

На правах рукописи



**Елкина Анна Анатольевна**

**ВЛИЯНИЕ ИЗОТОПНОГО СОСТАВА СРЕДЫ НА ФИЗИЧЕСКИЕ  
ПАРАМЕТРЫ ГЕТЕРОГЕННЫХ СИСТЕМ**

Специальность 01.04.07 – Физика конденсированного состояния

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
кандидат физико-  
математических наук,  
профессор, профессор РАН  
Барышев Михаил Геннадьевич

Краснодар 2020

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1 Анализ влияния изотопного состава сред ( $^2\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{18}\text{O}$ , $^{25}\text{Mg}$ , $^{34}\text{S}$ и др.) на скорость химических реакций в гетерогенных системах.....	10
1.1 Исследование влияния стабильных тяжелых изотопов ( $^2\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{18}\text{O}$ , $^{25}\text{Mg}$ , $^{34}\text{S}$ и др.) на энергию химической связи в гетерогенных системах .....	10
1.2 Анализ физических эффектов, возникающих при модификации жидких сред в гетерогенных системах на примере молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты.....	14
1.3 Выводы к главе 1.....	24
Глава 2 Исследование процессов влияния некомпенсированного нейтрона на энергию химической связи между парами стабильных тяжелых изотопов ( $^2\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{18}\text{O}$ , $^{25}\text{Mg}$ , $^{34}\text{S}$ и др.) .....	25
2.1 Исследование особенностей фракционирования тяжелых нерадиоактивных изотопов ( $^2\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{18}\text{O}$ , $^{25}\text{Mg}$ , $^{34}\text{S}$ и др.) в жидких средах и гетерогенных системах.....	25
2.2 Изучение влияния изотопного состава сред на изменение энергии химической связи гетерогенной системы.....	31
2.3 Физико-математическое обоснование влияния некомпенсированного нейтрона на энергию ковалентной связи .....	39
2.4 Выводы к главе 2.....	57
Глава 3 Физико-математическое моделирование и исследование процессов влияния $^2\text{H}/^1\text{H}$ соотношения в гетерогенных средах на энергию разрыва водородных связей в двухцепочечной молекуле.....	59
3.1 Физико-математическая модель молекулы, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников и учитывающая энергию разрыва связи между комплементарными парами .....	59

3.2 Физико-математическое моделирование возникновения разрывов водородных связей между парами азотистых оснований в двухцепочечной молекуле в зависимости от изотопного $^2\text{H}/^1\text{H}$ состава сред.....	67
3.3 Исследование условий возникновения областей различной длины с деформированными водородными связями между парами азотистых оснований двухцепочечной молекулы .....	90
3.4 Выводы к главе 3.....	96
Глава 4 Практическое применение методов модификации изотопного состава сред.....	97
4.1 Методика исследования реактивности гетерогенных систем при модификации изотопного $^2\text{H}/^1\text{H}$ состава сред .....	97
4.2 Результаты исследования оптической плотности и энергетического запаса гетерогенных систем при модификации изотопного $^2\text{H}/^1\text{H}$ состава их внешней и внутренней сред .....	100
4.3 Выводы к 4 главе.....	104
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	106
Список использованных источников.....	108

## ВВЕДЕНИЕ

Научные тенденции последних лет направлены на поиск новых подходов в исследовании процессов фракционирования стабильных нерадиоактивных изотопов биогенных элементов (прежде всего  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{34}\text{S}$  и др.) в гетерогенных системах, а также анализ возникающих при этом изотопных градиентов во внешней и внутренней средах.

Известно, что возникающие колебания концентраций стабильных изотопов биогенных элементов с различным количеством нейтронов являются основой для возникновения термодинамических, кинетических и туннельных изотопных эффектов [1–2], сопровождающихся замедлением или ускорением физико-химических процессов, а также изменением функциональной активности гетерогенных систем [3]. При этом даже незначительное колебание изотопных соотношений в гетерогенных системах характеризуется достоверным изменением изотопного градиента на различных уровнях организации [4]. В частности, термодинамическая неравноценность изотопных соединений приводит к неравномерному распределению изотопов водорода [5]. Реакции изотопного обмена в гетерогенных системах сопровождаются изменением не только термодинамических (удельный заряд ионов), но прежде всего кинетических (коэффициент диффузии, скорость протекания химических реакций) показателей на молекулярном уровне.

В данном диссертационном исследовании показано, что изменение интенсивности изотопного воздействия на естественные гетерогенные системы происходит не только в зависимости от концентрации отдельных нерадиоактивных изотопов ( $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{67}\text{Zn}$ ), но также от их способности формировать определенные пары, например,  $^{17}\text{O}$ – $^2\text{H}$ ,  $^{18}\text{O}$ – $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ – $^{18}\text{O}$ ,  $^{12}\text{C}$ – $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ – $^2\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ – $^{18}\text{O}$ , что подтверждается различными работами [6–11]. Через химические связи вышеописанных пар реализуется помимо термодинамических и кинетических изотопных эффектов, нейтронное туннелирование, приводящее к появлению изотопного эффекта. Все это, в

совокупности с термодинамической и кинетической составляющими изотопного влияния на гетерогенную систему, обеспечивает существенные колебания ее функциональной активности при возникновении фракционирования ряда стабильных изотопов. Показано, что изменение скорости химических реакций, вызванные воздействием модификации изотопного ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{34}\text{S}$  и др.) состава внешней среды на гетерогенные системы обусловлены изменением энергии ковалентной связи в случае наличия нескомпенсированного нейтрона в паре ядер, которая в свою очередь будет зависеть от следующих факторов:

- валентные электроны взаимодействуют с магнитными моментами обоих атомов, образующих ковалентную связь, поэтому изменение любого из них приводит к изменению энергии химической связи;
- взаимодействие магнитных моментов ядер атомов, приводящее к изменению расстояния между ними;
- эффект влияния размеров ядра на энергию валентного электрона.

