

ISSN 2075-3810 (print)
ISSN 2075-3829 (online)

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

Біофізичний Вісник

Випуск 42

Заснований 1998 р.

Харків 2019

ISSN 2075-3810 (print)
ISSN 2075-3829 (online)

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

Biophysical Bulletin

Issue 42

Founded in 1998

Kharkiv 2019

Біофізичний вісник публікує наукові 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. Журнал виходить 2 рази на рік.

Свідоцтво про державну реєстрацію: КВ № 11007 від 17.02.2006.

ISSN 2075-3829 (Online)

ISSN 2075-3810 (Print)

Біофізичний вісник є фаховим виданням у галузях фізико-математичних та біологічних наук (Наказ Міністерства освіти і науки України № 1328 від 21.12.2015).

Статті проходять внутрішнє та зовнішнє подвійне сліпе рецензування. Затверджено до друку рішенням Вченої ради Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна (протокол № 6 від 27.05.2019).

Журнал має Digital Object Identifier: **10.26565/2075-3810**.

Головний редактор

Косевич М. В., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України, Україна

Заступник головного редактора

Катрич В. О., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Відповідальний секретар

Берест В. П., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Члени редколегії

Аврунін О. Г., Харківський національний університет радіоелектроніки, Україна

Баранник Є. О., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Бондаренко В. А., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Говорун Д. М., Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Україна

Горбенко Г. П., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Довбешко Г. І., Інститут фізики НАН України, Україна

Зленко С. М., Вінницький національний технічний університет, Україна

Карачевцев В. О., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України, Україна

Кнігавко В. Г., Харківський національний медичний університет, Україна

Огурцов О. М., Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», Україна

Осецький О. І., Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Україна

Павлов С. В., Вінницький національний технічний університет, Україна

Перський С. Е., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Семенов М. О., Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, Україна

Соляник Г. І., Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. С. Кавецького НАН України, Україна

Степаньян С. Г., Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України, Україна

Ткачук Р. А., Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, Україна

Трусова В. М., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Узленкова Н. Є., Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор'єва НАМН України, Україна

Шестопалова Г.В., Інститут радіофізики та електроніки ім. О. Я. Усикова НАН України, Україна

Шкорбатов Ю. Г., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна

Андрущенко В., Інститут органічної хімії і біохімії Чеської Академії Наук, Чеська Республіка

Беднарчик П., Варшавський Університет наук про життя, Польща

Біндер Х., Лейпцизький університет, Німеччина

Буркіна В., Університет Південної Богемії в Чеській Республіці, Чеська Республіка

Доманов Є., Центр досліджень та інновацій Л'Ореаль, Франція

Фельдман Ю., Єврейський університет в Єрусалимі, Ізраїль

Мірошниченко Д., Онкологічний центр та науково-дослідний інститут ім. Х. Лі Моффіта, США

Рева І., Університет Коїмбри, Португалія

Руткаускас Д., Центр фізичних наук і технологій, Литва

Штис Д., Університет Південної Богемії в Чеській Республіці, Чеська Республіка

Яковенко С., Університет Західної Вірджинії, медичний факультет, США

Замаратська Г., Шведський університет аграрних наук, Швеція

Золочевська О., Медичний філіал Техаського університету, Галвестон, Техас, США

Горобченко О. О., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна – *технічний редактор*

Жигалова Н. М., Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Україна – *технічний секретар*

Біофізичний вісник індексується: Національною бібліотекою України імені В.І. Вернадського; Directory of Open Access Journals (DOAJ); Бібліографічною базою даних WorldCat; CAS (Chemical Abstracts Service); Google Scholar; ResearchBib; Ulrichsweb; Bielefeld Academic Search Engine (BASE); Index Copernicus.

Адреса редколегії та видавництва:

Кафедра молекулярної і медичної біофізики,
Факультет радіофізики, біомедичної електроніки та комп'ютерних систем,
Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,
майдан Свободи, 4, Харків, 61022, Україна

Tel: +38-057-707-55-76

E-mail: biophys-visnyk@karazin.ua

Web-page: <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>

Biophysical Bulletin publishes original scientific articles, short communications and reviews dealing with physical and mathematical problems pertaining to biological systems of various complexity levels and solved with the help of modern life sciences experimental methods and computer simulation. The journal is published twice a year.

Certificate of state registration: KB № 11007 of 17.02.2006.

ISSN 2075-3829 (Online)

ISSN 2075-3810 (Print)

Biophysical Bulletin is a professional edition in field of physical and mathematical and biological sciences (Decree of Ministry of Education and Science of Ukraine No 1328 of December 21, 2015).

All manuscripts are double blind peer-reviewed by at least two reviewers. Approved for publication by the Academic Council of V. N. Karazin Kharkiv National University (May 27, 2019, Protocol No. 6).

Biophysical Bulletin has Digital Object Identifier: **10.26565/2075-3810**.

Editor-in-Chief

M. V. Kosevich, B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine, Ukraine

Deputy Editor-in-Chief

V. A. Katrich, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine

Executive Secretary

V. P. Berest, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine

Editorial Board

O. G. Avrunin, Kharkiv National University of Radio Electronics, Ukraine

E. A. Barannik, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine

V. A. Bondarenko, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine

G. P. Gorbenko, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine

D. M. Govorun, Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine, Ukraine

G. I. Dovbeshko, Institute of Physics of the NAS of Ukraine, Ukraine

V. A. Karachevtsev, B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine, Ukraine

V. G. Knigavko, Kharkiv National Medical University, Ukraine

O. M. Ogurtsov, National Technical University "Kharkiv Polytechnic Institute", Ukraine

A. I. Osetski, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Ukraine

S. V. Pavlov, Vinnytsia National Technical University, Ukraine

Ye. E. Perskiy, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine

M. A. Semenov, O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the NAS of Ukraine, Ukraine

Yu. G. Shckorbatov, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine

A. V. Shestopalova, O. Ya. Usikov Institute for Radiophysics and Electronics of the NAS of Ukraine, Ukraine

G. I. Solyanik, R. E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology of the NAS of Ukraine, Ukraine

S. G. Stepanian, B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine, Ukraine

R. A. Tkachuk, Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ukraine

V. M. Trusova, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine

N. E. Uzlenkova, SI «Grigoriev Institute for Medical Radiology of National Academy for Medical Sciences», Ukraine

S. M. Zlepko, Vinnytsia National Technical University, Ukraine

V. Andrushchenko, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Academy of Science of Czech Republic, Czech Republic

P. Bednarczyk, Warsaw University of Life Sciences, Poland

H. Binder, Leipzig University, Germany

V. Burkina, University of South Bohemia in Czech Republic, Czech Republics

Ye. Domanov, L'Oréal Research & Innovation, France

Yu. Feldman, The Hebrew University of Jerusalem, Israel

D. Miroshnichenko, H. Moffitt Cancer Center and Research Institute, USA

I. Reva, Universidade de Coimbra, Portugal

D. Rutkauskas, Centre for Physical Sciences and Technology, Lithuania

D. Štys, University of South Bohemia in Czech Republic, Czech Republics

S. Yakovenko, West Virginia University, School of Medicine, USA

G. Zamaratskaia, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden

O. Zolocheska, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

O. O. Gorobchenko, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine – *Technical Editor*

N. M. Zhyhalova, V. N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine – *Technical Secretary*

Biophysical Bulletin is indexed in: Vernadsky National Library of Ukraine; Directory of Open Access Journals (DOAJ); WorldCat; CAS (Chemical Abstracts Service); Google Scholar; ResearchBib; Ulrichsweb; Bielefeld Academic Search Engine (BASE); Index Copernicus.

Editorial Office and Publisher:

Department of Molecular and Medical Biophysics
School of Radiophysics, Biomedical Electronics and Computer Systems
V. N. Karazin Kharkiv National University,
4 Svobody Sq., Kharkiv, 61022, Ukraine

Tel: +38-057-707-55-76

E-mail: biophys-visnyk@karazin.ua

Web-page: <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>

ЗМІСТ

РЕДАКЦІЙНА СТАТТЯ

- М.В. Косевич, В.П. Берест, Г.В. Шестопалова**
Пам'яті професора Юрія Павловича Благого присвячується 7

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

- М.В. Косевич, О.А. Рязанова, В.А. Пашинская**
Биофизические исследования молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов. 1. Противоопухолевые и противовирусные препараты. (Обзор) 8-27
- В.А. Пашинская, М.В. Косевич**
Биофизические исследования молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов. 2. Противомикробные и противомаларийные препараты. (Обзор) 28-48
- M.V. Olenchuk, O.P. Gnatyuk, G.I. Dovbeshko, I.O. Polovyi, S.O. Karakhim**
Do carbon nanotubes inhibit or promote amyloid fibrils formation? 49-60
- В.Б. Аракелян, А.Т. Карапетян, П.О. Вардеванян**
Влияние адсорбции лигандов на выходной сигнал ДНК-биосенсора 61-67
- М.І. Суховія, С.Е. Бірдус., М.І. Шафраньош, Ю.Ю. Свіда, І.І. Шафраньош**
Молекулярні механізми впливу повільних електронів на біологічні структури 68-74

ХРОНІКА

- Ю.В. Рубин**
Воспоминания о Ю.П. Благом 75-77
- В.Б. Аракелян, П.О. Вардеванян, А.Т. Карапетян**
Памяти профессора Юрия Павловича Благого – воспоминания коллег из Ереванского университета 78-79

CONTENTS**EDITORIAL**

- M.V. Kosevich, V.P. Berest, A.V. Shestopalova**
Dedicated to memory of Professor Yuri P. Blagoi 7

MOLECULAR BIOPHYSICS

- M.V. Kosevich, O.A. Ryazanova, V.A. Pashynska**
Biophysical investigations of molecular mechanisms of chemotherapeutic agents action. 1. Chemotherapeutic and antiviral agents. (Review) 8-27
- V.A. Pashynska, M.V. Kosevich**
Biophysical investigations of molecular mechanisms of action of chemotherapeutic agents. 2. Antimicrobial and antimalarial agents (Review) 28-48
- M.V. Olenchuk, O.P. Gnatyuk, G.I. Dovbeshko, I.O. Polovyi, S.O. Karakhim**
Do carbon nanotubes inhibit or promote amyloid fibrils formation? 49-60
- V.B. Arakelyan, A.T. Karapetyan, P.O. Vardevanyan**
Influence of adsorption of ligands on output signal of DNA-biosensor 61-67
- M.I. Sukhoviya, S.E. Birdus, M.I. Shafranyosh, Yu.Yu. Svida, I.I. Shafranyosh**
Molecular mechanisms of influence of slow electrons on biological structures 68-74

CHRONICLE

- Yu.V. Rubin**
Remembering Yu.P. Blagoi 75-77
- V.B. Arakelyan, P.O. Vardevanyan, A.T. Karapetyan**
In memory of Yuri Pavlovich Blagoi – memoirs of collaborators from Yerevan University 78-79

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-01>

ПАМ'ЯТІ ПРОФЕСОРА ЮРІЯ ПАВЛОВИЧА БЛАГОГО ПРИСВЯЧУЄТЬСЯ

Даний випуск «Біофізичного вісника» присвячено пам'яті видатного українського біофізика професора Юрія Павловича Благого (1929-2018 рр.). Професор Благой Ю. П. був одним з засновників української школи молекулярної біофізики та зробив великий внесок у становлення та розвиток біофізичного напрямку досліджень у місті Харкові, багато років очолював відділ молекулярної біофізики Фізико-технічного інституту низьких температур імені Б. І. Веркіна Національної академії наук України, був завідувачем кафедри молекулярної та прикладної біофізики Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна, членом редакційної колегії «Біофізичного вісника», активним членом Українського біофізичного товариства, членом спеціалізованої вченої ради із захисту дисертацій за спеціальністю «біофізика».

З біографічними даними Благого Ю. П. можна ознайомитися у попередніх випусках «Біофізичного вісника» [1, 2] та в електронному ресурсі «Енциклопедія сучасної України» [3]. Особисту розповідь Юрія Павловича стосовно наукової роботи у ФТІНТ НАН України можна знайти у книзі спогадів [4].

Учні, колеги та друзі Юрія Павловича вшановують його пам'ять низкою оглядів, оригінальних статей та особистих спогадів, включених до цього випуску журналу. Про невідомість наукового процесу та спадкоємність поколінь нагадує фотографія, зроблена на початку 80-х років ХХ сторіччя (Рис. 1). На засіданні державної екзаменаційної комісії на кафедрі молекулярної та прикладної біофізики Харківського державного університету професор Благой Ю.П. (перший ліворуч) з колегами оцінюють захист дипломних робіт студентів найперших випусків кафедри, які наразі є співавторами дописів до цього меморіального випуску журналу, викладачами кафедри та членами редакційної колегії «Біофізичного вісника».



Рис. 1. Засідання державної екзаменаційної комісії на кафедрі молекулярної та прикладної біофізики ХДУ, початок 80-х років ХХ ст. Зліва направо: професори Благой Юрій Павлович, Малеев Володимир Якович, Сухаревський Борис Якович, доцент Стьопін Лев Дмитрович.

REFERENCES

1. Karachevtsev, V. A., Kosevich, M. V., Zhigalova, N. M. (2018) In memory of Professor Yuri P. Blagoi. *Biophysical bulletin*, (39), 81-82. doi: 10.26565/2075-3810-2018-39-07
2. Iurii Pavlovich Blagoi. K 70-letiiu so dnia rozhdenniia (1999) *Visnyk Kharkivskoho universytetu* № 466. *Biophysical bulletin*, (5), 116-117
3. *Entsyklopediia suchasnoi Ukrainy*. (2004). Retrieved from http://esu.com.ua/search_articles.php?id=35449
4. Blagoi, Iu. P. (2007). *Vospominaniia* In V. V. Eremenko (Ed.), *B. I. Verkin, kakim my ego pomnim* (pp. 90-94). Retrieved from <http://www.ilt.kharkov.ua/verkin/p90.php>

М.В. Косевич, В.П. Берест, Г.В. Шестопалова

Огляд

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-02>

УДК 577.32+615.28+577.323+577.323+577.113.7+544.173+535.34+535.372

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.

1. Противоопухолевые и противовирусные препараты (Обзор)

М.В. Косевич, О.А. Рязанова, В.А. Пашинская

Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,

пр. Науки, 47, Харьков, Украина, 61103

e-mail: mvkosevich@ilt.kharkov.ua

Поступила в редакцию 4 октября 2018 г.

Принята 19 ноября 2018 г.

Актуальность. Установление молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов создает научную основу для направленного поиска эффективных фармакологических средств. Предполагаемые пути взаимодействия химиотерапевтических препаратов, воздействующих на возбудителей инфекционных заболеваний и злокачественные новообразования, с их потенциальными молекулярными мишенями требуют прямых доказательств на молекулярном уровне. Эти доказательства могут быть получены средствами молекулярной биофизики, которая имеет мощный арсенал новых физических методов для изучения межмолекулярных взаимодействий биомолекул и лекарственных агентов.

Цель работы. Целью настоящего обзора явилось обобщение результатов многолетних исследований молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов в биофизических отделах Физико-технического института низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины (ФТИНТ). В первой части обзора рассмотрены противоопухолевые и противовирусные препараты, предполагаемой молекулярной мишенью которых являются нуклеиновые кислоты.

Материалы и методы. Масс-спектрометрическое исследование молекул термически нестабильных фармакологических препаратов и их комплексов с биомолекулами значительно продвинулось благодаря разработке мягких методов ионизации/десорбции, заметный вклад в развитие которых внесли специалисты ФТИНТ. В комплексных исследованиях были применены методы молекулярной спектроскопии и компьютерное моделирование средствами квантовой химии.

Результаты. Объектами исследования были системы, состоящие из химиотерапевтических препаратов – тиофосамида, производных феназина и модифицированных ими антигенных/антисмысловых олигонуклеотидов, четвертичных соединений, тилорона – и их молекулярных мишеней – ДНК, олиго- и полинуклеотидов и компонентов нуклеиновых кислот. На модельном молекулярном уровне установлены механизмы действия этих препаратов, состоящие в специфических и неспецифических невалентных или ковалентных взаимодействиях молекул препаратов с нуклеиновыми кислотами и их компонентами, и в образовании стабильных комплексов препарата с молекулой-мишенью.

Выводы. Опыт исследований, проводившихся в течение нескольких десятилетий во ФТИНТ, продемонстрировал эффективность применения молекулярно-биофизических подходов и методов к установлению молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов. Полученные фундаментальные результаты имеют практическое значение для дальнейшей разработки новых лекарственных средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: межмолекулярные взаимодействия; химиотерапевтические препараты; противоопухолевые препараты; нуклеиновые кислоты; масс-спектрометрия; молекулярная спектроскопия.

БІОФІЗИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАΝІЗМІВ ДІЇ ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ.

1. Протипухлинні та противірусні препарати (Огляд)

М.В. Косевич, О.О. Рязанова, В.А. Пашинська

Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України,

пр. Науки, 47, Харків, Україна, 61103

Актуальність. Встановлення молекулярних механізмів дії лікарських препаратів створює наукову базу для спрямованого пошуку ефективних фармакологічних засобів. Ймовірні шляхи взаємодії хіміотерапевтичних препаратів, які впливають на збудників інфекційних захворювань та злоякісні новоутворення, з їх потенційними молекулярними мішенями потребує прямих доказів на молекулярному рівні. Ці докази можна отримати засобами молекулярної біофізики, яка має потужний арсенал нових фізичних методів для вивчення міжмолекулярних взаємодій біомолекул та лікарських агентів.

Мета роботи. Метою огляду є узагальнення результатів багаторічних досліджень молекулярних механізмів дії хіміотерапевтичних препаратів у біофізичних відділах Фізико-технічного інституту низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України (ФТІНТ). У першій частині огляду розглянуто протипухлинні та противірусні препарати, ймовірною молекулярною мішенню яких є нуклеїнові кислоти.

Матеріали та методи. Мас-спектрометричне дослідження молекул термічно нестабільних фармакологічних препаратів та їх комплексів з біомолекулами значно просунулося завдяки розробці м'яких методів іонізації/десорбції, значний внесок у розвиток яких внесли фахівці ФТІНТ. У комплексних дослідженнях було застосовано методи молекулярної спектроскопії та комп'ютерне моделювання засобами квантової хімії.

Результати. Об'єктами дослідження були системи, які склалися з хіміотерапевтичних препаратів – тіофосфаміду, похідних феназину та модифікованих ним антигенних/антисенсових олігонуклеотидів, четвертинних сполук, тилорону – та їх молекулярних мішеней - ДНК, оліго- та полінуклеотидів, компонентів нуклеїнових кислот. На модельному молекулярному рівні встановлено механізми дії цих препаратів, які полягають у специфічних і неспецифічних невалентних та ковалентних взаємодіях молекул препаратів з нуклеїновими кислотами та їх компонентами, та в утворенні стабільних комплексів препаратів з молекулою-мішенню.

Висновки. Досвід досліджень, які проводилися протягом кількох десятиріч у ФТІНТ, продемонстрував ефективність застосування молекулярно-біофізичних підходів та методів до встановлення молекулярних механізмів дії лікарських препаратів. Отримані фундаментальні результати мають практичне значення для подальшої розробки нових лікарських засобів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: міжмолекулярні взаємодії; хіміотерапевтичні препарати; протипухлинні препарати; нуклеїнові кислоти; мас-спектрометрія; молекулярна спектроскопія.

BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS OF MOLECULAR MECHANISMS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS ACTION.

1. Chemotherapeutic and antiviral agents (Review)

M.V. Kosevich, O.A. Ryazanova, V.A. Pashynska

B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Nauky Avenue, Kharkiv, Ukraine, 61103

Background: Determination of molecular mechanisms of action of drugs forms a scientific basis for the directed search of efficient medications. Assumed pathways of interactions of chemotherapeutic drugs which affect infectious agents and malignant neoplasm with their potential molecular targets require direct evidences at the molecular level. Such evidences can be obtained by means of molecular biophysics which possesses an arsenal of new powerful physical techniques for studying the intermolecular interactions of biomolecules and pharmaceutical agents.

Objectives: The aim of this review is the generalization of the results of long standing investigations on the molecular mechanisms of action of chemotherapeutic agents performed in the biophysical departments of B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering (ILTPE) of the NAS of Ukraine. The first part of the review is devoted to anticancer and antiviral agents targeted presumably at nucleic acids.

Materials and methods: Mass spectrometric studies of molecules of thermally unstable drugs and their complexes with biomolecules have been advanced significantly due to the development of soft ionization/desorption techniques; the researchers of ILTPE have made noticeable contribution to this field. The methods of molecular spectroscopy and computer modeling by means of quantum chemistry were applied in the combined investigations.

Results: The objects of study were the systems composed of chemotherapeutic drugs – thiophosphamide, phenazine derivatives and phenazine-modified antigene/antisense oligonucleotides, quaternary compounds, tilorone – and their molecular targets – DNA, oligo- and polynucleotides and nucleic acids components. The mechanisms of action of these drugs established at the model molecular level consisted

in the specific and nonspecific noncovalent or covalent interactions of the drugs' molecules with nucleic acids and their components and in the formation of stable drug-target complexes.

Conclusions: The experience of investigations conducted during several decades at the ILTPE has demonstrated the efficiency of the application of the methods and approaches of molecular biophysics to establishing of molecular mechanisms of drugs action. The basic results obtained are of practical importance for the further development of new efficient pharmaceuticals.

KEY WORDS: intermolecular interactions; chemotherapeutic agents; anticancer drugs; nucleic acids; mass spectrometry; molecular spectroscopy.

Информация о молекулярных механизмах действия биологически активных соединений с доказанной или потенциальной фармакологической активностью необходима для разработки более эффективных и менее токсичных лекарственных препаратов, а также для усовершенствования терапевтических схем применения лекарственных агентов. По объекту воздействия лекарственные средства разделяют на две группы: фармакотерапевтические и химиотерапевтические. В то время как фармакотерапевтические препараты воздействуют на функционирование организмов человека или животного, объектами химиотерапевтических препаратов являются возбудители заболеваний – бактерии, вирусы, грибы, а также чуждые организму опухолевые клетки [1]. Для разработки способов воздействия на простейшие патогены на уровне отдельных клеток особое значение приобретает определение молекул-мишеней, взаимодействие с которыми химиотерапевтических препаратов блокирует жизненные функции возбудителей заболеваний. Наряду с биохимическими реакциями, механизмы действия многих химиотерапевтических препаратов основываются на невалентных межмолекулярных взаимодействиях с молекулами-мишенями, изучение которых попадает в сферу задач, решаемых молекулярной биофизикой. Для исследований на уровне отдельных молекул и их невалентных (супрамолекулярных) комплексов необходима разработка соответствующих экспериментальных методов, дополняемых теоретическими расчетами и компьютерным моделированием.

В данном обзоре обобщен опыт изучения молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов в биофизических отделах Физико-технического института низких температур (ФТИНТ) им. Б.И. Веркина НАН Украины [2]. Молекулярно-биофизические исследования в ФТИНТ, инициированные его основателем, академиком АН УССР Веркиным Борисом Иеремиевичем (1919-1990), проводились в нескольких подразделениях института под руководством профессора Благого Юрия Павловича (1929-2018), академика НАН Украины Янсона Игоря Кондратьевича (1938-2011), чл.-корр. НАН Украины Суходуба Леонида Федоровича. Далее биофизические исследования лекарственных препаратов были продолжены их сотрудниками и учениками Пятигорской Т.Л., Зозулей В.Н., Андриевским Г.В., Лиманской (Жилковой) О.Ю., Шелковским В.С., Косевич М.В., Пашинской В.А., Боряком О.А., Степаньяном С.Г., Волошиным И.М., Рязановой О.А.

В течение почти сорока лет одним из актуальных направлений исследований являлось систематическое изучение биофизических аспектов действия различных классов химиотерапевтических препаратов: противоопухолевых, противомикробных и противогрибковых, противомаларийных и противовирусных. Разрабатывались и усовершенствовались соответствующие экспериментальные спектроскопические методы исследования; значительные успехи были достигнуты в развитии современного метода изучения биомолекул – мягкоионизационной масс-спектрометрии [3]. Моделирование структуры и расчет термодинамических параметров межмолекулярных взаимодействий использовались как для интерпретации полученных экспериментальных данных, так и как самостоятельное компьютерное исследование. Часть работ

выполнялась в рамках международных проектов в сотрудничестве с учеными Бельгии, Германии, Венгрии, США, а также из других научных организаций Украины.

В обзоре рассмотрены вопросы разработки экспериментальных методик для биофизических исследований с акцентом на мягкоионизационную масс-спектрометрию и результаты установления с их помощью спектроскопических, масс-спектрометрических, структурных и термодинамических характеристик фармакологических препаратов и их невалентных комплексов с молекулами-мишенями. Первая часть обзора посвящена изучению механизмов действия химиотерапевтических противоопухолевых и противовирусных препаратов, основными молекулярными мишенями которых считаются нуклеиновые кислоты и их компоненты. Во второй части обзора будут рассмотрены механизмы действия противомикробных и противомаларийных агентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Разработка масс-спектрометрических методов исследования биомолекул

В семидесятых-восемидесятых годах прошлого века актуальной задачей, инициированной потребностями развития молекулярной биологии и молекулярной биофизики, стала разработка методов исследования на уровне отдельных биомолекул. Наиболее ярко прогресс в этом направлении проявился на примере масс-спектрометрии, которая проделала путь от узкоспециализированного инструмента фундаментальных ядерно-физических исследований до метода, широко применяемого для решения разнообразных молекулярно-биологических и биомедицинских задач [4-6]. Самой сложной задачей на этом пути явилась разработка методов перевода в газовую фазу без разложения ионизированных молекул термически нестабильных соединений, каковыми является большинство биомолекул и фармакологически активных веществ. Успешное решение этой задачи имело настолько важное значение для прогресса науки в целом, что было отмечено Нобелевской премией 2002 года «за создание мягких методов десорбции/ионизации для масс-спектрометрического анализа биологических макромолекул» (“for their development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules” [7]).

Исследователи ФТИНТ внесли свой вклад в развитие масс-спектрометрических методик для биофизических исследований [2, 3, 8]. Были внедрены и усовершенствованы методы полевой ионизации (ПИ), (Field Ionization, FI) [3, 9, 10], полевой десорбции (ПД), (Field Desorption, FD) [11, 12], бомбардировки быстрыми атомами (ББА), (Fast Atom Bombardment, FAB) и низкотемпературной (НТ) версии вторично-ионной масс-спектрометрии (ВИМС), (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS) [13-15].

Возможности, предоставляемые центром коллективного пользования НАН Украины при Институте химии поверхности (ИХП) НАН Украины (г. Киев) [8], были использованы для экспериментов с использованием методов лазерной десорбции/ионизации (ЛДИ), (Laser Desorption/Ionization, LDI) и матрично-активированной ЛДИ (МАЛДИ), (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI). В рамках международных проектов в сотрудничестве с Институтом органической химии Исследовательского центра естественных наук Венгерской академии наук (ИОХ ИЦЕН ВАН, г. Будапешт, Венгрия) и Антверпенским университетом (г. Антверпен, Бельгия) проводили масс-спектрометрические эксперименты с ионизацией электрораспылением (ИЭР) растворов, (Electrospray Ionization, ESI).

2. Спектроскопические и расчетные методы

Свойства биологически активных соединений и их комплексов с молекулами-мишенями (нуклеиновые кислоты) исследовали методами молекулярной спектроско-

пии, такими как абсорбционная спектроскопия в видимой и УФ области, флуоресцентная спектроскопия с использованием поляризационных измерений, термическая денатурация с абсорбционной и флуоресцентной регистрацией кривых плавления. При определении термодинамических параметров перехода спираль-клубок в комплексах нуклеиновых кислот использовали модель «двух состояний». Разработанные молекулярно-биофизические подходы и полученные с их помощью результаты изучения структурных и термодинамических параметров нуклеиновых кислот и их комплексов с биологически-активными веществами обобщены в монографии Благого Ю.П. с соавторами [16].

Компьютерное моделирование выполняли методами квантовой химии в сотрудничестве с Аризонским университетом (США).

3. Объекты исследования

Объектами исследования служили модельные системы, состоящие из химиотерапевтических противоопухолевых и противовирусных препаратов и их биомолекулярных мишеней – нуклеиновых кислот и их компонентов.

В табл. 1 представлены структурные формулы веществ, используемых в качестве химиотерапевтических препаратов, и ряда их производных, исследовавшихся в работах, цитируемых в данном обзоре. Названия, структурные формулы, физико-химические и фармакологические свойства препаратов, а также ссылки на наиболее информативные литературные источники можно найти в базе данных PubChem [17].

Таблица 1. Структурные формулы и названия исследовавшихся химиотерапевтических препаратов

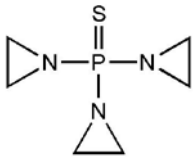
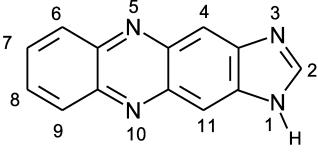
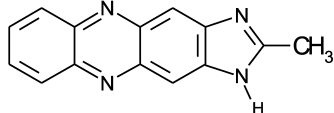
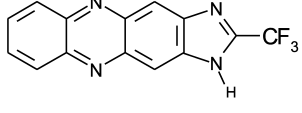
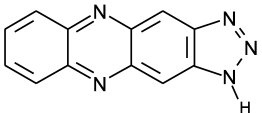
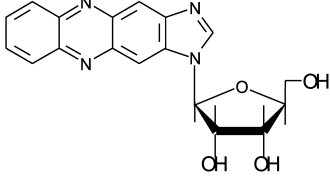
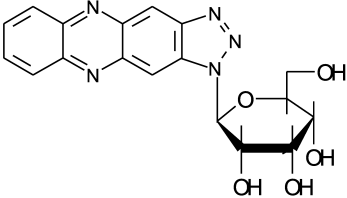
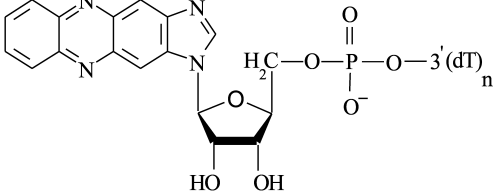
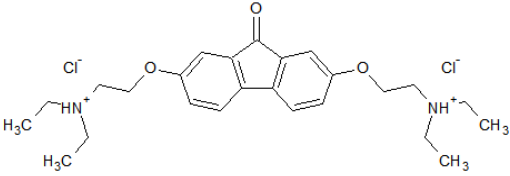
Структурные формулы молекул препаратов	Название, ссылка в базе данных PubChem
	Тиофосфамид, ТиоТЭФ, Thiotepa https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5453
	Имидазо-(4,5-d)-феназин, (F1), 1H-Imidazo[4,5-b]phenazine https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5998849
	2-метилимидазо-(4,5-d)-феназин (F2)
	2-трифторметилимидазо-(4,5-d)-феназин, (F3)
	1,2,3-триазоло-(4,5-d)-феназин, (F4)

Таблица 1 (продолжение). Структурные формулы и названия исследованных химиотерапевтических препаратов

	имидазо-(4,5-d)-феназин-N1-β-D-рибофуранозид, (F1rib)
	1,2,3-триазоло-[4,5-d]-феназин-N1-β-D-глюкопиранозид, (F4gl)
	Конъюгат феназинового красителя с олигонуклеотидом F1rib-(dT) _n (n = 10, 14, 15)
	Тилорон дигидрохлорид, Tilorone dihydrochloride https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/33958

Были исследованы следующие модельные системы, состоящие из химиотерапевтического препарата и его молекулярной мишени:

- химиотерапевтический противоопухолевый препарат тиофосфамид (ТиоТЭФ) и его мишень в опухолевых клетках – ДНК и ее компоненты (азотистые основания, нуклеотиды);
- производные феназина и их гликозиды (потенциальные антибиотические, противораковые, противомаларийные, антипаразитарные, противогрибковые агенты) и олигонуклеотиды;
- модифицированные имидазофеназином антигенные/антисмысловые олигонуклеотиды и синтетические олиго- и полинуклеотиды;
- имидазофеназин-порфириновый конъюгат, его металлизированные производные и синтетические олиго- и полинуклеотиды (в том числе теломерные, образующие G-квадруплексы), а также клеточные культуры легочной карциномы Льюиса мышей;
- бисчетвертичные аммониевые соли и ДНК;
- противовирусный препарат тилорон и компоненты нуклеиновых кислот ДНК и РНК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Изучение химиотерапевтических препаратов масс-спектрометрическими, спектроскопическими и расчетными методами

1.1. Противоопухолевые алкилирующие препараты

Разработка мягкоионизационных масс-спектрометрических методик для исследования низколетучих термически нестабильных молекул обеспечила значительный прогресс в изучении химиотерапевтических препаратов, поскольку позволила впервые зарегистрировать информативные масс-спектры, содержащие неразрушенные молекулярные ионы.

Для химиотерапевтического противоопухолевого препарата тиофосфамида впервые были зарегистрированы масс-спектры в режимах ПИ [18, 19] и БА [20]. Данные о продуктах гидролиза препарата, полученные сочетанием методов тонкослойной хроматографии и ПИ [18, 19], представляли интерес для фармакологов, занимающихся разработкой алкилирующих агентов. Расчетными методами были выявлены различия в структуре молекулы тиофосфамида в кристаллической и газовой фазе [21], на основании чего сделаны рекомендации относительно выбора конформации молекулы при проведении корреляций структура-активность и моделировании процессов «узнавания» при взаимодействии препарата с мишенью. Проведен конформационный анализ, определивший параметры вращения азиридиновых колец тиофосфамида, определяющих возможность его подстраивания к молекуле-мишени [22]. В рамках вопросов фундаментальных основ масс-спектрометрии актуальными были исследования влияния электрического поля высокой напряженности в условиях ПИ на перераспределение электронной плотности в молекуле тиофосфамида, вызывающее явление полевой полимеризации [21], и обусловленные этим эффекты образования достаточно экзотических двухзарядных фрагментных ионов [23].

Также были получены масс-спектрометрические характеристики для серий разрабатывавшихся в свое время соединений с потенциальной противоопухолевой активностью на основе производных арил- и ариaldiэтилентриамидов фосфорной кислоты [24, 25].

Вклад работ биофизиков ФТИНТ в международную копилку знаний о свойствах и механизмах действия химиотерапевтических препаратов отмечен включением работ [10, 19, 21, 23] в обобщающую монографию 2006 года «Novel Anticancer Agents. Strategies for Discovery and Clinical Testing» [26].

1.2. Четырехциклические производные феназина

Многие органические красители, гетероциклические молекулы которых имеют планарную структуру, относятся к противоопухолевым агентам, основным механизмом действия которых является интеркаляция (встраивание) между парами оснований в двуспиральной ДНК. Наряду с такими невалентными взаимодействиями, некоторые механизмы биологического действия этих гетероциклических соединений обусловлены их химическими окислительно-восстановительными (редокс) свойствами.

Ряд новых четырехциклических производных феназина – нейтральных амфотерных соединений, отличающихся различными заместителями в пятичленном кольце и являющихся потенциальными химиотерапевтическими агентами с антибиотическим, противораковым, противомаларийным, противопаразитическим и противогрибковым действием – был всесторонне исследован с использованием спектроскопических и

теоретических методов [27-30]. Было проведено комплексное изучение зависимости спектроскопических (в том числе флуоресцентных) свойств производных (соединения F1-F4 в табл. 1), а также их гликозидов (соединения F1gib и F4gl в табл. 1) от pH [27], полярности и протонодонорной способности растворителя [28, 29]. Установлены диапазоны существования и спектроскопические характеристики ионных форм красителей, определены места и константы их протонирования/депротонирования [27]. Сделаны выводы о влиянии заместителей в пятичленном кольце на спектроскопические и электронные свойства феназинов. Квантовохимическими методами определены конфигурации их изолированных молекул, распределение зарядов на атомах, рассчитаны величины дипольных моментов молекул в основном состоянии (показано, что дипольные моменты молекул лежат в плоскости молекулы и направлены практически перпендикулярно ее длинной оси), онзагеровских радиусов и молекулярного объема [28]. По изменениям спектров определены изменения дипольных моментов феназиновых производных при оптическом возбуждении, рассчитаны энергии электронных $S_1 \leftarrow S_0$ переходов в различных растворителях, построена энергетическая диаграмма, иллюстрирующая влияние заместителей в имидазольном кольце [28]. Обнаружено, что при переходе от кислых растворов к нейтральным наблюдается шестидесятикратный рост интенсивности флуоресценции имидазофеназина (F1), что позволило предложить использование данного красителя в качестве pH-сенсора в диапазоне pH от 1 до 7 [27]. Также был обоснован выбор красителя для ковалентной модификации им антисмысловых/антигенных олигонуклеотидов с целью повышения их терапевтической эффективности.

