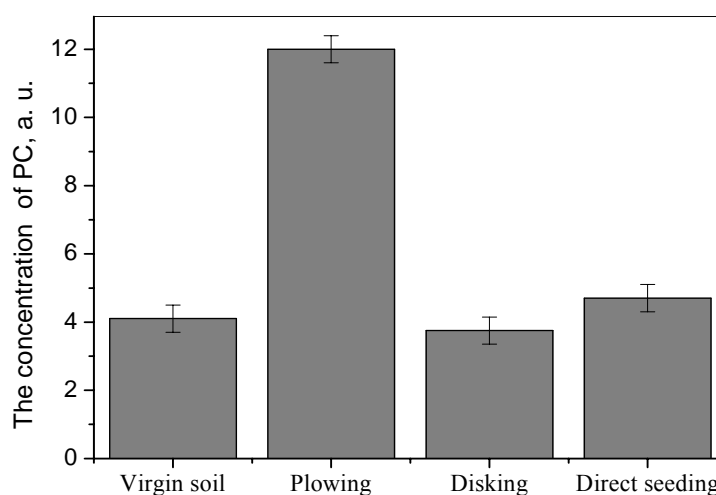


Fig. 4. Concentration of paramagnetic centers (PC) in arbitrary units in HA2 depending on the tillage intensity of the typical black soil.

Dynamics of the content of total carbon in the HA fractions of the typical black soil (Table 1) point out to a formation of mobile humic compounds (increase of content the HA1 in humus) and reduction of total carbon at intensification of tillage of the typical black soil, that is caused by a more intense biodegradation of the soil organic matter. The rate of decay process of organic matter by enzymes depends on the overall ratio of carbon to nitrogen (C/N) [20]. The maximum rate of the biodegradation of the humus typical black soil is observed after plowing (Table 2, C/N ratio). Thus, plowing causes displacement of the coupled processes of synthesis and decomposition of humus to the decay as associated with the change of microbial community (Table 2, index of diversity), which gives rise to a change in the

enzymatic activity of important enzymes like polyphenoloxidase and invertase performing the formation of humic acids (Table 2).

Less intensive tillage of typical black soil (disking) has caused a lower mineralization and some increase in total carbon accumulation of the HA2 and some smaller quantity of the HA1 as compared to plowing (Table 1). Importantly, a low content of the HA1 and a high content of the HA2 at direct seedling (Table 1) point out to a formation of more inert humic acids that reduce the overall mobility of the humic system and results in formation of structures of the soil available to plants.

The virgin typical black soil, which is a natural ecological system, is characterized by a more balanced state, caused by the shift of equilibrium between the synthesis and decay of humus in soil, to the accumulation of humus (total carbon). Minimizing of tillage (disking and direct seeding) causes a decrease of humus decay. At direct seeding an accumulation of inert humus is observed. At disking, its quality indicators are more favorable for development of plants. It is known that tillage induces changes of physical properties of the soil (contents of the air and moisture) and leads to a redistribution in population of microorganisms by mechanical tillage of the black soil [21]. Plowing leads to the improved aeration and causes activation of aerobic microorganisms that mineralize the soil organic matter, that activate the HA formation processes, as indicated by an increase of the HA1 after plowing and disking.