На примере математической модели, использующей аналогию между молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников, позволяющей исследовать ее динамику, обусловленную вращательным движением азотистых оснований вокруг пентозо-фосфатного двунитевого остова показано, что присутствие атома дейтерия в последовательности нуклеотидов приводит к изменению энергии водородных связей между парами азотистых оснований (от 0,3 до  $0,59 \cdot 10^{-22}$  Дж), которое может приводить – как к увеличению, так и уменьшению вероятности возникновения областей денатурации различной длины.

Таким образом, актуальность результатов, представленных в работе обусловлена необходимостью понимания физических механизмов влияния изотопов на гетерогенные системы.

**Цель диссертационной работы:** теоретическое и экспериментальное исследование влияния изотопного состава жидких сред на физические параметры органических соединений и гетерогенных систем.

Для достижения поставленной цели решены следующие **задачи:**

1. Теоретически исследованы процессы фракционирования тяжелых нерадиоактивных изотопов в гетерогенных системах.

2. Исследованы физические механизмы, обусловленные наличием нескомпенсированного нейтрона, возникающие при воздействии модифицированных по изотопному ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{34}\text{S}$  и др.) составу внешних сред на гетерогенные системы.

3. Исследована физико-математическая модель молекулярной динамики дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии с учетом энергии разрыва водородных связей.

4. Теоретически исследованы вероятности разрыва водородных связей по длине последовательности полипептидов, вызванные изменением частоты колебаний азотистых оснований вокруг сахаро-фосфатного остова при внедрении атомов  $^2\text{H}$  в водородные связи между парами азотистых оснований молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты. Проведены численные эксперименты по исследованию эффектов, вызванных внедрением атома дейтерия в водородные связи между парами азотистых оснований двухцепочечной молекулы.

5. Разработан экспериментальный метод практического применения модификации изотопного  $^2\text{H}/^1\text{H}$  состава внешней и внутренней сред гетерогенных систем.

**Научная новизна** диссертационной работы определяется основными результатами, приведенными ниже:

Впервые обнаружена следующая закономерность: возникновение изотопных эффектов в органических системах характерно в случаях, когда высока вероятность образования связей с количеством нейтронов больше, чем

протонов на нечетное число (нескомпенсированным нейтроном/нейтронами) или при наличии в системе химического элемента, имеющего нескомпенсированный нейтрон/нейтроны.

Впервые теоретически доказано, что физические процессы и эффекты, вызванные воздействием модификации изотопного ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{34}\text{S}$  и др.) состава внешних сред на гетерогенные системы обусловлены изменением энергии ковалентной связи в случае наличия нескомпенсированного нейтрона в паре ядер, которая в свою очередь будет зависеть от следующих факторов:

- валентные электроны взаимодействуют с магнитными моментами обоих атомов, образующих ковалентную связь, поэтому изменение любого из них приводит к изменению энергии химической связи;
- взаимодействие магнитных моментов ядер атомов, приводящее к изменению расстояния между ними (дано аналитическое решение);
- эффект влияния размеров ядра на энергию валентного электрона (дано аналитическое решение).

С помощью математической модели, использующей аналогию между молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников, позволяющей исследовать ее динамику, обусловленную вращательным движением азотистых оснований вокруг пентозо-фосфатного двунитевого остова показано, что присутствие дейтерия в последовательности нуклеотидов (изменение энергии водородных связей между парами азотистых оснований в диапазоне от 0,3 до  $0,59 \cdot 10^{-22}$  Дж) приводит – как к увеличению до 71%, так и уменьшению до 83% вероятности возникновения областей денатурации различной длины.

### **Практическая значимость работы:**

В работе показано, что интенсивность проявления изотопных эффектов изменяется в зависимости от их концентрации: при высоких концентрациях

изотопов ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{34}\text{S}$  и др.) преимущественно реализуются их термодинамические и кинетические эффекты (что характеризуется относительно невысокими различиями в скоростях фракционирования), тогда как при низких концентрациях ( $\pm 9,5\%$  от природного уровня) этих же изотопов возрастает вероятность образования резонансных пар с дальнейшим возникновением валентного изотопного нейтронного эффекта, позволяющего дополнительно реализовывать туннелирование, что приводит к появлению аномальных (или парадоксальных) изотопных эффектов в одних и тех же гетерогенных системах.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Установлено, что возникновение изотопных эффектов в гетерогенных системах характерно в случаях, когда высока вероятность образования связей с нечетным (1, 3, 5, 7 и т.д.:  $N_n - N_p = 2k + 1$ , где  $k \in Z$ ,  $n$  – нейтрон,  $p$  – протон) количеством нейтронов (нескомпенсированным нейтроном) или при наличии в системе химического элемента, имеющего нескомпенсированный нейтрон/нейтроны.