Методом ИК спектроскопии были впервые изучены спектры поглощения производных феназина в низкотемпературной аргоновой матрице (10 K) [30]. Анализ спектров, проведенный с использованием частот и интенсивностей гармонических колебаний, рассчитанных квантово-механическим методом DFT, показал хорошее согласие экспериментальных и расчетных данных.

Масс-спектрометрические характеристики для серии красителей – производных имидазофеназина (соединения F1-F5 в табл. 1), были получены с использованием набора десорбционно-ионизационных методов БА, ЛДИ, МАЛДИ [31-33]. Новизной этих работ стало наблюдение в условиях масс-спектрометрических экспериментов редокс превращений красителей.

Продукты восстановления красителей путем присоединения одного и двух атомов водорода легко идентифицировали по изменению массы исходного соединения. На основании анализа интенсивностей пиков этих продуктов в масс-спектрах с БА был построен ряд эффективности восстановления для серии производных имидазофеназина с различными заместителями, который хорошо коррелировал со значениями энергии низшей вакантной молекулярной орбитали (НВМО), рассчитанной квантово-химическими методами [31]. Учитывая эти результаты, была предложена методика экспресс-скрининга восстановительной активности красителей по данным масс-спектрометрического контроля, обычно проводимого при синтезе новых веществ [31, 33]. Также были установлены зависимости интенсивности редокс-процессов в зависимости от варьирования условий масс-спектрометрического эксперимента с использованием методик МАЛДИ, ЛДИ с металлической или графитовой поверхности, ИЭР, низкотемпературной ВИМС и БА в режимах положительных и отрицательных ионов [32]. С точки зрения функциональной активности красителей, полученные результаты указывали на высокую чувствительность их редокс-активности к балансу электронов и протонов в реакционной системе. С точки зрения развития фундаментальных основ масс-спектрометрии, обнаруженные эффекты позволили провести оценку вклада

процессов ПИ и ПД в механизм генерации ионов при ЛДИ с наноструктурированных графитовых поверхностей [34].

2. Взаимодействие алкилирующих противоопухолевых препаратов с компонентами нуклеиновых кислот

Разработка новых противоопухолевых средств во второй половине прошлого века была активизирована осознанием того факта, что их основной молекулярной мишенью может являться ДНК пролиферирующих клеток. При конструировании химиотерапевтических препаратов испытывались вещества с разной структурой, которые могли воздействовать на ДНК по различным механизмам. Выделяют три основных вида взаимодействия противораковых агентов с ДНК: модификация азотистых оснований ДНК посредством химических реакций, невалентные взаимодействия путем встраивания (интеркаляции) плоских частей молекул препаратов между парами оснований и/или укладки молекул в бороздки двойной спирали ДНК [26]. В рамках междисциплинарных комплексных исследований, проводившихся во всем мире, необходимо было получить прямые доказательства ковалентных или невалентных взаимодействий препаратов с молекулой ДНК, и биофизики ФТИНТ приняли активное участие в решении этой задачи.

При создании препаратов, вызывающих химическую модификацию азотистых оснований ДНК, использовали соединения, способные к реакции алкилирования – присоединения к основаниям алкильных групп, препятствующих комплементарному спариванию и узнаванию оснований. Поскольку результаты ранних исследований действия алкилирующих препаратов, проводившихся во ФТИНТ, уже обсуждались в ряде обзоров [10, 11, 35], здесь мы приведем лишь наиболее значимые результаты. В работах исследователей ФТИНТ, благодаря использованию новых возможностей мягкоионизационной масс-спектрометрии, впервые были получены данные о результатах взаимодействия препарата алкилирующего действия – тиофосфамида – с ДНК и ее компонентами [11, 36-41]. На уровне модельных систем (азотистое снование + тиофосфамид) были обнаружены продукты ковалентного взаимодействия препарата со всеми основаниями ДНК. С помощью методов ПИ, ПД, ББА впервые была проведена прямая идентификация продуктов, представлявших собой комплексы оснований с одной и двумя присоединившимися молекулами препарата, комплексы с этиленимином, источником которого являются азиридиновые кольца тиофосфамида, и ряд других продуктов алкилирования оснований [11, 36-39]. Также были зарегистрированы комплексы одной молекулы препарата с двумя молекулами оснований, что может моделировать образование сшивок между двумя нитями ДНК. С использованием набора метилпроизводных оснований, в которых метильные группы блокируют определенные реакционноспособные атомы, удалось установить центры связывания препарата с основаниями, каковыми являются N1 цитозина, N3 тимина, N9 аденина. Данные относительно отдельных оснований имеют самостоятельную ценность, поскольку свидетельствуют о возможности образования в клетках модифицированных оснований – предшественников синтеза ДНК, существование которых было ранее предложено для объяснения задержанного мутагенного эффекта препарата.

Далее были проведены исследования на уровне молекул ДНК с использованием методов тонкослойной хроматографии, УФ-спектроскопии и ББА масс-спектрометрии [40, 41]. Было обнаружено выщепление из ДНК алкилированных пуриновых оснований (так называемая депуринизация) – N3-монотиотэфпроизводного аденина и N7-монотиотэфпроизводного гуанина. Такие продукты алкилирования оснований, образуясь в

ДНК, могут служить структурным фактором, обуславливающим терапевтический эффект тиофосфамида.

Существенный вклад в установление механизмов взаимодействия алкилирующих препаратов этиленимина и тиофосфамида с ДНК внесли работы Андриевского Г.В., выполненные в сотрудничестве с Институтом химической физики АН СССР [43-44] и продолженные во ФТИНТ [40].

Масс-спектрометрические исследования взаимодействия химиотерапевтических препаратов с компонентами нуклеиновых кислот были продолжены Суходубом Л.Ф. и его учениками в Институте прикладной физики НАН Украины (г. Сумы) [10, 35, 45-50] и Сумском государственном университете МОН Украины [51, 52].

3. Взаимодействие производных феназина с нуклеиновыми кислотами

Другим типом потенциальных противораковых агентов, исследовавшихся во ФТИНТ, являлись гетероциклические соединения – интеркаляторы, молекулы которых имеют плоскую структуру. К таким веществам относятся производные феназина. В исследование механизмов действия этих агентов большой вклад внес Зозуля В.Н., многие годы возглавлявший группу флуоресцентной спектроскопии в отделе молекулярной биофизики ФТИНТ.

3.1. Взаимодействие феназиновых производных с ДНК и синтетическими полинуклеотидами различного состава и структурной организации

Методами поляризованной флуоресценции и абсорбционной спектроскопии было изучено взаимодействие производных феназина, относящихся к гликозидам и четвертичным солям, с нативной ДНК [53, 54] и синтетическими одно- и двухнитевыми полинуклеотидами poly(A), poly(G), poly(A,G), poly(dA)·poly(dT), poly(A)·poly(U), poly(dG)·poly(dC), poly(G)·poly(C) [54]. Определены спектроскопические характеристики свободных красителей и их комплексов с нуклеиновыми кислотами, константы связывания с ДНК и полинуклеотидами при низкой ионной силе растворов и условиях, близких к физиологическим. Показано, что основным типом связывания феназинов с нейтральной формой хромофора является интеркаляция молекул красителя между плоскостями оснований двойной спирали ДНК. Для катионных красителей, помимо интеркаляционного механизма, существенный вклад в комплексообразование вносит кооперативное электростатическое взаимодействие с фосфатными группами нуклеиновых кислот, проявляющееся за счет гидрофобных эффектов как при низкой, так и при умеренной ионных силах. При анализе процесса связывания использовали уравнения МакГи и ван Хиппела, модифицированные для учета энергии кулоновского отталкивания между адсорбированными молекулами красителя, что позволяет с хорошей точностью описать экспериментальные изотермы связывания.

Было установлено, что при интеркаляции в двухнитевые полинуклеотиды, образованные G·C парами, наблюдается тушение флуоресценции феназиновых красителей, а при связывании с A·T и A·U последовательностями – ее усиление. Для протяженных двухнитевых дезоксирибонуклеотидов связывание феназинов с G·C парами было предпочтительнее, чем с A·T, в то время как для полирибонуклеотидов связывание с G·C последовательностями слабее, чем с A·U. При связывании с однонитевыми полинуклеотидами наблюдался стэкинг хромофоров красителей с нуклеотидными основаниями. При этом гуаниновые основания тушили флуоресценцию катионного феназина, а остальные приводили к увеличению ее квантового выхода. Для нейтрального хромофора наблюдалось тушение его флуоресценции обоими пуриновыми основаниями. Противоположные изменения интенсивности

флуоресценции присоединенного имидазофеназина, наблюдаемые при его связывании с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями, позволяют использовать его в качестве флуоресцентного зонда корректности молекулярной гибридизации антисмысловых олигонуклеотидов.

Эти исследования выполнялись в сотрудничестве с коллегами из Института молекулярной биотехнологии (г. Йена, Германия) и Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины (г. Киев).

3.2. Влияние феназинового красителя, ковалентно присоединенного к концу антисмыслового олигонуклеотида, на стабильность образуемых им двух- и трехспиральных комплексов с полинуклеотидами

Высокая биологическая активность феназиновых красителей, обусловленная, в частности, их способностью интеркалировать между основаниями нуклеиновых кислот, дает возможность использовать эти вещества для повышения эффективности лекарственных препаратов для противораковой и противовирусной терапии на основе антисмысловой и антигенной стратегии. Суть этой стратегии состоит в том, что антисмысловые олигонуклеотиды, образующие двухспиральные комплексы с РНК, и антигенные олигонуклеотиды, образующие трехспиральные комплексы с ДНК, действуют как блокировщики экспрессии генетического кода. Модификация олигонуклеотидов интеркалирующими флуоресцентными красителями повышает сродство связывания антисмысловых и антигенных олигонуклеотидов с нуклеиновыми кислотами (мишенями) при сохранении высокой сиквенс-специфичности, что позволяет эффективно регулировать экспрессию генов, блокируя процессы репликации, транскрипции или трансляции, а также облегчает доставку олигонуклеотидов в клетки и существенно улучшает их резистентность к действию экзонуклеазы *in vivo*.

В работах [55-59] методами молекулярной спектроскопии и термической денатурации с регистрацией по поглощению и флуоресценции изучены комплексы антисмысловых олигонуклеотидов $(dT)_n$ ($n = 10, 14, 15$), модифицированных имидазофеназиновым производным F1rib, с комплементарными биополимерами - мишенями: олигонуклеотидом $(dA)_{15}$, однонитевыми полинуклеотидами $poly(rA)$, $poly(dA)$, двухнитевым $poly(dA) \cdot poly(dT)$. Установлено, что ковалентное присоединение красителя к 3'-концу олигонуклеотидной последовательности существенно повышает термостабильность образуемых двух- и трехспиральных структур за счет интеркаляции хромофора между плоскостями адениновых оснований, что обеспечивает дополнительную энергию связывания (рис. 1, рис. 2). При этом повышение температуры перехода спираль-клубок в олигонуклеотид-полинуклеотидных комплексах тем больше, чем короче олигонуклеотид.

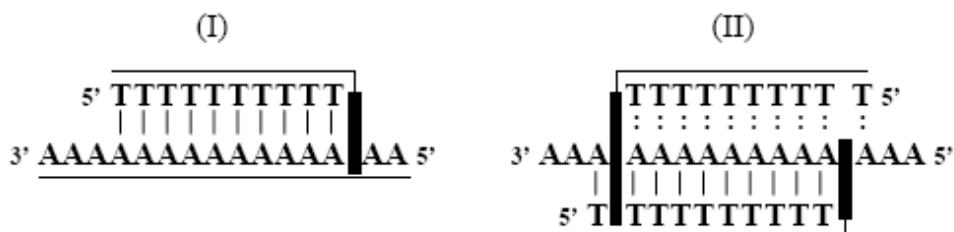


Рис. 1. Схемы комплексов, которые могут быть образованы конъюгатом $(dT)_{10}F1rib$ с олигонуклеотидом $(dA)_{15}$: дуплекс $(dA)_{15} \cdot (dT)_{10}F1rib$ (I) и триплекс $(dA)_{15} \cdot 2(dT)_{10}F1rib$ (II). Черным прямоугольником обозначен хромофор имидазофеназина. Рисунок воспроизведен из работы [56] по лицензии издательства John Wiley and Sons.

Данный способ модификации имеет преимущество по сравнению с присоединением красителя через гибкий линкер, так как обеспечивает предопределенное положение хромофора в нуклеотидной последовательности при комплексообразовании. Оценено влияние присоединенного к олиготимидилату, (dT)_n, феназинового красителя на изменение термодинамических потенциалов ΔH , ΔS , ΔG при конформационном переходе спираль – клубок. Предложенный метод модификации антисмысловых олигонуклеотидов существенно повышает эффективность их терапевтического действия. Эти исследования выполнялись в сотрудничестве с коллегами из Отдела синтетических биорегуляторов Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины (г. Киев).

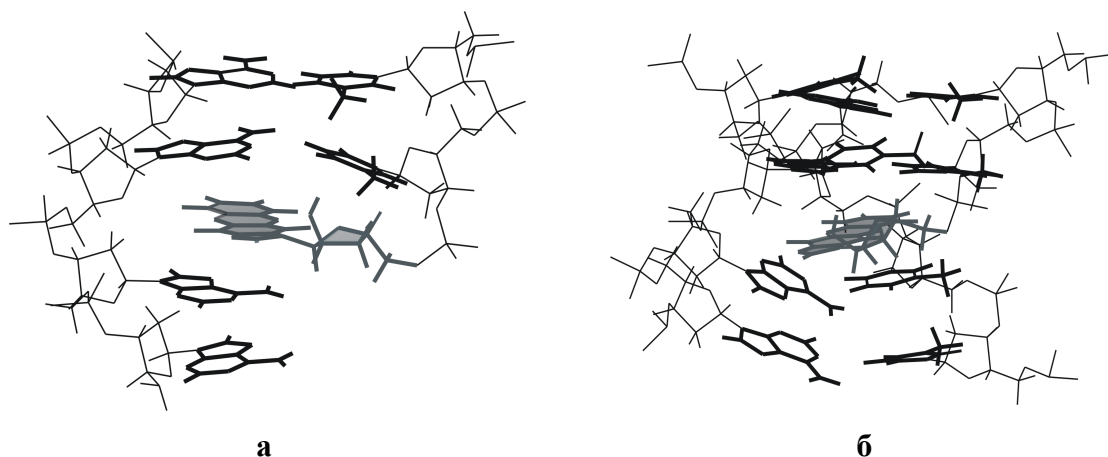


Рис. 2. Вид минимизированных по энергии структур дуплекса (dA)₁₅·(dT)₁₀F1rib (A) и триплекса (dA)₁₅·(dT)₁₅·(dT)₁₀F1rib (B), где показаны сегменты спиралей, содержащие интеркалированный краситель F1rib (затемнен). Рисунок воспроизведен из работы [56] по лицензии издательства John Wiley and Sons.

Приведенный в работах [55-59] способ 3'-модификации олигонуклеотидов может быть применен для повышения эффективности молекулярной гибридизации олигонуклеотидов. Данные о стабилизирующем влиянии феназинового красителя, ковалентно присоединенного к олигонуклеотиду, могут быть использованы при разработке терапевтических противораковых и противовирусных препаратов ген-направленного действия на основе синтетических антисмысловых и антигенных олигонуклеотидов.

3.3. Взаимодействие порфирин-феназиновых конъюгатов с G-квадруплексами

С целью поиска новых противораковых препаратов нашими коллегами из Отдела синтетических биорегуляторов Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины (г. Киев) были синтезированы конъюгат имидазофеназина с трехкатионным производным мезо-порфирина TMPyP4 (TMPyP³⁺-ImPzn, Рис. 3) и его металлизированные ионами Zn²⁺ и Mn³⁺ производные, в которых флуоресцирующие гетероароматические молекулы соединены гибким алкиламидным линкером [60] (рис. 3).

Известно, что TMPyP4 селективно накапливается в раковых клетках и является фотосенсибилизатором для фотодинамической терапии рака, а также стабилизатором G-квадруплексов. Предполагалось, что при связывании с теломерной ДНК порфириновая часть конъюгатов будет стабилизировать G-квадруплексы, тогда как имидазофеназин усилит эффект путем интеркаляции в двухспиральный участок нуклеиновой кислоты.

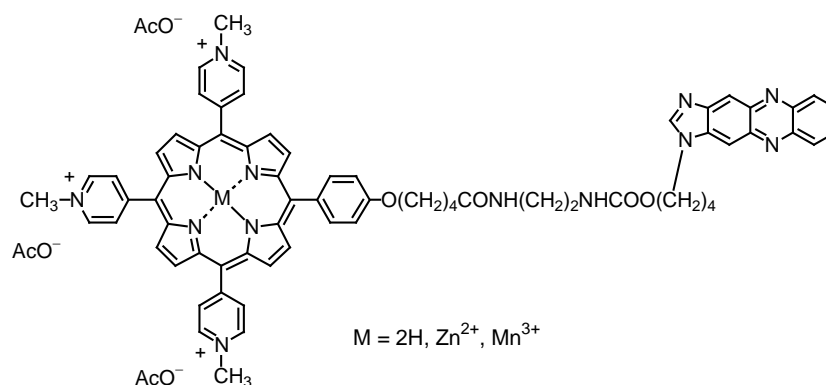


Рис. 3. Структурная формула конъюгата $TMPyP^{3+}-ImPzn$ и его металлопроизводных.

Тестирование антипролиферативной активности конъюгатов *in vitro* на клеточных культурах легочной карциномы Льюиса мышей (LLC) подтвердили их высокую биологическую активность (табл. 2). Самая высокая IC_{50} 5,9 мкМ наблюдалась для цинкового конъюгата, что в 3,7 раза выше, чем для неметаллизированного [60].

Таблица 2. Ингибирование опухолевых клеток LLC порфириновыми конъюгатами [60]

Конъюгат	IC_{50}^* , мкМ
$TMPyP^{3+}-ImPzn$	$21,8 \pm 5,2$
$Zn(II) TMPyP^{3+}-ImPzn$	$5,9 \pm 1,1$
$Mn(III) TMPyP^{3+}-ImPzn$	$11,2 \pm 2,4$

* IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования – показатель эффективности лиганда при ингибирующем биохимическом или биологическом взаимодействии. IC_{50} является количественным индикатором, который показывает, сколько нужно лиганда-ингибитора для ингибирования биологического процесса на 50 %.

Методами молекулярной спектроскопии и термической денатурации было проведено исследование спектроскопических свойств синтезированных конъюгатов и их комплексов с олигонуклеотидом теломерной последовательности человека, Tel22, образующим мономолекулярный G-квадруплекс [61], а также с модельным тетрамолекулярным квадруплексом, образованным синтетическим полинуклеотидом poly(G) [62, 63]. Показано, что все соединения имеют высокое сродство к квадруплексам Tel22 и poly(G). В зависимости от соотношения молярных концентраций полимер/краситель наблюдается два конкурирующих типа связывания, которые характеризуются существенным изменением формы, интенсивности и положения полос в спектрах поглощения и флуоресценции. В рамках модели двух состояний определены изменения термодинамических параметров образования квадруплексов, вызванные связыванием с конъюгатами. Показано, что металлоконъюгаты стабилизируют структуру квадруплекса Tel22, десятикратно увеличивая равновесную константу его формирования при физиологической температуре.

Установлено, что оба компонента неметаллизированного $TMPyP^{3+}-ImPzn$ образуют внутримолекулярный гетеродимер, который встраивается в бороздку квадруплексной poly(G) как единое целое. Металлизированные конъюгаты димер не образуют (Zn^{2+} и Mn^{2+} ионы образуют координационную связь с молекулами воды, которые препятствуют формированию гетеродимеров), что позволяет обеим частям конъюгата по отдельности связываться с нуклеиновыми кислотами. Предполагается, что

порфириновая часть встраивается в бороздку poly(G), а феназиновая – интеркалирует между ее основаниями (рис. 4).

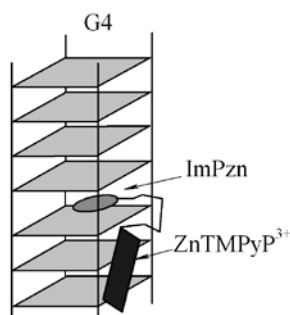


Рис. 4. Схематическое изображение встраивания $ZnTMPyP^{3+}$ части конъюгата в бороздку poly(G) и интеркаляция ImPzn части между гуаниновыми основаниями. Рисунок из работы [63] воспроизведен по лицензии издательства Springer Nature.

Усиленная стабилизация квадруплексной ДНК обеими компонентами металлоконъюгата может быть причиной их повышенной антипролиферативной активности, которая проявляется в нарушении теломеразной активности и угнетении роста раковых клеток.

4. Взаимодействие бисчетвертичных аммониевых соединений с нуклеиновыми кислотами

Молекулы соединений, выбираемых для взаимодействия с ДНК путем укладки в бороздки двойной спирали, должны иметь вытянутую (протяженную) структуру и нести положительный заряд, способствующий электростатическим взаимодействиям с фосфатными группами ДНК. Этим критериям удовлетворяют бисчетвертичные аммониевые соединения (БЧАС) декаметоксин и этоний, относящиеся к противомикробным препаратам. Основным механизмом их действия, как будет показано во второй части обзора, считается взаимодействие с мембранами бактериальных клеток. Особый интерес к БЧАС обусловлен тем, что они, как было установлено ранее, являются малотоксичными для человека и не обладают мутагенным или тератогенным действием. Однако не исключена возможность их взаимодействия (в определенных условиях) с нуклеиновыми кислотами патогенов. Предполагалось, что воздействие БЧАС на ДНК должно проходить по неинтеркаляционному механизму путем укладки их дикатионов в бороздки двунитевой ДНК. Для проверки этой гипотезы был проведен ряд исследований взаимодействия этония [64, 65] и декаметоксина [66, 67] с ДНК с использованием спектроскопических методик, разработанных ранее Благим Ю.П. с сотрудниками для изучения взаимодействия ионов металлов с нуклеиновыми кислотами [16]. Обнаружено влияние этих БЧАС на параметры плавления ДНК, доказывающее их связывание с нуклеиновыми кислотами. Обнаружена специфичность дикатионов БЧАС к участкам ДНК, обогащенным А-Т парами.

Оценивая достижения современной масс-спектрометрии, следует отметить, что бельгийскими исследователями Э. Де По и В. Габеликой был предложен метод получения в условиях масс-спектрометрии с ИЭР зависимостей, подобных кривым плавления ДНК [68, 69]. Этот метод был применен для исследования термодинамики связывания химиотерапевтических препаратов с бороздками двунитевых ДНК. Мы приводим данный пример как показательную демонстрацию возможностей нестандартных применений масс-спектрометрии в решении биофизических задач, а также дополнения данных о физико-химических параметрах нуклеиновых кислот в конденсированном состоянии данными об их свойствах в газовой фазе [69].

5. Исследования межмолекулярных взаимодействий противовирусного препарата тилорона с биомолекулами-мишенями и их компонентами

Наряду с исследованиями молекулярных механизмов действия противоопухолевых и противомикробных препаратов, наше внимание привлекают и исследования противовирусных агентов. Среди таких объектов – интерферон-индуцирующий агент тилорон, молекулярные механизмы антивирусного действия которого остаются предметом научной дискуссии, несмотря на его активное использование в качестве действующего вещества ряда современных фармакологических препаратов. Для прояснения этого вопроса совместно с сотрудниками Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины было проведено исследование взаимодействий тилорона с потенциальными биомолекулами-мишенями: нуклеиновыми кислотами и их компонентами – нуклеозидами, содержащими как пуриновые, так и пиримидиновые азотистые основания [70].

С целью изучения возможной агрегации тилорона с его потенциальными мишенями - одноцепочечными РНК (ssRNA), полученными из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, методом динамического светорассеяния была исследована система (тилорон + РНК) в растворе натрий-фосфатного буфера с добавлением 10% сыворотки крови телят, т.е. в условиях, приближенных к физиологическим. Было обнаружено, что введение тилорона в раствор РНК вызывало формирование в модельной системе агрегатов тилорон + ssRNA, которые более чем в 10 раз превышали по размеру частицы, присутствовавшие в исходном растворе РНК.

Метод масс-спектрометрии с ИЭР применялся для исследования межмолекулярных взаимодействий в модельных бинарных системах «тилорон + нуклеозид» (Ado или Thd, или Urd) и трехкомпонентной системе «тилорон + Ado + Urd», растворенных в полярном растворителе метаноле. Масс-спектры всех исследованных бинарных систем «тилорон+нуклеозид» содержали пики ионов, характерных для индивидуальных компонентов смеси, а в спектре системы (тилорон + Urd) наряду с этим обнаружен достаточно интенсивный сигнал стабильного супрамолекулярного комплекса $Urd \cdot Til \cdot 2H^{2+}$. Исследование трехкомпонентной модельной системы «тилорон + Ado + Urd» подтвердило данные о возможной селективности связывания тилорона с нуклеозидами, поскольку при наличии в спектре системы пика нековалентного комплекса $Urd \cdot Til \cdot 2H^{2+}$ пики кластеров Ado с тилороном в спектре не обнаружены. Полученные данные свидетельствуют о возможности формирования стабильных нековалентных комплексов тилорона с одноцепочечными РНК и их компонентами в биологических системах и указывают на Urd как на один из потенциальных центров специфического связывания тилорона с молекулами РНК [70].

ВЫВОДЫ

Опыт исследований, проводившихся в течение нескольких десятилетий во ФТИНТ, продемонстрировал эффективность применения молекулярно-биофизических подходов и методов к установлению молекулярных механизмов действия ряда лекарственных препаратов, молекулярными мишенями действия которых в живых системах являются нуклеиновые кислоты и их компоненты.

Показано, что в каждой из перечисленных выше систем «химиотерапевтический препарат – предполагаемая мишень» такие механизмы состоят в специфических или неспецифических невалентных или ковалентных взаимодействиях и в формировании стабильных супрамолекулярных комплексов молекул лекарственного агента и биомолекулы-мишени. Методы мягкоионизационной масс-спектрометрии позволили зарегистрировать такие комплексы молекул лекарственных препаратов с компонентами

нуклеиновых кислот. Методы молекулярной спектроскопии и квантово-химические расчеты позволили установить структурные, электронные и энергетические характеристики препаратов и их комплексов с нуклеиновыми кислотами.

Полученные результаты могут представлять практический интерес для поиска новых эффективных химиотерапевтических препаратов, а также при разработке новых методик лечения различных заболеваний, включая вирусные и онкологические.

БЛАГОДАРНОСТИ

Этот обзор авторы посвящают памяти многолетнего руководителя отдела молекулярной биофизики ФТИНТ, одного из основателей Харьковской школы биофизики, видного украинского физика и биофизика профессора Благого Юрия Павловича. Его активная преподавательская деятельность на кафедре молекулярной и прикладной биофизики Харьковского национального университета, эффективное научное руководство аспирантами и сотрудниками отдела, полученные весомые научные результаты внесли неоценимый вклад в развитие биофизической науки в Украине, включая исследования, которым посвящен данный обзор. Авторы обзора благодарны всем соавторам цитируемых работ за вдохновляющее творческое сотрудничество.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Authors' ORCID ID

M.V. Kosevich  <http://orcid.org/0000-0003-0257-4588>
 O.A. Ryazanova  <https://orcid.org/0000-0002-8277-8611>
 V.A. Pashynska  <https://orcid.org/0000-0001-9786-6828>

REFERENCES

1. Mashkovskii, M. D. (2011) *Lekarstvennye sredstva: posobie dlia vrachei [Medicines: A Handbook for Physicians]*. Moskva: Novaia volna. (in Russian)
2. Gnatchenko, S. L. (Ed). (2010). *Fiziko-tehnicheskij institut nizkih temperatur im. B.I. Verkina NAN Ukrainy. 50 let [Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine. 50 years]*. Kiev: Naukova dumka. (in Russian)
3. Verkin, B. I., Yanson, I. K., Sukhodub, L. F., Teplitsky, A. B. (1985). *Vsaimodejstviia biomolekul. Novye eksperimental'nye podhody i metody. [Interactions of biomolecules. New experimental approaches and methods]*. Kiev: Naukova dumka. (in Russian)
4. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S. (2000) Progress of mass spectrometric technique for biomedical experiments as an example of influence of social demands on the advancement of science. *Visnyk Kharkivskoho universytetu No 497. Biofizychnyi visnyk [Biophysical Bulletin]*, (7), 84–99. (in Russian)
5. Vékey, K. (2012). Applications to small biomolecules and developments in Central and Eastern Europe. In K. R. Jennings (Ed.), *A History of European Mass Spectrometry* (pp. 195-212). Chichester: IM Publications
6. Siuzdak, G. (2003). *The expanding role of mass spectrometry in biotechnology*. San Diego: MCC Press.
7. Nobelprize.org. Nobel Media AB (2002). The 2002 Nobel Prize in Chemistry - Advanced Information. Retrieved from <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/advanced-information/>
8. Pokrovskiy, V. A. (2012). Desorption mass spectrometry: physics, physical chemistry, surface chemistry. *Visnyk Natsionalnoi Akademii Nauk Ukrainy [Visnyk of the National Academy of Sciences of Ukraine]*, (12), 28-43. (in Ukrainian)
9. Sukhodub, L. F. (1977). *Mass-spektrometricheskoe issledovanie mezhmolekuliarnyh vzaimodeistvii azotistyh osnovanii nukleinovykh kislot v vacuume [Mass spectrometric study of intermolecular interactions of nitrogen bases in vacuum]* (PhD dissertation). Retrieved from <https://search.rsl.ru/ru/record/01009515558> (OD Дк 77-1/765). (in Russian)

10. Sukhodub, L. F. (1995). Soft-ionization mass spectrometry study of deoxynucleoside bioclusters and deoxynucleoside-antitumor medicinal preparation clusters // *Mass Spectrometry Reviews*, 14(4-5), 235-254. doi: 10.1002/mas.1280140402
11. Kosevich, M. V. (1989). *Molekuliarnyi analiz lekarstvennykh preparatov i produktov ih vzaimodeistviia s DNK i ee komponentami po dannym miagkoionizatsionnoi mass-spektrometrii* [Molecular analysis of medicines and products of their interaction with DNA and its components according to soft ionization mass spectrometry]. (PhD dissertation). Retrieved from <https://search.rsl.ru/ru/record/01008471022> (OD 61 89-1/1884). (in Russian)
12. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Pashynska, V. A. (1993). Novyi tip emitterov na osnive poverkhnosti izloma grafita dlia mass-spektrometrii s polevoi ionizatsiei i polevoi desorbtsiei [New type of emitters based on graphite fracture surface for mass spectrometry with field ionization and field desorption]. *Doklady AN Ukrainy* [Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine], (9), 75-79. (in Russian)
13. Kosevich, M. V. (2001). *Physical mechanisms of secondary emission of clusters from condensed matter at low temperatures*. (Doctor of Sciences dissertation). Retrieved from Vernadsky National Library of Ukraine, Kiev. (JC71291). (in Russian)
14. Kosevich, M. V. (1998) Low temperature secondary emission mass spectrometry. Cryobiological applications. *European Mass Spectrometry*, 4(4), 251-264. doi: 10.1255/ejms.218
15. Blagoi, Yu. P., Sheina, G. G., Ivanov, A. Yu., Radchenko, E. D., Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Boryak, O. A., Rubin, Yu. V. (1999). Low-temperature experimental studies in molecular biophysics: a review. *Low Temperature Physics*, 25(10), 747-760. doi:10.1063/1.593810
16. Blagoi, Yu. P., Galkin, V. L., Gladchenko, G. O., Kornilova, S. V., Sorokin, V. A., Shkorbatov, A. G. (1991). *Metallokompleksy nukleinykh kislot v rastvorah* [Metal complexes of nucleic acids in solutions]. Kiev: Naukova Dumka. 269 p. (in Russian)
17. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (2018). PubChem Compound Database. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
18. Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Y., Shelkovsky, V. S., Kosevich, M. V., Grizodub, A. I., Sukhodub, L. F. (1985). Izuchenie produktov prevrashhenija tiofosfamida v vodnykh rastvorah metodami tonkoslojnoj hromatografii i mass-spektrometrii [Study of thiophosphamide transformation products in water solutions by means of thin layer chromatography and mass spectrometry]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* [Pharmaceutical Chemistry Journal], 19(10), 1235--241. (in Russian)
19. Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Y., Shelkovsky, V. S., Arkhangelova, N. M., Grizodub, A. I., Sukhodub, L. F. (1987). Hydrolysis of 1, 1', 1''-phosphinothiolydinetrizaziridine (thiotepa) in aqueous solution. *Biological Mass Spectrometry*, 14(4), 143-148. doi: 10.1002/bms.1200140402
20. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Boryak, O. A., Stepanov, O. I. (1991). Fast atom bombardment mass spectra of thiotepa. *Organic Mass Spectrometry*, 26(6), 619-620. doi: 10.1002/oms.1210260615
21. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Stepanyan, S. G. (1996). Dependence of the biological activity and mass spectrometric pattern on the structure peculiarities of the molecule of alkylating drug thiotepa. *Biophysical Chemistry*, 57(2-3), 123-131. doi: 10.1016/0301-4622(95)00053-6
22. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Stepanyan, S. G., Boryak, O. A., Tretiak, S. M., Telezhenko, Yu. V. (1991). Vozmozhnosti izucheniia fiziko-khimicheskikh kharakteristik veshstva s ispolzovaniem mass-spektrometrii s razlichnymi vidami ionizatsii na primere preparata TioTEF. [Possibilities of study of physico-chemical characteristics of substances by means of mass spectrometry with different ionization modes exemplified by ThioTEPA drug]. *Preprint of Institute for Low Temperature Physics, Kharkov*. (3-91). 1-46. (in Russian)
23. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S. (1990). On the formation of doubly charged fragment and cluster ions of oxygen- and sulfur-containing substances in field ionization and field desorption mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 4(12), 493-494. doi: 10.1002/rcm.1290041202
24. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Boldeskul, I. E., Protsenko, L. D. (1989). Mass-spektrometricheskoe issledovanie arildijetilentriamidov fosfornoj kisloty [Mass spectrometric study of aryldiethylenetriamides of phosphoric acid]. *Ukrainskii Khimicheskii Zhurnal*, 55(6), 642-645. (in Russian)
25. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Boldeskul, I. E., Protsenko, L. D. (1989). Acildijetilentriamidy fosfornoj kisloty: mass-spektrometricheskoe issledovanie [Acyldiethylenetriamides of phosphoric acid: mass-spectrometric investigation]. *Ukrainskii Khimicheskii Zhurnal*, 55(7), 752-757. (in Russian)
26. Powers, R., Siegel, M. M. (2006). *Applications of nuclear magnetic resonance and mass spectrometry to anticancer drug discovery*. In A. A. Adjei, J. K. Buolamwini (Eds.), *Novel Anticancer Agents. Strategies for Discovery and Clinical Testing* (pp. 107-190). Amsterdam: Academic Press. doi: 10.1016/B978-012088561-9/50006-5