It has been found that intensification of tillage of the typical black soil induces strong absorption of aromatic structures of the HA2 in the UV region (Fig. 1), caused by electronic π - π^* transitions. It is known that the π - π^* electronic transition is associated with the transition between the main and excited states of humic acids molecules, featuring the energy transition [22]. As a result, the unpaired electrons are moved throughout the system of double bonds. Hyperchromic effect in the HA2 after plowing is caused by a more active mobility of the π -electron system, which is due to the donor-acceptor interactions between the HA structure and coordinated paramagnetic transition metals [22]. According to the results of FTIR spectroscopy, appearance of a clear signal in the 1330 cm^{-1} and absence at $1720\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$ (Fig. 2) bear evidence of the formation of complexes of carboxylic acid/ketone groups with metals. The OH groups in the HA2 react with metal ions Fe^{3+} and Al^{3+} (Fig. 2). The absorption ratio of the structural elements in the HA2 testifies to a decrease in the proportion of aliphatic structures with the tillage intensification, due to the increased mineralization process, bringing about to an increase in the content of carboxyl and ketone groups. The content of aliphatic structures and oxygen-containing groups of the aromatic system increases after disking. A smaller variety of structural elements is detected in the HA2 of typical black soil after the non-tillage technology, due to the formation of inert humus substances. Subject to the fact that the general shape of the ESR spectrum's line is not affected by the soil treatment intensity, and differs only by the spectrum intensity (Fig. 3), we can conclude that paramagnetic centers of the same structure (one type of paramagnetic centers) in the HA2 tested samples are formed. For example such a structure can be represented by paramagnetic centers formed by complexes with paramagnetic metals of intermediate group. It may be (Fe^{3+}), since it is known that at room temperature the ESR signal of Fe^{2+} is not detected [23].

The broad line in ESR spectrum of humic acids with g-factor of 2.0023 is associated with the paramagnetic centers, which are represented by complexes with paramagnetic metals. It is known that paramagnetic Fe^{3+} refers to groups with the electron configuration of the ions that are in the S-state (spin moment of 6 (5/2) for Fe^{3+} and Mn^{2+}) [23, 24]. In the above ions, the orbital angular momentum is zero, so the main levels in the crystal lattice should not be split, but the paramagnetic activity is shown. S-state ions in the complexes have the g-factor close to the value of unpaired electron (2.0023) that is found in the spectra [23]. Thus, a broad ESR line of the HA2 with the g-factor of the free unpaired electron clearly corresponds to the "non-

free" unpaired electron in chelate complex with the ion Fe^{3+} . Aromatic systems of humic acids are represented by different cyclic structures with the oxygen-containing functional groups, the spatial configuration forming various complexes due chelate (and macrocyclic) effects. Complexity of the organization of supramolecular structure increases the stability and multifunctional properties of paramagnetic complexes and of the entire supramolecular structure [24].

We have proposed a generalized structure scheme of the chelate supramolecular complex of the HA2 (Fig. 5) subject to the data obtained by the UV, FTIR, and ESR spectroscopy. Configuration of the supramolecular structure is also stabilized by the hydrogen bonds (like a dative bond), and the latter may be united in cooperative paramagnetic clusters in the HA2 [27-29].