2. Установлено, что механизмом реализации нейтронного эффекта, является возможность спина нескомпенированного нейтрона влиять на реакционную способность химической связи, образуемой изотопами ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{34}\text{S}$  и др.), имеющими суммарную нескомпенсированность по нейтронам.

3. Присутствие атома дейтерия в водородных связях между парами нуклеотидов молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты приводит в зависимости от значения энергии разрыва водородной связи (в диапазоне от 0,3 до  $0,59 \cdot 10^{-22}$  Дж) – как к увеличению до 71%, так и уменьшению до 83% вероятности возникновения областей (длиной от 2 до 40 пар азотистых оснований) с разорванными водородными связями.

4. Подтверждено, что в зависимости от изотопного состава среды в диапазоне от 10 до 150 ppm по дейтерию изменяется уровень выделения  $\text{CO}_2$ .



### **Личный вклад автора**

Вклад автора в формулировку проблемы, в постановку задач исследований и интерпретации результатов является определяющим. Исследованы физические механизмы, возникающие при воздействии модифицированных по изотопному составу внешних сред на гетерогенные системы, обусловленные наличием нескомпенсированного нейтрона. Проведен анализ физических эффектов, возникающих при модификации жидких сред в гетерогенных системах. Исследованы условия возникновения областей различной длины с деформированными водородными связями между парами азотистых оснований двухцепочечной молекулы. Разработана методика воздействия изотопного состава среды на некоторые параметры гетерогенных систем.

### **Апробация результатов работы**

Основные результаты диссертационного исследования были доложены автором на следующих конференциях и семинарах: Всероссийская научно-практическая конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Технологический Форсайт 2.0» (Краснодар, 2016), VIII Международный конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения» (Санкт-Петербург, 2018), VII Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2020), XIV Международный Форум «РосБиоТех-2020» (Москва, 2020), III Всероссийская научная конференция «Физика водных растворов» (Москва, 2020).

### **Публикации**

Результаты диссертационного исследования опубликованы в 11 научных изданиях, в том числе 3 статьи в рецензируемых российских и международных изданиях из списка ВАК и наукометрических библиографических баз Scopus и Web of Science.

## **Структура диссертации**

Диссертация содержит введение, четыре главы, заключение, список цитированной литературы. Содержание диссертации изложено на 131 странице, включая 16 рисунков. Список цитируемой литературы представлен 224 источниками.

# Глава 1 Анализ влияния изотопного состава сред ( $^2\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{18}\text{O}$ , $^{25}\text{Mg}$ , $^{34}\text{S}$ и др.) на скорость химических реакций в гетерогенных системах

## 1.1 Исследование влияния стабильных тяжелых изотопов ( $^2\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{18}\text{O}$ , $^{25}\text{Mg}$ , $^{34}\text{S}$ и др.) на энергию химической связи в гетерогенных системах

Понимание механизмов возникновения изотопных эффектов представляет интерес для изучения особенностей фракционирования стабильных изотопов в гетерогенных системах [1–3].

Однако, несмотря на многочисленные экспериментальные данные о различном соотношении легких и тяжелых изотопов в гетерогенных системах [4, 5], нерешенным в отношении обмена стабильных нерадиоактивных изотопов ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{34}\text{S}$  и др.) остается вопрос, посвященный объяснению механизмов их полиизотопного воздействия. Решение данной задачи необходимо для прогнозирования конечных эффектов в гетерогенной системе, при естественных или искусственно создаваемых колебаниях изотопного состава, в том числе при создании различных способов полиизотопной коррекции метаболических нарушений [6, 7].

В связи с этим целенаправленное изменение соотношения тяжелых и легких изотопов во внутренних средах обеспечивает возможность превентивного повышения адаптационного потенциала гетерогенной системы за счет модификации интенсивности обменных процессов и структурных перестроек на различных уровнях [8].

Данный эффект объясняется ожидаемым положительным воздействием на гетерогенные системы путем уменьшения концентрации тяжелых изотопов, обладающих выраженными кинетическими изотопными эффектами [9].

Несомненно, крупным открытием является доказательство наличия парамагнитных изотопных эффектов у некоторых металлов, принимающих участие в катализе [10, 11]. В данных работах прежде всего показано изменение активности ферментов, регулирующих энергообмен и передачу

генетической информации в гетерогенных системах в зависимости от изотопного состава среды [12, 13].

Известно, что термодинамическая неравноценность изотопных соединений приводит к неравномерному распределению изотопов водорода. Реакции изотопного обмена в гетерогенных системах могут сопровождаться изменением не только термодинамических (удельный заряд ионов), но прежде всего кинетических (коэффициент диффузии, скорость протекания биохимических реакций) показателей на молекулярном уровне.