27. Ryazanova, O.A., Voloshin, I. M., Makitruk, V. L., Zozulya, V. N., Karachevtsev, V.A. (2007). pH – induced changes in electronic absorption and fluorescence spectra of phenazine derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 66(4-5), 849-859. doi: 10.1016/j.saa.2006.04.027
28. Ryazanova, O. A., Zozulya, V. N., Voloshin, I. M., Karachevtsev, V. A., Makitruk, V. L., Stepanian, S. G. (2004). Absorption and fluorescence spectral studies of imidazophenazine derivatives. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60(8-9), 2005-2011. doi:10.1016/j.saa.2003.10.020
29. Ryazanova, O. A., Zozulya, V. N., Voloshin, I. M., Karachevtsev, V. A., Makitruk, V. L. (2003). Spekttralno-fluorestsentnyie svoystva potentsialnyh fluorestsentnyh zondov molekulyarnoy gibridizatsii nukleinykh kislot na osnove proizvodnykh fenazina. *Visnyk Kharkivskoho universytetu No 593. Biofizychnyi visnyk [Biophysical Bulletin]*, (12), 49-52. (in Russian)
30. Zarudnev, E. S., Karachevtsev, V. A., Plokhotnichenko, A. M., Stepan'yan, S. G., Adamovich, L. (2009). IR Spectroscopy and ab initio calculations of imidazophenazine and its derivatives in a low-temperature argon matrix. *Low Temperature Physics*, 35(6), 491-502. doi: 10.1063/1.3151996
31. Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Shelkovsky, V. S., Chagovets, V. V., Stepanian, S. G., Karachevtsev, V. A., Adamowicz, L. (2006). Evaluation of the reduction of imidazophenazine dye derivatives under fast atom bombardment mass spectrometric conditions. *Journal of Mass Spectrometry*, 41(1), 113-123. doi:10.1002/jms.974
32. Kosevich, M. V., Chagovets, V. V., Shmigol, I. V., Snegir, S. V., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Shelkovsky, V. S., Pokrovskiy, V. A., Gomory, A. (2008). Sensitivity of redox reactions of dyes to variations of conditions created in mass spectrometric experiments. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(10), 1402–1412. doi: 10.1002/jms.1421
33. Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Chagovets, V. V., Shelkovsky, V. S., Pokrovskiy, V. A. (2016). Chapter Seven: Interactions of biologically active redox-sensitive dyes with nanomaterials: mass spectrometric diagnostics. In V. A. Karachevtsev (Ed.). *Nanobiophysics: Fundamentals and Applications*. (pp. 193–233). Singapore: Pan Stanford Publishing
34. Shelkovskii, V. S., Kosevich, M. V., Chagovets, V. V., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Snegir', S. V., Shmigol', I. V., Pokrovskii, V. A. (2009). About the plausible contribution of field ionization in the mechanisms of the formation of dyes of ions under conditions of laser desorption/ionization from a nanostructured graphite surface. *Mass-Spectrometria*, 6(4), 271-279
35. Sukhodub, L. F. (1991). The possibilities of the soft-ionization mass-spectrometry in the molecular-biological studies. *Biopolymers & Cell*, 7(6), 15-32. (in Russian) doi: 10.7124/bc.0002FC
36. Sukhodub, L. F., Shelkovsky, V. S., Kosevich, M. V., Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Yu. (1985). Mass spectrometric study of thiophosphamide interaction with nucleic acid bases. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 283(10), 714-716. (in Russian)
37. Sukhodub, L. F., Shelkovsky, V. S., Kosevich, M. V., Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Yu. (1986). Nucleic acid base complexes with thiotepa as revealed by field ionization mass spectrometry. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*, 13(4), 167-170. doi: 10.1002/bms.1200130403
38. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Yu., Shelkovsky, V. S., Boryak, O. A. (1987). Nablyudenie produktov alkilirovaniya osnovaniy nukleinykh kislot metodom polevoj mass-spektrometrii [Observation of alkylation products of nucleic acids bases by means of field mass spectrometry]. *Aktual'nye Problemy Eksperimental'noj Khimioterapii Opuholej*, (2), 94-96. (in Russian)
39. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Yu. (1990). Direct observation of adducts between nitrogen bases and thio-TEPA using soft ionization mass spectrometry. *Biofizika*, 35(4), 549-551. (in Russian)
40. Sukhodub, L. F., Andrievskiy, G. V., Pyatigorskaya, T. L., Kosevich, M. V., Zhilkova, O. Yu. (1988). Use of the method of fast atom bombardment mass spectrometry for identification of products of the interaction of thiophosphamide with DNA. *Bioorganicheskaya Khimiya [Russian Journal of Bioorganic Chemistry]*, 14(12), 1698-1699. (in Russian)
41. Pyatigorskaya, T. L., Zhilkova, O. Yu., Murav'eva, L. M., Sukhodub, L. F. (1986). DNA interaction with the antitumor agent thiophosphamide. *Molekulyarnaya Biologiya*, 20(2), 423-429. (in Russian)
42. Serebryanyj, A. M., Andrievskiy, G. V., Bekker, A. R., Sibeldina, L. A., Povolotskaya, M. I. (1986). Directions of deoxyguanosine and deoxyguanylic acid alkylation by thio-TEPA. *Bioorganicheskaya Khimiya [Russian Journal of Bioorganic Chemistry]*, 12(4), 499-506. (in Russian)
43. Serebryanyi, A. M., Andrievskii, G. V., Bekker, A. R., Sibeldina, L. A., Sharova, O. L. (1987). The structure of the products of nucleotides and DNA modification by ethyleneimine and thio-TEPA. *Bioorganicheskaya Khimiya [Russian Journal of Bioorganic Chemistry]*, 13(6), 786-792. (in Russian)
<http://rjbc.ru/arc/13/6/0786-0792.pdf>

44. Andrievskii, G. V. (1988). *Modifikatsiia nukleotidov i DNK etileniminom i tiotefom* [Modification of DNA nucleotides by ethyleneimine and thiotepa]. (PhD dissertation). Retrieved from <https://search.rsl.ru/ru/record/01008273270> (OD 61 89-2/440). (in Russian)
45. Sukhodub, L. F., Chivanov, V. D., Grebenik, L. I., Bondarenko, P. V., Zubarev, R. A., Knysh, A. N. (1991). Observation of thiotepa-deoxyguanosine-5'-phosphate modification products by mass spectrometry with isolation of Californium-252 fragments. *Bioorganicheskaya Khimiya* [Russian Journal of Bioorganic Chemistry], 17(7), 999–1001. (in Russian)
46. Sukhodub, L. F., Chivanov, V. D., Grebenik, L. I., Bondarenko, P. V., Zubarev, R. A., Knysh, A. N. (1992). Study of the interaction of triethylenethiophosphamide with nucleotides by mass spectrometry with ionization by fission fragments of californium-252. *Ukrainskii Biokhicheskii Zhurnal* [The Ukrainian Biochemical Journal], 64(1), 41-49. (in Russian)
47. Sukhodub, L. F., Grebenik, L. I., Chivanov, V. D. (1994). Use of time-of-flight mass spectrometry with ionization division fragments of californium-252 for studying the mechanisms of action of drugs on DNA and its components. *Biofizika*, 39(2), 289-293. (in Russian)
48. Sukhodub, L. F., Grebenik, L. I., Chivanov, V. D. (1994). Study of anticancer drug interaction with DMA by means of particle-induced desorption mass spectrometry: Prospidine and deoxyguanosine-5'-monophosphate. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8(2), 195-198. doi: 10.1002/rcm.1290080214
49. Grebenik, L. I. (1996). *Vyvchennia mizhmolekuliarnykh vzaiemodii protypukhlynykh preparativ (tiotefa, prospidina, doksorubitsyna, farmorubitsyna) z deiakymy strukturnymy komponentamy nukleinyvykh kyslot ta bilkiv metodom mas-spektrometrii* [Study of intermolecular interactions of anticancer drugs (thioTEPA, prospidine, doxorubicine, farmorobicine) with some structural components of nucleic acids and proteins by means of mass spectrometry]. (PhD dissertation). Retrieved from <https://dlib.rsl.ru/viewer/01000775262#?page=1> (in Ukrainian)
50. Kalinkevich, A. N., Pilipenko, V. V., Kalinichenko, T. G., Sukhodub, L. F. (2002). Mass spectrometry (252Cf-PDMS) study of aminoglycoside antibiotics interaction with nucleic acid components. *Biopolymers & Cell*, 18(2), 114-116. (in Russian) doi: 10.7124/bc.0005F1
51. Nikolaienko T. Yu., Bulavin L. A., Sukhodub L. F. (2014). The complexation of the anticancer drug ThioTEPA with methylated DNA base guanine: combined ab initio and QTAIM investigation. *Molecular Informatics*, 33(2), 104-114. doi: 10.1002/minf.201300059
52. Samtsevych, A. I., Bulavin, L. A., Sukhodub, L. F., Nikolaienko, T. Yu. (2014). Interaction of DNA nucleotide bases with anticancer drug ThioTEPA: molecular docking and quantum-mechanical analysis. *The Ukrainian Biochemical Journal*, 86(2), 50-59. (in Russian) doi: 10.15407/ubj86.02.050
53. Zozulya, V., Blagoi, Yu., Löber, G., Voloshin, I., Winter, S., Makitruk, V., Shalamay, A. (1997). Fluorescence and binding properties of phenazine derivatives in complexes with polynucleotides of various base compositions and secondary structures. *Biophysical Chemistry*, 65(1), 55-63. doi: 10.1016/S0301-4622(96)02247-8
54. Blagoi, Yu. P., Zozulya, V. N., Voloshin, I. M., Makitruk, V. L., Shalamay, A. S., Shcherbakova, A. S. (1997). Investigation of phenazine derivatives interaction with DNA by polarized fluorescence method. *Biopolymers & Cell*, 13(1), 22-29. (in Russian) doi: 10.7124/bc.000462
55. Zozulya, V., Shcherbakova, A., Dubey, I. (2000). Calculating helix-to-hoile transitions of duplexes formed by phenazine-conjugated oligonucleotide, using fluorescence melting data. *Journal of Fluorescence*, 10(1), 49-53. doi: 10.1023/A:1009487613659
56. Zozulya, V., Blagoi, Yu., Dubey, I., Fedoryak, D., Makitruk, V., Ryazanova, O., Shcherbakova, A. (2003). Anchorage of an oligonucleotide hybridization by a tethered phenazine nucleoside analogue. *Biopolymers (Biospectroscopy)*, 72(4), 264-273. doi: 10.1002/bip.10403
57. Ryazanova, O. A., Dubey, I. Ya., Zozulya, V. N. (2008). Investigation of the effect of covalently attached phenazine dye on helix-to-coil transition in mixed poly(rA)-(dT)₁₄ system. *Biophysical Bulletin*, 20(1), 17-23. (in Russian)
58. Ryazanova, O. A., Dubey, L. V., Dubey I. Ya., Zozulya V. N. (2012). Spectroscopic study on the effect of imidazophenazine tethered to 5'-end of pentadecathymidilate on stability of poly(dA)·(dT)₁₅ duplex. *Journal of Fluorescence*, 22(6), 1431-1439. doi: 10.1007/s10895-012-1080-y
59. Dubey, L., Ryazanova, O., Zozulya, V., Fedoryak, D., Dybey, I. (2011). Postsynthetic modification of oligonucleotides with imidazophenazine dye and its effect on duplex stability. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, 30(7-8), 585-596. doi: 10.1080/15257770.2011.598489
60. Dubey, L. V., Ilchenko, M. M., Zozulya, V. N., Ryazanova, O. A., Pogrebnoy, P. V., Dubey, I. Ya. (2011). Synthesis, structure and antiproliferative activity of cationic porphyrin - imidazophenazine conjugate. *International Review of Biophysical Chemistry*, 2(4), 147 152

61. Zozulya, V. N., Ryazanova, O. A., Voloshin, I. M., Dubey, L. V., Dubey I. Ya. (2011). Spectroscopic studies on binding of porphyrin-phenazine conjugate to intramolecular G-quadruplex formed by 22-mer oligonucleotide. *International Review of Biophysical Chemistry*, 2(4), 112-119
62. Ryazanova, O., Zozulya, V., Voloshin, I., Dubey, L., Dubey, I., Karachevtsev, V. (2015). Spectroscopic studies on binding of porphyrin-phenazine conjugate to four-stranded poly(G). *Journal of Fluorescence*, 25(4), 1013-1021. doi: 10.1007/s10895-015-1585-2
63. Ryazanova, O., Zozulya, V., Voloshin, I., Dubey, L., Dubey, I., Karachevtsev, V. (2015). Binding of metallated porphyrin-imidazophenazine conjugate to tetramolecular quadruplex formed by poly(G): a spectroscopic investigation. *Journal of Fluorescence*, 25(6), 1897-1904. doi: 10.1007/s10895-015-1682-2
64. Kukhar', V. P., Sorokin V. A., Blagoi, Yu. P., Sukhodub, L. F. (1989). Observation of AT-nucleotide specificity during the interaction of dexamethoxin with native DNA. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 305(4), 997-999. (in Russian) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/journals/dokl-akad-nauk-sssr/>
65. Sorokin, V. A., Blagoi, Yu. P., Valeev, V. A., Gladchenko, G. O., Sukhodub, L. F., Volianskiĭ, Iu. L. (1990). The study of complex-formation of DNA with the antimicrobial drug decamethoxine. *Molekuliarnaia Biologiya*, 24(1), 214-219. (in Russian)
66. Sorokin, V. A., Valeev, V. A., Gladchenko, G. O., Blagoi, Yu. P., Sukhodub, L. F. (1994). Interaction between antimicrobial ethonium drug and natural DNA. *Biopolymers & Cell*, 10(1), 82-89. (in Russian) doi: 10.7124/bc.000396
67. Sorokin, V. A., Valeev, V. A., Gladchenko, G. O., Blagoi, Yu. P., Ryazanova, O. A., Sukhodub, L. F. (1994). Ethonium interaction with single-chain homopolynucleotides. *Biopolymers & Cell*, 10(2), 61-68. (in Russian) doi:10.7124/bc.0003A6
68. Rosu F., De Pauw E., Gabelica V.(2008). Electrospray mass spectrometry to study drug-nucleic acids interactions. *Biochimie*, 90(7), 1074-1087. doi: 10.1016/j.biochi.2008.01.005
69. Gabelica, V. (Ed.). *Nucleic acids in the gas phase*. Berlin: Springer-Ferlag. doi: 10.1007/978-3-642-54842-0
70. Pashynska V. A., Zholobak N. M., Kosevich M. V., Gomory A., Holubiev P. K., Marynin A. I. (2018). Study of intermolecular interactions of antiviral agent tilorone with RNA and nucleosides. *Biophysical Bulletin*, 39(1), 15-26. doi: 10.26565/2075-3810-2018-39-02

Огляд

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-03>

УДК 577.32+615.28+543.51

БИОФИЗИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ХИМИОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ. 2. Противомикробные и противомаларийные препараты (Обзор)

В.А. Пашинская, М.В. Косевич

*Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,
пр. Науки, 47, Харьков, Украина, 61103*

e-mail: mykosevich@ilt.kharkov.ua

Поступила в редакцию 5 октября 2018

Принята 8 декабря 2018 г.

Актуальность. Получение сведений о молекулярных механизмах действия биологически активных соединений является необходимым шагом для разработки новых лекарственных препаратов. Для установления механизмов взаимодействия химиотерапевтических препаратов, воздействующих на возбудителей инфекционных заболеваний, с их потенциальными молекулярными мишенями в биообъектах необходимы разработка и применение молекулярно-биофизических экспериментальных и теоретических методов исследования.

Цель работы. Целью данного обзора явилось обобщение многолетнего опыта изучения молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов в биофизических отделах Физико-технического института низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины (ФТИНТ). Во второй части обзора представлены данные о предлагаемых механизмах действия ряда противомикробных и противомаларийных агентов.

Материалы и методы. В комплексных исследованиях были использованы экспериментальные методики мягкоионизационной масс-спектрометрии в сочетании с компьютерным моделированием методами квантовой химии.

Результаты. Были исследованы модельные системы, состоящие из химиотерапевтического препарата и его молекулярных мишеней: противомикробных препаратов и компонентов биомембран; противомаларийных препаратов и гема. На молекулярном уровне установлены механизмы действия этих химиотерапевтических агентов, состоящие в невалентных взаимодействиях молекул или ионов препаратов с молекулами-мишенями с образованием стабильных супрамолекулярных комплексов. Методы мягкоионизационной масс-спектрометрии позволили зарегистрировать невалентные комплексы лекарственных препаратов с биомолекулами. Структурные, электронные и энергетические параметры этих комплексов установлены квантово-химическими расчетами.

Выводы. Результаты исследований, проводившихся в течение нескольких десятилетий во ФТИНТ, продемонстрировали эффективность применения молекулярно-биофизических подходов к установлению молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов. Полученные результаты имеют практическое значение для дальнейшей разработки лекарственных средств и способов их применения. Ряд результатов включен в международные базы данных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: межмолекулярные взаимодействия; химиотерапевтические препараты; масс-спектрометрия; квантовая химия; бисчетвертичные аммониевые соединения; производные артемизинина; фосфолипиды.

БІОФІЗИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МЕХАНІЗМІВ ДІЇ ХІМІОТЕРАПЕВТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ.

2. Протимікробні та протималарійні препарати (Огляд)

В.А. Пашинська, М.В. Косевич

*Фізико-технічний інститут низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України,
пр. Науки, 47, Харків, Україна, 61103*

Актуальність. Отримання відомостей стосовно молекулярних механізмів дії біологічно активних сполук є необхідним кроком для розробки нових лікарських препаратів. Для встановлення механізмів взаємодії хіміотерапевтичних препаратів, які впливають на збудників інфекційних захворювань, з їх потенційними молекулярними мішенями у біооб'єктах необхідні розробка та застосування молекулярно-біофізичних експериментальних та теоретичних методів дослідження.

Мета роботи. Метою огляду є узагальнення багаторічного досвіду вивчення молекулярних механізмів дії хіміотерапевтичних препаратів у біофізичних відділах Фізико-технічного інституту низьких температур ім. Б.І. Веркіна НАН України (ФТІНТ). У другій частині огляду представлено дані стосовно запропонованих механізмів дії низки протимікробних і протималарійних агентів.

Матеріали та методи. У комплексних дослідженнях було використано експериментальні методики м'якоіонізаційної мас-спектрометрії в поєднанні з комп'ютерним моделюванням методами квантової хімії.

Результати. Було досліджено модельні системи, які склалися з хіміотерапевтичного препарату та його молекулярних мішеней: протимікробних препаратів та компонентів біомембран, протималарійних препаратів та гема. На молекулярному рівні встановлено механізми дії цих хіміотерапевтичних агентів, які полягають у невалентних взаємодіях молекул або іонів препаратів з молекулами-мішенями з утворенням стабільних супрамолекулярних комплексів. Методи м'якоіонізаційної мас-спектрометрії дозволили зареєструвати невалентні комплекси лікарських препаратів з біомолекулами. Структурні, електронні та енергетичні характеристики цих комплексів встановлено квантово-хімічними розрахунками.

Висновки. Результати досліджень, які проводилися протягом кількох десятиріч у ФТІНТ, продемонстрували ефективність застосування молекулярно-біофізичних підходів до встановлення молекулярних механізмів дії хіміотерапевтичних препаратів. Отримані результати мають практичне значення для подальшої розробки лікарських засобів та способів їх застосування. Низку результатів включено до міжнародних баз даних.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: міжмолекулярні взаємодії; хіміотерапевтичні препарати; мас-спектрометрія; квантова хімія; бісчетвертинні амонієві сполуки; похідні артемізініну; фосфоліпіди.

BIOPHYSICAL INVESTIGATIONS OF MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS.

2. Antimicrobial and antimalarial agents (Review)

V.A. Pashynska, M.V. Kosevich

B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine, 47 Nauky Avenue, Kharkiv, Ukraine, 61103

Background: Getting information on molecular mechanisms of action of biologically active compounds is a necessary step in the elaboration of new medicines. The development and application of molecular-biophysical experimental and theoretical techniques are required to establish the mechanisms of interaction of chemotherapeutic drugs, which affect infectious agents, with their potential molecular targets in biological objects.

Objectives: The aim of this review is a generalization of the results of long-term investigations on molecular mechanisms of action of chemotherapeutic agents performed in the biophysical departments of B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering (ILTPE) of the NAS of Ukraine. In the second part of the review the data on the assumed mechanisms of action of some antimicrobial and antimalarial agents are presented.

Materials and methods: Experimental methods of soft ionization mass spectrometry and computer simulations by means of quantum chemistry were used in the combined investigations.

Results: Model systems composed of chemotherapeutic drugs and their molecular targets were studied, such as antimicrobial drugs and biomembranes components, antimalarial drugs and heme. The mechanisms of action of these chemotherapeutic agents were revealed at the molecular level, which consisted in the noncovalent interactions of the drugs' molecules or ions with molecular targets resulting in the supramolecular complexes formation. Methods of soft ionization mass spectrometry allowed us to detect such noncovalent complexes of the medicines with biomolecules. Structural, electronic and energetic characteristics of these complexes were established by quantum chemical calculations.

Conclusions: The results of investigations conducted during several decades at the ILTPE have demonstrated the efficiency of the application of the methods and approaches of molecular biophysics to determination of molecular mechanisms of chemotherapeutic drugs action. The results obtained are of practical importance for further development of medicines and schemes of their application. A number of the results obtained were included into international data bases.

KEY WORDS: intermolecular interactions; chemotherapeutic agents; mass spectrometry; quantum chemistry; bisquaternary ammonium compounds; artemisinin derivatives; phospholipids.

Сведения о молекулярных механизмах действия биологически активных соединений необходимы для целенаправленного поиска и разработки новых

эффективных лекарственных препаратов и схем их применения в медицинской практике. При классификации фармакологических препаратов в отдельную группу выделяют химиотерапевтические препараты, объектами воздействия которых являются возбудители заболеваний – бактерии, вирусы, грибы, а также клетки злокачественных новообразований [1]. Механизмы действия многих химиотерапевтических препаратов связаны с их невалентными межмолекулярными взаимодействиями с биомолекулами-мишенями в клетках патогенов. Изучение таких механизмов попадает в сферу задач, решаемых молекулярной биофизикой.

Целью данного обзора явилось обобщение результатов изучения молекулярных механизмов действия химиотерапевтических препаратов в биофизических отделах Физико-технического института низких температур (ФТИНТ) им. Б.И. Веркина НАН Украины [2]. В первой части обзора [3] были рассмотрены работы исследователей ФТИНТ, посвященные механизмам действия противоопухолевых и противовирусных агентов, мишенью которых являются нуклеиновые кислоты. Во второй части обзора основное внимание уделяется установлению механизмов действия ряда противомикробных и противомаларийных препаратов. А именно, проанализированы результаты работ по изучению взаимодействия противомикробных препаратов на основе солей бисчетвертичных аммониевых соединений (БЧАС) с фосфолипидами и белками мембран микробных клеток и возможных путей взаимодействия противомаларийных препаратов – производных артемизинина с гемом гемоглобина эритроцитов крови.

Также определен вклад работ ФТИНТ в интернациональные исследования фармакологических препаратов и механизмов их действия, отмечено цитирование оригинальных публикаций в международных базах научных данных, намечены перспективы и направления дальнейших исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

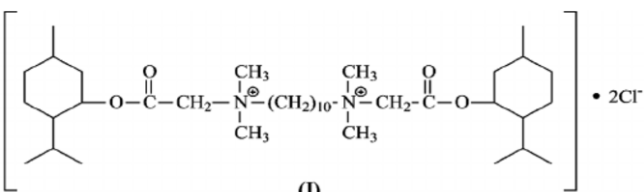
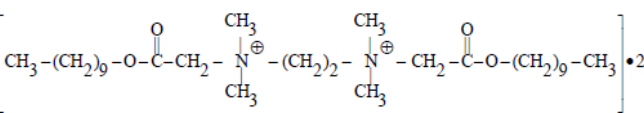
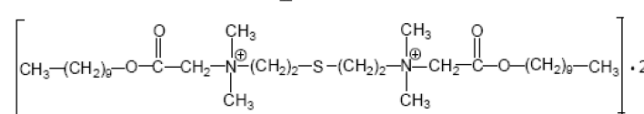
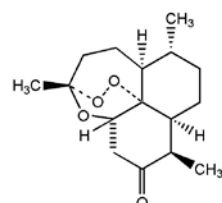
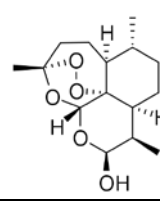
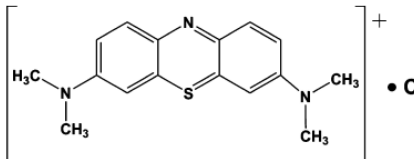
Для изучения межмолекулярных взаимодействий биомолекул и химиотерапевтических препаратов применялся комплекс экспериментальных и теоретических методов биофизических исследований, которые развивались и совершенствовались сотрудниками биофизических отделов ФТИНТ. В первой части данного обзора [3] была дана оценка вклада ученых ФТИНТ в усовершенствование масс-спектрометрических методик [2, 4, 5]. В рамках единого масс-спектрометрического подхода разносторонняя информация об объектах исследования была получена с применением различных способов воздействия на вещество: ионизации электронами (ИЭ), (Electron Ionization, EI), полевой ионизации (ПИ), (Field Ionization, FI) [4, 6], полевой десорбции (ПД), (Field Desorption, FD) [7, 8], бомбардировки быстрыми атомами (ББА), (Fast Atom Bombardment, FAB) и вторично-ионной масс-спектрометрии (ВИМС), (Secondary Ion Mass Spectrometry, SIMS), включая жидкостную ВИМС (жВИМС) [9, 10].

Актуальность проблемы выявления молекулярных механизмов действия лекарственных препаратов обеспечила возможность проведения ряда исследований в рамках международных научных проектов. В сотрудничестве с Институтом органической химии Исследовательского центра естественных наук Венгерской академии наук (ИОХ ИЦЕН ВАН, г. Будапешт, Венгрия) и Антверпенским университетом (г. Антверпен, Бельгия) мы проводили масс-спектрометрические эксперименты с ионизацией электро-распылением (ИЭР) растворов, (Electrospray Ionization, ESI). Ресурсы, предоставлявшиеся Центром коллективного пользования НАН Украины при Институте химии поверхности (ИХП) НАН Украины (г. Киев) [5], были использованы для проведения экспериментов методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ), (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI).

Исследования механизмов действия противомикробных препаратов на уровне модельных мембран проводились в рамках многолетнего сотрудничества с Институтом скинтилляционных материалов НАН Украины (г. Харьков), с использованием метода дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК). Для решения ряда задач применяли методы молекулярной спектроскопии. Компьютерное моделирование выполняли методами квантовой химии в сотрудничестве с Аризонским университетом (США).

Объектами исследования служили модельные системы, состоящие из химиотерапевтических противомикробных и противомаларийных препаратов и их биомолекулярных мишеней в клетках патогенов (табл. 1).

Таблица 1. Структурные формулы и названия исследовавшихся химиотерапевтических препаратов

Структурные формулы молекул препаратов	Название, ссылка в базе данных PubChem
 <p style="text-align: center;">(I)</p>	Декаметоксин, Decamethoxine, Decamethoxinum https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/162291
	Этоний, Ethonium https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/30869
	Тионий Thiomium https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/156859
	Артемизинин, Artemisinin https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/68827
	Дигидроартемизинин Dihydroartemisinin https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/456410
	Метиленовый синий, Methylene Blue https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6099

В табл. 1 представлены структурные формулы ряда химиотерапевтических препаратов, исследовавшихся в работах, цитируемых в данном обзоре. Названия, структурные формулы, физико-химические и фармакологические свойства препаратов,

а также ссылки на наиболее информативные литературные источники можно найти в базе данных PubChem [11].

Отметим, что антимикробные препараты декаметоксин, этоний и тионий относятся к классу солей бисчетвертичных аммониевых соединений (БЧАС), т. е. являются органическими солями. Они также являются поверхностно-активными веществами (ПАВ). К исследовавшимся производным артемизинина, наряду с дигидроартемизинином (ДГА) относятся артеметер и артеестер; также, для сравнения, использовали известный противомаларийный агент хинин.

В исследованиях комбинированного действия нескольких препаратов использовали ацетилсалициловую кислоту (АСК) – аспирин, 2,5-дигидробензойную кислоту (2,5-dihydrobenzoic acid, DHB), тетраметиламмоний и додецилсульфат натрия (sodium dodecylsulfate, SDS). В качестве основного компонента модельных биомембран использовали фосфолипид дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ).

Были исследованы следующие модельные системы, состоящие из химиотерапевтического препарата и его предполагаемых молекулярных мишеней:

- препараты противомикробного действия на основе солей БЧАС - этоний, тионий, декаметоксин (также с фунгицидной активностью) - и фосфолипиды или белки клеточных мембран;

- противомаларийные препараты артемизининового ряда и гем.

Также исследовали системы, включающие препарат широкого спектра действия – краситель метиленовый синий, монослой ПАВ и наноматериалы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Масс-спектрометрическое изучение химиотерапевтических препаратов на основе бисчетвертичных аммониевых соединений

Особым классом лабильных органических соединений, масс-спектрометрическое исследование которых было невозможно до изобретения мягкоионизационных десорбционных методов, являются органические соли. К таковым относятся соли четвертичных и бисчетвертичных аммониевых соединений, обладающие противомикробной активностью. Основной проблемой для получения информативных масс-спектров таких соединений является их термическая нестабильность и низкая летучесть. Сложность перевода БЧАС в газовую фазу без термического разложения препятствовала их исследованию с использованием таких традиционных методик, существовавших на ранних этапах становления масс-спектрометрии, как электронный удар и химическая ионизация.

С использованием набора разнообразных масс-спектрометрических методов ионизации и десорбции, включая мягкоионизационные методы (ИЭ, ПИ, ПД, БА, ВИМС, МАЛДИ, ИЭР), в наших работах были охарактеризованы БЧАС декаметоксин – противомикробный препарат украинской разработки, этоний и тионий [12-17]. Сравнение результатов, полученных разными методиками, и использование дополнительных приемов воздействия на образцы, реализуемые в условиях масс-спектрометрических экспериментов, дало возможность получить разностороннюю информацию о стабильности, структурных особенностях и некоторых физико-химических характеристиках молекул (ионов) препаратов.

Известно, что основной путь термического разложения солей БЧАС, общую формулу которых можно представить как совокупность органического дикатиона Cat^{2+} и двух неорганических анионов, обычно галогенов (в нашем случае Cl^- , $\text{Cat}^{2+} \cdot 2\text{Cl}^-$), состоит в так называемой декватернизации, т.е. превращении четвертичного азота в третичный путем отрыва галогеналкилов, например:



Образовавшиеся в результате реакции (1) нейтральные соединения с третичным азотом являются летучими. Было показано, что масс-спектры БЧАС декаметоксина [12] и этония [13], полученные в режимах ИЭ и ПИ, требующих термического испарения твердого образца, соответствуют нейтральным продуктам термодеструкции БЧАС, т.е., фактически, другим индивидуальным соединениям вида $(\text{Cat} - 2\text{CH}_3)$. Только с появлением мягкоионизационного десорбционного метода ПД впервые удалось зарегистрировать интактные дикатионы Cat^{2+} , необходимые для однозначной идентификации этих соединений. Далее, с использованием растворов препаратов в жидкой матрице в методах ББА и жВИМС были зарегистрированы комплексы дикатиона с противоионом хлора $\text{Cat}^{2+} \cdot \text{Cl}^-$ с соответствующей фрагментацией. Метод жВИМС был использован для изучения стабильности препарата декаметоксина и его разложения со временем [14]. После появления ИЭР и МАЛДИ, эти методы также были применены нами для изучения БЧАС [15-17].

Наряду с традиционным аналитическим приложением масс-спектрометрии как метода получения своего рода «отпечатков пальцев» для идентификации веществ, на базе современных экспериментальных установок реализуются уникальные методики для получения разнообразных физико-химических характеристик вещества на уровне отдельных молекул. Так, для масс-спектрометрических приборов с двойной фокусировкой был разработан метод оценки кинетической энергии, выделяемой при распаде метастабильных ионов на два фрагмента. Этот метод, внедренный венгерскими коллорабораторами в ИОХ ИЦЕН ВАН, был применен нами для сравнения энергий распада дикатионов декаметоксина и этония за счет кулоновского отталкивания между двумя положительно заряженными частями дикатионов [18]. В результате был сделан вывод о том, что органические дикатионы в газовой фазе являются более стабильными, чем считалось ранее. Объяснение этому эффекту было дано с помощью квантово-химических расчетов распределения плотности зарядов в дикатионах [19-21], показавших, что положительный заряд в группе четвертичного азота не локализован, как считалось ранее, на атоме азота, а делокализован по атомам водорода ближайших алкильных заместителей. В результате энергия отталкивания между пространственно делокализованными зарядами становится меньшей, чем энергия, оцененная в приближении локализованных точечных единичных зарядов [18, 19]. Квантово-химические расчеты были применены нами также для установления зависимости электронных параметров БЧАС от такого их структурного параметра, как расстояние между четвертичными атомами азота [19, 20]. Эта информация имеет важное практическое значение для моделирования взаимодействия БЧАС с биологическими молекулами-мишенями и установления зависимости «структура-активность» для биологически активных БЧАС [20].

Для получения информации о структуре стабильных молекулярных ионов в современной масс-спектрометрии используются приемы их разбиения путем столкновения с молекулами газа-реагента – диссоциация, индуцируемая столкновениями (ДИС), которая реализуется в тандемных масс-спектрометрах, в которых последовательно («в тандеме») соединены несколько масс-анализаторов. В таких приборах, независимо от типа источника ионов, ДИС осуществляется в ячейке столкновений, располагаемой между двумя масс-анализаторами. В приборах, использующих метод ИЭР, фрагментация путем ДИС возможна в пространстве между определенными электродами в источнике ионов, причем энергией столкновений можно управлять, изменяя потенциал между этими электродами (для этого потенциала в англоязычной литературе принято название «cone voltage», CV). Оба эти метода впервые были применены нами к изуче-

нию БЧАС декаметоксина [15, 18] и этония [10], что позволило составить детальные схемы фрагментации их дикатионов в условиях ВИМС [18] и ИЭР [15, 16]. На основе анализа этих схем было сделано интересное наблюдение: масс-спектры БЧАС являются сложной суперпозицией спектров нескольких ионов-прекурсоров, т. е. ряд первичных фрагментов претерпевают вторичную фрагментацию. Это наблюдение имеет практическое значение для правильной интерпретации масс-спектров БЧАС, полученных методом ИЭР, поскольку было обнаружено, что спектры, зарегистрированные при самом низком и самом высоком из доступных значений CV , выглядят как масс-спектры совершенно разных соединений и содержат разные наборы ионов (рис. 1).

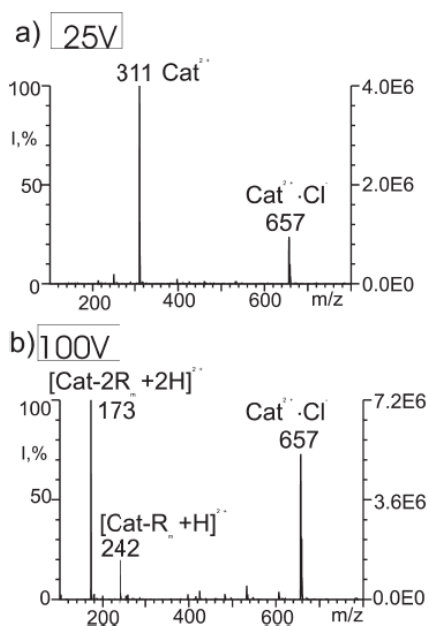


Рис. 1. Масс-спектры ИЭР органической соли декаметоксина ($Cat^{2+} \cdot 2Cl^-$), полученные при двух различных значениях параметра CV . Масс-спектры содержат разные наборы ионов и воспринимаются как спектры различных веществ. (Воспроизведено по данным работы [15] по лицензии издательства Wiley and Sons).

Поскольку для получения структурной информации в рамках метода ИЭР обычно используются средние или высокие значения CV , а при исследовании взаимодействий БЧАС с молекулами-мишенями для стабилизации ожидаемых ассоциатов в газовой фазе используются самые низкие значения CV , знание об особенностях спектров БЧАС при разных CV приобретает особую практическую и методическую значимость.