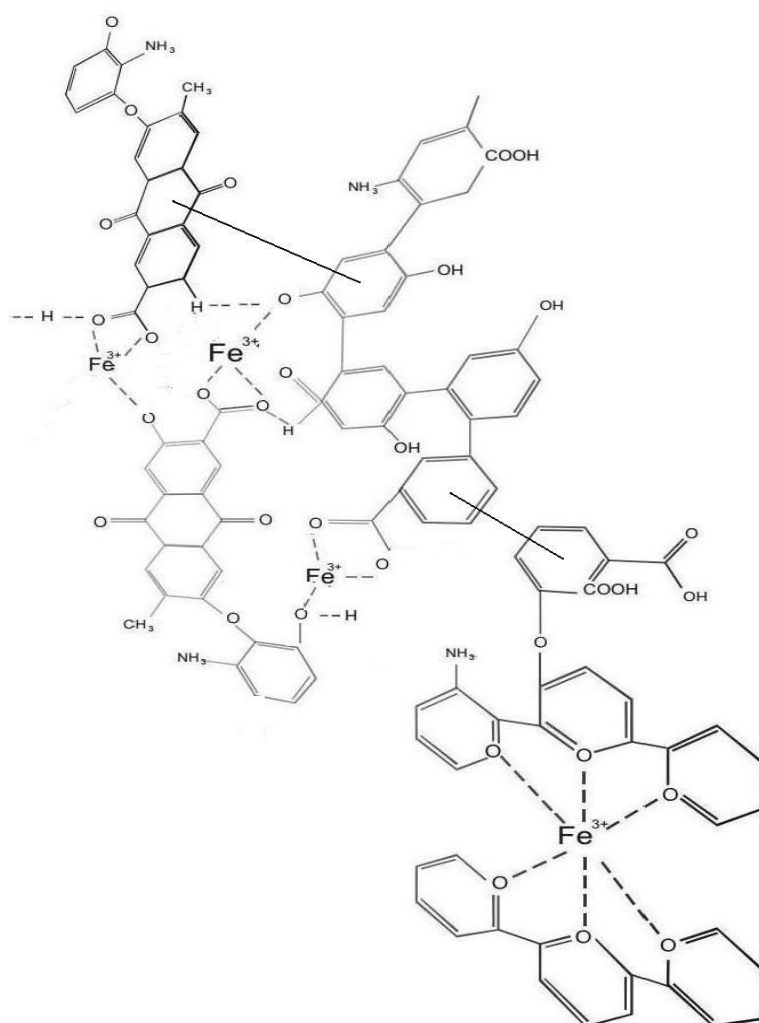


Fig. 5. Scheme of the fragment of supramolecular structure of HA2 from the black soil tillage by plowing, including the cooperative cyclic interaction with Fe^{3+} ions also stabilized by H-bond.

The ESR spectra of the HA2 isolated from the black soil after plowing tillage have the highest intensity of signal (Fig. 4), due to a high content of paramagnetic centers represented by paramagnetic chelate complexes with Fe^{3+} . In the aromatic system Fe^{3+} chelate, the complexes are formed owing to oxygen-containing groups due to the electrostatic interactions. In the macroscopic approach, such complexes can be regarded as a cluster structures with cyclic delocalized cooperative interactions because the electron-donor-acceptor interactions with the formation of Fe^{3+} complexes [24, 25-27] are observed in the

HA2. Such complexes are paramagnetic due to overlap of the electron clouds of the paramagnetic ion and ligands of π -aromatics system and the unpaired electron can move throughout the system of double bonds of the complex [26-28].

The demonstrated intense mineralization after plowing of the typical black soil is accompanied by a more active formation of the so-called "immature" humic formation of associates of low molecular weight complex structure in the soil [5, 21]. This process is connected with emergence of paramagnetic complexes with Fe^{3+} in the HA2. Presumably, subject to changes of external conditions (for example, redox potential), the supramolecular complexes can dissociate into low molecular weight compounds [29, 30], especially in the root zone of plants (rhizosphere) due to the plant exudation [6, 21]. It is known that in rhizosphere, the biofermentation activity varies, which fact consequently impacts the metabolic redox processes and pH, causing a change of the valence of the metals of the intermediate group, in this case, of ions of Fe^{2+} into Fe^{3+} , with the intensification of mechanical processing the soil, thereby affecting the physicochemical properties of the soil [1, 2, 19, 20].

CONCLUSIONS

It has been found that the methods of tillage of the typical black soil affect the redistribution and content of agronomically valuable fractions of the HA1 and the HA2 in the soil. Such effect is connected with the change of microbial and enzymatic activity in the soil microbial community. It is shown that an increase in the tillage intensity causes a reduction in the overall carbon content in the typical black soil and a decrease of the HA2 content through a shift of equilibrium between the humus synthesis and decay in the direction of humus degradation (mineralization). It is found that direct seeding results in low content of the HA1 and high content of the HA2 in the soil, testifying to formation of inerte humus in the soil, and affecting fertility of the soil.