Известен межмолекулярный или изотопный эффект, обусловленный более устойчивым взаимодействием дейтерированной сольватирующей оболочки и непосредственно молекулы (например, дезоксирибонуклеиновой кислоты и др.) [14]. Данный изотопный эффект сопровождается снижением вовлеченности молекулы в химические реакции в связи с замедлением десольватации отдельных регулирующих участков молекул при переходе их в функционально активное состояние. При этом необходимо учитывать, что в гетерогенных системах наблюдается суммирование межмолекулярных и внутримолекулярных кинетических изотопных эффектов. Это обусловлено сложностью организации высокомолекулярных соединений (белков, нуклеиновых кислот), которые обладают высокой способностью к сольватации и, следовательно, к изотопному обмену водорода между диссоциирующими группами в макромолекуле и ее гидратационной оболочкой. Такие изменения приводят не только к модификации энергетического взаимодействия ферментов с субстратами (межмолекулярный эффект), но и сопровождаются различной скоростью внутримолекулярных конформационных перестроек. Например, вышеописанные вариации в комплексах фермент–субстрат или фермент–кофактор (фермент–кофермент) приводят к уменьшению времени отдельных этапов каталитических превращений или ускоряют восстановление фермента в активную форму по завершении отдельного каталитического цикла, повышая таким образом активность химических процессов [15, 16].

Наглядным примером изучения вышеуказанного влияния скорости химических процессов при различных соотношениях легких и тяжелых изотопов на функционирование гетерогенных систем является оценка интенсивности энергетического обмена в молекулах, позволяющая характеризовать результирующий эффект воздействия изотопных флуктуаций на метаболизм [17–19].

При этом замена дейтерия на протий приводит, по данным ряда исследований, к ускорению переноса протонов в молекулы и, следовательно, к усилению продукции отдельных субстратов, обеспечивая, в том числе, и более высокий энергообмен.

Влияние изотопного обмена на каталитические комплексы в некоторых органоидах может не только изменять интенсивность метаболических процессов на клеточном уровне, но и существенно модифицировать резистентность и/или реактивность гетерогенных систем в целом. Например, молекула, находящаяся в различном функциональном состоянии, характеризуется особым уровнем энергетических потребностей [20, 21], которые, в свою очередь, могут меняться в определенном диапазоне, модифицируя цепочки метаболических превращений с выраженной конкуренцией за пируватный фонд. Данная зависимость сопровождается изменением соотношений частей пируватного фонда, избирательно извлекающихся для энергетического потенциала и синтеза метаболитов, требующихся в данной ситуации, обуславливая селекцию изотопов [22].

В отдельных работах описано разнонаправленное воздействие реакций изотопного обмена на функциональную активность гетерогенных систем, их нативные свойства и структурную организацию [23–28]. Прежде всего это касается влияния пониженных (по отношению к природному уровню) концентраций тяжелых нерадиоактивных изотопов на гетерогенные системы [29]. Последнее нередко связано с традиционным объяснением кинетических изотопных эффектов, которое базируется на представлении об увеличении их выраженности, пропорциональном концентрации тяжелых изотопов. При

этом нередко не учитываются изотопные эффекты, связанные с целенаправленным понижением концентрации тяжелых нерадиоактивных изотопов по отношению к их природному содержанию, и изотопные эффекты, возникающие в сложноорганизованных гетерогенных системах при формировании различных изотопных градиентов [30].

Важным в такого рода научной работе представляется выбор объекта исследования, который бы позволял должным образом оценить всю многогранность влияния реакций изотопного обмена на гетерогенные системы. В связи с чем в научной литературе можно встретить исследования различных гетерогенных систем [31–35], что, однако, нередко представлено в дискретном виде.

## 1.2 Анализ физических эффектов, возникающих при модификации жидких сред в гетерогенных системах на примере молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты

Основная причина, по которой форма двухцепочечной молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты представляет собой двойную спираль, заключается в том, что такая форма более стабильна для сохранения генетической информации [36], что происходит за счет взаимодействий водородных связей между парными основаниями Уотсона-Крика (гуанин (G) - цитозин (C) и аденозин (A) - тимин (T)). Таким образом, кодирующие последовательности генов находятся внутри дуплекса дезоксирибонуклеиновой кислоты и, следовательно, плохо доступны для любого вида повреждений (например, от ионов  $\text{OH}^-$  и  $\text{H}_3\text{O}^+$  или мутагенов [37]).

Несмотря на то, что структура дезоксирибонуклеиновой кислоты в двойной спирали достаточно прочна, она является достаточно нестабильной для того, чтобы позволить раскрытие двойной спирали. Гибридизация и дегибридизация дезоксирибонуклеиновой кислоты являются

фундаментальными процессами. При естественных условиях самопроизвольное раскрытие происходит редко, но в момент, когда генетический код доступен для молекулярных механизмов, данную реакцию могут катализировать некоторые ферменты.

Вышеописанные процессы происходят во время транскрипции, репликации, рекомбинации, восстановления или связывания любого фермента на отдельных цепях. Например, полимеразы рибонуклеиновой кислоты способны считывать одноцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту. Открытие дезоксирибонуклеиновой кислоты обеспечивает доступ ферментов к её основаниям. Поэтому открытые состояния активно участвуют в специфических белковых взаимодействиях. В последнее время эта точка зрения получила прямые экспериментальные подтверждения [38, 39]. Кроме того, полное или частичное нарушение стэкинга при открывании дуплекса может существенно замедлять или полностью блокировать перенос в нём катион-радикалов. Перенос заряда в дезоксирибонуклеиновой кислоте играет важную роль не только в процессах мутагенеза [40–43] и канцерогенеза [41, 44], но и при репарации её повреждений [45–47].