Отдельный вопрос вторично-эмиссионной масс-спектрометрии касается особенностей получения масс-спектров ПАВ, к которым относятся БЧАС декаметоксин и этоний. С одной стороны, повышение концентрации ПАВ на поверхности жидкой матрицы является положительным фактором, способствующим получению интенсивных сигналов ПАВ в условиях ББА и жВИМС. С другой стороны, этот же фактор осложняет получение адекватных масс-спектров смесей, содержащих ПАВ, что проявляется в так называемом «эффекте подавления» - существенном снижении интенсивностей сигналов всех компонентов образца, отличных от ПАВ, включая жидкую матрицу.

При анализе масс-спектрометрической информации, накопленной для катионных ПАВ декаметоксина и этония, а также анионного ПАВ додецилсульфата натрия (SDS), было предложено одно из возможных объяснений этого эффекта, основанное на образовании на поверхности жидкой матрицы двойного электрического слоя из органической части ПАВ и комплексов неорганической части с молекулами матрицы [22]. Эти типы частиц распыляются из поверхностного слоя в условиях ББА/жВИМС, причем в режиме положительных ионов в масс-спектрах регистрируются органические катионы, а стабильные отрицательно заряженные комплексы молекул матрицы с

анионом отсутствуют. Данный результат вносит вклад в развитие фундаментальных основ масс-спектрометрии, а предложенная модель была использована далее для интерпретации масс-спектров смесей ПАВ и биологически активных красителей [23].

С появлением метода МАЛДИ его возможности также были использованы нами для изучения БЧАС. МАЛДИ спектры получали с использованием в качестве матричного вещества дигидроксibenзойной кислоты (2,5-dihydroxybenzoic acid, ДНВ) [17]. Структура МАЛДИ масс-спектра декаметоксина качественно была подобна таковой, наблюдавшейся в условиях жВИМС и ИЭР, однако наблюдались количественные различия, обусловленные разным количеством энергии, передаваемой молекулам образца разными ионизирующими агентами. Интересной отличительной особенностью МАЛДИ масс-спектров было наблюдение ассоциатов бисчетвертичного дикатиона, обладающего основными свойствами, с органическим анионом ДНВ, фактически замещавшим неорганический анион хлора исходной соли БЧАС. Из этого наблюдения следовали два важных вывода прикладного [24] и фундаментального [25] характера, инициировавшие цепочку дальнейших исследований. В плане исследований взаимодействий «лекарство-мишень» было высказано предположение, что анион ДНВ может моделировать два сайта белков, по которым может проходить узнавание и связывание БЧАС: анионные карбоксильные боковые радикалы аминокислот и гетероциклические боковые радикалы, с которыми возможно так называемое катион-пи взаимодействие. Для проверки и подтверждения этого предположения нами были выполнены квантово-химические расчеты комплексов аниона ДНВ с тетраметиламмонием как моделью активной функциональной группы БЧАС [24].

Основываясь на результатах этих исследований, в дальнейшем нами были предложены подходы к изучению межмолекулярных взаимодействий БЧАС с другими лекарственными препаратами, относящимися к классу органических кислот, в частности, с аспирином, которые модулируют активность БЧАС (см. раздел 2 этого обзора). В плане развития фундаментальных основ масс-спектрометрии МАЛДИ была предложена модель, объясняющая существенное подавление сигналов протонированных молекул кислотной матрицы при наличии в ней четвертичных аммониевых солей образованием новой соли с замещением неорганического аниона ЧАС на органический анион матрицы [25].

Накопленные данные об основных закономерностях формирования масс-спектров БЧАС нашли практическое применение в работах других исследователей при интерпретации масс-спектрометрических данных для новых биологически активных веществ [26, 27] этого класса. Кроме того, данные нашей работы [18] рекомендованы в международной базе PubChem для описания свойств декаметоксина [28].

Масс-спектрометрические характеристики ряда других препаратов, использовавшихся в обсуждающихся ниже работах, были получены ранее другими авторами на этапе разработки и синтеза этих веществ.

2. Молекулярные механизмы действия противомикробных препаратов на основе солей бисчетвертичных аммониевых соединений

Молекулярные механизмы действия противомикробных лекарственных препаратов декаметоксина, этония и тиония на основе солей БЧАС изучались в отделе молекулярной биофизики ФТИНТ в течение двадцати лет с использованием всего арсенала методов мягкоионизационной масс-спектрометрии, а также другими биофизическими методами, включая спектроскопию, микроскопию и ДСК в рамках сотрудничества с Институтом сцинтилляционных материалов НАН Украины, Харьковским национальным университетом им. В.Н. Каразина, а также с ИОХ ИЦЕН ВАН (Венгрия) и

Антверпенским университетом (Бельгия) [29-35]. Результаты экспериментальных исследований были существенно дополнены структурно-энергетическими данными, полученными благодаря применению к изученным модельным системам «лекарство – молекула-мишень» современных методов квантово-химических расчетов, выполненных с привлечением компьютерных мощностей Аризонского университета (США) [20, 25].

Одним из основных механизмов действия противомикробных препаратов, обладающих свойствами ПАВ, считается нарушение нормального функционирования мембран клеток микроорганизмов, вызванное взаимодействием этих ПАВ с компонентами мембран (мембранотропное действие). Однако до последнего времени молекулярные механизмы взаимодействия мембранотропных ПАВ на основе БЧАС с компонентами биомембран и биофизические последствия таких взаимодействий были изучены недостаточно.

На начальном этапе наших исследований методом жВИМС изучались межмолекулярные взаимодействия декаметоксина и этония с дипальмитоилфосфатидилхолином (ДПФХ), который является наиболее распространенным фосфолипидным компонентом биологических мембран [29, 31, 32]. В полученных масс-спектрах были зарегистрированы стабильные супрамолекулярные нековалентные комплексы органических дикатионов декаметоксина и этония с молекулой ДПФХ, что явилось прямым доказательством активного связывания этих препаратов с ДПФХ, а также исследована стабильность таких комплексов в зависимости от структурных особенностей дикатионов БЧАС. Методом тандемной масс-спектрометрии были получены данные о процессах распада двухзарядных супрамолекулярных комплексов дикатион БЧАС-ДПФХ, что позволило определить структурно-энергетические параметры этих комплексов в газовой фазе [31, 32].

Масс-спектрометрические данные, полученные на уровне отдельных молекул, были подкреплены результатами партнерских исследований методом ДСК на уровне модельных мембран, построенных из гидратированного ДПФХ [29-32]. Установлено, что лекарственные препараты на основе БЧАС существенно влияют на жидкокристаллическое состояние модельных мембран, изменяя температуру фазового перехода последних, и, следовательно, могут существенно нарушать функциональную активность мембран клеток бактерий, оказывая противомикробное действие. Причем характер влияния солей БЧАС на физико-химические свойства модельных фосфолипидных мембран зависит от структурных характеристик дикатионов БЧАС, а именно, от расстояния между атомами четвертичного азота. Так, введение в систему, содержащую модельные фосфолипидные мембраны, декаметоксина, в дикатионе которого расстояние между положительно заряженными группами четвертичного азота составляет порядка 14 Å, приводило к значительному (около 4 °С) снижению температуры фазового перехода мембраны в сравнении с системой без лекарственного препарата. В то же время, введение в аналогичную модельную систему этония, в дикатионе которого расстояние между атомами четвертичного азота составляет порядка 4 Å, приводило, наоборот, к увеличению температуры фазового перехода модельных фосфолипидных мембран [30-33]. Таким образом, было обнаружено, что структурные особенности дикатионов изученных БЧАС определяют характер их взаимодействия с мембранными структурами, на основании чего была предложена следующая модель (рис. 2). Дикатион декаметоксина, характеризующийся сравнительно большим расстоянием между положительно заряженными группами, взаимодействует с полярными головками фосфолипидов, и основной вклад в это взаимодействие вносят электростатические силы, в то время как дикатион этония своей полярной частью взаимодействует с

полярными головками ДПФХ, а алифатические хвосты этого дикатиона БЧАС вступают в гидрофобные взаимодействия с гидрофобными хвостами фосфолипидов, т.е. встраиваются в мембрану [29-33].

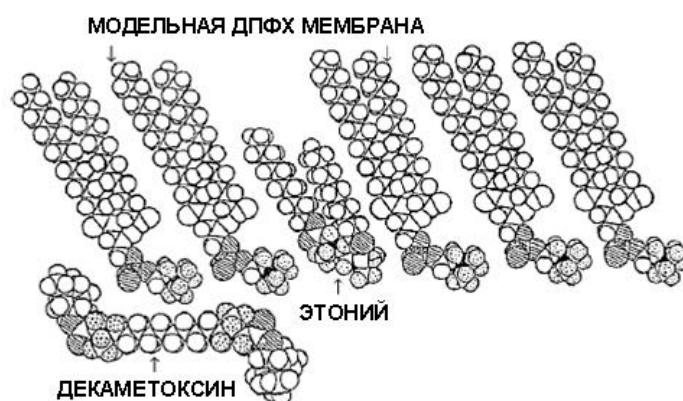


Рис. 2. Схематическое представление наиболее вероятных способов взаимодействия дикатионов декаметоксина и этония с фосфолипидными мембранами, предложенное на основе данных ДСК, масс-спектрометрии и квантово-химических расчетов.

Адаптировано по данным работ [31] и [32] по лицензии издательства Wiley and Sons.

Анализ полученных результатов масс-спектрометрических и ДСК экспериментов позволил предложить молекулярный механизм действия противомикробных препаратов на основе БЧАС, который состоит в нековалентных взаимодействиях дикатионов этих мембранотропных препаратов с фосфолипидными компонентами мембран, что вызывает изменение структурно-функционального состояния последних и, в свою очередь, может оказывать бактерицидный или бактериостатический эффект [29-33].

С появлением масс-спектрометрического метода ИЭР стало возможным изучение ассоциации биомолекул в растворах, что явилось шагом в приближении используемых модельных систем к реальным биологическим. В связи с этим, на следующем этапе исследований модельной системы «БЧАС+ДПФХ» нами был применен метод ИЭР с использованием опций ДИС с фрагментацией в ячейке столкновений или источнике ионов [34-36]. В результате установления зависимости вида масс-спектров ИЭР для систем «БЧАС+ДПФХ» от такого экспериментального параметра источника ионов, как CV, определяющего энергетические параметры процесса электрораспыления, были определены оптимальные условия для регистрации супрамолекулярных комплексов препаратов с фосфолипидами.

В масс-спектрах ИЭР систем «БЧАС+ДПФХ» были зарегистрированы стабильные двухзарядные нековалентные комплексы дикатионов декаметоксина, этония и тиония Cat^{2+} с молекулами ДПФХ (М) с общей формулой $n\text{M}\cdot\text{Cat}^{2+}$, включающие до девяти молекул ДПФХ в комплексах с декаметоксином [34] и до четырех – в комплексах с этонием [35] и тионием [36] (рис. 3). Такие кластеры моделируют ассоциаты лекарственных препаратов с фосфолипидными локусами клеточных мембран в реальных биосистемах.

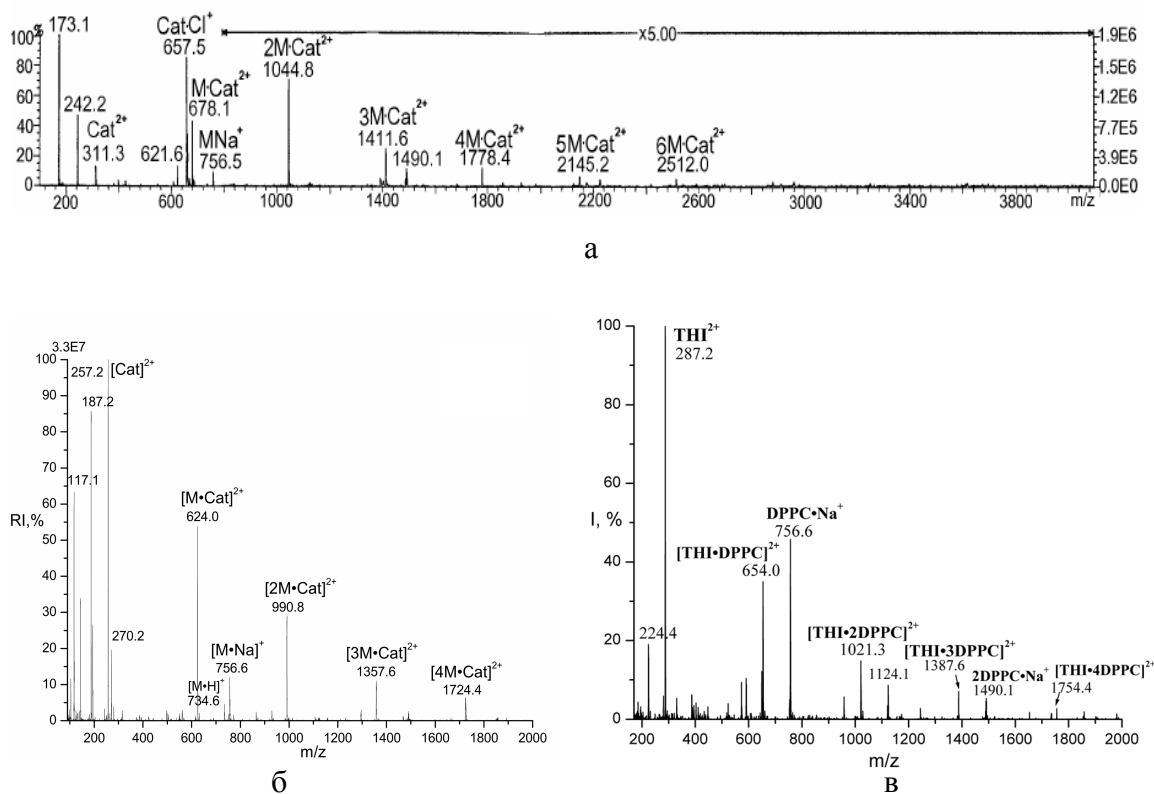


Рис. 3. Масс-спектры с ИЭР для систем, состоящих из ДПФХ и БЧАС:
 а) (ДПФХ+декаметоксин) [34]; б) (ДПФХ+этоний) [35]; в) (ДПФХ+тионий) [36].
 Обозначения: М – молекула ДПФХ (DPPC), Cat²⁺ – органический дикатион БЧАС.
 Рисунки воспроизведены с разрешения издательств журналов [34-36].

Эксперименты ИЭР с использованием тандемной масс-спектрометрии и опции ДИС позволили определить, что наибольшей относительной энергетической стабильностью среди зарегистрированных ионов $nM \cdot \text{Cat}^{2+}$ ($n=1 \div 9$) характеризуется комплекс дикатиона декаметоксина с двумя молекулами ДПФХ [34]. На основе проведенных экспериментов мы рекомендовали описанный масс-спектрометрический подход для регистрации комплексов БЧАС с крупными ассоциатами фосфолипидных молекул как эффективный метод экспресс-оценки мембрантропной активности бисчетвертичных аммониевых соединений с потенциальными антимикробными свойствами [34, 35].

Результаты, полученные в ходе проведенных экспериментов по изучению взаимодействия БЧАС с потенциальными молекулами-мишенями в клетке и суммированные в работе [31], были дополнены данными модельных расчетов методами квантовой химии [20, 25, 37]. Наши теоретические исследования связаны с анализом еще одного возможного молекулярного механизма противомикробного действия БЧАС, который состоит во взаимодействии дикатионов лекарственных препаратов этого класса с локусами мембран клеток бактерий, в которых расположены цепи переноса отрицательных зарядов, в частности, дыхательные цепи микроорганизмов. Перенос электрона с активных центров ферментов дыхательной цепи бактерий (например, с гема цитохромоксидазы) на дикатионы БЧАС вызовет прерывание транспорта электрона по дыхательной цепи, что может привести к подавлению активности или гибели микроорганизма. Расчет электронных параметров (потенциала ионизации и сродства к электрону) дикатионов декаметоксина, этония, тиония и

порфирина гема методом АМ1 и сравнение окислительно-восстановительных свойств этих соединений показали, что для всех исследуемых дикатионов сумма потенциала ионизации и сродства к электрону более чем на 50% превосходит такую сумму для порфирина [20]. Это позволило сделать вывод о возможности переноса электрона с гема цитохромоксидазы на данные катионные ПАВ, и такое прерывание передачи электрона по дыхательной цепи может также вносить вклад в бактериостатическое или бактерицидное действие лекарственных препаратов на основе БЧАС. Кроме того, было показано, что взаимодействие катиона тетраметиламмония с группами, моделирующими боковые радикалы аминокислот мембранных ферментов клеток бактерий, происходит в конкуренции с противоионом хлора, входящим в состав БЧАС. При этом биологически значащие взаимодействия заряженных четвертичных групп аммония с отрицательно заряженными группами боковых радикалов аминокислотных остатков молекул-мишеней могут быть энергетически более выгодным процессом [25, 37].

Еще одним важным вопросом современной молекулярной медицины и молекулярной биофизики является установление взаимного влияния нескольких различных препаратов при комплексной фармако- или химиотерапии. Мотивацией для наших исследований в этой области [36, 38-41] послужили два разноплановых факта. Первый из них непосредственно связан с выработкой правил применения исследуемых противомикробных лекарственных средств, поскольку при лечении простудных заболеваний препараты на основе БЧАС могут использоваться совместно с аспирином (ацетилсалициловой кислотой, АСК), который является распространенным противовоспалительным и кроверазжижающим средством. Второй факт связан с результатами наших масс-спектрометрических экспериментов [17], описанных выше, в которых было обнаружено, что органические анионы могут конкурировать с неорганическим противоионом хлора за связывание с четвертичными аммониевыми группами.

Двух- и трехкомпонентные системы, содержащие БЧАС декаметоксин, этоний или тионий, обладающие основными свойствами, и аспирин, являющийся органической кислотой, а также ДПФХ, мы исследовали методом масс-спектрометрии с ИЭР [36, 40]. Было установлено формирование стабильных ассоциатов дикатионов БЧАС с анионом аспирина, что является одним из возможных путей дезактивации ионных форм препаратов при совместном применении. Образование стабильных комплексов БЧАС с ДПФХ и аспирина с ДПФХ в двухкомпонентных системах, а также распределение комплексов в трехкомпонентных системах БЧАС-АСК-ДПФХ, указывают на существование конкурентного комплексообразования в модельных молекулярных системах, содержащих БЧАС, АСК и мембранные фосфолипиды и возможность такого комплексообразования в биосистемах [40, 41].

Далее, совместно с нашими партнерами, мы продолжили исследование взаимодействия между декаметоксином и аспирином в фосфолипид-содержащих системах различного уровня сложности: растворах [36, 40, 41], модельных фосфолипидных мембранах [36, 38, 39, 41] и образцах эритроцитов [41] человека. В каждой системе соответствующими экспериментальными методами были зарегистрированы специфические эффекты, обусловленные взаимодействием декаметоксина и аспирина: а) методом масс-спектрометрии с ИЭР подтверждено образование нековалентных комплексов декаметоксина и аспирина в органическом растворителе, содержащем ДПФХ; б) в модельных мембранах из ДПФХ методом ДСК было показано, что совместное действие декаметоксина и аспирина приводит к повышению температуры плавления мембраны T_m , тогда как индивидуальное действие каждого препарата приводит к снижению T_m (рис. 4); в) с помощью оптической

микроскопии показано замедление индуцированного декаметоксином гемолиза эритроцитов при совместном введении декаметоксина и аспирина [41].

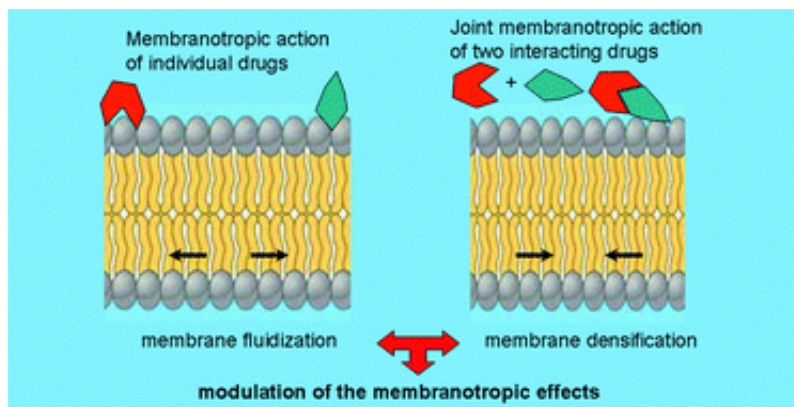


Рис. 4. Графическая аннотация к работе [36], иллюстрирующая молекулярные механизмы воздействия на фосфолипидные мембраны БЧАС и аспирина при индивидуальном и совместном применении препаратов. Воспроизведено из [36] с разрешения The Royal Society of Chemistry.

Полученные результаты указывают на возможность модуляции активности бисчетвертичных аммониевых противомикробных агентов и аспирина при совместном применении препаратов вследствие конкуренции между лекарствами за связывание с мембранными фосфолипидами, а также благодаря формированию нековалентных комплексов между БЧАС и АСК.

Работы [18, 32, 36] включены в международную базу PubChem [28, 42] в списки основополагающих работ, описывающих физико-химические и фармакологические свойства препаратов декаметоксина и этония.

3. Молекулярные основы биологической активности противомаларийных препаратов артемизининового ряда

Одной из актуальнейших социо-медицинских проблем современного мира остается проблема борьбы с опасными инфекционными заболеваниями, к которым относится и малярия. По данным ВОЗ одними из наиболее эффективных противомаларийных лекарственных препаратов являются артемизинин и ряд его синтетических производных, молекулярные механизмы действия которых изучались в отделе молекулярной биофизики ФТИНТ в сотрудничестве с коллегами из масс-спектрометрической лаборатории Антверпенского университета (Бельгия) и химического факультета Аризонского университета (США).

Основные сложности в создании новых эффективных противомаларийных препаратов обусловлены сложным циклом развития возбудителя малярии - малярийного плазмодия, проходящего определенные стадии развития в разных органах тела инфицированного человека. Предполагается, что одним из возможных способов повреждающего воздействия на плазмодий на эритроцитарной стадии его развития может служить блокировка полимеризации гема (освобождающегося из гемоглобина, которым питаются мерозоиты малярийного плазмодия), который в мономерной форме токсичен для возбудителя заболевания.

Методом масс-спектрометрии с ИЭР было установлено формирование стабильных нековалентных комплексов между Fe(III)-гемом и молекулами противомаларийных препаратов хинина, артемизинина, дигидроартемизинина, артемтера и артеестера [43]. Образование невалентных комплексов препаратов с отдельными молекулами гема

должно препятствовать химической полимеризации гема и его последующей детоксикации. Неполимеризованный гем в мономерной форме, после распада нековалентных комплексов с противомалярийными препаратами, остается токсичным для плазмодия при взаимодействии с его структурами и может вызвать гибель патогенна. Таким образом, выявленный процесс невалентного комплексообразования предлагается как возможный молекулярный механизм противомалярийной активности хинина и препаратов артемизининового ряда.

Далее методом ДИС в условиях тандемной масс-спектрометрии нами были изучены сравнительные характеристики стабильности зарегистрированных комплексов гем-лекарственный препарат. Установлено, что наибольшей относительной стабильностью обладает комплекс гема с хинином. Из препаратов артемизининового ряда наиболее стабильным и сравнимым по энергетическим характеристикам с гем-хинин комплексом, является кластер гема с дигидроартемизинином, который считается активным метаболитом препаратов артемизининового ряда в организме человека. Полученные результаты показывают возможность комплексообразования с гемом и блокировки его полимеризации артемизинином и его производными в биосистемах, причем эффективность этого процесса сравнима с таковой для традиционного противомалярийного препарата хинина. Проведенное исследование также показало эффективность подхода с использованием масс-спектрометрии с ИЭР для поиска новых противомалярийных средств, механизм действия которых связан с взаимодействием с гемом [43].

Лечение малярии, которая сопровождается тяжелыми формами проявления лихорадки, осуществляется, как правило, с применением мультилекарственных терапевтических схем, поэтому актуальным является также изучение возможной модуляции действия противомалярийных и противовоспалительных препаратов при их совместном применении. Этому вопросу было посвящено комплексное модельное исследование (с применением метода масс-спектрометрии с ИЭР и метода квантово-химических расчетов DFT B3LYP/aug-cc-pVDZ) межмолекулярных взаимодействий противомалярийных препаратов артемизининового ряда (дигидроартемизинин, артемизинин и артеестер) и аспирина (который является распространенным противовоспалительным и жаропонижающим средством) с мембранными фосфолипидами [44]. Исследование модельных трехкомпонентных систем, содержащих препарат артемизининового ряда, аспирин и ДПФХ, методом масс-спектрометрии выявило существование процесса конкуренции между молекулами противомалярийных агентов и аспирина за нековалентное связывание с ДПФХ. Кроме того, в масс-спектрах зарегистрированы также стабильные супрамолекулярные комплексы противомалярийных агентов с самим аспирином [44]. Для оценки структурно-энергетических характеристик комплексов, зарегистрированных в ходе масс-спектрометрического эксперимента, проведены квантово-химические расчеты комплексов дигидроартемизинин-аспирин и комплексов каждого из препаратов с полярной головкой ДПФХ – фосфатидилхолином (ФХ) [44]. Определены наиболее энергетически выгодные геометрии модельных комплексов (рис. 5). Сравнение величин энергии связи (IE) в этих комплексах показало, что наиболее стабильным является нековалентный комплекс аспирина с ФХ, а энергии стабилизации кластеров дигидроартемизинина с ФХ и аспирина с дигидроартемизинином меньше по абсолютной величине и близки по значению, что еще раз подтверждает вывод, что аспирин и антималярийный агент конкурируют за связывание с фосфолипидами мембран в трехкомпонентных модельных системах [44]. Полученные результаты показывают, что мембранотропная активность артемизининовых агентов и аспирина может модулироваться при совместном применении препаратов.

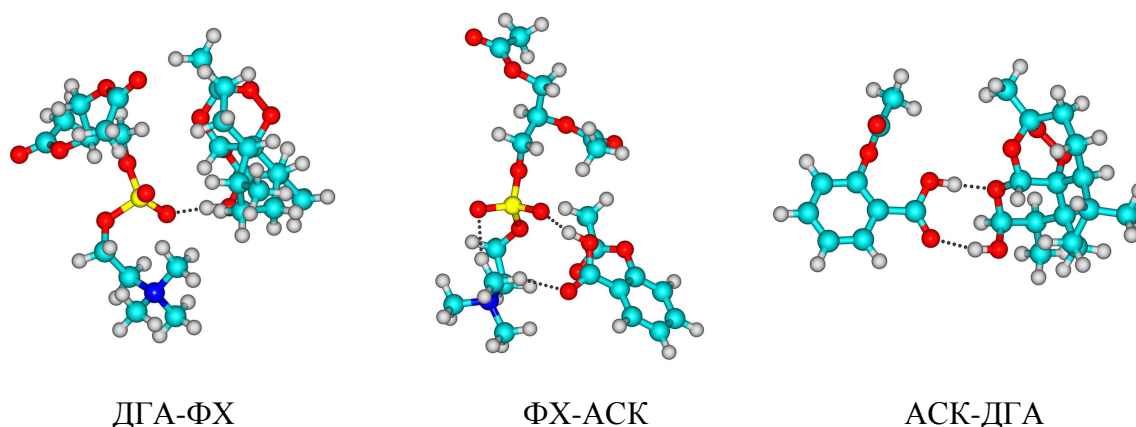


Рис. 5. Структуры наиболее энергетически стабильных нековалентных парных комплектов дигидроартемизинина (ДГА), ацетилсалициловой кислоты (АСК) и фосфатидилхолина (ФХ), полученных в результате расчетов методом B3LYP/aug-cc-pVDZ level в вакууме.

Адаптировано по материалам статьи [44] в разрешения издательства Elsevier.

Возможности применения препаратов артемизининового ряда в медицинской практике не ограничиваются борьбой с малярией. Недавно в литературе появилась информация о противораковой активности этих препаратов [45], однако молекулярный механизм такого действия остается мало исследованным. Установлению возможного механизма противораковой активности артемизинина и его производных было посвящено масс-спектрометрическое исследование межмолекулярных взаимодействий артемизинина и дигидроартемизинина с пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями – компонентами нуклеиновых кислот, которые рассматриваются как потенциальные молекулы-мишени действия многих противоопухолевых препаратов [46]. В масс-спектрах ИЭР были зарегистрированы стабильные супрамолекулярные комплексы «артемизининовый агент - азотистое основание» для всех исследованных оснований (Ade, Cyt, mThy) и проведен сравнительный анализ стабильности комплексов препаратов с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями.

Анализ полученных экспериментальных результатов позволил предположить, что комплексы стабилизируются Ван-дер-Вальсовыми и водородными связями между функциональными группами противомалярийных препаратов и азотистых оснований. Формирование супрамолекулярных комплексов препаратов артемизининового ряда с азотистыми основаниями ДНК и РНК рассматривается в качестве возможного молекулярного механизма противоопухолевого действия препаратов [46].

4. Действие многофункционального красителя метиленового синего

Среди многообразия химиотерапевтических препаратов особо хочется выделить катионный редокс-активный краситель метиленовый синий (Methylene Blue, MB) (см. табл. 1), спектр применения которого распространяется практически на все мишени, рассмотренные в данном обзоре: MB используется в качестве антисептического, противомикробного, противомалярийного, интеркалирующего и фотосенсибилизирующего противоопухолевого средства, а также как молекулярный компонент наноразмерных устройств [47]. Соответственно, механизмы его взаимодействия с разнообразными мишенями активно изучались и продолжают изучаться. Нами были выбраны несколько недостаточно изученных механизмов, помочь в прояснении которых способна современная масс-спектрометрия.

В рамках проблемы применения MB в фотодинамической терапии в литературе [47] обсуждается зависимость механизмов действия препарата от концентрации,

определяющей степень агрегации катионов этой органической соли $\text{Cat}^+\cdot\text{Cl}^-$ в растворе или на границе раздела фаз. Используя метод оценки редокс-активности красителей на основе характерных изменений в масс-спектрах, разработанный нами ранее [49-50] и описанный в первой части этого обзора [3], были выявлены различия в редокс-активности MB, адсорбированного на модельных отрицательно заряженных монослоях SDS, моделирующих отрицательно заряженные биомембраны (рис. 6) [23].

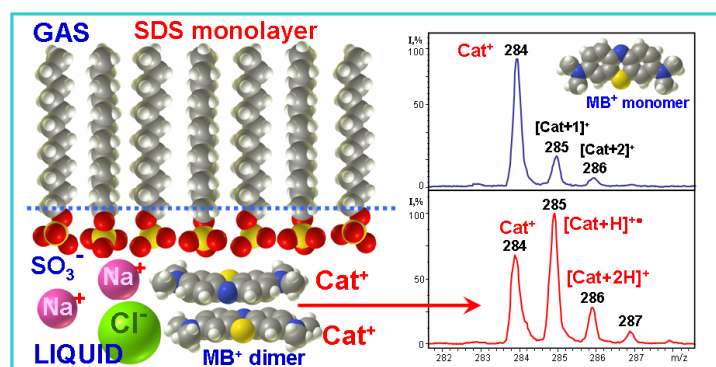


Рис. 6. Графическая аннотация к работе [23]. Слева: отрицательно заряженный монослой ПАВ SDS на поверхности раздела жидкость-газ с адсорбированным на нем димером катиона (Cat^+) метиленового синего. Справа: различие в распределении пиков в масс-спектрах систем, содержащих MB в мономерной (верх) и димерной (низ) формах. Воспроизведено из статьи [23] с разрешения The Royal Society of Chemistry.

Обнаруженное отсутствие или наличие продуктов восстановления MB во вторично-эмиссионных масс-спектрах систем с мономерной и димерной формами адсорбции MB на монослое, соответственно, показало, что редокс-процессы осуществляются в системах с концентрацией MB, достаточной для его агрегации [23]. Аналогичный масс-спектрометрический подход был применен для установления формы адсорбции MB на поверхности углеродных нанотрубок, которая оказалась мономерной [51].

Разработанная масс-спектрометрическая методика слежения за редокс-активностью MB была использована в поисковых исследованиях возможных механизмов вмешательства MB в процессы, связанные с нейродегенеративной патологией – болезнью Альцгеймера [52]. Было показано, что MB, восстанавливаясь, способен окислять аминокислотный остаток цистеина в белках, способствуя образованию дисульфидных мостиков [52], препятствуя, тем самым, формированию патологических нейрофибриллярных клубков.

8. Перспективы исследований и нанотехнологии

В последнее время перспективы развития науки и техники связывают с нанотехнологиями. Не обошла эта тенденция и фармакологию, в рамках которой нанотехнологические приемы и методики применяются для создания новых лекарственных форм с большей биодоступностью и меньшей токсичностью, а также биосовместимых наноматериалов. Отдельное направление состоит в разработке форм для целенаправленной доставки лекарств к их мишеням в живом организме. Во ФТИНТ в рамках развиваемого под руководством члена-корреспондента НАН Украины Карачевцева В.А. направления нанобиофизики [53] ведутся исследования по созданию бионаноконструкций и бионаногибридов биомолекул с углеродными наноматериалами – углеродными нанотрубками (УНТ) и графеном. Результаты исследований, выполненных до 2016 года, обобщены в монографии "Nanobiophysics: Fundamentals and

Applications" [53]. Основным достижением этих работ является создание бионаногибридов УНТ с биополимерами – нуклеиновыми кислотами, установление их спектроскопических и структурных параметров.

Таким образом, перспективы дальнейших работ связаны с использованием разработанных биофизических подходов к исследованию молекулярных механизмов функционирования новых лекарственных форм, создаваемых с помощью нанотехнологий.

ВЫВОДЫ

Результаты исследований, проводившихся в течение нескольких десятилетий во ФТИНТ, подтвердили эффективность применения молекулярно-биофизических подходов и методов к установлению молекулярных механизмов биологического действия химиотерапевтических препаратов.

Показано, что в каждой из исследованных систем (химиотерапевтический препарат и предполагаемая молекулярная мишень) для ряда противомикробных БЧАС и противомаларийных агентов артемизининового ряда такие механизмы включают невалентные взаимодействия лекарственных агентов с биологическими молекулами-мишенями с последующим формированием стабильных супрамолекулярных комплексов, что может обуславливать химиотерапевтическую активность препарата. Методы мягкоионизационной масс-спектрометрии позволили зарегистрировать такие комплексы молекул или ионов лекарственных препаратов с молекулами-мишенями. Структурные, электронные и энергетические характеристики комплексов установлены в квантово-химических расчетах. Масс-спектрометрические результаты подкреплены результатами исследований совместно с нашими партнерами методами ДСК, которые показали, что нековалентные взаимодействия противомикробных БЧАС с фосфолипидами биомембран оказывают существенное влияние на жидкокристаллические свойства мембран и, следовательно, на их функциональную активность, что может быть молекулярной основой бактериостатического и бактерицидного действия изученных БЧАС.

Существенным результатом проведенных исследований можно считать установление молекулярных основ модуляции активности ряда противомикробных и противомаларийных препаратов аспирином при возможном совместном применении препаратов различных классов. Показано, что как изученные БЧАС, так и препараты артемизининового ряда могут конкурировать с аспирином за нековалентное связывание с биомолекулами-мишенями или образовывать супрамолекулярные комплексы лекарственных агентов различных классов.

Ряд оригинальных результатов, полученных сотрудниками ФТИНТ, и ссылки на соответствующие публикации включены в обзорные монографии и международные базы данных.

Перспективы дальнейших исследований связаны с нанотехнологическими подходами к разработке и изучению новых лекарственных форм, состоящих из биологически активных молекул и наночастиц/наноматериалов, предназначенных для целенаправленной доставки лекарств к их мишеням в живом организме или в патогене.