It is shown that the intense absorption of the HA2 in the near-UV region is due to the active electron mobility in the π - π^* electronic system of double bonds of the aromatic system, caused by formation of the complexes with metals of the intermediate group. The HA2 that are isolated from the black soil after plowing are characterized by the most intense absorption in the UV area. It is shown that direct seeding gives rise to a lower diversity in the structural and functional elements of the HA2. It is found that the soil disking increases the content of aliphatic elements in the HA2 by reducing the mineralization process. It is proved that the highest content of the metal-oxygen-containing groups in the HA2 of the typical black soil is observed after intensive tillage. It is demonstrated that the broad line of the ESR spectrum of the HA2 corresponds to a paramagnetic chelate complexes with Fe^{3+} . It has been revealed that plowing provides an intramolecular rearrangement in aromatic system of the HA2, as evidenced by the increase in number of the paramagnetic Fe^{3+} complexes.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors want to thank Professor Yuriy Shkorbatov for many helpful discussions and for proofreading of this manuscript.

REFERENCES

1. Orlov D. S. Humic substances and general theory of humification / D.S. Orlov; Moscow: MSU, 1990. – 325 p.
2. Stevenson F.J. Humus chemistry: Genesis, composition, reactions / F.J. Stevenson; 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd, 1994. – 512 p.
3. Giovanela M. Elemental compositions, FT-IR spectra and thermal behavior of sedimentary fulvic and humic acids from aquatic and terrestrial environments / M. Giovanela // *Geochemical Journal*. – 2004. – N. 38. – P. 255-264.