Для инициации транскрипции требуется образование так называемой транскрипционной области с деформированными водородными связями в первом участке транскрипции. При достаточно высокой температуре (или достаточно низкой ионной силе), тепловая энергия способствует частичной или даже полной диссоциации пар оснований, явлению, называемому денатурацией дезоксирибонуклеиновой кислоты. Это свойство используется, например, в полимеразной цепной реакции (ПЦР), где дезоксирибонуклеиновая кислота денатурируется перед гибридизацией коротких последовательностей, которые затем удлиняются. Этот процесс проходит в течение нескольких десятков циклов.

Локальные разрывы водородных связей между парами азотистых оснований в дуплексе, обычно называемые областями денатурации, могут наблюдаться при любой температуре, однако при комнатной температуре, где

доля открытых пар оснований в двухцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислоте составляет  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  для пар А-Т [48-50], что на порядок меньше, чем для пар G-C и является достаточно редким явлением [51]. Вероятность их образования (и размер) становится больше с ростом температуры [51, 52], при этом, количество областей с деформированными водородными связями увеличивается при приближении к так называемой температуре денатурации или плавления (точно определяется как середина перехода, в момент, когда одна половина пар оснований денатурирована). Из-за неоднородности последовательностей, в сегментах с высоким содержанием А-Т наблюдается меньшая стабильность, чем в сегментах с высоким содержанием G-C, первые имеют тенденцию плавиться при более низких температурах [53]. Как следствие, в макромолекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты могут наблюдаться спонтанные области возникновения открытых состояний при физиологических температурах в участках, из-за тепловых колебаний богатых А-Т парами [44]. Раскрытие дуплекса также может происходить в случаях, когда молекула сильно изогнута [54] или суперскручена [55].

Со времени открытия Уотсоном и Криком в 1953 г. трехмерной структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты [56] внутренняя динамика дезоксирибонуклеиновой кислоты с двойной спиралью стала предметом многих теоретических и экспериментальных исследований с физической точки зрения. Внутренняя динамика дезоксирибонуклеиновой кислоты соответствует либо переходу дезоксирибонуклеиновой кислоты из денатурированного в дуплексное состояние, либо переходу из дуплекса в одноцепочечное состояние или диффузии областей денатурации. Понимание внутренней динамики дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии, считается первым шагом перед тем, решать всю проблему динамики в нуклеосоме или хроматине, где белки, связанные с дезоксирибонуклеиновой кислотой (например, гистоны) являются еще более сложными задачами [36]. Многие белки взаимодействуют с двухцепочечной



дезоксирибонуклеиновой кислотой. Некоторые из этих комплексов белок-дезоксирибонуклеиновая кислота связаны с открытием двойной спирали.

Помимо упомянутой выше полимеразы рибонуклеиновой кислоты, инициировать процесс возникновения областей с деформированными водородными связями могут также полимеразы дезоксирибонуклеиновой кислоты, играющие центральную роль в ее репликации, ферменты, действующие в гомологичной рекомбинации [36], такие как RecA в бактериях или RAD51 у людей, а также одноцепочечные связывающие белки, необходимые для сохранения генетической информации [57].

Однако, даже *in vitro*, где дезоксирибонуклеиновая кислота изолирована, с экспериментальной точки зрения многие вопросы остаются открытыми. Разработка надежных теоретических моделей в корреляции с экспериментальными работами [37] может помочь разграничить различные механизмы при изучении кинетики сопряжения оснований.

С теоретической точки зрения, многообразие этих квазиодномерных динамических систем обусловлено:

1. Взаимодействием между соседними парами оснований, которое способствует резкому пересечению (в пределах нескольких Кельвинов) между закрытым и открытым состояниями при дестабилизации нуклеиновых оснований путем повышения температуры выше температуры плавления.

2. Значительно меньшим модулем изгиба и кручения области с деформированными водородными связями дезоксирибонуклеиновой кислоты по сравнению с двойной спиралью дезоксирибонуклеиновой кислоты, который эффективно связывает пары оснований и конформационные цепи, увеличивает энтропию в денатурированном состоянии и, таким образом, дестабилизирует дуплексное состояние при достаточно высоких температурах [58-60].

3. Спиральным характером молекулы в ее дуплексном состоянии, которая дополнительно стабилизируется посредством геометрической запутанности и, кроме того, может быть сверхскрученной. Это обеспечивает

дополнительный способ перехода от закрытого к денатурированному состоянию, особенно часто наблюдаемом в природе [20], например, путем активного приложения крутящего момента к молекуле через специализированные ферменты [36, 61] или с помощью отрицательно суперспирализирующихся хромосом и плазмид [22, 62, 63].

#### 4. Гетерогенностью генетических последовательностей.

Несмотря на то, что обе нуклеиновые кислоты имеют много общего, кинетика спаривания оснований Уотсона-Крика в молекулах дезоксирибонуклеиновой кислоты относительно проще, чем в рибонуклеиновой кислоте, поскольку представляет собой двойную спираль, тогда как вторичные и третичные структуры рибонуклеиновой кислоты могут быть гораздо более сложными [36, 64].

Молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты также обладает вторичными структурами, отличными от простой двойной спирали (например, тройными или четырехкратными спиралями [22, 65-67]). При этом динамика спаривания оснований дезоксирибонуклеиновой кислоты остается весьма сложной в связи с взаимодействием между внутренней (пара-основание) и внешней (конформация цепи) степенями свободы в дуплексном состоянии. Архивирование дезоксирибонуклеиновой кислоты также имеет некоторые сходства с переходом от спирали к спирали [68], хотя в этом случае задействован только один полимер.

Механизмы вариаций пар оснований дезоксирибонуклеиновой кислоты в последнее время вызывают особый интерес в области нанотехнологий [69-73]. Кроме того, как вид исследования вызывает интерес флуоресцентная корреляционная спектроскопия, которая широко используется в химической физике. Общий принцип этого метода – регистрация флуоресценции очень небольшой части объема раствора как функции времени [74]. В каждый момент значение сигнала пропорционально количеству флуоресцентных молекул в объеме пробы, которое колеблется около определенного среднего значения. Из-за того, что объем невелик, относительные колебания сигнала

достигают значительного значения. Основные причины флуктуаций сигнала - химические переходы частиц в неизлучающее состояние и наоборот, а также диффузия молекул по объему образца. Построив автокорреляционные функции, можно найти временной масштаб этих процессов. Таким образом, флуоресцентная корреляционная спектроскопия позволяет получать данные о кинетике химических реакций в растворе, коэффициентах диффузии и равновесных концентрациях молекул [74].

Первые исследования поведения денатурации дезоксирибонуклеиновой кислоты с помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии были выполнены Бонне Г. С коллегами [75]. В их работе изучалась кинетика денатурации специфических структур типа 5'-СССAA-(B)<sub>n</sub>-TTGGG-3'. Результатом исследований стали структуры, названные «молекулярными маячками» [75].

Существуют две категории областей с деформированными водородными связями, которые необходимо четко разделять: переходные области с деформированными водородными связями (открытие нескольких пар оснований, за которым следует ренатурация) и метастабильные области с деформированными водородными связями (цепь успевает прийти в равновесие после открытия области с деформированными водородными связями перед ее повторным закрытием).

Измеряя обмен амино-протонами с водой с помощью протонного ядерного магнитного резонанса в близких к физиологическим условиям [49, 50] в 2000 году были обнаружены две различные временные шкалы, связанные с временем жизни открытых пар А-Т в коротких дуплексах [41]. Первые находятся в наносекундном диапазоне, как и показано в более ранних работах [37, 48, 49, 76]. Эти эксперименты также показали существование более длинных открытых состояний с временем жизни в микросекундном диапазоне, число которых составляет менее 10% от общего количества образующихся областей денатурации. Предположительно более короткие времена жизни соответствуют переходным областям с деформированными

водородными связями, тогда как более длинные должны соответствовать метастабильным областям с деформированными водородными связями.

К. Фелпс с коллегами [77] измерили временные интервалы образования областей с деформированными водородными связями, равные 200 мс, с использованием одно-молекулярного переноса энергии резонанса и линейного дихроизма. Они объясняют тот факт, что время жизни областей с деформированными водородными связями было в 5 раз больше, чем у Альтан-Бонне Г. [77], различием между схемами маркировки, использованными в двух исследованиях.

В этих различных контекстах дезоксирибонуклеиновая кислота может быть исследована теоретически на более или менее высоком уровне. Более реалистичные описания принадлежат атомному моделированию с явным или неявным растворителем. Однако в контексте молекулярной и клеточной биологии, где часто используются сложные механизмы, одним из ограничений таких подходов является то, что ключевые степени свободы, связанные с данным процессом, не всегда легко идентифицировать среди атомистических деталей и физического понимания.

Существует важное отличие между квазистатическими и не равновесными процессами [78]. В первом случае большинство степеней свободы рассматриваются как переменные, которые могут быть предварительно усреднены в эффективной свободной энергии, зависящей только от нескольких переменных. Такое приближение оказывается неуместным для динамики спаривания оснований дезоксирибонуклеиновой кислоты, особенно в том, что касается ориентационных степеней свободы цепи.

После открытия Уотсоном, Криком и Франклином в 1953 году структуры двойной спирали дезоксирибонуклеиновой кислоты, в научных работах была предложена последовательность мезоскопических моделей с основной целью описания равновесных термодинамических свойств

дезоксирибонуклеиновой кислоты перед рассмотрением динамических моделей.

В 1960-х годах первые физические мезоскопические модели были основаны на одномерной модели физики твердого тела Изинга [79]. Они показали, что базовая пара может быть либо открытой, либо закрытой, что приписывает булеву переменную каждой базовой паре. В такой модели дезоксирибонуклеиновая кислота рассматривается как лестница, ступеньки которой представляют собой водородные связи между парами оснований, разорванные либо неразорванные. В связи с чем, на этом уровне моделирования спиральность является вторичной. Связывание между соседними парами оснований объясняет их кооперативность, которая следует из суммирования взаимодействий между последовательными циклами вдоль одной и той же цепи. Расчеты показывают, что в отсутствие кооперативности, переход происходит более чем на 50 Кельвинов, что явно противоречит экспериментам. Как и ожидалось, кооперативность сужает переход до нескольких Кельвинов, но при этом, переход не может быть термодинамическим, поскольку речь идет о одномерной системе с короткодействующими взаимодействиями.