БЛАГОДАРНОСТИ

Этот обзор авторы посвящают памяти многолетнего руководителя отдела молекулярной биофизики ФТИНТ, одного из основателей Харьковской школы биофизики, видного украинского физика и биофизика профессора Благого Юрия Павловича. Его активная преподавательская деятельность на кафедре молекулярной и

прикладной биофизики Харьковского национального университета, внимательное научное руководство аспирантами и сотрудниками отдела, полученные весомые научные результаты внесли неоценимый вклад в развитие биофизической науки в Украине, включая исследования, которым посвящен данный обзор. Мы выражаем благодарность Юрию Павловичу за передачу бесценного научного опыта, начиная с лекций по биофизике, прослушанных в свое время, до наставничества и совместной творческой работы. Авторы обзора благодарны всем соавторам цитируемых работ за вдохновляющее творческое сотрудничество.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Authors' ORCID ID

V.A. Pashynska  <https://orcid.org/0000-0001-9786-6828>

M.V. Kosevich  <http://orcid.org/0000-0003-0257-4588>

REFERENCES

1. Mashkovskii, M. D. (2011) *Lekarstvennye sredstva: posobie dlia vrachei [Medicines: A Handbook for Physicians]*. Moskva: Novaia volna. (in Russian)
2. Gnatchenko, S. L. (Ed). (2010). *Fiziko-tehnicheskij institut nizkih temperatur im. B.I. Verkina NAN Ukrainy. 50 let [Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the NAS of Ukraine. 50 years]*. Kiev: Naukova dumka. (in Russian)
3. Kosevich, M. V., Ryazanova, O. A., Pashynska, V. A. (2019). Biophysical investigations of molecular mechanisms of chemotherapeutic agents action. 1. Chemotherapeutic and antiviral agents (Review). *Biophysical Bulletin*, (42), 8-27. (in Russian)
4. Verkin, B. I., Yanson, I. K., Sukhodub, L. F., Teplitsky, A. B. (1985). *Vsaimodejstviia biomolekul. Novye eksperimental'nye podhody i metody. [Interactions of biomolecules. New experimental approaches and methods]*. Kiev: Naukova dumka. (in Russian)
5. Pokrovskiy V. A. (2012). Desorption mass spectrometry: physics, physical chemistry, surface chemistry. *Visnyk Natsionalnoi Akademii Nauk Ukrainy [Visnyk of the National Academy of Sciences of Ukraine]*, (12), 28-43. (in Ukrainian)
6. Sukhodub, L. F. (1995). Soft-ionization mass spectrometry study of deoxynucleoside bioclusters and deoxynucleoside-antitumor medicinal preparation clusters // *Mass Spectrometry Reviews*, 14(4-5), 235-254. doi:10.1002/mas.1280140402
7. Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S. (1993). A new type of graphite emitters for field ionization/field desorption mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 7(9), 805-811. doi 10.1002/rcm.1290070905
8. Kosevich, M. V., Pashinskaya, V. A., Shelkovsky, V. S. (1994). Direct identification of organic inclusions in graphite on the basis of field desorption mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, 29(9), 458-462. doi: 10.1002/oms.1210290903
9. Kosevich, M. V. (1998) Low temperature secondary emission mass spectrometry. Cryobiological applications. *European Mass Spectrometry*, 4(4), 251-264. doi: 10.1255/ejms.218
10. Blagoi, Yu. P., Sheina, G. G., Ivanov, A. Yu., Radchenko, E. D., Kosevich, M. V., Shelkovsky, V. S., Boryak, O. A., Rubin, Yu. V. (1999). Low-temperature experimental studies in molecular biophysics: a review. *Low Temperature Physics*, 25(10), 747-760. doi:10.1063/1.593810
11. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (2018). PubChem Compound Database. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
12. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Shelkovskii, V. S., Volianskii, Iu. L. (1989). Mass-spectrometric analysis of an anti-microbial preparation decamethoxine. *Antibiotiki i khimioterapiia*, 34(11), 823-827
13. Sukhodub, L. F., Kosevich, M. V., Shelkovskii, V. S., Boriak, O. A., Volianskii, Iu. L., Moleva, V. I., Chumachenko, T. A. (1989). Identification of bis-quaternary ammonium compounds using mild ionization mass spectrometry. *Antibiotiki i khimioterapiia*, 35(2), 10-12. (in Russian)
14. Kosevich, M. V., Pashynska, V. A., Szilagyu, Z., Vekey, K., Shelkovsky, V. S., Blagoi, Yu. P. (1998). Stability of decamethoxin dication as revealed by secondary-ion mass spectrometry. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu No 422. Biofizychnyi Visnyk [Biophysical Bulletin]*, (2), 15-23

15. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Van den Heuvel, H., Claeys, M. (2006). The effect of cone voltage on electrospray mass spectra of the bisquaternary ammonium salt decamethoxinum. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(5), 755-763. doi: 10.1002/rcm.2371
16. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Vekey, K., Claeys, M., Chagovets, V. V., Pokrovskiy, V. A. (2015). Variable electrospray ionization and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectra of the bisquaternary ammonium salt ethonium. *Mass Spectrometry & Purification Techniques*, 1(1), 103 (9p). doi: 10.4172/2469-9861.1000103
17. Pokrovsky, V. A., Kosevich, M. V., Osaulenko, V. L., Chagovets, V. V., Pashynska, V. A., Shelkovsky, V. S., Karachevtsev, V. A., Naumov, A. Yu. (2005). Matrix-assisted laser desorption-ionization study of bisquaternary ammonium antimicrobial agent decamethoxinum in 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Mass-spektrometrija*, 2(3), 183-192
18. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Szilagy, Z., Vekey, K., Stepanian, S. G. (2005). On the stability of the organic dication of the bisquaternary ammonium salt decamethoxinum under liquid secondary ion mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(6), 785-797. doi: 10.1002/rcm.1846
19. Kosevich, M. V., Pashinskaya, V. A., Stepanian, S. G., Shelkovsky, V. S., Orlov, V. V., Blagoy, Yu. P. (1999). Quantum chemical study of decamethoxinum and related dications. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu No 434. Biofizychnyi Visnyk [Biophysical Bulletin]*, (3), 31-38
20. Pashinskaya, V. A., Kosevich, M. V., Stepanian, S. G. (1999). Application of quantum chemical calculations data in study on molecular mechanisms of activity of drugs based on bisquaternary ammonium salts. *Visnyk Problem Biologii ta Medicyny*, (1), 118-125. (in Russian)
21. Pashinskaya, V. A., Kosevich, M. V., Stepanian, S. G. (2000). Quantum-mechanical study of structure of hydrated bisquaternary ammonium compound decamethoxinum. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu. Biofizychnyi Visnyk No 497 [Biophysical Bulletin]*, (7), 29-34. (in Russian)
22. Kosevich, M. V., Chagovets, V. V., Shelkovsky, V. S., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Gomory, A., Vegh, P. (2007). Is there a "matrix suppression effect" under fast atom bombardment liquid secondary ion mass spectrometry of ionic surfactants in glycerol? *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(4), 466-478. doi: 10.1002/rcm.2859
23. Shelkovsky, V. S., Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Chagovets, V. V., Shmigol, I. V., Pokrovskiy, V. A. (2014). Monomer/dimer dependent modulation of reduction of the cationic dye methylene blue in negatively charged nanolayers as revealed by mass spectrometry. *RSC Advances*, 4(104), 60260-60269. doi: 10.1039/C4RA09592H
24. Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Chagovets, V. V., Pashynska, V. A., Orlov, V. V., Stepanian, S. G., Shelkovsky, V. S. (2007). "Wet chemistry" and crystallochemistry reasons for acidic matrix suppression by quaternary ammonium salts under MALDI conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(11), 1813-1819. doi: 10.1002/rcm.3020
25. Pashynska, V., Kosevich, M., Stepanian, S., Adamowicz, L. (2007). Noncovalent complexes of tetramethylammonium with chlorine anion and 2,5-dihydroxybenzoic acid as models of the interaction of quaternary ammonium biologically active compounds with their molecular targets. A theoretical study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 815(1-3), 55-62. doi: 10.1016/j.theochem.2007.03.019
26. Lysytsia, A. V. (2002). Fyzyko-khimichna kharakterystyka biolohichno aktyvnykh rehovyn za danymy chasoprolitnoi plazmovo-desorbtsiinoi mas-spektrometrii [Physico-chemical characterization of biologically active compounds by means of plasma desorption mass spectrometry]. (PhD dissertation). Retrieved from <http://www.dissers.com.ua/contents/42180.html> (in Ukrainian)
27. Babaev, V. M., Musin, R. Z., Korochkina, M. G. (2012). Investigation of diterpenoid isosteviol ammonium derivatives by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Mass-Spektrometrija*, 9(3), 175-180
28. National Center for Biotechnology Information (2018). PubChem Compound Database; Decamethoxine; CID=162291. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/162291>
29. Pashinskaya, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Vekey, K., Korzovskaya, O., Lisetskiy, L. N., Blagoy, Yu. P. (1999). Mass spectrometry investigation of noncovalent complexes of bisquaternary ammonium salts with phospholipids. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu No 450. Biofizychnyi Visnyk [Biophysical Bulletin]*, (4), 59-62. (in Russian)
30. Korzovskaya, O. V., Pashinskaya, V. A., Kosevich, M. V., Lisetski, L. N. (1999). Interaction of antimicrobial agents decamethoxinum and aethonium with model membranes. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu No 450. Biofizychnyi Visnyk [Biophysical Bulletin]*, (4), 35-39
31. Pashinskaya, V. A. (2000). Interactions of bisquaternary ammonium compounds with components of biological membranes. (PhD dissertation). Retrieved from <http://dissers.com.ua/content/13690.html> (in Russian)

32. Pashynskaya, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Vashchenko, O. V., Lisetski, L. N. (2002). Mechanistic investigation of the interaction between bisquaternary antimicrobial agents and phospholipids by liquid secondary ion mass spectrometry and differential scanning calorimetry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(18), 1706–1713. doi: 10.1002/rcm.771
33. Vashchenko, O., Pashynska, V., Kosevich, M., Panikarska, V., Lisetski, L. (2011). Lyotropic mesophase of hydrated phospholipids as model medium for studies of antimicrobial agents activity. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 547(1), 155/[1845]–163[1853]. doi: 10.1080/15421406.2011.572038
34. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Van den Heuvel, H., Cuyckens, F., Claeys, M. (2004). Study of non-covalent complexes formation between the bisquaternary ammonium antimicrobial agent decamethoxinum and membrane phospholipids by electrospray ionization and collision- induced dissociation mass spectrometry. *Visnyk Kharkivskoho Universytetu No 637. Biofizychnyi Visnyk [Biophysical Bulletin]*, (14), 123–130
35. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Vekey, K. (2012). Investigations of the formation of noncovalent complexes between antimicrobial agent ethonium with membrane phospholipids by electrospray ionization mass spectrometry. *Mass-Spectrometria*, 9(2), 121–128
36. Kasian, N. A., Pashynska, V. A., Vashchenko, O. V., Krasnikova, A. O., Gomory, A., Kosevich, M. V., Lisetski, L. N. (2014). Probing of the combined effect of bisquaternary ammonium antimicrobial agents and acetylsalicylic acid on model phospholipid membranes: differential scanning calorimetry and mass spectrometry studies. *Molecular BioSystems*, 10(12), 3155–3162. doi: 10.1039/c4mb00420e
37. Pashynska, V., Boryak, O., Kosevich, M. V., Stepanian, S., Adamovicz, L. (2010). Competition between counterions and active protein sites to bind bisquaternary ammonium groups. A combined mass spectrometry and quantum chemistry model study. *European Physical Journal D*, 58(3), 287–296. doi: 10.1140/epjd/e2010-00125-5
38. Vashenko, O. V., Pashinskaya, V. A., Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Kasyan, N. A. (2010). Study of joint action of bisquaternary ammonium compounds and organic acids on model phospholipid membranes. *Biophysical Bulletin*, 25(2), 44–61. (in Russian)
39. Vashchenko, O. V., Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Panikarskaya, V. D., Lisetski, L. N. (2010). Modulation of bisquaternary ammonium agents affect on model biomembranes by complex formation with an organic anion. *Biopolymers and Cell*, 26(6), 472–477. (in Russian)
40. Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Gomory, A., Vekey, K. (2013). Model mass spectrometric study of competitive interactions of antimicrobial bisquaternary ammonium drugs and aspirin with membrane phospholipids. *Biopolymers and Cell*, 29(2), 157–162. doi: 10.7124/bc.000814
41. Vashenko, O. V., Kasian, N. A., Pashynska, V. A., Kosevich, M. V., Sadchenko, A. O., Tishko, D. N., Tishko, T. V., Titar, V. P., Lisetski, L. N. (2015). Intermolecular interaction of decamethoxinum and acetylsalicylic acid in systems of various complexity levels. *Biophysical Bulletin*, 34(2), 5–15
42. National Center for Biotechnology Information (2018). PubChem Compound Database; Ethonium; CID=30869. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/30869>
43. Pashynska, V. A., Van den Heuvel, H., Claeys, M., Kosevich, M. V. (2004). Characterization of noncovalent complexes of antimalarial agents of the artemisinin-type and FE(III)-heme by electrospray mass spectrometry and collisional activation tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 15(8), 1181–1190. doi: 10.1016/j.jasms.2004.04.030
44. Pashynska, V., Stepanian, S., Gomory, A., Vekey, K., Adamowicz, L. (2015). Competing intermolecular interactions of artemisinin-type agents and aspirin with membrane phospholipids: Combined model mass spectrometry and quantum-chemical study. *Chemical Physics*, 455, 81–87
doi: 10.1016/j.chemphys.2015.04.014
45. Das, A. K. (2017). Anticancer effect of antimalarial artemisinin compounds. *Anticancer Research*, 37(11), 5995–6003
46. Pashynska, V. A. (2009). Mass spectrometric study of intermolecular interactions between the artemisin-type agents and nucleobases. *Biophysical Bulletin*, 22(1), 20–28
47. Shelkovsky, V.S. (2015). Utilization of redox and aggregation properties of methylene blue dye in nanobiophysical investigations. *Biophysical Bulletin*, 33(1), 5–29
48. Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Shelkovsky, V. S., Chagovets, V. V., Stepanian, S. G., Karachevtsev, V. A., Adamowicz, L. (2006). Evaluation of the reduction of imidazophenazine dye derivatives under fast atom bombardment mass spectrometric conditions. *Journal of Mass Spectrometry*, 41(1), 113–123. doi: 10.1002/jms.974
49. Kosevich, M. V., Chagovets, V. V., Shmigol, I. V., Snegir, S. V., Boryak, O. A., Orlov, V. V., Shelkovsky, V. S., Pokrovskiy, V. A., Gomory, A. (2008). Sensitivity of redox reactions of dyes to variations of conditions created in mass spectrometric experiments. *Journal of Mass Spectrometry*, 43(10), 1402–1412. doi: 10.1002/jms.1421

50. Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Chagovets, V. V., Shelkovsky, V.S., Pokroveky, V. A. (2016). Chapter Seven: Interactions of biologically active redox-sensitive dyes with nanomaterials: mass spectrometric diagnostics. In V. A. Karachevtsev (Ed.), *Nanobiophysics: Fundamentals and Applications* (pp. 193–233). Singapore: Pan Stanford Publishing
51. Chagovets, V. V., Kosevich, M. V., Stepanian, S. G., Boryak, O. A., Shelkovsky, V. S., Orlov, V. V., Leontiev, V. S., Pokrovskiy, V. A., Adamowicz, L., Karachevtsev, V. A. (2012). Noncovalent interaction of methylene blue with carbon nanotubes: theoretical and mass spectrometry characterization. *Journal of Physical Chemistry C*, 116(38), 20579–20590. doi: 10.1021/jp306333c
52. Shelkovsky, V. S., Kosevich, M. V., Boryak, O. A., Zobnina, V. G., Plokhotnichenko, A. M. Redox interactions of methylene blue with cysteine amino acid as a possible mechanism of biological action of the dye. *Biophysical Bulletin*, 1(37), 30–41. (in Russian) doi: 10.26565/2075-3810-2017-37-04
53. Karachevtsev, V. A. (Ed.). (2016). *Nanobiophysics: Fundamentals and Applications*. Singapore: Pan Stanford Publishing

Original article

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-04>

УДК 577.359

DO CARBON NANOTUBES INHIBIT OR PROMOTE AMYLOID FIBRILS FORMATION?

M.V. Olenchuk¹, O.P. Gnatyuk¹, G.I. Dovbeshko¹, I.O. Polovyi¹, S.O. Karakhim²

¹Institute of Physics of NASU, Nauky Avenue, 46, Kyiv, Ukraine, 03028

²Palladin Institute of Biochemistry of NASU, Leontovycha St. 9, Kyiv, Ukraine, 01601

e-mail: ipoliovy@gmail.com

Submitted October 5, 2018

Accepted February 5, 2019

Background: Carbon nanotubes, due to their unique physical properties, have been widely used in materials science and electronics; however, numerous attempts to create systems for delivering drugs or complexes of therapeutic drugs with nanotubes for improving their effectiveness and specificity have not succeeded. It is primarily due to the high cytotoxicity of nanotubes for living cells as well as the lack of mechanisms for their biodegradation. On the other hand, carbon nanotubes can form stable compounds with such biologically important molecules as DNA, phospholipids, proteins. In this paper, the possibility of the formation of amyloid fibril structures in lysozyme due to the interaction with carbon nanotubes is shown. The obtained results have both a fundamental and an applied value, since this may be a method for obtaining model amyloid fibrils for further study.

Objectives: The purpose of the work was to study the effect of carbon nanotubes on the formation of fibril structures in lysozyme at room temperature under different pH values.

Materials and methods: For the preparation of the samples, hen egg-white lysozyme protein (HEWL, Fluka), as well as single-walled (SWCNT, Sigma-Aldrich) and multi-walled (MWCNT, ООО ТМ "Spetsmash", Kyiv, Ukraine) carbon nanotubes were used. Used techniques: IR-Fourier Absorption Spectroscopy; confocal microscopy.

Results: In this paper, the study of molecular mechanisms of interaction of lysozyme with carbon nanotubes by vibrational spectroscopy was carried out and a conformational analysis of the formed complexes was performed. It is shown that carbon nanotubes can affect the structure of lysozyme even at room temperature and normal pH values, as evidenced by conformational changes in lysozyme due to interaction with carbon nanotubes. Complexes which are formed as a result of such interaction, have characteristic features of amyloid fibrillar structures. It reveals one of possible mechanisms of carbon nanotubes cytotoxicity. On the other hand, such a technique can be introduced to obtain model amyloid fibrils for further study.

Conclusion: The method of vibrational spectroscopy has shown that carbon nanotubes can influence the structure of lysozyme, as it is shown by the conformational analysis of the absorption band Amide I. After the interaction of lysozyme with CNT, an increase in the contribution of antiparallel β -conformation in the structure of lysozyme is observed, and the contribution of the α -helix conformation is reduced, which are characteristic features in the formation of fibrillar structures. The possibility of amyloid fibril formation without the use of high temperatures at different pH values with the interaction of lysozyme and carbon nanotubes, which can be applied as a method for obtaining the model amyloid fibrils, is shown.

KEY WORDS: amyloid fibril; lysozyme; carbon nanotubes; β -sheet.

ВУГЛЕЦЕВІ НАНОТРУБКИ ПЕРЕШКОДЖАЮТЬ ЧИ СПРИЯЮТЬ ФОРМУВАННЮ АМІЛОЇДНИХ ФІБРИЛ?

М.В. Оленчук¹, О.П. Гнатюк¹, Г.І. Довбешко¹, І.О. Польовий¹, С.О. Карахим²

¹Інститут фізики НАН України, проспект Науки 46, Київ, Україна, 03028

²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна, вул. Леонтовича, 9, Київ, Україна, 01601

Актуальність. Вуглецеві нанотрубки, завдяки своїм унікальним фізичним властивостям, знайшли широке застосування в матеріалознавстві та електроніці, однак численні спроби створення систем доставки ліків чи комплексів терапевтичних препаратів з нанотрубками з метою покращення ефективності та специфічності їх дії не призвела до успіху. В першу чергу це пов'язано з високою цитотоксичністю нанотрубок для живих клітин та відсутністю механізмів їх біодеградації. З

іншого боку, вуглецеві нанотрубки можуть утворювати стійкі комплексами з такими біологічно важливими молекулами як ДНК, фосфоліпіди, білки. В даній роботі показана можливість формування амілоїдних фібрилярних структур в лізоцимі при взаємодії з вуглецевими нанотрубками. Отримані результати мають як фундаментальне, так і прикладне значення, оскільки це може бути методом отримання модельних амілоїдних фібрил для подальшого вивчення.

Мета роботи. Метою роботи було дослідити вплив вуглецевих нанотрубок на процес утворення фібрилярних структур в лізоцимі при кімнатній температурі при різних значеннях рН.

Матеріали і методи. Для приготування експериментальних зразків був використаний лізоцим, виділений з білка курячих яєць (HEWL – Hen Egg-White Lysozyme, Fluka), а також одностінні (SWCNT, Sigma-Aldrich) та багатостінні (MWCNT, ООО ТМ «Спецмаш», Київ, Україна) вуглецеві нанотрубки. Використані методики: ІЧ-Фур'є-спектроскопія поглинання; конфокальна мікроскопія.

Результати. В даній роботі проведено дослідження молекулярних механізмів взаємодії лізоциму з вуглецевими нанотрубками методом коливальної спектроскопії та проведено конформаційний аналіз утворених комплексів. Показано, що вуглецеві нанотрубки можуть впливати на просторову структуру лізоциму навіть при кімнатній температурі та нормальних значеннях рН, про що свідчать конформаційні зміни в лізоцимі внаслідок взаємодії з вуглецевими нанотрубками. Комплекси, утворені внаслідок такої взаємодії, мають характерні риси амілоїдних фібрилярних структур, що розкриває один з механізмів цитотоксичності вуглецевих нанотрубок. З іншого боку, така методика може бути впроваджена для отримання модельних амілоїдних фібрил з метою їх подальшого вивчення.

Висновки. Методом коливальної спектроскопії показано, що вуглецеві нанотрубки можуть впливати на просторову структуру лізоциму, про що свідчить конформаційний аналіз смуги поглинання Амід І. Після взаємодії лізоциму з ВНТ, відбувається збільшення вкладу антипаралельної β -конформації в структурі лізоциму, та зменшення вкладу α -спіральної конформації, що є характерними рисами при формуванні фібрилярних структур. Показана можливість утворення амілоїдних фібрилярних структур без застосування високих температур при різних значеннях рН при взаємодії лізоциму з вуглецевими нанотрубками, що може мати прикладне застосування в якості методу отримання модельних амілоїдних фібрил.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: амілоїдні фібрили; лізоцим; вуглецеві нанотрубки; β -шари.

УГЛЕРОДНЫЕ НАНОТРУБКИ ПРЕПЯТСТВУЮТ ИЛИ ВЫЗЫВАЮТ ФОРМИРОВАНИЕ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ?

М.В. Оленчук¹, Е.П. Гнатюк¹, Г.И. Довбешко¹, И.А. Полевой¹, С.А. Карахим²

¹Институт физики НАН Украины, проспект Науки 46, Киев, Украина, 03028

²Институт биохимии им. О.В. Палладина, ул. Леонтовича, 9, Киев, Украина, 01601

Актуальность. Углеродные нанотрубки, благодаря своим уникальным физическим свойствам, нашли широкое применение в материаловедении и электронике, однако многочисленные попытки создания систем доставки лекарств или комплексов терапевтических препаратов с нанотрубками с целью повышения эффективности и специфичности их действия не привела к успеху. В первую очередь это связано с высокой цитотоксичностью нанотрубок для живых клеток и отсутствием механизмов их биодegradации. С другой стороны, углеродные нанотрубки могут образовывать устойчивые комплексы с такими биологически важными молекулами как ДНК, фосфолипиды, белки. В данной работе показана возможность формирования амилоидных фибриллярных структур из лизоцима при взаимодействии с углеродными нанотрубками. Полученные результаты имеют как фундаментальное, так и прикладное значение, поскольку это может быть способом получения модельных амилоидных фибрилл для дальнейшего изучения.

Цель работы. Целью работы было исследовать влияние углеродных нанотрубок на процесс образования фибриллярных структур в лизоциме при комнатной температуре при различных значениях рН.

Материалы и методы. Для приготовления экспериментальных образцов был использован лизоцим, выделенный из белка куриных яиц (HEWL – Hen Egg-White Lysozyme, Fluka), а также одностенные (SWCNT, Sigma-Aldrich) и многостенные (MWCNT, ООО ТМ «Спецмаш», Киев, Украина) углеродные нанотрубки. Используются методики: ИК-Фурье-спектроскопия поглощения; конфокальная микроскопия.

Результаты. В данной работе проведено исследование молекулярных механизмов взаимодействия лизоцима с углеродными нанотрубками методом колебательной спектроскопии и проведен конформационный анализ образованных комплексов. Показано, что углеродные нанотрубки могут

влиять на пространственную структуру лизоцима даже в условиях комнатной температуры и нормальных значений pH, о чем свидетельствуют конформационные изменения в лизоциме в результате взаимодействия с углеродными нанотрубками. Комплексы, образованные в результате такого взаимодействия, имеют характерные черты амилоидных фибриллярных структур, раскрывают один из механизмов цитотоксичности углеродных нанотрубок. С другой стороны, такая методика может быть введена для получения модельных амилоидных фибрилл с целью их дальнейшего изучения.

Выводы. Методом колебательной спектроскопии показано, что углеродные нанотрубки могут влиять на пространственную структуру лизоцима, о чем свидетельствует конформационный анализ полосы поглощения Амид I. После взаимодействия лизоцима с УНТ, происходит увеличение вклада антипараллельной β -конформации в структуре лизоцима, и уменьшение вклада α -спиральной конформации, которые являются характерными чертами при формировании фибриллярных структур. Показана возможность образования амилоидных фибриллярных структур без применения высоких температур при различных значениях pH при взаимодействии лизоцима с углеродными нанотрубками, что может иметь прикладное применение в качестве метода получения модельных амилоидных фибрилл.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: амилоидные фибриллы; лизоцим; углеродные нанотрубки; β -слои.

A key issue in the amyloid science is to understand a mechanism of the amyloid fibril formation and its connection with pathological state of a living body [1] It is known that amyloid fibril arising is correlate with a number of diseases such as Alzheimer and Parkinson diseases, prion propagation, cancer geneses and metastases progress etc [2]; moreover, amyloid fibrils can appear in a variety of different morphological shapes [3-5].

Lysozyme (Lys), a small protein with four disulfide bonds, stems a property of bactericidal enzyme. It was found in a salivary fluid, in human tears, in the protein of hen egg. It is able to destroy the cell wall of gram-negative bacteria and some types of fungi. It contains 129 amino acid residues. Lysozyme is one of the most intensively studied proteins, especially, it is often used as a model system for amyloid fibril formation study [6, 7]. The amyloid fibril is a type of insoluble protein that aggregate with a specific secondary structure. [3-5, 8-10]. Lysozyme is not associated with any known amyloid diseases; however, it shares similar morphological features with amyloids from disease associated proteins. Study of mechanism of amyloid formation extends our knowledge about fibril formation and assists to clear up a possible disadvantage of interaction between nanoparticles and amyloids.

Carbon nanotubes (CNTs) are the most investigated carbon nanomaterials due to their unique physical and chemical characteristics, cheap and easy production, stability and indispensability for improving of electrical and mechanical properties of materials. Last years the carbon nanotubes are used as supporting matrix for protein adsorption and isolation [11]. Thus, Yuan et al. used Multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) as a carrier to prepare lysozyme imprinted polymers or even separation of lysozyme from egg white. However, the question arises: how do CNTs influence the amyloid fibrils formation. A fact about solubility of carbon nanotubes in the presence of fibril-forming protein lysozyme is an additional argument indicating easy possibility for fibril appearing [12-14]. However, a computer simulation of a CNT interaction with lysozyme done in [2] showed another possibility, namely, breaking of fibrils in the presence of CNT. So, the question about the CNT role in the fibrils breaking and formation is important. That is why the subject of our research was to study an influence of carbon nanotubes on fibril formation *in vitro* model experiment.

MATERIALS AND METHODS

Hen egg white lysozyme (HEWL) was purchased from Fluka and used without further purification. MWCNT were provided by OOO TM "Spetsmash", Kiev, Ukraine. They were obtained by catalytic pyrolysis of acetylene with the outer diameter 2-40 nm, the number of walls from 2 to 15 and the length up to 50 μm , and treated from catalyst residues by

hydrofluoric acid. Single walled carbon nanotubes (SWCNT) were bought from Sigma-Aldrich, with the diameter of 1.4-1.5 nm and the length about 1-2 μm .

The process of preparation of amyloid fibrils included ultrasonic treatment of aqueous solution of nanotubes (three times), followed by the selection of the central transparent part of the solution. Thereafter, an aqueous suspension of nanotubes was added to the aqueous solution of lysozyme (concentration 1 mg/ml).

In this study we did not use surface-active substances intentionally because they could affect the formation of amyloid fibrils and could also provide additional absorption bands in vibrational spectra, which significantly distort the analysis of results.

An aqueous suspension of SWCNT was prepared by ultrasonification at 60 W and 22 kHz for 3 hours. 1 mg of HEWL was dissolved in 1 ml of distilled water (pH = 5.5). This solution was acidified to pH = 2.5 with HCl addition or alkalinized to pH = 11.5 with KOH. An aqueous suspension of MWCNT was added to the prepared lysozyme solution and incubated for 14 days at room temperature. An aqueous suspension of SWCNT was added to the prepared lysozyme solutions and incubated for 2 days at 50 °C. For the IR absorption spectra registration and confocal imaging, the samples were dropped onto a rough gold surface and dried.

The IR spectra were collected in the 400-7000 cm^{-1} region with an IFS-66 Bruker instrument with resolution of 0.5 cm^{-1} and wavenumber definition accuracy of not less than 0.01 cm^{-1} . Repeatability of frequency in our IR spectra measurements was 0.5 cm^{-1} and that of absorbance – about 0.0005. The IR spectra of proteins were measured in the external reflection configuration at the light incidence angle 16.5°, as described in [15,16]. Deconvolution and decomposition of the spectral bands were performed with Opus-5.5 software program. The peak positions of the absorption bands were estimated by using the second derivative method and/or the standard Opus-5.5 peak finding method. All spectra were baseline-corrected and normalized by the peak intensity of O-H stretching vibrations band centered near 3300 cm^{-1} [16, 17].

Confocal imaging was carried out with a Carl Zeiss LSM-510 META confocal laser scanning microscope with the 4D Plan-Neofluar 40x/0.6 Korr oil immersion objective in Multi Track mode. For observing objects in a transmittance mode in visible light a halogen incandescent lamp was used. A fluorescence images of the objects were obtained by excitation with ultraviolet mercury lamp HBO-100 or with diode laser ($\lambda=405$ nm, 25 mW), Ar or ArKr laser ($\lambda=488$ nm, 30 mW) and HeNe laser ($\lambda=633$ nm, 5 mW) in backscattering geometry. Magnification in the experiments was x40 and x10. The most important optical advantage of confocal microscopy is that the radiated photons are focused by the objective lens on a small (~ 50 μm) detector pinhole which limits a depth of focus and cut other photons by pinhole causing better contrast in comparison with other types of optical microscopes.

RESULTS AND DISCUSSION

To analyze the contribution of antiparallel β -layers in the spatial structure of HEWL, conformational analysis of the IR absorption bands of the lysozyme Amide I (1700–1600 cm^{-1}) was done (Fig. 1).

This part of the IR absorption spectrum gives a lot of information about the protein secondary structure and conformational changes. The Amide I band is mainly due to C=O stretching vibration (approximately 80%) of the amide groups coupled with in-plane NH bending (<20%).

The set and position of the bands for a fitting were selected according to the literature data [18-20] of conformational states of lysozyme to certain positions of the bands of Amide I. The conformational state of the protein in amyloid fibrils differs from that in initial protein

and results in the appearance of the new conformation, namely, antiparallel β -layers, which were not found in reference sample.

In order to mark the antiparallel β -sheet, we performed a model experiment for the amyloid fibril formation under standard conditions (2 days at 50°C) and at different pH.

With the vibrational spectra analysis we found that markers of antiparallel β -layers conformation are in the region of 1687-1695 cm^{-1} and 1615-1625 cm^{-1} . Thus, in the fitting processes we must consider the appearance of this new conformation, so the number of components in the reference sample and in the amyloid will be different. In the case of incubation with MWCNT, the total contribution of β -sheet increases by about 10% compared to that for SWCNT.

Quantitative analysis of the protein secondary structure is based on the assumption that secondary structure can be presented as a contributions of all conformations. The components of the Amide I band can be determined by considering their frequency and intensity behavior.

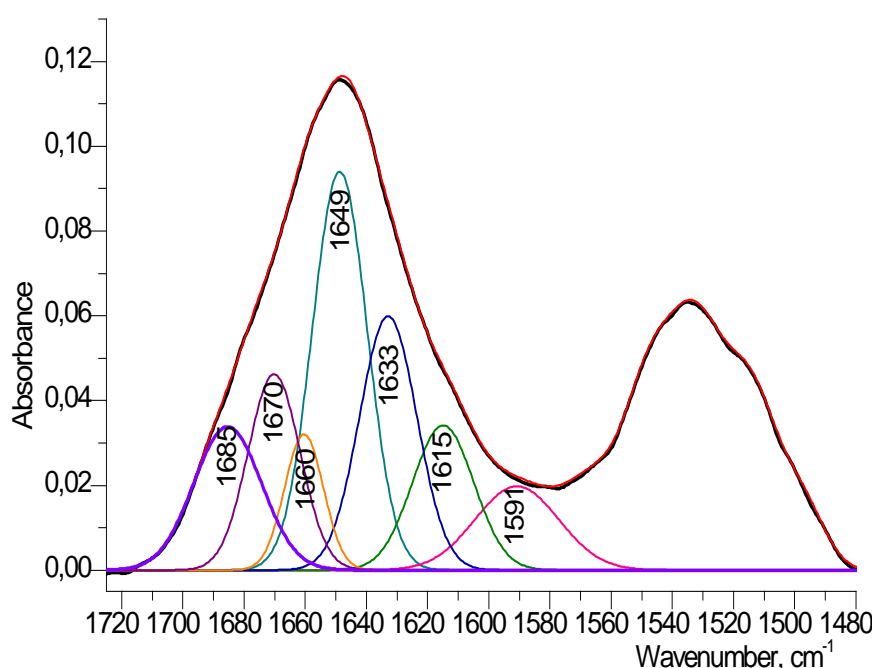


Fig. 1. Component analysis of Amide I IR absorption bands of HEWL, pH 5.3.

The biological activity of CNTs relative to proteins was checked with FTIR spectroscopy. It was shown that after the interaction of the proteins with MWCNT, the relative percentage content of β -conformation in the structure of the proteins increases, and an unordered state of the protein decreases. Thus, our experimental studies confirm the possibility of forming the structures harmful to human body upon interaction of HEWL with CNTs.

Our results show that the protein structural composition is the following: α -helix – 28.17%, β -turn – 13.07%, β -sheet – 31.38%, disordered structure – 27.38%. The similar secondary structure of lysozyme dissolved in water was determined from the far-UV CD spectra [6]. We suppose that peaks at 1615 cm^{-1} and 1685 cm^{-1} are formed by the contribution of β -sheet and side groups in the reference [21]. After interaction with SWCNT structural composition is similar to reference HELW, but we see a small part antiparallel form (6.59%) in the β -sheet (Fig. 2 b). After interaction with MWCNT, the protein undergoes structural changes (Fig. 2 a): the contribution from β -sheet, namely, antiparallel conformation increases (16.24%) along with a decrease in the contribution from the disordered structure

(15.35 %). Similar strong changes in the protein conformation indicate the formation of the amyloid fibril structures [18-20].