4. Ishakov H.A. / Humic complexes / H.A. Ishakov // Chemical technology. Vestnik Kazansky STU. – 2010. – N. 6. – P. 126-129.
5. Physiological effects of humic substances on higher plants / S. Nardi, D. Pizzeghello, A. Muscolo, A. Vianello // Soil Biology & Biochemistry. – 2002. – N 34. – P. 1527-1536.
6. Nebbioso A. Advances in Humeomic: enhanced structural identification of humic molecules after size fractionation of a soil humic acid / A. Nebbioso, A. Piccolo // Analytica Chimica. – 2012. - N 720. - P. 77-90.
7. Piccolo A. The supramolecular structure of humic substances / A. Piccolo // Soil Sci. - 2001. – N. 166. - P. 810-832.
8. Kravchenko Y. Amount and dynamics of soil organic matter in typical chernozem of Ukraine under different soil tillage systems / Y. Kravchenko // China: Northeast Forestry University. – 2010. – 109 p.
9. Skrilnik E.V. Effect of tillage system and fertilization on humic condition and nutrition in typical black soil / E.V. Skrilnik, O.S. Perebikovska, V.P. Moskalenko // Agrohimiya i Gruntoznavstvo. – 2008. – N. 68. – P. 90-94.
10. Ovchinnikova M.F. Symptoms and Mechanisms of nutrient transformation of humic substances sod-podzolic soil / M.F. Ovchinnikova // Agrohimiya. – 2012. – N. 1. – P. 3-13.
11. Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy / M. Gonzalez, P. Ladislau, C. Sergio [et al.] // Geoderma. - 2004. – N. 118. – P. 181-190.
12. Haynes R.J. Labile organic matter fractions as central components of the quality of agricultural soils: an overview / R.J. Haynes // Adv. Agron. – 2005. – N. 85. – P. 221-268.
13. Bakina L.G. Labile humus sod-podzolic loamy soils of the North-West of Russia at liming / L.G. Bakina // Agrohimiya. – 1997. – N. 6. – P. 27-31.
14. DSTU 7926:2015. Method for determining total carbon and nitrogen in organic samples. Soil quality. – Kiev: DP UkrNDCN. – 12 p.
15. DSTU 7828:2015 Determination of the group and fractional composition of humus by I. V. Tyurin methods in modification by V.V. Ponomareva and T.A. Plotnikova. Soil quality. – Kiev: DP UkrNDCN. – 14 p.
16. Orlov D. S. Practicum work on humus biochemistry / D.S. Orlov, L.O. Grishina. – Moscow: MSU. – 1981. – 272 p.
17. Effect of no-till cropping systems on soil organic matter in a sandy clay loam Acrisol from Southern Brazil monitored by electron spin resonance and nuclear magnetic resonance / R.L. Parfitt, B.K. Theng, J.S. Whitton, T.G. Shepherd // Soil & Tillage Research. – 2000. – N. 53. – P. 95-104.
18. Vilnyiy R.P. Effect of minimization soil tillage on ecobiological condition of black soil / R.P. Vilnyiy // Pochvovedenie i agrohimiya. – 2015. – N. 1. – P. 104-114.
19. Investigation of the structure of humic acid by EPR-spectroscopy / V.P. Strigutskiy, Yu.Yu. Navosha, T.P. Smychnik, N.N. Bambalov // Pochvovedenie. – 1992. – N. 1. – P. 147-151.
20. Schapov L.N. Microbe succession at organic soil matter transformation / L.N. Schapov // Pochvovedenie. – 2004. – N. 8. – P. 967-975.
21. Kravchenko Y. Quality and dynamics of soil organic matter in a typical chernozem of Ukraine under different long-term tillage systems / Y. Kravchenko, N. Rogovska, L. Petrenko // Canadian Journal of Soil Science. – 2012. – N. 92. – P. 429-438.
22. Kudayarova A.Yu. About informativeness of the electronic spectra of humic substances / A.Yu. Kudayarova // Pochvovedenie. – N 11. – 2001. – P. 1323– 331.
23. Altshuler S. A. ESR-spectroscopy the elements of the transition groups / S.A. Altshuler, B.M. Kozyrev. –M.: Science. – 1972. – 366 p.
24. Konstantinova E.A. ESR spectroscopy of disordered and low-dimensional solid-state systems / E.A. Konstantinova, Yu.V. Kashkarov. – M.: MSU. - 2002. – 74 p.
25. Gubin S.P. Cluster chemistry / S.P. Gubin – M.: Science. – 1987. – 262 p.
26. Melson G.A. Coordination chemistry of macrocyclic compounds / G.A. Melson. – New York: Plenum Press. – 1979. – 325 p.
27. Len Zh.-M. Supramolecular chemistry. Concepts and Perspectives / Zh.-M. Len. – Novosibirsk: Science. – 1998. – 333 p.
28. Ionenko V.I. Crown clathrate concept of humus structure / V.I. Ionenko // Melioratsiya i himizatsiya zemledeliya Moldavii: tez. dokl. konf. – Kishinev, Ch. 1. – 1988. – P. 5-8.
29. Phenomenology of functional structural models of natural and synthetic humic substances / V.I. Ionenko, E.A. Golovachev, A.M. Besckrovnuy [et al.] // Sibirskiy Bulletin of Agriculture. – 1988. – N 5. – P. 91–104.
30. Tsapko Yu.L. Structure of humic acids in aspects of effect on the acidic soil functions / Yu.L. Tsapko // Bulletin of V.V. Dokuchayev Kharkiv National Agrarian University. – 2014. – N 1. – P. 12-18.

ПАМ'ЯТІ ЄВГЕНА ОЛЕКСАНДРОВИЧА ГОРДІЄНКА

Геній – гине,
Але залишаються гени.
В моїй душі – душа Шевченка,
Ген ще не здійсненого вчинка...

Євген Гордієнко

10 червня 2015 року пішов із життя відомий учений, педагог, член-кореспондент НАН України, доктор біологічних наук, професор Євген Олександрович Гордієнко. Не стало мудрої талановитої людини з бурхливою енергією, любов'ю до життя в усіх його проявах, величезною працездатністю та невичерпним запасом наукових ідей, якими він щедро ділився з учнями та колегами. Це була різнобічно обдарована людина зі щирим серцем, яка могла досягти успіху в будь-якій царині. Та Євген Олександрович вибрав науку, а саме біофізику.