Чтобы сделать шаг вперед в процессе физического моделирования, было разработано множество механических мезоскопических моделей [80], в которых дезоксирибонуклеиновая кислота рассматривается как прямая цепь масс (точек, сфер или дисков), соединенная линейными или крутильными пружинами. Среди этих моделей следует различать линейные физические и нелинейные физические модели. Как показала в своей работе Якушевич Л.В. [80], процессы диссипации могут полностью игнорироваться в механических моделях.

Нелинейные модели широко изучались в контексте дезоксирибонуклеиновой кислоты. Первые работы были посвящены моделям с одним основанием, в котором потенциал между последовательными мономерами был выбран неквадратичным для продольной [81], поперечной

[82] или изогнутой мод [83]. Однако, основной интерес нелинейных моделей заключается в том, что большие отклонения оснований и, следовательно, неспаренность пар оснований, могут быть доступны при надлежащем моделировании взаимодействий между основаниями двух отдельных цепей. Принимая простые двухчастичные потенциалы, аналитические решения возникают в виде солитонов по аналогии с механическими солитонами в цепях маятника, как впервые показали Энгландер С. [84] и Скотт А. [85].

Одна из наиболее известных двойных палочковидных моделей, приводящих к солитонным решениям, связана с тем, что вклад в раскрытие пары оснований происходит от вращательных движений оснований вокруг основания. Таким образом, важными переменными являются степени свободы основных мономеров относительно оси вращения, параллельной оси дуплекса [80, 86-90].

Несколько расширений были разработаны в последние годы [91-96]. Одним из недостатков этих моделей является то, что не допускаются крупные колебания межцепочечного разделения (расстояние между остовами цепей поддерживается постоянным), что затрудняет надлежащее описание всех областей с деформированными водородными связями. Кроме того, число эффективных параметров может стать очень большим, когда модель будет изменена, что делает их оценку на практике затруднительной.

В альтернативной модели, предложенной Пейрардом М. и Бишопом А., а затем расширенной Дауксуа Т. с соавт. [97, 98] вращательное движение оснований игнорируется, и раскрытие пар оснований моделируется путем растяжения водородных связей, где существенной переменной, является расстояние между двумя основаниями. Две нити также должны оставаться параллельными.

Динамика такой системы широко изучалась численно с использованием моделирования молекулярной динамики в сочетании с термостатом Носа или моделирования Ланжевена [99-101]. Они показывают небольшие области нескольких пар оснований, где расстояние между парами оснований достигает

большой амплитуды, которые были названы бризерами. Авторы предположили, что эти бризеры могут быть предшественниками областей денатурации, наблюдаемых в экспериментах.

Кроме того, используя экспериментальные данные стековых взаимодействий из термодинамических расчетов, были исследованы другие типы нелинейных связей [99, 102, 103].

Если структура характеризуется двумя состояниями, обычно одно соответствует состоянию равновесия, а другое – метастабильному состоянию, то динамику можно изучать в плоскости процесса диффузии низкоуровневой равновесной свободной энергии. Этот подход оказался эффективным при изучении сворачивания/разворачивания маленьких шпилек дезоксирибонуклеиновой кислоты в рамках приближения двух состояний.

Была рассмотрена ренатурация молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты, начинающаяся в любом месте молекулы и заканчивающаяся на одном из ее концов, предполагая, что нуклеация - редкое событие и при комнатной температуре происходит в молекуле только один раз. Как только конечность достигнута, закрытие происходит мгновенно. Однако, возможно, что застегивание начинается на двух удаленных участках, в частности, если один начинается только с частично денатурированного дуплекса. В этом случае закрытие заканчивается на участке, расположенном в середине цепочки. Открытие двойной спирали для транскрипции или дубликации также отвечает за пузырьки, локализованные в середине молекулы.

Проблема закрытия большой ( $> 7$  п.н.) области с деформированными водородными связями при комнатной температуре ( $T < T_m$ ) недавно была решена с помощью броуновского моделирования и метадинамики [104] на спиральной мезоскопической модели [105, 106]. Было продемонстрировано, что как только далекое от равновесия застегивание почти достигается, когда размер области с деформированными водородными связями достигает порядка постоянной длины одноцепочечной дезоксирибонуклеиновой кислоты, изгибающие и торсионные силы начинают конкурировать с силой,

провоцирующей закрытие [106, 107], из-за ограничений связи с обеих сторон области с деформированными водородными связями. После перехода в метастабильный режим моделирование показывает, что время закрытия области с деформированными водородными связями растет экспоненциально с увеличением модуля крутильности. Таким образом, закрытие метастабильной области с деформированными водородными связями, является общим механизмом, при котором область с деформированными водородными связями скручивается, пока пары оснований закрываются [105].

### 1.3 Выводы к Главе 1

1. Проведен анализ влияния физических параметров на скорость химических реакций в конденсированных средах и гетерогенных системах, установлено, что актуальной задачей является выявление закономерностей формирования физических механизмов и эффектов при полиизотопном взаимодействии макро- и микроэлементов в гетерогенных системах.