A new absorption peak at 1620 cm^{-1} (Fig. 2 a) and 1616 cm^{-1} (Fig. 2 b) corresponds to the appearance of a new conformation, likely HEWL amyloid fibril [6]. Peaks at $\sim 1635\text{ cm}^{-1}$ and at $\sim 1685\text{ cm}^{-1}$ are characteristic of β -sheet structure [21]. A peak about 1694 cm^{-1} is characteristics of antiparallel form in the β -sheet (Fig. 2 b) [16]. In the case of MWCNT, the fitting of the system gives 1699 cm^{-1} peak. The shift of the peak in high frequency region could be explained by additional interaction in the system MWCNT-protein. The results of spectra fitting show an interaction of MWCNT and SWCNT with lysozyme for both cases (Fig. 2). Thus, in the Fig. 2, we see a larger (about 10%) contribution of antiparallel β -sheet conformation in the case of HEWL+MWCNT in comparison with the same for HEWL+SWCNT. This conclusion is in accordance with the data from [13] where lysozyme has stronger interaction with larger diameter of nanotubes that could assist better fibril formation.

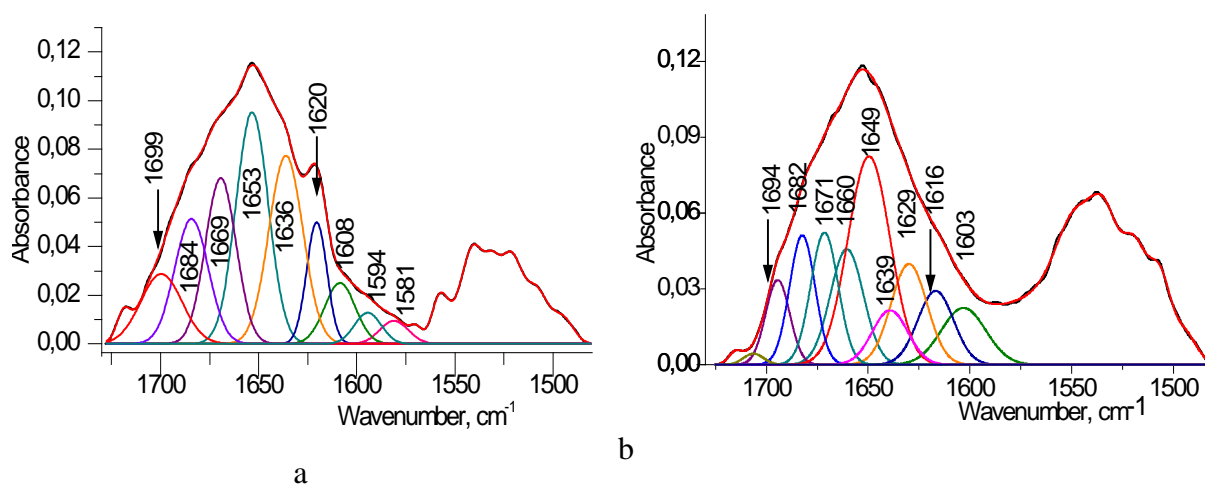


Fig. 2. Component analysis of Amide I and Amide II IR bands of HEWL+MWCNT at pH 5.5 (a) and 1580 HEWL+SWCNT at pH 6.0 (b).

For comparison we added also all spectra for all the samples under neutral pH (5.5-6) on one figure, from which we can clearly see appearance of the antiparallel beta-sheet conformation (1621 cm^{-1} and 1696 cm^{-1} in Lys+MWCNT and 1614 cm^{-1} in Lys+SWCNT) (Fig. 3). These peaks are clearly distinguished on the shoulders of wider Amide I bands of the sample with carbon nanotubes in comparison to reference sample.

In confocal microscopy image at pH = 5.5 (Fig. 4 a) the lysozyme does not show fibril structure; similarly, we have not observed the formation of fibrils for lysozyme+SWCNT complex (Fig. 4 b, c), too. At normal pH for SWCNT and MWCNT, we observed the formation of a continuous thin film of protein, a thickness of about 0.5 microns, in which we do not observe fibrillar structures. We see aggregation of CNTs presented by black points inside of the film of lysozyme (Fig. 4).

The colorful bands we see in the images are of an interference nature and indicate that the film is heterogeneous and has a different thickness. Black strips are cracks of the crystal film of lysozyme. Multiple black dots in Fig. 4 b and c we assign to carbon nanotubes.

In the case of lysozyme+SWCNT complex dense nuclei from lysozyme are formed (Fig. 4 b and Fig. 5 b, respectively). We can suggest that this is a state of the fibril film formation with participation of SWCNT and/or MWCNT, supported by FTIR spectroscopy.

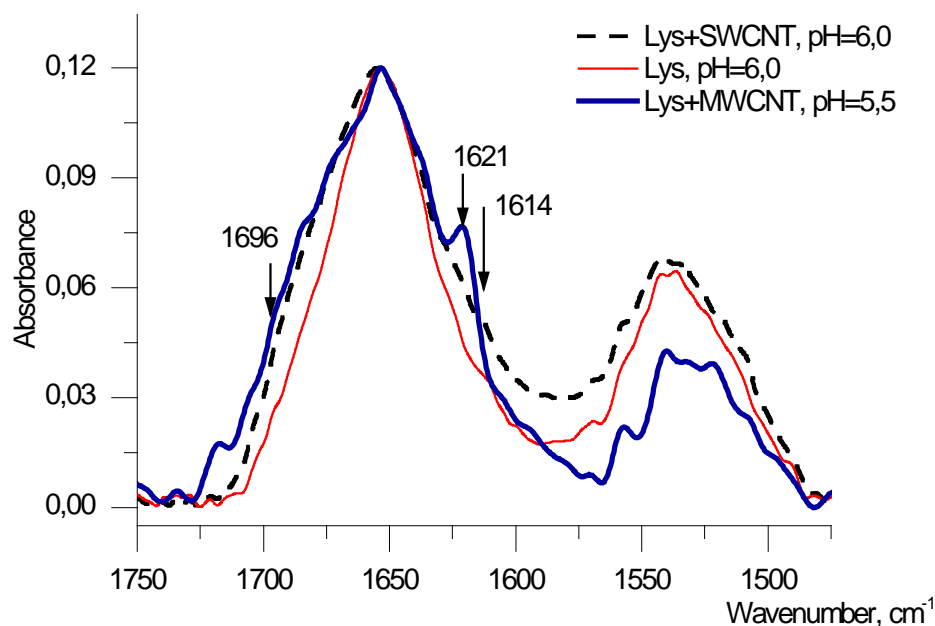


Fig. 3. IR spectra of lysozyme Amid I and Amid II regions: HEWL+SWCNT (dot line), HEWL (thin line), HEWL+MWCNT (thick line).

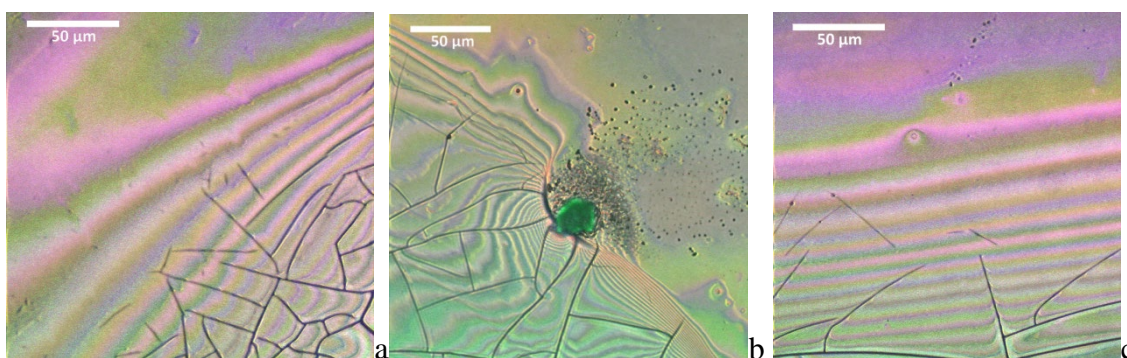


Fig. 4. Confocal images of pure HEWL (a), HEWL+SWCNT (b), HEWL+MWCNT (c) under pH=5.5.

We suppose that the fibrils come close one to another and form solid-like film [22] as in the case of the local larger protein concentration being a result of film thickness variation. The confocal microscopy data are not in accordance with FTIR fitting data and the conclusion about fibril features appearance in the Amid I spectral region.

IR spectra in the region of Amid I for all the samples of Lys obtained under 11.7 are similar (Fig. 5). In the case of alkaline pH, the shape of Amid I band is mostly determined by pH of the sample, and the spectra have negligible differences. Due to the dominant contribution of beta conformation in protein structure, which has maximum at 1628 cm^{-1} , we could not registered low frequency shoulder located near 1614 cm^{-1} assigned to antiparallel beta conformation. Meanwhile high frequency of antiparallel beta conformation near 1693 cm^{-1} we can find at 1693 cm^{-1} for both samples (Fig. 5).

For a sample of lysozyme without nanotubes at an alkaline value of the pH (Fig. 6 a, pH 11.5), the size of the observed fibrillar aggregates is smaller than with the nanotubes (Fig. 6 b, c, pH 11.5). Here we registered clear, elongated structures with a diameter up to several microns and a length of tens of microns or more.

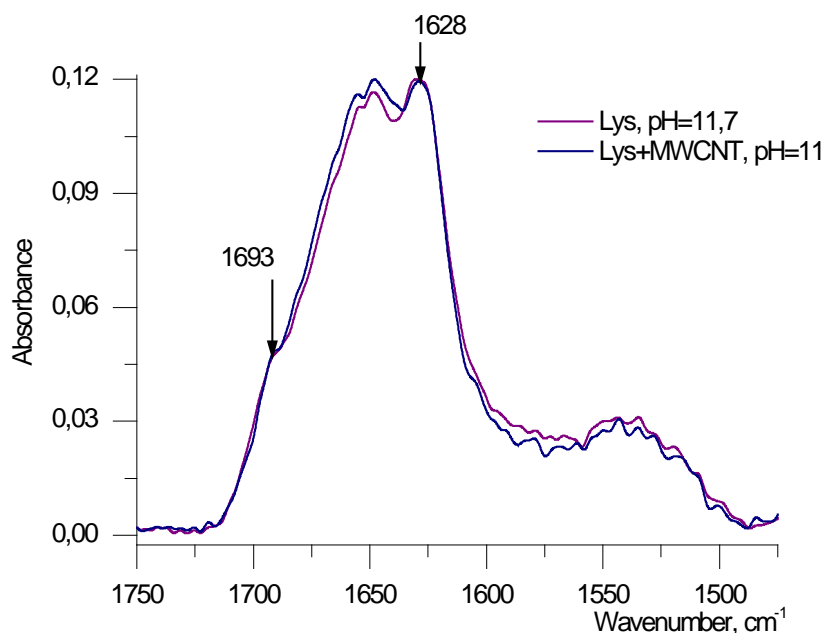


Fig. 5. IR spectra of lysozyme Amid I and Amid II regions: HEWL (thin line), HEWL+MWCNT (thick line).

Confocal microscopy cannot record structures with thin diameter (from units totens of nanometer), which is characteristic for fibril at initial stage of its formation. However, earlier [23–27] it was shown that the centroid of an image of the spot can be used to locate the object far beyond the resolution limit, despite the fact that the actual object size in the image can significantly differ from microscopy data.

We suggested that the size of actual fibrillar aggregates varies up to the size of a pixel. According to Nyquist criteria for digital resolution, the smallest resolved objects should have ~ 2.3 pixels [23].

According to the confocal microscopy resolution, for wavelength of 405 nm, optical resolution of obtained images is

$$d = 0.4 \frac{\lambda}{NA} = 216 \text{ nm},$$

where NA is numerical aperture of the objective, λ is wavelength. Next, the size of a pixel is calculated being equal 94 nm in our case. However, the location of the luminescent object can be estimated with nanometer precision for the images with a high signal-noise ratio. [24–27]

In case of SWCNT, we observed ramified net of fibrillar aggregates (Fig. 6 b, pH 11.5). In case of MWCNT on the background of small size structures (micron and less) we observed distinct elongated structures of 50 μm , which are corresponding to the size of carbon nanotubes used in our experiment (Fig. 6 c, pH 11.5).

In contrast to high pH = 11.7 (Fig. 5) in the case of low pH = 2.5 (Fig. 7) fibrils seems to form more easily. Thus, in the sample of Lys+MWCNT at pH 2.5 we registered beta conformation at 1626 cm^{-1} , but in this sample (Lys+MWCNT) we could not distinguish low frequency shoulder at 1615 cm^{-1} , at the same time high frequency shoulder at 1962 cm^{-1} appears. However, for the samples Lys and Lys+SWCNT we registered low frequency shoulder at 1613 cm^{-1} assign to beta conformation.

Therefore, MWCNT possesses more significant effect than SWCNT. We suppose that influence from both pH and MWCNT are being added (Fig. 7).

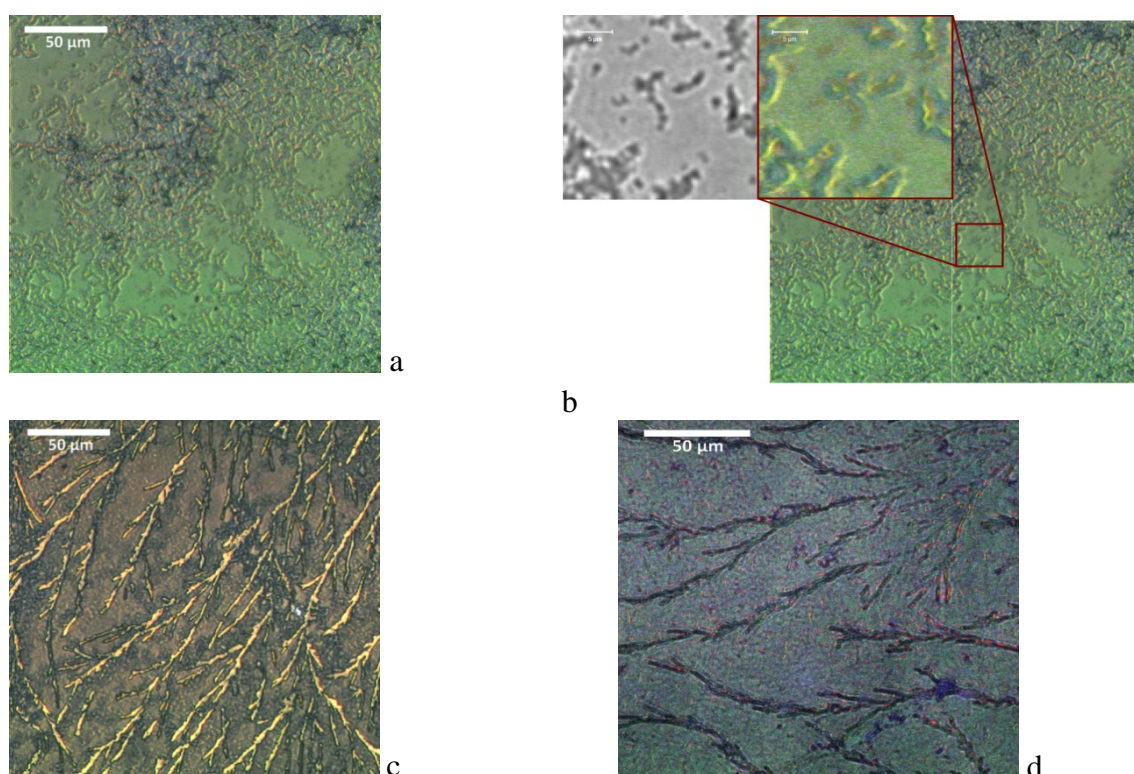


Fig. 6. Confocal images of pure HEWL (a,b), HEWL+SWCNT (c), HEWL+MWCNT (d) under pH=11.5.

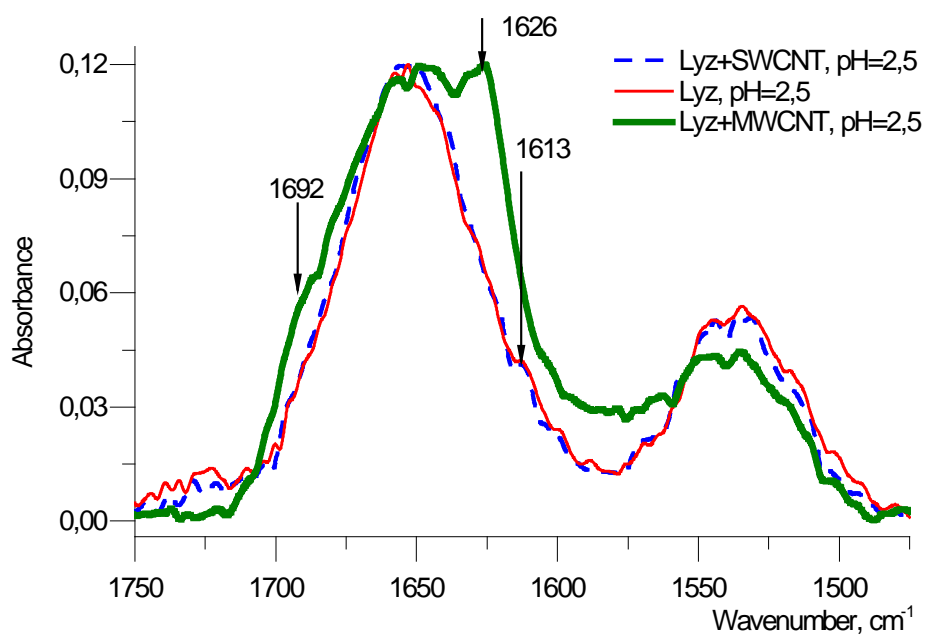


Fig. 7. IR spectra of lysozyme Amid I and Amid II regions: HEWL+SWCNT (dot line), HEWL (thin line), HEWL+MWCNT (thick line).

In case of acidic pH of the sample, we observe separated, seldom located fibrillar aggregates in confocal images. These aggregates were located more tightly in case of MWCNT (Fig. 8, c, pH 2.5), in comparison to those with SWCNT (Fig. 8, b, pH 2.5), and the sample without nanotubes (Fig. 8, a, pH 2.5).

Nanotubes serve as a surface, on which the formation of amyloid fibrils occurs more effectively. Surface of SWCNT and MWCNT have similar properties. Therefore, SWCNT and MWCNT influence the amyloid fibril formation similarly.

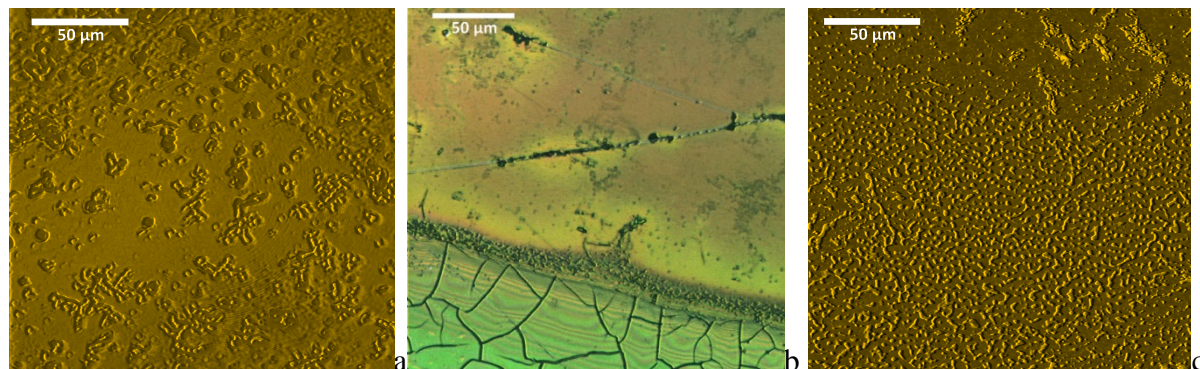


Fig. 8. Confocal images of pure HEWL (a), HEWL+SWCNT (b), HEWL+MWCNT (c) under pH=2.5.

Since the concentration of nanotubes was significantly (several orders of magnitude) lower than the concentration of lysozyme, the size of amyloid aggregates ranged up to several microns in diameter and 10 µm in length, which agrees with [23].

CONCLUSION

Summarizing, using FTIR spectroscopy and confocal microscopy, we have found out that CNTs could be a good promoter to initiate the process of fibril formation even under the room temperature and pH range of 5.5-6. The effect of amyloid fibril formation under different physiological conditions could be modeled by presence of CNT in lysozyme solution. The mechanism of this effect seems to be connected with good absorbance of lysozyme on the CNT and matches their surfaces. The relationship of the revealed effect with the diseases should be studied *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported by the HORIZON 2020 project “Asymmetry of biological membrane: theoretical, experimental and applied aspects” (690853-assymcurv-H2020-MSCA-RISE-2015/ H2020-MSCA-RISE-2015), NATO 98 5291, STCU 6175, “Development of 2D materials and “smart” sensors for medical and biological purposes” 11/1 2018.

This paper is dedicated by the authors to the memory of a prominent Ukrainian physicist and biophysicist Professor Blagoi Yuri Pavlovych. We are grateful to Yuri Pavlovych for the sharing of invaluable scientific experience in the field of interaction between DNA and other biological molecules with metal ions, mutual creative work. The authors of the paper thank to all the co-authors of the cited papers for their cooperation.

CONFLICT OF INTEREST

The authors report that there is no conflict of interest.

Authors' ORCID ID

M.V. Olenchuk  <https://orcid.org/0000-0002-3710-6349>

G.I. Dovbeshko  <https://orcid.org/0000-0002-7701-0106>

O.P. Gnatyuk  <https://orcid.org/0000-0003-4406-5503>

I.O. Polovyi  <https://orcid.org/0000-0003-0149-7314>

S.O. Karakhim  <https://orcid.org/0000-0002-8389-0584>

REFERENCES

1. Annamalai, K., Gührs, K.-H., Koehler, R., Schmidt, M., Michel, H., Loos, C., Fändrich, M. (2016). Polymorphism of Amyloid Fibrils In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition*, 55(15), 4822–4825.
2. Li, H., Luo, Y., Derreumaux, P., & Wei, G. (2011). Carbon Nanotube Inhibits the Formation of β -Sheet-Rich Oligomers of the Alzheimer's Amyloid- β (16-22) Peptide. *Biophysical Journal*, 101(9), 2267–2276. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.09.046>
3. Close, W., Neumann, M., Schmidt, A., Hora, M., Annamalai, K., Schmidt, M., ...Fändrich, M. (2018). Physical basis of amyloid fibril polymorphism. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03164-5>
4. Schmidt, A., Annamalai, K., Schmidt, M., Grigorieff, N., &Fändrich, M. (2016). Cryo-EM reveals the steric zipper structure of a light chain-derived amyloid fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(22), 6200–6205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522282113>
5. Liberta, F., Loerch, S., Rennegarbe, M., Schierhorn, A., Westermark, P., Westermark, G. T., ...Schmidt, M. (2018). Cryo-EM structure of an amyloid fibril from systemic amyloidosis. *Cold Spring Harbor Laboratory*. <https://doi.org/10.1101/357129>
6. Knubovets, T., Osterhout, J. J., Connolly, P. J., &Klibanov, A. M. (1999). Structure, thermostability, and conformational flexibility of hen egg-white lysozyme dissolved in glycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4), 1262–1267. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1262>
7. Zou, Y., Hao, W., Li, H., Gao, Y., Sun, Y., & Ma, G. (2014). New Insight into Amyloid Fibril Formation of Hen Egg White Lysozyme Using a Two-Step Temperature-Dependent FTIR Approach. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(33), 9834–9843. <https://doi.org/10.1021/jp504201k>
8. Riek, R., & Eisenberg, D. S. (2016). The activities of amyloids from a structural perspective. *Nature*, 539(7628), 227–235. <https://doi.org/10.1038/nature20416>
9. Sipe, J. D., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Ikeda, S., Merlini, G., Saraiva, M. J. M., &Westermark, P. (2016). Amyloid fibril proteins and amyloidosis: chemical identification and clinical classification International Society of Amyloidosis 2016 Nomenclature Guidelines. *Amyloid*, 23(4), 209–213. <https://doi.org/10.1080/13506129.2016.1257986>
10. Annamalai, K., Liberta, F., Vielberg, M.-T., Close, W., Lilie, H., Gührs, K.-H., ...Fändrich, M. (2017). Common Fibril Structures Imply Systemically Conserved Protein Misfolding Pathways In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(26), 7510–7514. <https://doi.org/10.1002/anie.201701761>
11. Yuan, S., Deng, Q., Fang, G., Wu, J., Li, W., & Wang, S. (2014). Protein imprinted ionic liquid polymer on the surface of multiwall carbon nanotubes with high binding capacity for lysozyme. *Journal of Chromatography B*, 960, 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.04.021>
12. Gao, R., Zhang, L., Hao, Y., Cui, X., Liu, D., Zhang, M., & Tang, Y. (2015). Novel polydopamine imprinting layers coated magnetic carbon nanotubes for specific separation of lysozyme from egg white. *Talanta*, 144, 1125–1132. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.07.090>
13. Horn, D. W., Tracy, K., Easley, C. J., & Davis, V. A. (2012). Lysozyme Dispersed Single-Walled Carbon Nanotubes: Interaction and Activity. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(18), 10341–10348. <https://doi.org/10.1021/jp300242a>
14. Vaitheeswaran, S., & Garcia, A. E. (2011). Protein stability at a carbon nanotube interface. *The Journal of Chemical Physics*, 134(12), 125101. <https://doi.org/10.1063/1.3558776>
15. Dovbeshko, G. I., Chegel, V. I., Gridina, N. Y., Repnytska, O. P., Shirshov, Y. M., Tryndiak, V. P., ... Solyanik, G. I. (2002). Surface enhanced IR absorption of nucleic acids from tumor cells: FTIR reflectance study. *Biopolymers*, 67(6), 470–486. <https://doi.org/10.1002/bip.10165>
16. Dovbeshko, G.I. (2009). *Molecular mechanisms of interaction of biological molecules with nanostructures, ligands and low doses of ionizing and microwave irradiation*. (Doctor of sciences dissertation, V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv). (in Ukrainian). Available from Vernadsky National Library of Ukraine (DS117134)
17. Dovbeshko, G.I., Chegel, V.I., Gridina, N.Ya., Gnatyuk, O.P., Shirshov, Y.M., Tryndiak, V.P., and Todor, I.M. (2001). Surface enhanced infrared absorption of nucleic acids on gold substrate. *Semiconductor Physics Quantum Electronics and Optoelectronics*, 4(3), 202–206. <https://doi.org/10.1117/12.429717>
18. Dong A., Meyer J.D., Brown J.L., Manning M.C., Carpenter J. F. (2000). Comparative Fourier Transform Infrared and Circular Dichroism spectroscopic analysis of all-proteinase inhibitor and ovalbumin in aqueous solution. *Arch. Biochem. Biophys.* 383(1), 148–155. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2054>
19. Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M., &Raussens, V. (2006). Evaluation of the Information Content in Infrared Spectra for Protein Secondary Structure Determination. *Biophysical Journal*, 90(8), 2946–2957. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.072017>

20. Pérez, C., & Griebenow, K. (2000). Fourier-transform infrared spectroscopic investigation of the thermal denaturation of hen egg-white lysozyme dissolved in aqueous buffer and glycerol. *Biotechnology Letters*, 22(23), 1899–1905. <https://doi.org/10.1023/a:1005645810247>
21. Zandomenighi, G., Krebs, M. R. H., McCammon, M. G., & Fändrich, M. (2009). FTIR reveals structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Science*, 13(12), 3314–3321. <https://doi.org/10.1110/ps.041024904>
22. del Mercato, L. L., Pompa, P. P., Maruccio, G., Torre, A. D., Sabella, S., Tamburro, A. M., ... Rinaldi, R. (2007). Charge transport and intrinsic fluorescence in amyloid-like fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(46), 18019–18024. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702843104>
23. Waters, J. C. (2009). Accuracy and precision in quantitative fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 185(7), 1135–1148. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903097>
24. Churchman, L. S., Okten, Z., Rock, R. S., Dawson, J. F., & Spudich, J. A. (2005). Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(5), 1419–1423. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409487102>
25. Yildiz, A., & Selvin, P. R. (2005). Fluorescence Imaging with One Nanometer Accuracy: Application to Molecular Motors. *Accounts of Chemical Research*, 38(7), 574–582. <https://doi.org/10.1021/ar040136s>
26. Huang, B., W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang. (2008). Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 319(5864), 810–813
27. Manley, S., Gillette, J. M., Patterson, G. H., Shroff, H., Hess, H. F., Betzig, E., & Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature Methods*, 5(2), 155–157. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1176>
28. Pawley J. B. (2006) Handbook of Biological Confocal Microscopy (3^d ed.). Springer, New York: Science+Business Media, LLC
29. Kovalska, V., Chernii, S., Cherepanov, V., Losytskyy, M., Chernii, V., Varzatskii, O., ... Yarmoluk, S. (2017). The impact of binding of macrocyclic metal complexes on amyloid fibrillization of insulin and lysozyme. *Journal of Molecular Recognition*, 30(8), e2622. <https://doi.org/10.1002/jmr.2622>

Оригінальна стаття

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-05>

УДК 577.3+543.64

ВЛИЯНИЕ АДСОРБЦИИ ЛИГАНДОВ НА ВЫХОДНОЙ СИГНАЛ ДНК-БИОСЕНСОРА

В.Б. Аракелян¹, А.Т. Карапетян², П.О. Вардеванян¹

¹Ереванский государственный университет, А. Манукяна 1, Ереван, Армения, 0025

²Национальный университет архитектуры и строительства Армении, Теряна 105, Ереван, Армения, 0009

e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

Поступила в редакцию 8 октября 2018 г.

Принята 7 ноября 2018 г.

Актуальность. Важное преимущество применения ДНК-биосенсоров по сравнению с традиционными молекулярно-биологическими методами связано с миниатюризацией исследуемых образцов и анализаторов, что значительно снижает стоимость анализа и время его проведения. Однако миниатюризация неизбежно приводит как к уменьшению величины выходного сигнала ДНК-биосенсора, так и к повышению уровня шумов сигнала. Поэтому становятся актуальными исследования, посвященные влиянию различных факторов, в частности лигандов, на величину выходного сигнала ДНК-биосенсоров и уровень шумов.

Цель работы. Теоретически рассчитать зависимость выходного сигнала ДНК-биосенсора от концентрации лигандов в растворе. Исследовать характерные особенности выходного сигнала ДНК-биосенсора.

Теория. Модель, в рамках которой проводятся теоретические расчеты, следующая. Имеется подложка, на которой иммобилизованы одноцепочечные молекул ДНК-мишеней. Подложка граничит с раствором, где имеются как комплементарные с ДНК-мишенью одноцепочечные ДНК, так и лиганды, способные адсорбироваться на дуплексы ДНК. Величина выходного сигнала ДНК-биосенсора пропорциональна числу дуплексов ДНК. Адсорбция лигандов на дуплексы ДНК приводит к изменению выходного сигнала ДНК-биосенсора. Принимаем, что адсорбированный лиганд увеличивает выходной сигнал ДНК-биосенсора. Поскольку образование и распад комплекса лигандов с дуплексом ДНК происходит случайным образом, то число связанных с дуплексом ДНК лигандов будет изменяться случайным образом, что неизбежно приведет к флуктуации выходного сигнала ДНК-биосенсора.

Результаты. Показано, что с увеличением концентрации лигандов в растворе выходной сигнал ДНК-биосенсоров монотонно растет, а время релаксации выходного сигнала уменьшается. Показано также, что дисперсия выходного сигнала ДНК-биосенсора с увеличением концентрации лигандов в растворе вначале увеличивается, а затем, проходя через максимум, уменьшается и стремится к нулю при дальнейшем увеличении концентрации лигандов в растворе.

Выводы. Полученные данные могут быть использованы на практике при изготовлении микро ДНК-биосенсоров и анализе результатов измерений.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДНК-биосенсоры; адсорбция лигандов; средний выходной сигнал; дисперсия сигнала; время релаксации сигнала.

ВПЛИВ АДСОРБЦІЇ ЛІГАНДІВ НА ВИХІДНИЙ СИГНАЛ ДНК-БІОСЕНСОРА

В.Б. Аракелян¹, А.Т. Карапетян², П.О. Вардеванян¹

¹Єреванський державний університет, А. Манукяна 1, Єреван, Вірменія, 0025

²Національний університет архітектури та будівництва Вірменії, Теряна 105, Єреван, Вірменія, 0009

Актуальність. Важлива перевага застосування ДНК-біосенсорів в порівнянні з традиційними молекулярно-біологічними методами пов'язана з мініатюризацією досліджуваних зразків і аналізаторів, що значно знижує вартість аналізу і час його проведення. Однак мініатюризація неминує призводить як до зменшення величини вихідного сигналу ДНК-біосенсора, так і до підвищення рівня шумів сигналу. Тому стають актуальними дослідження, присвячені впливу різних чинників, зокрема лігандів, на величину вихідного сигналу ДНК-біосенсорів і рівень шумів.

Мета роботи. Теоретично розрахувати залежність вихідного сигналу ДНК-біосенсора від концентрації лігандів у розчині. Дослідити характерні особливості вихідного сигналу ДНК-біосенсора.

Теорія. Модель, в рамках якої проводяться теоретичні розрахунки, наступна. Є підложка, на якій іммобілізовані одноланцюгові молекули ДНК-мішеней. Підложка межує з розчином, де є як комплементарні з ДНК-мішенню одноланцюгові ДНК, так і ліганди, здатні адсорбуватися на дуплекси ДНК. Величина вихідного сигналу ДНК-біосенсора пропорційна числу дуплексів ДНК. Адсорбція лігандів на дуплекси ДНК призводить до зміни вихідного сигналу ДНК-біосенсора. Приймаємо, що адсорбований ліганд збільшує вихідний сигнал ДНК-біосенсора. Оскільки утворення і розпад комплексу лігандів з дуплексом ДНК відбувається випадковим чином, то число пов'язаних з дуплексом ДНК лігандів буде змінюватись випадковим чином, що неминуче приведе до флуктуації вихідного сигналу ДНК-біосенсора.

Результати. Показано, що зі збільшенням концентрації лігандів в розчині вихідний сигнал ДНК-біосенсорів монотонно зростає, а час релаксації вихідного сигналу зменшується. Показано також, що дисперсія вихідного сигналу ДНК-біосенсора зі збільшенням концентрації лігандів в розчині спочатку збільшується, а потім, проходячи через максимум, зменшується і прямує до нуля при подальшому збільшенні концентрації лігандів в розчині.

Висновки. Отримані дані можуть бути використані на практиці при виготовленні мікро ДНК-біосенсорів і аналізі результатів вимірювань.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: ДНК-біосенсори; адсорбція лігандів; середній вихідний сигнал; дисперсія сигналу; час релаксації сигналу.

INFLUENCE OF ADSORPTION OF LIGANDS ON OUTPUT SIGNAL OF DNA-BIOSENSOR

V.B. Arakelyan¹, A.T. Karapetyan², P.O. Vardevanyan¹

¹Yerevan State University, 1 A. Manoogian, Yerevan, Armenia, 0025

²National University of Architecture and Construction of Armenia, 105 Teryan, Yerevan, Armenia, 0009

Background: The important advantage of the application of DNA-biosensors as compared to traditional molecular-biological methods is connected to the miniaturization of the studied samples and analyzers, which significantly decreases the analysis value as well as the time of its realization. Though, the miniaturization inevitably results in both decreasing the DNA-biosensor output signal value and increasing the noise signal level. That is why the studies devoted to the influence of different factors, particularly ligands on the output signal value and noise level of DNA-biosensors become actual tasks.

Objectives: To theoretically calculate the dependence of DNA-biosensor output signal on the concentration of ligands in the solution. To study the characteristic peculiarities of DNA-biosensor output signal.

Theory: The model, in the frame of which the theoretical calculations were carried out, is described here. There is an underlayer, on which the single-stranded molecules of DNA-targets are immobilized. The underlayer borders on the solution, where there are both single-stranded DNA molecules complementary to DNA-targets and ligands able to be adsorbed on DNA duplexes. The value of output signal DNA-biosensor is proportional to the number of DNA duplexes. Adsorption of ligands on DNA duplexes results in changing the output signal of DNA-biosensor. It is accepted that the adsorbed ligand enhances DNA-biosensor output signal. Taking into account that the formation and decomposition of the complex of ligands with DNA duplex occur in a random way, the number of bound ligands to DNA duplexes will change randomly as well, which will inevitably result in DNA-biosensor output signal fluctuations.