Після закінчення радіофізичного факультету Харківського державного університету за спеціальністю «біофізика» Євген Олександрович постійно працював в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України з часів його заснування в 1972 році. З 1995 до 2011 року він був завідувачем одного з ключових відділів інституту – відділу низькотемпературного консервування. У 2011 році Гордієнко Є.О. був обраний заступником директора з наукової роботи ІПКіК НАН України. З 1998 року Євген Олександрович був професором кафедри біофізики Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна і очолював її протягом останніх трьох років.

Гордієнко Є.О. був професором міжнародної кафедри кріобіології і кріомедицини, заснованої 1998 року ЮНЕСКО та НАН України з метою підготовки висококваліфікованих кадрів із цих спеціальностей у світовому масштабі. Він має понад 170 наукових друкованих праць, які опубліковані у вітчизняних і закордонних виданнях, у тому числі три монографії, підручник для ВНЗ і 10 патентів на винаходи. Під керівництвом Євгена Олександровича захищено 9 кандидатських дисертаційних робіт, він був науковим консультантом 4-х докторських дисертацій. Протягом багатьох років Є.О. Гордієнко успішно поєднував наукову та викладацьку діяльність на кафедрі біологічної і медичної фізики Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна. За вагомих внесок у розвиток вітчизняної науки Є.О. Гордієнко нагороджений відзнакою НАН України «За професійні здобутки».

У полі наукових інтересів Є.О. Гордієнка перебували фундаментальні дослідження в галузі кріобіології як основи для прикладних розробок, які мають важливе значення для клінічної практики й народного господарства. Основним напрямком його наукових досліджень був теоретичний аналіз та експериментальне вивчення причин і механізмів

кріпошкодження й кріозахисту клітин з метою розробки нових і удосконалення існуючих технологій довготривалого збереження біологічних об'єктів у життєздатному стані. Гордієнко Є.О. мав глибокі знання в різних галузях біології, фізики, хімії й медицини, спираючись на які успішно вирішував складні міждисциплінарні завдання кріобіології. Гордієнком Є.О. створені оригінальні моделі явищ гіпер- і гіпотонічного лізису, температурного шоку, постгіпертонічного кріогемолізу, електропорації клітин, процесів трансмембранного масопереносу та латерального перерозподілу компонентів клітинної мембрани на різних етапах циклу низькотемпературного консервування клітинних суспензій. Ним створена кількісна модель кріпошкодження клітин на етапі кристалізації і побудований алгоритм оцінки значення оптимальної швидкості охолодження суспензії клітин на етапі її кристалізації. Він був одним з ініціаторів і основних виконавців фундаментальних досліджень в галузі кріобіології, що спрямовані на спрощення та здешевлення технологій кріоконсервування та довгострокового збереження функціональної повноцінності біооб'єктів різного походження, зокрема мікроорганізмів, репродуктивних та імунокомпетентних клітин.

Гордієнко Є.О. ефективно поєднував фундаментальні дослідження з вирішенням прикладних задач кріобіології. У його роботах теоретично обґрунтований та експериментально підтверджений новий підхід до розв'язання проблеми оптимізації умов заморожування біологічних об'єктів порівняно великих розмірів. Одним з прикладних напрямків роботи відділу, яким він керував, є застосування кріогенних методів для лікування захворювань щитоподібної залози. Він приймав активну участь у створенні експериментального зразка кріобанку крові для обласних станцій переливання крові України.

Євгена Олександровича більше немає поряд з нами, але його наукові ідеї, його харизма та сміливість на дорозі пізнання ще довго будуть підтримувати нас на нелегкому шляху науки.

...І у часи буремні та важкі
Завжди були і будуть ватажки,
Які у нижніх
точках кризи
Із крісел ніжних
встають на ризик...

Євген Гордієнко

Друзі, колеги, учні