Results: It has been shown that along with increasing the concentration of ligands in the solution the output signal of DNA-biosensors rises monotonously and the relaxation time of the output signal decreases. It was also shown that the output signal dispersion of DNA-biosensor increases at first with the concentration increase of ligands in the solution, then passing through the maximum decreases and tends to zero at the further concentration enhancement of ligands in the solution.

Conclusions: The obtained data can be applied practically in the preparation of micro DNA-biosensors and analysis of the measurement results.

KEY WORDS: DNA-biosensors; adsorption of ligands; average output signal; signal dispersion; signal relaxation time.

В настоящее время ДНК-биосенсоры интенсивно применяются в различных областях медицины, сельского хозяйства, а также в области диагностики генетических заболеваний [1-4]. С их помощью достигнуты впечатляющие успехи. Однако все же остается нерешенным целый ряд задач, связанных как с усилением выходного сигнала

ДНК-биосенсора, так и с влиянием шумов различной природы на его выходной сигнал. Принцип работы ДНК-биосенсора весьма прост – одноцепочная ДНК-мишень иммобилизуется на подложке, а находящиеся в растворе одноцепочные ДНК, комплементарные ДНК-мишеням, связываются с ДНК-мишенью, образуя дуплексы ДНК [5]. Дуплексы ДНК в свою очередь активизируют сигнал, величина которого пропорциональна их числу. В подавляющем большинстве случаев, среда, в которой проводятся измерения с использованием ДНК-биосенсоров, содержит лиганды, которые могут адсорбироваться как на одноцепочные ДНК-мишени, так и на дуплексы ДНК, что может привести к изменению выходного сигнала ДНК-биосенсора. Следует отметить, что проблеме взаимодействия различных лигандов с ДНК посвящено множество теоретических и экспериментальных работ [6-10]. В данной работе рассмотрено влияние адсорбции лигандов на дуплексы ДНК на выходной сигнал ДНК-биосенсора. Важность этого обусловлена тем, что часто генерация и усиление выходного сигнала ДНК-биосенсора связана именно с адсорбцией соответствующих лигандов на дуплексы ДНК [11-13]. Заметим, что поскольку связывание лиганда с дуплексами ДНК происходит в результате случайного столкновения лиганда с адсорбционным местом на дуплексе ДНК, а распад комплекса лиганд-ДНК происходит в случайный момент времени, то число адсорбированных лигандов на дуплексах ДНК флуктуирует. Это в свою очередь может приводить к флуктуациям выходного сигнала ДНК-биосенсора. Шум, обусловленный такими флуктуациями, принято называть внутренним шумом, характерная особенность которого состоит в том, что с уменьшением размеров системы увеличиваются относительные флуктуации [14]. В данной статье рассмотрено влияние адсорбции лигандов на дуплексы ДНК на характерные особенности выходного сигнала ДНК-биосенсора.

ТЕОРИЯ

Опишем модель, в рамках которой теоретически исследуется влияние адсорбции лигандов на дуплексы ДНК на выходной сигнал ДНК-биосенсора. Подложка, на которой иммобилизовано N_d одноцепочечных молекул ДНК-мишеней, граничит с раствором, где имеются как комплементарные с ДНК-мишенью одноцепочные ДНК, так и лиганды, способные адсорбироваться на дуплексы ДНК. Максимальное число дуплексов N_d . Считая, что величина выходного сигнала от одного дуплекса равна I_d , для максимальной величины выходного сигнала ДНК-биосенсора имеем $I_0 = N_d I_d$. Адсорбция лиганда на дуплексы ДНК изменяет величину выходного сигнала I_d на величину, пропорциональную числу связанных с одним дуплексом ДНК лигандов $x(t)$. В принципе, адсорбированный лиганд может как увеличить, так и уменьшить выходной сигнал ДНК-биосенсора. Будем рассматривать случай увеличения сигнала. Учитывая это обстоятельство, выходной сигнал ДНК-биосенсора можно представить в виде $I(t) = I_0 + N_d \beta \cdot x(t)$, где β – коэффициент пропорциональности. Поскольку образование и распад комплекса лигандов с дуплексом ДНК происходит случайным образом, то число связанных с дуплексом ДНК лигандов будет изменяться случайным образом, что неизбежно приведет к флуктуации выходного сигнала ДНК-биосенсора. Дуплекс ДНК представим в виде одномерной решетки с N_p числом центров адсорбции. Лиганд при адсорбции занимает n подряд расположенных адсорбционных центров на дуплексе ДНК. Образование комплекса лиганда (L) с дуплексом ДНК и его распад представим в виде квазихимической реакции [15]



где M – адсорбционное место на дуплексе ДНК, (LM) – комплекс лиганда с дуплексом ДНК, k_1 и k_{-1} – константы скоростей образования и распада комплекса.

Далее, следуя работе [15], можно определить кинетику заполнения дуплекса лигандами, а затем получить следующие окончательные выражения для среднего значения выходного сигнала ДНК-биосенсора $\overline{I(t)}$ и его дисперсии $\overline{\Delta I^2}$ в виде

$$\overline{I(t)} = I_0 + N_d \beta \cdot \frac{k_1 c_f N_p}{k_{-1} + (2n-1)k_1 c_f} (1 - \exp(-(k_{-1} + (2n-1)k_1 c_f)t)), \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \overline{\Delta I^2} = N_d^2 \cdot \beta^2 \cdot \frac{k_1 c_f N_p (k_{-1} - (2n-1)k_1 c_f)}{(k_{-1} + (2n-1)k_1 c_f)^2} \cdot (1 - \exp(-(k_{-1} - (2n-1)k_1 c_f)t)) + \\ + \frac{k_1^2 c_f^2 N_p (2n-1)}{(k_{-1} + (2n-1)k_1 c_f)^2} \cdot (1 - \exp(-2(k_{-1} - (2n-1)k_1 c_f)t)) \end{aligned} , \quad (3)$$

где c_f - концентрация лигандов в растворе.

Из (2) и (3) легко найти стационарные значения среднего выходного сигнала ДНК-биосенсора $\overline{I_{st}}$ и его дисперсии $\overline{\Delta I_{st}^2}$ в виде

$$\overline{I_{st}} = I_0 + N_d \beta \cdot \frac{K c_f N_p}{1 + (2n-1)K c_f} , \quad (4)$$

$$\overline{\Delta I_{st}^2} = N_d^2 \cdot \beta^2 \cdot N_p \frac{K c_f}{(1 + (2n-1)K c_f)^2} , \quad (5)$$

где $K = k_1 / k_{-1}$ константа равновесия квазихимической реакции (1).

Важной характеристикой выходного сигнала ДНК-биосенсора является время выхода сигнала на стационарный уровень. Это время можно оценить из анализа уравнений, описывающих кинетику связывания лигандов с ДНК дуплексами [16]. Следуя [16], из (2) можно получить следующее выражение для времени релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора в виде

$$\tau_f = (k_{-1} + (2n-1)k_1 c_f)^{-1} . \quad (6)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из (4) и (5) видно, что если в растворе отсутствует лиганд, то стационарные значения среднего выходного сигнала ДНК-биосенсора и его дисперсия равны соответственно I_0 и $\overline{\Delta I_{st}^2} = 0$. Из (4) видно также, что с увеличением концентрации лигандов в растворе увеличивается стационарное значение среднего выходного сигнала ДНК-биосенсора. На рис. 1 приведен график зависимости относительного значения стационарного среднего выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерной концентрации лигандов, построенный по формуле (4). Из рис. 1 и (4) следует, что предельное относительное увеличение выходного сигнала ДНК-биосенсора зависит от параметра $N_d \beta N_p$ и с его ростом усиливается стационарное значение среднего выходного сигнала ДНК-биосенсора. Из рис. 1 видно также, что с ростом n стационарное значение среднего выходного сигнала ДНК-биосенсора уменьшается.

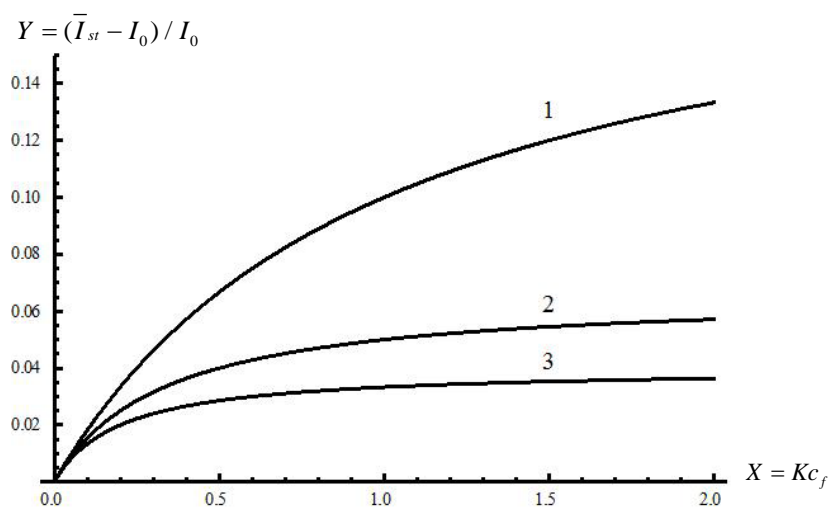


Рис. 1. Зависимость увеличения относительного значения стационарного среднего выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерной концентрации лигандов в растворе при различных значениях n . Цифры на кривых соответствуют значениям $n=1$, $n=2$ и $n=3$. На всех кривых параметр $(N_d \beta \cdot N_p) / I_0 = 0.2$.

Анализ выражения (6) показывает, что время релаксации среднего значения выходного сигнала ДНК-биосенсора $\tau_{\bar{I}}$ уменьшается как с ростом концентрации лигандов в растворе c_f , так и с ростом числа мест, с которыми связывается одна молекула лиганда n . Из (6) видно также, что $\tau_{\bar{I}}$ уменьшается с ростом констант скоростей образования и распада комплекса лиганда с дуплексом ДНК. Зависимость безразмерного времени релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерной концентрации лигандов в растворе, построенная по формуле (6), представлена на рис. 2.

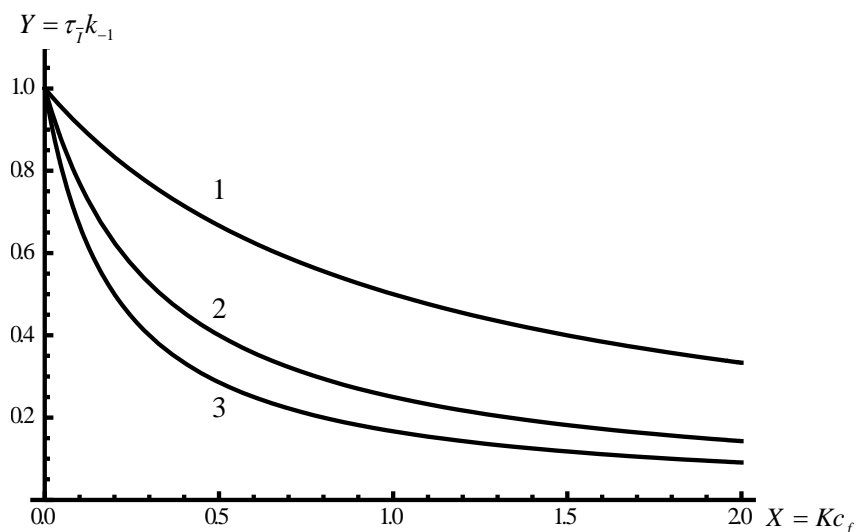


Рис. 2. Зависимость безразмерного времени релаксации выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерной концентрации свободных лигандов. Цифры на кривых соответствуют значениям $n=1$, $n=2$ и $n=3$.

Из (5) видно, что при малых концентрациях лиганда дисперсия линейно растет с увеличением концентрации. Дальнейшее увеличение концентрации лиганда приводит к

тому, что дисперсия достигает максимального значения и далее при стремлении концентрации лиганда к бесконечности дисперсия стремится к нулю. Такая зависимость дисперсии от концентрации лиганда в растворе физически понятна и связана с тем, что в начале процесса адсорбции с увеличением концентрации лигандов в растворе растет и число адсорбированных лигандов на дуплексе ДНК, и, соответственно, должна расти и дисперсия. При больших концентрациях лиганда в растворе число адсорбированных лигандов на дуплексе ДНК выходит на некоторое постоянное значение, что и приводит к выходу дисперсии на ноль. Зависимость безразмерной стационарной дисперсии выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерной концентрации лигандов в растворе, построенная по формуле (5), представлена на рис. 3.

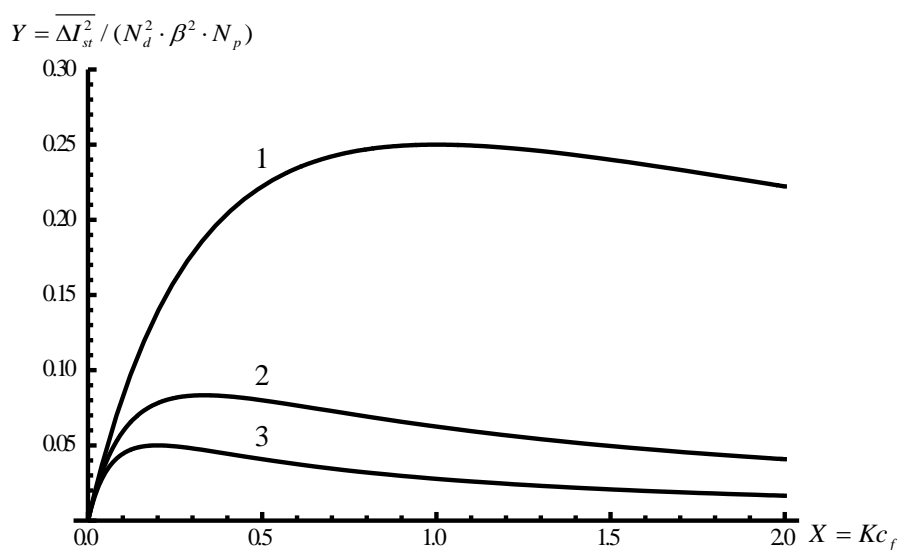


Рис. 3. Зависимость безразмерной дисперсии выходного сигнала ДНК-биосенсора от безразмерной концентрации лигандов при различных значениях n . Цифры на кривых соответствуют значениям $n=1$, $n=2$ и $n=3$.

Из рис. 3 видно, что высота максимума кривой и его положение зависят от n – с ростом n уменьшается высота максимума, а положение максимума сдвигается в область малых значений концентраций. Следует отметить, что характерные особенности кривых, представленных на рис. 3, могут быть использованы при идентификации источника шума выходного сигнала ДНК-биосенсора.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в работе вычислены среднее значение выходного сигнала ДНК-биосенсора и его дисперсия при учете внутреннего шума биосенсора. Показано, что среднее значение выходного сигнала ДНК-биосенсора монотонно зависит от концентрации лигандов в растворе, а зависимость дисперсии от концентрации имеет вид кривой с максимумом. Вычислено время релаксации среднего значения выходного сигнала ДНК-биосенсора и показано, что оно уменьшается с ростом концентрации лигандов в растворе. Полученные результаты могут быть использованы при изготовлении микро ДНК-биосенсоров и полезны для анализа результатов измерений.

БЛАГОДАРНОСТИ

Статья посвящена памяти профессора Ю.П. Благого.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что не существует никакого конфликта интересов.

Author's ORCID ID

Poghos Vardevanyan  <https://orcid.org/0000-0003-2541-9337>

REFERENCES

1. Mullen, W.H., & Evans, G.P. (1988). Biosensors in laboratory. *Int. Labmate*, 13, 15-17
2. Turner, E., Carube, I., & Wilson, J. (1992). Biosensory, osnovy i prilozhenija. Moscow: Mir. (In Russian).
3. Drummond, T.G., Hill, M.G., & Barton, J. (2003). Electrochemical DNA sensors. *Nat. biotechnol.*, 21(10), 1192-1199
4. Domany, E. (2005). Analysis of DNA-chip and antigen-chip data: studies of cancer, stem cells and autoimmune diseases. *Comp. Phys. Commun.*, 169(1-2), 183-187
5. Yevdokimov, Y.M. (1998). Biosensors Based on Single-and Double-Stranded Linear DNA Molecules. *Sensory systems*, 12(1), 1-13
6. Vardevanyan, P.O., Antonyan, A.P., Parsadanyan, M.A., Shahinyan, M.A., & Melkonyan, G.A. (2015). Behavior of ethidium bromide-Hoechst 33258-DNA and ethidium bromide-methylene blue-DNA triple systems by means of UV melting. *International Journal of Spectroscopy*, 2015, 586231, 1-5. doi: 10.1155/2015/586231
7. Karapetian, A.T., Grigoryan, Z.A., Mamasakhlisov, Y.S., Minasyants, M.V., & Vardevanyan, P.O. (2016). Theoretical treatment of helix-coil transition of complexes DNA with two different ligands having different binding parameters. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 34(1), 201-205. doi: 10.1080/07391102.2015.1010584
8. Vardevanyan, P.O., Antonyan, A.P., Parsadanyan, M.A., Torosyan, M.A., & Karapetian, A.T. (2016). Joint interaction of ethidium bromide and methylene blue with DNA. The effect of ionic strength on binding thermodynamic parameters. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 34(7), 1377-1382. doi: 10.1080/07391102.2015.1079557
9. Vardevanyan, P.O., Antonyan, A.P., Parsadanyan, M.A., Shahinyan, M.A., & Sahakyan, V.G. (2017). Peculiarities of interaction of synthetic polyribonucleotide poly(rA)-poly(rU) with some intercalators. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 36(14), 3607-3613. doi: 10.1080/07391102.2017.1402708
10. Mamasakhlisov, Y., Sngryan, H., Tonoyan, Sh., Hakobyan, A., & Vardevanyan, P. (2018). The double-stranded DNA stability in presence of a flexible polymer. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, Published online: 23 Apr 2018. doi: 10.1080/07391102.2018.1459320
11. Tonoyan, Sh.A., Hakobyan, A.A., Andreassian, A.K., Morozov, V.F., & Mamasakhlisov, Y.Sh. (2018). Sensitivity of DNA sensors in the presence of charged ligands. *Journal of Contemporary Physics*, 53(2), 179-186. doi: 10.3103/S1068337218020111
12. Evtjugin, G.A., Budnikov, G.K., Porfir'eva, A.V. (2008). Jelektrohimicheskie DNK-sensory dlja opredelenija biologicheskij aktivnyh nizkomolekuljarnyh soedinenij. *Rossijskij himicheskij zhurnal (Zhurnal rossijskogo himicheskogo obshhestva im. D.I. Mendeleeva)*, LII(2), 66-79. (In Russian)
13. Cai, H., Cao, X., Jiang, Y., He, P., & Fang Y. (2003). Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375(2), 287-293. doi: 10.1007/s00216-002-1652-9
14. R. Kubo. (1967). *Statisticheskaja mehanika*. M.: Mir. (In Russian)
15. Arakelyan, V., Babayan, Yu., & Potikyan, G. (2000). Determination of constant rates of adsorption of ligand on DNA by analysis of correlation functions. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 18(2), 231-235. doi: 10.1080/07391102.2000.10506661
16. Arakelyan, V.B., Babayan, S.Yu., Tairyan, V.I., Arakelyan, A.V., Parsadanyan, M.A., & Vardevanyan, P.O. (2006). Kinetics of Ligand Binding to Nucleic Acids. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 23(4), 479-484. doi: 10.1080/07391102.2006.10507073

Огляд

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-06>

УДК 577.32:577.338

МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ВПЛИВУ ПОВІЛЬНИХ ЕЛЕКТРОНІВ НА БІОЛОГІЧНІ СТРУКТУРИ

М.І. Суховія, С.Е. Бірдус, М.І. Шафраньош, Ю.Ю. Свида, І.І. Шафраньош

Ужгородський національний університет, пл. Народна, 3, м. Ужгород, Україна, 88000

e-mail: misshafr@gmail.com

Надійшла до редакції 29 жовтня 2018 р.

Прийнята 19 грудня 2018 р.

Актуальність. У статті наведено огляд біофізичних досліджень, виконаних науковцями Закарпатського відділення Українського біофізичного товариства, який присвячується світлій пам'яті видатного українського біофізика, професора Юрія Павловича Благого.

Мета роботи – з'ясування особливостей фізичних процесів та структурних змін у молекулах нуклеїнових кислот, ініційованих низькоенергетичними електронами (10^{-1} - 10^2 eV).

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження було обрано молекулярні компоненти нуклеїнових кислот – азотисті основи, нуклеозиди. Застосовано комплекс методів: спектральний метод для вивчення люмінесценції біомолекул, збуджених електронним ударом; електричний метод при визначенні повних перерізів утворення позитивних і негативних іонів; метод газозфазної мас-спектрометрії з іонізацією електронним ударом для встановлення продуктів взаємодії повільних електронів з біомолекулами. Більшість експериментів було проведено в умовах пучків електронів та молекул, що перетинаються.

Результати. Досліджено процеси збудження, іонізації та фрагментації молекулярних складових нуклеїнових кислот електронним ударом. Отримано спектри випромінювання біомолекул в області довжин хвиль 200-500 нм для різних енергій налітаючих електронів. Для ідентифікації спектральних смуг детально досліджено відповідні функції збудження, визначено енергетичні пороги процесів, здійснено мас-спектрометричний аналіз з іонізацією біомолекул електронним ударом, проведено квантово-хімічні напівемпіричні розрахунки параметрів їх структури. Встановлено, що складна суперпозиційна природа спектрів відображає одночасне протікання різних фізичних процесів. Зокрема, крім прямого збудження синглетних і триплетних станів молекул основ, наявне дисоціативне збудження та збудження іонізованих біомолекул і їх фрагментів. Аналіз функцій збудження показав наявність інтеркомбінаційних переходів з утворенням триплетних метастабільних станів молекул основ нуклеїнових кислот. Важливо, що процеси появи негативних іонів мають резонансний характер і супроводжуються дисоціацією молекул навіть при енергіях, менших за пороги збудження та іонізації.

Висновки. Досліджено фізичні процеси, ініційовані впливом низькоенергетичного випромінювання у біоорганічних структурах, та їхні біофізичні наслідки. Зокрема, показано, що електрони, змінюючи фізичну структуру нуклеотидних основ, навіть при невеликих енергіях можуть викликати появу точкових мутацій.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нуклеїнові кислоти; азотисті основи; низькоенергетичні електрони; мас-спектрометрія; спектроскопія.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВЛИЯНИЯ МЕДЛЕННЫХ ЭЛЕКТРОНОВ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ

М.И. Суховия, С.Э. Бирдус, М.И. Шафраньош, Ю.Ю. Свида, И.И. Шафраньош

Ужгородский национальный университет, пл. Народная, 3, г. Ужгород, Украина, 88000

Актуальность. В статье приведен обзор исследований, выполненных биофизиками Закарпатского отделения Украинского биофизического общества, посвященный светлой памяти выдающегося украинского биофизика, профессора Юрия Павловича Благого.

Цель работы – выяснение особенностей физических процессов и структурных изменений в молекулах нуклеиновых кислот, инициированных низкоэнергетическими электронами (10^{-1} - 10^2 эВ).

Материалы и методы. Объектами исследования были выбраны молекулярные компоненты нуклеиновых кислот – азотистые основания, нуклеозиды. Применен комплекс методов: спектральный метод для изучения люминесценции возбужденных электронным ударом молекул;

электрический метод при определении полных сечений образования положительных и отрицательных ионов; метод газовой масс-спектрометрии с ионизацией электронным ударом. Большинство экспериментов были проведены в условиях пересекающихся пучков электронов и молекул.

Результаты. Исследованы процессы возбуждения, ионизации и фрагментации молекул азотистых оснований нуклеиновых кислот электронным ударом. Измерены спектры излучения биомолекул в области длин волн 200-500 нм при разных энергиях налетающих электронов. Для идентификации спектральных полос исследованы функции возбуждения нуклеотидных оснований, осуществлен масс-спектрометрический анализ с ионизацией биомолекул электронным ударом, проведены квантово-химические полумпирические расчеты параметров их структуры. Установлено, что сложная суперпозиционная природа спектров отражает протекание различных физических процессов. Кроме прямого возбуждения синглетных и триплетных состояний молекул оснований, происходит диссоциативное возбуждение и возбуждение ионизированных биомолекул и их фрагментов. Анализ функций возбуждения показал наличие интеркомбинационных переходов с образованием триплетных метастабильных состояний молекул оснований нуклеиновых кислот. Показано, что процессы появления отрицательных ионов имеют резонансный характер и сопровождаются диссоциацией молекул даже при энергиях, меньших порогов возбуждения и ионизации.

Выводы. Исследованы физические процессы, инициированные влиянием низкоэнергетического излучения в биоорганических структурах, и их биофизические следствия. В частности, показано, что электроны, изменяя физическую структуру нуклеотидных оснований, даже при небольших энергиях могут вызывать появление точечных мутаций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нуклеиновые кислоты; азотистые основания; низкоэнергетические электроны; масс-спектрометрия; спектроскопия.

MOLECULAR MECHANISMS OF INFLUENCE OF SLOW ELECTRONS ON BIOLOGICAL STRUCTURES

M.I. Sukhoviya, S.E. Birdus, M.I. Shafranyosh, Yu.Yu. Svida, I.I. Shafranyosh

Uzhgorod National University, 3 Narodna Sq., Uzhgorod, Ukraine, 88000

Background: The article reviews investigations carried out by biophysicists of the Transcarpathian Branch of the Ukrainian Biophysical Society, dedicated to the memory of the prominent Ukrainian biophysicist, Professor Yuri Pavlovich Blagoi.

Objectives: Study of the peculiarities of physical processes and structural changes in nucleic acid molecules initiated by low-energy electrons (10^{-1} - 10^2 eV).

Materials and methods: Molecular components of nucleic acids – nucleobases, nucleosides – were chosen as objects of research. A complex of methods is applied: the spectral method for obtaining the luminescence spectra of molecules excited by an electron impact; the electric method in determining the complete cross-sections of the formation of positive and negative ions; the method of gas-phase mass spectrometry with electron impact ionization. A new approach is proposed, which is based on the development of the methods for obtaining biomolecules in an isolated (gas) state, the formation of molecular beams, and the implementation of a crossed electron and molecular beams method.

Results: The processes of excitation, ionization and fragmentation of molecules of nucleic acid bases under electron impact are investigated. The radiation spectra of biomolecules in the wavelength region from 200 nm to 500 nm for different energies of incident electrons are obtained. For identification of spectral bands, the excitation functions of biomolecules are investigated, mass spectrometry analysis of the bases is performed, semi-empirical quantum-chemical calculations of structural parameters are carried out. It is established that the complex superpositional nature of the spectra reflects the simultaneous occurrence of various physical processes, including, in addition to the direct excitation of the singlet and triplet states of the base molecules, the dissociation excitation and excitation of ionized biomolecules and their fragments. The analysis of the excitation functions shows the presence of intersystem transitions with the formation of triplet metastable states of the nucleic acid bases molecules. It is shown that the processes of the appearance of negative ions are of resonant nature and are accompanied by the dissociation of molecules even at energies smaller than the thresholds for excitation and ionization.

Conclusions: It is established that physical processes initiated by the influence of low-energy radiation in bioorganic structures lead to various biophysical consequences. In particular, the electrons destroying the molecules of the bases, may cause the appearance of point mutations.

KEY WORDS: nucleic acids; nucleobases; low energy electrons; mass spectrometry; spectroscopy.

Вивчення фізичних процесів і біофізичних наслідків, викликаних низькоенергетичними електронами в біоструктурах, є важливим з декількох причин.

По-перше, це актуальність проблеми внутріклітинного опромінення вторинними електронами, які утворюються у значній кількості в речовині при дії високоенергетичного випромінювання різних видів. Саме з повільними електронами з енергією (10^{-1} - 10^2) еВ пов'язують основні деструктивні зміни на молекулярному рівні біоб'єктів. При цьому головною мішенню стають генетичні макромолекули. Збудження, міграція енергії та іонізація молекул у біоструктурах зумовлюють радіаційні зміни у клітинах живих організмів.

По-друге, за допомогою монокінетичного пучка низькоенергетичних електронів регульованих енергій можна отримати фундаментальну інформацію не лише про оптично дозволені переходи між станами електронної системи молекул, але і про пряме збудження інтеркомбінаційних переходів. У результаті цього ефективно виникатимуть метастабільні триплетні стани молекул, які завдяки своїм фізичним особливостям відіграють виняткову роль у реалізації первинних фізичних стадій складних біологічних процесів (наприклад, біоенергетичних перетворень, фотосинтезу, ферментативного каталізу, а також деструктивних реакцій і навіть канцерогенезу). Не виключено, що ці взаємодії можуть стосуватися й такої унікальної проблеми, як абіогенний синтез біомолекул під впливом електронної похідної космічного випромінювання.

Ефективним способом вивчення механізмів таких процесів може бути фізичне моделювання передачі біосистемам певної кількості енергії від 0 до 20 еВ, тобто в області, де знаходяться нижні синглетні й триплетні збуджені рівні та потенціали (енергії) іонізації біомолекул. Тому для вирішення багатьох важливих завдань в області біофізики, медицини та екології необхідна інформація про молекулярні механізми впливу випромінювання малих енергій на біомолекули, особливо ДНК і РНК, які є носіями спадкової інформації.

Пріоритетні дослідження взаємодії низькоенергетичних електронів з біоструктурами розпочалися на фізичному факультеті Ужгородського державного (зараз національного) університету ще у 80-х роках минулого сторіччя [1, 2]. Слід відмітити, що на кафедрі біофізики університету вивчався також вплив високоенергетичних випромінювань на клітини і біомолекули [3, 4].

Як біологічно значимий об'єкт для низькоенергетичних взаємодій були вибрані азотисті основи нуклеїнових кислот, молекули яких виявилися оптимальною фізичною моделлю для таких дослідів [5]. Поступ у цьому напрямку зумовлений наступними методично-експериментальними досягненнями. Це, насамперед, розробка методики отримання біомолекул в ізольованому (газовому) стані. Такий підхід дозволяє вивчати явища, які реалізуються за прямим механізмом, тобто завдяки поглинанню енергії самими молекулами, що дає змогу зменшити вплив середовища і міжмолекулярних взаємодій. Наступні кроки – розробка способів формування молекулярних пучків і їх перетину з електронним пучком. Важливим етапом було удосконалення джерел електронів, що дало змогу отримати пучки електронів регульованих енергій з монокінетичністю 0,3-0,01 еВ. Так були створені передумови для прямого вивчення фізичних процесів, викликаних у біомолекулах електронним ударом в області енергій від десятих часток до десятків електронвольт.

Важливо відмітити, що перші презентації і обговорення отриманих результатів відбувались на біофізичних конференціях і з'їздах у місті Харкові. Автори з вдячністю згадують цінні консультації та допомогу, надану професором Юрієм Павловичем Благим і його колегами.

МАТЕРІАЛИ Й МЕТОДИ

Об'єктами дослідження були молекулярні компоненти нуклеїнових кислот – азотисті основи, нуклеозиди.

Застосовано комплекс методів: спектральний метод для отримання спектрів випромінювання (люмінесценції) збуджених молекул і для вимірювання функцій збудження (енергетичних залежностей перерізів збудження); електричний метод при визначенні повних перерізів утворення позитивних і негативних іонів та їх енергетичних залежностей; метод газофазної мас-спектрометрії з іонізацією електронним ударом для встановлення продуктів взаємодії повільних електронів з біомолекулами; оптичний метод для визначення концентрації молекул у пучку. Для досягнення мети та завдань досліджень більшість цих експериментів було проведено в умовах пучків електронів та молекул, що перетинаються. Такий підхід забезпечив мінімізацію впливу середовища на процес вимірів абсолютних значень перерізів іонізації молекул та гарантував високу точність і надійність отриманих результатів. Квантово-хімічні методи AM1, PM3 застосовано для розрахунків фізичних параметрів молекулярних складових нуклеїнових кислот.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

За допомогою оригінальних експериментальних методичних розробок вперше отримано інформацію про закономірності процесів збудження, іонізації та деструкції біомолекул азотистих основ нуклеїнових кислот повільними монокінетичними електронами в діапазоні енергій від 0 до 200 еВ. Основні результати опубліковано у серії робіт [5-30].

В експериментах з електронним пучком отримано спектри люмінесценції молекул нуклеотидних основ: цитозину, тиміну, урацилу, гуаніну та аденіну і продуктів їх дисоціативного збудження в області від 200 до 600 нм [5-11]. Досліджено енергетичні залежності перерізів збудження (функції збудження) спектральних молекулярних смуг у максимумі та проаналізовано їхні особливості: енергетичні пороги, форму функцій, положення максимумів. Показано наявність інтеркомбінаційних переходів з утворенням триплетних метастабільних станів молекул основ нуклеїнових кислот. Тобто виявлено пряме збудження електронним ударом триплетних метастабільних станів молекул нуклеотидних основ. На основі аналізу функцій збудження та іонізації, мас-спектрометричних вимірів та квантово-механічних розрахунків здійснено ідентифікацію інтенсивних смуг в емісійних спектрах молекул нуклеотидних основ. Показано, що найбільш інтенсивні смуги із максимумами при 275-290 нм зумовлені радіаційним розпадом першого збудженого електронно-коливного стану молекулярного іона в його основний стан. Більша частина спектральних артефактів пов'язана із процесами дисоціативного збудження.

Досліджено особливості процесів іонізації молекулярних компонентів нуклеїнових кислот електронним ударом. Так, експериментальним шляхом визначено абсолютні величини та енергетичні залежності повних перерізів утворення позитивних іонів (функції іонізації) молекул аденіну, гуаніну, цитозину, тиміну та урацилу в інтервалі енергій електронів від порогу процесу до 200 еВ [12-25]. У діапазоні енергій електронів 8-10 еВ виміряні енергетичні пороги утворення позитивних іонів (потенціали іонізації) для цитозину, тиміну, урацилу, аденіну та гуаніну. Максимальна ймовірність іонізації молекул спостерігалась в області 73-95 еВ і є дещо вищою для пуринових основ. На основі мас-спектрів, отриманих для азотистих основ нуклеїнових кислот, запропоновано схеми фрагментації молекул. Виміряно перерізи (ймовірності) утворення іонних фрагментів нуклеотидних основ та досліджено їхні залежності від

енергії електронів. Показано, що найбільші перерізи утворення $\sim 10^{-16} \text{ см}^2$ властиві молекулярним іонам.

Вивчено процес утворення негативних іонів молекулярних компонентів нуклеїнових кислот в інтервалі енергій електронів 0-12 eV [14, 19-21, 26-30]. У прямому експерименті визначено абсолютні величини та енергетичні залежності повних перерізів утворення негативних іонів молекул цитозину, тиміну, урацилу, аденіну та гуаніну. Показано, що процеси утворення негативних іонів при зіткненнях повільних електронів з молекулами нуклеотидних основ мають нелінійний резонансний характер і реалізуються при надзвичайно малих енергіях електронів 1-3 eV. На основі співставлення теоретичних розрахунків характеристик нейтральної та аніонної форм компонентів нуклеїнових кислот із експериментальними результатами визначено домінуючі канали дисоціації негативних іонів біомолекул. Аніоноутворення, яке моделює електронне захоплення, супроводжується збуренням коливної структури, що вказує на реалізацію у даних сполуках механізмів коливально-збудженого Фешбахівського резонансу.

Важливим є той факт, що у провідних наукових виданнях світу зростає низка публікацій вчених з відомих дослідницьких груп (див. наприклад [31-33]), що є ще одним вагогим доказом актуальності даної проблеми.

Фізичні процеси збудження, іонізації та фрагментації молекул [30], ініційовані впливом низькоенергетичних електронів (10^{-1} - 10^2 eV), у біоорганічних структурах можуть спричинити різноманітні біофізичні наслідки. Зокрема, електрони, руйнуючи молекули основ, викликатимуть появу точкових мутацій: делецій, трансверсій, транзицій, заміну кодонів. Порушення процесів транскрипції і трансляції може спричинити генотоксичні і мутагенні ефекти у клітинах, генетичні і соматичні зміни організму. Збільшення кількості іонізованих біомолекул та їх фрагментів підвищуватиме чутливість живих клітин до зовнішніх електромагнітних полів. Важливо, що найбільші перерізи утворення $\sim 10^{-16} \text{ см}^2$ при енергії електронів 70-95 eV властиві іонам цілих молекул основ, а не фрагментам. Це свідчить про відносну стабільність еволюційно вибраних молекулярних носіїв генетичної інформації.

ВИСНОВКИ

У статті представлено огляд результатів комплексного дослідження фізичних процесів і структурних змін, ініційованих у молекулярних складових нуклеїнових кислот повільними монокінетичними електронами енергіями від 0,1 eV до десятків електронвольт. Отримані результати мають пріоритетний характер. Так, вперше вивчено особливості збудження та іонізації молекул аденіну, тиміну, гуаніну, цитозину та урацилу електронним ударом. Виміряно енергетичні залежності перерізів (ймовірностей) цих процесів. Створено фізичні і математичні моделі для оцінки біофізичних наслідків низькоенергетичних взаємодій. Зокрема, показано, що електрони, змінюючи фізичну структуру нуклеотидних основ, навіть при невеликих енергіях можуть викликати появу точкових мутацій різних видів. Експериментально встановлений факт про резонансну деградацію біомолекул при припорогових електронних енергіях є перспективним для розробки нових методів радіосенсибілізації, для оптимізації радіотерапевтичних методик, цілеспрямованого радіаційного мутагенезу, для сучасних нанотехнологій.

ПОДЯКА

Автори з глибокою вдячністю згадують видатного біофізика, професора Юрія Павловича Благого – його цінні поради при обговоренні результатів наших перших


експериментів, науковій консультації та постійну підтримку нашого наукового напрямку. Назавжди залишаться у пам'яті світлі зустрічі і бесіди з Юрієм Павловичем і його дружиною – Вірою Володимирівною (кандидатом біологічних наук, талановитою художницею).


КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ


Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів.


Authors' ORCID ID

M.I. Sukhoviya  <https://orcid.org/0000-0003-0474-3293>

S.E. Birdus  <https://orcid.org/0000-0001-7299-3820>

M.I. Shafranyosh  <https://orcid.org/0000-0002-8556-2824>

Yu.Yu. Svida  <https://orcid.org/0000-0002-7800-5675>

I.I. Shafranyosh  <https://orcid.org/0000-0002-3113-8737>

REFERENCES

1. Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, I.I. (1980). Excitation of the nucleic acids bases by low-energy electrons. In *Mechanisms of radiation damage and restoration of nucleic acids* (p. 51). Pushchino-on-Oka. (in Russian)
2. Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, I.I. (1982). Peculiarities of the excited states formation of nucleic acid base molecules under slow electrons and laser radiation. *Abstracts of Papers. I Biophys. Congress. Moscow*, August 3-8, 1982. (Vol.4. p.76). (in Russian)
3. Sukhoviya, M.I. (1974). Dynamics of changes in the secondary luminescence of peripheral blood leukocytes after x-ray irradiation. *Radiobiology*, 14(3), 441-443. (in Russian)
4. Sukhoviya, M.I., Kovalchuk, A.V., Trifonov, E.N. (1975). Effect of ionizing electromagnetic radiation on DNA in solution and on white blood cells. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, 225(5), 1202-1205. (in Russian)
5. Sukhoviya, M.I., Slavik, V.N., Shafranyosh, I.I., Shimon, L.L. (1991). Peculiarity of the interaction of nucleic acid base molecules with of low energies electrons. *Biopolymers and Cell*, 7(6), 77-82. (in Ukrainian)
6. Sukhoviya, M.I., Voshchepinec, E.I., Shafranyosh, I.I., Shimon, L.L. (1996). Excitation and ionization of adenine by electron impact. *Biopolymers and Cell*, 12(3), 97-100. (in Ukrainian)
7. Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, M.I., Shafranyosh, I.I. (1999). Spectral investigation of the electron-impact excitation of the nucleic acid base molecules. In *Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions* (pp. 281-282). Kluwer Academic Publishers (Dordrecht / Boston/ London)
8. Shafranyosh, I.I., Sukhoviya, M.I. (2007). Excitation of thymine molecules in the gas phase by electron impact. *Optics and spectroscopy*, 102(4), 553-555. (in Russian)
9. Shafranyosh, I.I., Stecovich, V.V., Chavarga, M.M., Sukhoviya, M.I. (2012). Excitation of luminescence of uracil molecules by electron impact. *Optics and spectroscopy*, 112(1), 39-43. (in Russian)
10. Svyda, Ju.Ju., Shafranyosh, M.I., Sukhoviya, M.I., Chavarga, M.M., Shafranyosh, I.I. (2016). Luminescence of guanine molecules in the gas phase under the electron beam. *Uzhhorod University Scientific Herald. Series Physics*, (39), 106-110. (in Ukrainian)
11. Shafranyosh, I.I., Mitropolskij, I.E., Kuzma, V.V., Svyda, Ju.Ju., Sukhoviya, M.I. (2018). Electron-Impact Excitation of Uracil Luminescence on a Ceramic Surface. *Journal of Applied Spectroscopy*, 85(1), 32-36. (in Russian). doi: 10.1007/s10812-018-0607-7
12. Volkova, S.E., Nebesny, F.I., Slavik, V.N., Sukhoviya, M.I., Chavarga, M.M., Shafranyosh, I.I., Shimon, L.L. (1989). Mass spectrometry studies of nucleic acid bases. *Abstracts of Papers. Conf. on the application of mass spectrometry in biology and medicine*. Kharkov, 1989. (pp.109-110). (in Russian)
13. Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, I.I., Shimon, L.L. (1999). Investigation of the excitation and ionization of nucleic acid bases by electron impact. *Visnyk Kharkivskogo universytetu, №434, Biophysical bulletin*, 3(1), 39-41. (in Russian)
14. Shafranyosh, I.I., Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, M.I. (2006). Absolute cross sections of positive and negative ions production in electron collision with cytosine molecules. *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.*, (39), 4155-4162. doi: <http://dx.doi.org/10.1088/0953-4075/39/20/013>
15. Shafranyosh, I.I., Petrushko I.A., Slavik, V.N., Sukhoviya, M.I. (2000) .Structural changes of nucleic acid bases caused by low-energy electrons. *Uzhhorod University Scientific Herald. Series Physics*, (6), 259-263. (in Ukrainian)
16. Sukhoviya, M.I. (2001). Physical processes in biomacromolecules caused by electron impact and their biophysical role. *Visnyk Kharkivskogo universytetu, №2525, Biophysical bulletin*, 1(8), 34-36. (in Ukrainian)

17. Sukhoviya, M.I., Shimon, L.L., Shafranyosh, M.I., Margitych, M.O., Shafranyosh, I.I., (2006). Experimental determination of cross sections formation of the cytosine molecule positive ions and its fragments by slow electrons. *Visnyk Kharkivskogo universytetu, № 716, Biophysical bulletin*, 2(16), 19-24. (in Ukrainian)
18. Sukhoviya, M.I., Medulych, V.V., Shafranyosh, I.I. (2007). Ionization of uracil molecules by electron impact. *Uzhhorod University Scientific Herald. Series Physics*, (20), 46-49. (in Ukrainian)
19. Shafranyosh I.I., Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, M.I., Shimon L.L. (2008). Formation of positive and negative ions of thymine molecules under the action of slow electrons. *Technical Physics*, 53(12), 1536-1540. doi: 10.1134/S1063784208120025
20. Shvab, R.L., Shafranyosh, M.I., Stecovich, V.V., Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, I.I. (2009). Formation of positive and negative ions of adenine molecules caused by slow electrons. *Scientific Herald of Uzhhorod University. Series Physics*, (25), 195-201. (in Ukrainian)
21. Shvab, R.L., Mynda, V.V., Stecovich, V.V., Stukalov, O.M., Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, I.I. (2010). Experimental and quantum-chemical modeling of formation processes of positive and negative adenine ions by electron impact. *Cherkasy University Bulletin: Chemical Sciences*, (175), 54-57. (in Ukrainian)
22. Stecovich, V.V., Pavluchok-Gogorchak, O.V., Sukhoviya, M.I., Shvab, R.L., Shafranyosh, I.I. (2010). About radiobiological significance of slow electrons. *Uzhhorod University Scientific Herald. Series Biology*, (27), 198-201. (in Ukrainian)
23. Shafranyosh, I.I. and Sukhoviya, M.I. (2012). Inelastic collisions of the uracil molecules with electrons. *J. Chem. Phys.*, 137(18), 184303-1-184303-6. doi: 10.1063/1.4765307
24. Sukhoviya, M.I., Shafranyosh M.I., Chavarga M.M., Shafranyosh I.I. (2012). Electron impact ionization and excitation of uracil molecules. *Ukr. J. Phys.*, 57(7), 752-760
25. Shafranyosh, M.I., Zhygan, A.V., Svyda, Ju.Ju., Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, I.I., Minaev, B.F., Baryshnikov, G.V., Minaeva, V.A. (2014). Ionization of guanine molecules in collisions with electrons. *Uzhhorod University Scientific Herald. Series Physics*, (36), 137-143. (in Ukrainian)
26. Shafranyosh, I.I., Svyda, Ju.Ju., Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, M.I., Minaev, B.F., Baryshnikov, G.V., Minaeva, V.A. (2015). Absolute effective cross sections of ionization of adenine and guanine molecules by electron impact. *Technical Physics*, 85(10), 16-22. (in Russian). doi: 10.1134/S1063784215100278
27. Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, M.I., Margitych, M.O., Shafranyosh, I.I. (2005). Negative ions formation of the cytosine molecule by electron impact. *Biopolym. Cell.*, 21(6), 531-535. doi: 10.7124/bc.000711
28. Shafranyosh, M.I., Sukhoviya, M.I., Shimon, L.L., Shafranyosh, I.I. (2005). Absolute cross sections for the electron-impact formation of cytosine anions. *Tech. Phys. Let.*, 31(12), 1071-1073. doi: 10.1134/1.2150902
29. Shafranyosh, M.I., Sukhoviya, M.I., Shimon, L.L., Shafranyosh, I.I. (2008). Resonance formation of negative ions of uracil molecules. *Uzhhorod University Scientific Herald. Series Physics*, (23), 85-90. (in Ukrainian)
30. Minaev, B.F., Shafranyosh, M.I., Svyda, Ju.Ju., Sukhoviya, M.I., Shafranyosh, I.I., Minaev, B.F., Baryshnikov, G.V., Minaeva, V.A. (2014). Fragmentation of the adenine and guanine molecules induced by electron collisions. *J. Chem. Phys.*, 140(17), 175101-1-175101-15. doi: 10.1063/1.4871881
31. Aflatooni, K., Scheer, A.M., Burrow, P.D. (2006). Total dissociative electron attachment cross sections for molecular constituents of DNA. *J. Chem. Phys.*, 125(5), 054301-1 – 054501-5. doi: 10.1063/1.2229209
32. Huber, D., Beikircher, S., Denifl, M., Zappa, F., Matejcik, S., Märk, T.D. and Scheier, P. (2006). High resolution dissociative electron attachment to gas phase adenine. *J. Chem. Phys.*, 125(8), 084304-1-084304-7. doi: 10.1063/1.2336775
33. Van der Burgt, P.M., Finnegan, S. and Eden, S. (2015). Electron impact fragmentation of adenine: partial ionization cross sections for positive fragments. *Eur. Phys. J. D.*, 69(1), 173-181. doi: 10.1140/epjd/e2015-60200-y

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-07>

ВОСПОМИНАНИЯ О Ю.П. БЛАГОМ

Мое знакомство с Юрием Павловичем Благим началось в 1970 г. К этому времени во ФТИНТе в отделе Б.И. Веркина работала небольшая группа биологов и медиков, главной задачей которой было выделение (получение) образцов ДНК. После посещения Англии в 1967 г. Б.И. Веркин заинтересовался проблемами молекулярной биофизики и с присущим ему размахом решил развивать это направление во ФТИНТе. Были выделены большие финансовые средства и задействованы мощности в опытном производстве ФТИНТа для создания экспериментальной базы для биофизических исследований. Б.И. Веркин собирал во ФТИНТ специалистов, способных решать задачи в области молекулярной биологии и биофизики нуклеиновых кислот. С этой целью были приглашены: заведующий кафедрой генетики ХГУ – профессор В.Г. Шахбазов; биохимик – к.б.н. Г.Х. Божко; микробиолог – к.м.н. В.Н. Васильченко; биофизик-теоретик – к.ф.-м.н. В.И. Данилов (из Киева) и ряд молодых выпускников биологического и радиофизического факультетов ХГУ, среди которых был и я.

В январе 1970 г. были получены первые образцы растворов ДНК и Б.И. Веркин лично носил пробирку с ДНК по этажам ФТИНТа и настоятельно предлагал поместить эту пробирку в разные приборы и установки с целью изучения физических свойств ДНК. Этот «кавалерийский наскок» результатов не дал, но показал необходимость планомерных исследований ДНК. Б.И. Веркин, видимо, и ранее планировал создание нескольких отделов для этой цели. Перед ведущими специалистами в разных областях физики к.ф.-м.н. Ю.П. Благим и к.ф.-м.н. Б.Я. Сухаревским была поставлена задача возглавить отделы физики растворов ДНК и физики кристаллов ДНК.

К середине 1970 г. была завершена организация этих отделов, и началось формирование в них экспериментальной базы. Благодаря щедрому финансированию в короткий срок было закуплено уникальное оптическое и спектроскопическое оборудование. Опытное производство ФТИНТа смогло предоставить уникальное низкотемпературное оборудование. В отделе физики растворов ДНК, которым стал заведовать Ю.П. Благой, началось создание установок для изучения светорассеяния растворов ДНК, для спектрофотометрии растворов и низкотемпературной люминесцентной спектроскопии. Применение низких температур для исследования люминесценции ДНК и ее компонентов было обусловлено чрезвычайно низким квантовым выходом (10^{-6}) свечения ДНК при комнатных температурах. В то же время люминесцентные исследования давали информацию об электронной структуре ДНК. Благодаря накопленному в институте опыту экспериментальных исследований в отделе удалось довольно быстро создать уникальные экспериментальные установки и получить уже в 1971 г. первые интересные результаты. При этом Ю.П. Благой, являясь руководителем отдела, предоставил широкий простор для проявления инициативы и самостоятельности молодым ученым, что обеспечило возможность получения оригинальных результатов и возможность устанавливать контакты с ведущими учеными тогдашнего СССР. Были установлены контакты и обмен информацией о полученных результатах с учеными и конструкторами Москвы, Пущино, Ленинграда и Киева. Коммуникабельность и доброжелательность Ю.П. Благого позволяли на хорошем уровне поддерживать эти контакты в течение многих лет. Эти свойства характера впоследствии помогли Ю.П. Благому в работе партгором института.

При обсуждении новых результатов Ю.П. Благой проявлял тактичность и корректность по отношению к молодым сотрудникам. Он щедро делился своим опытом

и знаниями в области физики, терпеливо учил правильно писать и оформлять научные публикации.

Являясь изначально специалистом по термодинамике растворов, Ю.П.Благой в эти годы быстро осваивал новые для себя области науки – молекулярную биологию, биохимию, генетику. Этому способствовало также то, что жена Ю.П. Благого – Глущенко Вера Владимировна – была биологом.

Обладая большой эрудицией, Ю.П. Благой успешно осваивает новые разделы экспериментальной физики: УФ-, ИК- и КР-спектроскопию. С начала 70-х годов он начинает читать лекции на радиофизическом факультете ХГУ по специализации «биофизика». Успешная защита докторской диссертации по физике растворов сжиженных газов в 1971 г. позволила Ю.П. Благому сосредоточиться на задачах молекулярной биофизики. Благодаря творческой атмосфере в отделе шел поиск новых методов и усовершенствование ранее известных методов физики растворов и физики кристаллов биополимеров (методов рассеяния света, спектрофотометрии – обычной и дифференциальной, методов инфракрасной спектроскопии и низкотемпературной люминесценции). Шел поиск адекватных методов низкотемпературной люминесценции и объектов, среди которых были спиртовые и водные замороженные растворы компонентов нуклеиновых кислот, пленки и кристаллы компонентов нуклеиновых кислот, были попытки изготовить образцы для исследования низкотемпературных квазилинейчатых спектров.

Полученные экспериментальные результаты позволили Ю.П. Благому и его сотрудникам к середине 70-х годов полноценно участвовать во всесоюзных и международных конференциях, участвовать в организации всесоюзных конференций по спектроскопии биополимеров (всего было проведено 7 таких конференций), организовать школы-семинары по молекулярной биофизике (5 школ). Под руководством Ю.П. Благого были получены образцы с инверсной энергетикой спаривания азотистых оснований и проведены исследования фазовых переходов в квазиодномерных структурах, начаты работы по изучению фазовых переходов ДНК с ионами переходных металлов. В эти же годы началось изучение некоторых лекарственных препаратов и их взаимодействия с ДНК. Под руководством Ю.П. Благого были проведены работы по изучению с помощью люминесцентного зонда структурных переходов в растворах ДНК в интервале температур 4,2-293 К. Благодаря этим работам отдел был включен во Всесоюзную Программу «Геном человека».

Ю.П. Благой был высокообразованным человеком, настоящим интеллигентом, хорошо разбирался в изобразительном искусстве. Я вспоминаю его тонкие и квалифицированные замечания по поводу посещенных в командировках художественных выставок и музеев.

Несмотря на большую занятость, он продолжал заниматься спортом – играл в баскетбол, являлся заядлым туристом, участвовал в многочисленных экспедициях на Алтай. Ю.П. Благой проявлял постоянную заботу о своих сотрудниках. В течение многих лет он оказывал материальную и моральную помощь тяжело больному сотруднику.

Ю.П. Благой участвовал в работах по созданию аппаратуры для космических исследований. В частности, он участвовал в работе по созданию аппаратуры для изучения возможности жизни на Марсе.

Новую страницу в деятельности Ю.П. Благого открыли исследования в области низкотемпературной спектроскопии компонентов ДНК в условиях низкотемпературной матрицы инертных газов в 1980-1990 гг. Широкую известность получили работы по

низкотемпературным Фурье-спектрам компонентов нуклеиновых кислот, аминокислот и некоторых лекарственных препаратов.


Под руководством Ю.П. Благого в отделе было подготовлено и защищено более 10 кандидатских диссертаций, его бывшие аспиранты работают в разных странах Европы. За время пребывания Ю.П. Благого в должности заведующего отделом было защищено 2 докторских диссертации (В.А. Сорокин, Г.Г. Шеина), сам Ю.П. Благой являлся лауреатом Государственной премии Украины за цикл работ в области молекулярной биофизики.

Я, как и мои коллеги, на многие годы сохраню добрую память о замечательном человеке и выдающемся ученом Ю.П. Благом.

Ю.В. Рубин

*Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина
пр. Науки 47, Харьков, 61103, Украина*

e-mail: yuriv.rubin@gmail.com

 <https://orcid.org/0000-0002-7046-2193>

<https://doi.org/10.26565/2075-3810-2019-42-08>

ПАМ'ЯТИ ПРОФЕССОРА ЮРИЯ ПАВЛОВИЧА БЛАГОГО – ВОСПОМИНАННЯ КОЛЛЕГ ИЗ ЕРЕВАНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

В биографии крупных представителей науки важны не только реальные достижения данного ученого, но и его личность, черты его характера, отношение к окружающей жизни.

Многие ученые знают, что наиболее сильным впечатлением и стимулом в работе является соприкосновение с яркими представителями науки. И ее влияние сохраняется на протяжении всей нашей жизни, мы не можем недооценивать подобного влияния учителя на созданную им школу. Смерть налагает особый отпечаток на отношение к человеку: многое отступает на задний план и хочется говорить только о том, что было хорошее, великое в человеке. Между тем, воспоминания только тогда и ценны, когда они освещают человека всесторонне. Это возможно лишь тогда, когда жизнь человека рисуется с некоторого расстояния.

Юрий Павлович Благой – выдающийся ученый, с широким спектром научных интересов, включающих молекулярную физику, биофизику, молекулярные взаимодействия, кооперативные процессы и фазовые переходы в биополимерах. Нам наиболее близки его исследования в области физико-химических свойств комплексов природных и синтетических нуклеиновых кислот с ионами металлов, лекарственных веществ и красителей. Эти работы тесно соприкасаются с нашими работами, что и явилось основой личных контактов с Юрием Павловичем. Хотя наши встречи бывали нечастыми и непродолжительными, но, тем не менее, они оставили заметный след у нас и мы всегда с благодарностью и глубоким уважением вспоминаем его.

Профессионализм Юрия Павловича в науке, доброта и принципиальность в отношении к собеседнику мы ощутили с самых первых встреч с ним. Один из нас (Вардеванян П.О.) в полной мере ощутил эти качества Юрия Павловича, когда несколько раз встречался с ним и обсуждал результаты своих экспериментальных исследований по связыванию различных лигандов с ДНК. Аракелян В.Б. повезло еще больше. Он в самом начале своей научной карьеры практически сразу после окончания инженерно-физического факультета ХПИ непродолжительное время работал в отделе биофизики во ФТИНТ, руководимым Юрием Павловичем, где были созданы самые благоприятные условия для научной работы. А с Карапетяном А.Т. они были близкими друзьями и часто пересекались на различных конференциях.

Хочется вспомнить добрыми словами Юрия Павловича.

Вспоминает Валерий Б. Аракелян, профессор кафедры молекулярной физики физического факультета Ереванского государственного университета: «После окончания ХПИ я был зачислен на работу, на кафедру физики металлов. Моя работа на кафедре началась весьма успешно, за короткий промежуток времени с соавторами было напечатано несколько работ по тонким пленкам. Так что, скорее всего, меня ожидала вполне успешная научная карьера. Но я принял, на мой взгляд, авантюрное решение – бросить достаточно успешную работу и заняться биофизикой мембран. Сразу возникли проблемы – с кафедры меня отпустили с трудом, но еще сложнее было устроиться на работу, чтобы можно было заниматься биофизикой мембран. Но мне повезло, я встретил биолога В.Г. Шахбазова (ХГУ) и физика Ю.П. Благого (ФТИНТ), которые к тому времени успешно работали в области биофизики. К моему удивлению, они поддержали меня, хотя область их интересов прямо не была связана с биофизикой мембран. Юрий Павлович отнесся ко мне с исключительным вниманием и

доброжелательностью. Дал возможность войти в новую для меня область и время от времени контролировал мои «успехи». Его советы и помощь помогли мне, вселили в меня некоторую уверенность в том, что трудный выбор, который я сделал, перейдя в область биофизики, по-видимому, правильный. Много лет спустя, работая уже в ЕГУ, наши пути в науке с Юрием Павловичем снова пересеклись. Естественно, время от времени я обращался к Юрию Павловичу, как одному из активно работающих ученых в этой области, на предмет отзыва или мнения о той или иной работе. Всегда получал быстрый и высокопрофессиональный ответ».

Вспоминает профессор Погос О. Вардеванян, заведующий кафедрой биофизики биологического факультета Ереванского государственного университета: «Годы общения с Юрием Павловичем привели меня к очень важному для меня выводу. Для ученого фактор человеческого общения превыше всего. С Юрием Павловичем я имел честь и удовольствие общаться на конференциях в Харькове, в Тбилиси, в Кировакане (ныне Ванадзор). Будучи крупным ученым в области молекулярной биофизики, он был и остался для меня как человек большой души без искусственных условностей. Хочу вспомнить очень запавший мне в душу фрагмент моего общения с ним. После того как он был назначен моим оппонентом (защита моей докторской диссертации состоялась в конце февраля 1991 г в Тбилиси), я это известие передал по телефону ему. Он с удовольствием согласился, но попросил, чтобы я доложил у него на семинаре. Очень хорошо помню, что семинар был назначен на 21 января, а я прилетел в Харьков 20-го. В эти дни, как помните, произошла «знаменитая» павловская денежная реформа. И по прибытии в Харьков я оказался в несколько неловком положении. Вечером я был у себя в номере гостиницы, и вдруг стук в дверь. Моим гостем был сам Юрий Павлович. И та искренность, с которой он поддержал меня, освободив от тяжелого бремени «этих реформ» до сих пор свежа в моей памяти. Потом мы встретились с ним во время моей защиты в Тбилиси. И остались самые теплые воспоминания об этом Человеке».

Вспоминает Армен Т. Карапетян, профессор кафедры физики и электротехники Национального университета архитектуры и строительства Армении: «С Юрием Павловичем мы были большими друзьями. Много раз встречались на конференциях, семинарах, школах. Он был для меня человеком моего близкого круга общения. Пишу и вспоминаю: маленькая Армения ему очень понравилась, и он с любовью принимал участие в наших конференциях в Кировакане. И каждый раз приезжая к нам, он показывал, с какой любовью он это делает».

Нашу статью по влиянию адсорбции лигандов на выходной сигнал ДНК-биосенсора, которая по тематике перекрывается с исследованиями Юрия Павловича в области биофизики ДНК, мы также посвящаем памяти Юрия Павловича.

В.Б. Аракелян¹, П.О. Вардеванян¹, А.Т. Карапетян²

¹*Ереванский государственный университет, А. Манукяна 1, Ереван, 0025, Армения*

²*Национальный университет архитектуры и строительства Армении,*

Теряна 105, Ереван, 0009, Армения

e-mail: p.vardevanyan@ysu.am

Poghos Vardevanyan  <https://orcid.org/0000-0003-2541-9337>

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРІВ

В редакцію подається електронний варіант статті (MS Word 2007 і вище) українською, російською або англійською мовою через сайт журналу <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk> з направленням установи і експертним висновком у вигляді відсканованих файлів.

Текст набирається на аркушах формату А4 через один інтервал. Використовується шрифт Times New Roman 12 pt, вирівнювання тексту по ширині. Поля справа і зліва по 2,5 см, зверху – 3,5 см, знизу – 2 см. Математичні та хімічні символи вводяться до тексту статті за допомогою редактора MathType або Microsoft Equation. Рисунки, придатні до репродукції, у форматі *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png вставляються до тексту в межах площі сторінки, вказаної вище. Рисунки розміщувати в межах таблиці з прозорими зовнішніми границями у першому рядку, підпис та коментарі до рисунку – у другому рядку таблиці. Графіки будуються у програмних пакетах, призначених для обробки і візуалізації наукових даних: Origin, Mathcad тощо. Використання офісного пакету MS Excel для побудови графіків не допускається. Цифри і підписи на осях та надписах повинні мати шрифт 9 pt. Підписи під рисунками друкуються шрифтом 10 pt. Формули, таблиці й рисунки нумеруються послідовно арабськими цифрами, наприклад, (1); Табл. 1; Рис. 1.

На першій сторінці зверху на першому рядку в лівому верхньому куті наводиться УДК (курсив, 11 pt). Після пропуску одного рядка, розміщується назва статті (великі літери, прямий напівжирний шрифт, 12 pt, вирівнювання по центру). Після пропуску одного рядка набираються ініціали, прізвища авторів (прямий напівжирний шрифт, 12 pt, вирівнювання по центру). На наступному рядку розміщуються повні назви й адреси установ, де виконувалась робота, адреса електронної пошти автора – контактної особи (курсив, 10 pt, вирівнювання по центру). Потім вміщується дата надходження статті до редакції: число – цифрами, місяць – прописом, рік – цифрами (шрифт прямий, 10 pt, вирівнювання по центру). На наступному рядку вміщується дата прийняття статті до друку (заповнюється редколегією).

Після пропуску одного рядка вміщуються три реферати (українською, англійською, російською мовами). Реферат мовою статті розміщується першим. Перед другим та третім рефератами з нових рядків пишуться назви статей (великими літерами, шрифт прямий, 10 pt, напівжирний, вирівнювання по центру), ініціали та прізвища авторів (шрифт прямий 10 pt, напівжирний, вирівнювання по центру), назви організацій та їх адреси (курсив 9 pt., вирівнювання по центру). Реферат повинен бути структурованим та містити наступні частини з заголовками: **Актуальність, Мета роботи, Матеріали і методи, Результати, Висновки**, які починаються з нового рядка. Слова “Реферат” і “Abstract” не пишуться. Заголовки структурних частин пишуться напівжирним шрифтом, після заголовка ставиться крапка. Текст реферату складає не менше 1800 та не більше 2000 фонетичних символів, тобто без проміжків між словами; прямий шрифт 10 pt. Реферати двома іншими мовами також повинні мати обсяг не менше 1800 на не більше 2000 фонетичних символів. На наступному рядку вміщуються 5-8 ключових слів, які розділяються між собою крапкою з комою (10 pt – перший реферат, 9 pt – другий та третій реферати). З початку рядка великими літерами, шрифт напівжирний, пишеться заголовок з двокрапкою “**КЛЮЧОВІ СЛОВА:**”. Тексти рефератів і ключові слова мають ширину на 1 см меншу, ніж основний текст (по 0,5 см з кожного боку). Реферати розділяються одним пустим рядком.

Основний текст статті наводиться після пропуску одного рядка шрифтом Times New Roman (Cyr), 12 pt. Абзаци починаються з червоного рядка (0,75 см). Рекомендується розбиття статті на такі розділи: вступ (назва розділу не пишеться), **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** (обов'язково для експериментальних робіт), **РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ, ВИСНОВКИ**. Для теоретичних робіт передбачається більш вільне розташування матеріалу, наприклад, замість розділу **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** рекомендуються розділи **ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ, МОДЕЛЬ** та ін. Розділи не нумеруються, літери великі, напівжирні, вирівнювання по центру. При необхідності розділи поділяються на підрозділи. Назви підрозділів пишуться з великої літери і виділяються напівжирним шрифтом, вирівнювання по центру. Розділи або підрозділи розділяються одним пустим рядком. Після назв розділів і підрозділів крапка не ставиться. У кінці тексту статті після пропуску одного рядка у розділі **ПОДЯКА** зазначається назва фонду, який фінансував роботу, і номер гранту. Потім розміщується розділ **КОНФЛІКТ ІНТЕРЕСІВ**, у якому автори декларують наявність фінансових або інших конфліктів інтересів, які могли вплинути на результати, інтерпретацію та висновки дослідження. Якщо немає конфлікту інтересів, так і потрібно заявити: "Автори повідомляють про відсутність конфлікту інтересів". Потім розміщується розділ **Authors' ORCID ID**, у якому автори вказують адреси своїх профілів ORCID.

Літературні посилання нумеруються в порядку цитування в тексті, номер посилання пишеться у квадратних дужках. Не допускаються посилання на неопубліковані роботи, підручники та навчальні посібники. Список літератури (шрифт 10 pt.) розміщується за основним текстом статті, виділяється як розділ **REFERENCES** і оформлюється згідно з міжнародним стилем оформлення списку наукових публікацій **Vancouver**. Приклади оформлення бібліографічних посилань можна подивитись на сайті журналу у розділі «Керівництво для авторів»: <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions>.

Рукописи оформлені не у відповідності до наведених правил не розглядатимуться!

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Electronic files of the contributions (created in MS Word 2007 and later versions) written in English, Ukrainian or Russian, scans of the expert inference directive and directive from the author's institution should be sent to the Editorial Office online via the website <http://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk>.

A manuscript should be typed in single spacing on A4 paper. Use the MS Word with following options: 12 points Times New Roman font, text justified. Left and right margins should be 2.5 cm, the upper margin should be 3.5 cm, and bottom one should be 2 cm. Mathematical and chemical symbols, equations, and formulae should be inserted in the text by computer means (MathType or Microsoft Equation). Figures should be computer-generated in software packages intended for processing and visualization of scientific data: Origin, Mathcad, etc. The use of the MS Office Excel is not recommended. Use computer printed symbols for axes labeling. Insert prepared images into an MS Word file as files in *.emf, *.wmf, *.jpg, *.jpeg, *.png format within the area of the page specified above. We recommend the following layout: images are placed in the first row of the table with transparent outer borders, legends and comments to figures are placed in the second row of the table. The font size of figure legends should be 9 points. Formulae, tables, figures should be numbered consecutively using Arabic numerals, e.g. (1), Table 1, Fig 1.

Insert UDK in the first line on the left of a first page (11 pt, Italic). Leave one line blank. Place the title of the paper in capital letters (12 pt, bold, centered) on the next line. After one blank line type initials and surnames of the authors (12 pt, bold, centered). On the next line type the authors' affiliation and postal addresses of the institution where the actual work was done, including an e-mail address of the corresponding author (10 pt, Italic, centered). Then, place the date of the paper submission: day — in numbers, month — in words, year — in numbers (straight font, 10 pt, centered). Then, place the date of the paper submission (to be filled by editor).

After one blank line place three abstracts of the paper (written in Ukrainian, Russian and English). The first abstract should be written in the language of the manuscript. On the next line provide second, and then on the next line — third abstracts (capital letters, straight font, 10 pt, bold, centered). Above the second and third abstracts place the titles of the paper in two languages (capital letters, straight font, 10 pt, bold, centered), then — initials and surnames of the authors (straight font, 10 pt, bold, centered), and finally — the authors' affiliation names and addresses (9 pt, Italic, centered), every time starting from a new line. The abstract should be structured and consist of the following parts with headings: **Background, Objectives, Materials and Methods, Results, Conclusions**, each placed on a new line. The words "Резюме" and "Abstract" should be omitted. The headers of structural parts are written in bold letters, putting a dot after the header. All the three abstracts of the paper should contain not less than 1,800 and not more than 2,000 phonetic symbols (i.e., without taking into account the spacing between words); straight font, 10 pt. On the next line type 5-8 key words, separated by a semicolon (10 pt — first abstract, 9 pt — second and third abstracts). Next, the header "**KEY WORDS:**" should be typed in bold capital letters at the beginning of the line. The texts of the abstracts and key words should be indented 0.5 cm from the left and right margins. The abstracts should be separated by a blank line.

Then, leave one blank line before starting to type the text of the paper with following options: Times New Roman font, 12 pt, text justified. The first line of each paragraph should be indented 0.75 cm from the left margin. Each manuscript should contain the following elements: an introduction (heading of this section should be omitted), **MATERIALS AND METHODS** (obligatory for experimental studies), **RESULTS AND DISCUSSION**, **CONCLUSIONS**. For theoretical less specified text organization is envisaged, e.g., instead of section **MATERIALS AND METHODS**, the sections **PROBLEM FORMULATION** or **MODEL** are recommended, etc. The sections are not numbered, capital letters, bold, centered. Sections may be subdivided into subsections, if necessary. Subsection Headings are centered and should be bold and capitalized. Leave one blank line after each section or subsection. A dot should be omitted after headings of sections and subsections. Names of the foundations and grant numbers should be included in the section **ACKNOWLEDGMENTS** at the end of the text after one blank line. The next section should be **CONFLICT OF INTEREST** in which you should declare financial or any other conflict of interest. If there is no conflict of interest you can state: "The authors declare that there is no conflict of interest." The next section should be **Authors' ORCID ID** in which you should include ORCID internet addresses of all authors.

References to the literature should be cited in the text consecutively by Arabic numerals in square brackets. The citation of unpublished papers, textbooks and tutorials are prohibited. List of references (10 pt) should be given at the end of the manuscript as a separate section **REFERENCES**, formatted according to the **Vancouver** style for scientific publications.

The examples for reference formats are given on the journal's website in the "Author Guidelines": <https://periodicals.karazin.ua/biophysvisnyk/about/submissions>.

Manuscripts that do not meet the requirement mentioned above will not be considered for publication!

Наукове видання

“Біофізичний вісник”

Вип. 42

Збірник наукових праць

Укр., рос. та англ. мовами.

Комп'ютерне верстання к.ф.-м.н. Горобченко О.О.

Підписано до друку 04.06.2019. Формат 60×84 1/8.
Папір офсетний. Друк ризографічний.
Ум. друк. арк. 6,83. Обл.-вид. арк. 7,94. Наклад 60 пр.

61022, Харків, майдан Свободи, 4
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Надруковано: Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна
61022, Харків, майдан Свободи, 4, тел. +38-057-705-24-32
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 13.01.09