2. Анализ научной литературы, посвященной исследованию процессов динамики дезоксирибонуклеиновой кислоты и образованию областей денатурации, показал, что для получения более полных данных о возможных мутациях дезоксирибонуклеиновой кислоты необходимо построить математическую модель, учитывающую колебательную динамику дезоксирибонуклеиновой кислоты и влияние  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -обмена на вероятность образования областей денатурации.



## Глава 2 Исследование процессов влияния некомпенсированного нейтрона на энергию химической связи между парами стабильных тяжелых изотопов ( $^2\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{15}\text{N}$ , $^{18}\text{O}$ , $^{25}\text{Mg}$ , $^{34}\text{S}$ и др.)

2.1 Исследование особенностей фракционирования тяжелых нерадиоактивных изотопов ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ) в жидких средах и гетерогенных системах [121]

Термодинамическая неравноценность изотопных соединений приводит к неравномерному распределению изотопов водорода при достижении равновесия в результате реакций изотопного обмена ( $^2\text{H}/^1\text{H}$ ) между клетками, а также к преимущественному накоплению одной из изотопных форм в интрацеллюлярном или межклеточном пространствах. Реакции изотопного обмена в гетерогенных системах могут сопровождаться изменением не только термодинамических (коэффициент диффузии, удельный заряд ионов), но прежде всего кинетических (скорость протекания химических реакций) показателей на молекулярном уровне. Известно, что замена дейтерия на протий в высокомолекулярных соединениях не всегда существенно сказывается на их термодинамическом состоянии. Тем не менее, в ряде работ описан межмолекулярный или несвязанный изотопный эффект, обусловленный более устойчивым взаимодействием дейтерированной сольватирующей оболочки и молекулы, сопровождающиеся снижением их вовлеченности в биохимические реакции в связи с замедлением десольватации отдельных регулирующих участков молекул при переходе их в функционально активное состояние [35]. Однако, избирательные изменения в активных и аллостерических центрах ферментов, связанные с обменом изотопов водорода в составе легко диссоциирующих групп (гидроксильных (-OH), тиоловых (-SH), первичных и вторичных аминогрупп (-NH<sub>2</sub>, =NH)), увеличивающие содержание протия, изменяют скорость каталитических процессов, за счет снижения энергии активации переходных состояний

молекулы в ходе осуществления реакций катализа. При этом необходимо учитывать, что в гетерогенных системах будет наблюдаться суммирование межмолекулярных и внутримолекулярных кинетических изотопных эффектов, что обусловлено сложностью организации высокомолекулярных соединений, обладающих высокой способностью к сольватации, а, следовательно, к изотопному обмену водорода между диссоциирующими группами в макромолекуле и ее гидратационной оболочкой. Такие изменения приводят не только к модификации энергетического взаимодействия ферментов с субстратами (межмолекулярный эффект), но и способны сопровождаться различной скоростью внутримолекулярных конформационных перестроек, например, в комплексах фермент-субстрат или фермент-кофактор(-кофермент), что ведет к уменьшению времени отдельных этапов каталитических превращений или ускорению восстановления фермента в активную форму по завершении отдельного каталитического цикла, повышая таким образом активность физических и химических процессов.

Необходимо отметить, что первичный кинетический изотопный эффект характеризуется возрастанием энергии ( $E$ ) разрыва для связей, образованных более тяжелыми изотопами, например,  $E_{\text{разрыва(A-D)}} > E_{\text{разрыва(A-H)}}$ . В некоторых исследованиях предпринимаются попытки экстраполяции данных, полученных *in vitro* на гетерогенные системы [15, 16].

Примеры особенностей фракционирования различных изотопов, в том числе кислорода и водорода, в химических реакциях представлены ниже и объясняют возможности их локального неравномерного распределения не только внутри каких-либо частей целой системы, но и внутри отдельных клеток и даже органоидов, имеющих относительно изолированные компартменты (рисунки 2.1-2.3).

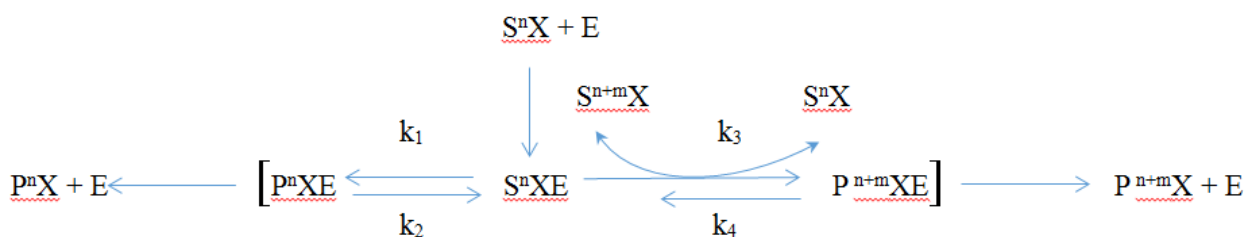


Рисунок 2.1 – Фракционирование изотопов (атомная масса  $^{n+m}\text{X} >$  атомная масса  $^n\text{X}$ ) наблюдается при  $k_1 \approx k_2$ ;  $k_3 \gg k_4$ ;  $k_3 \gg k_1$ .

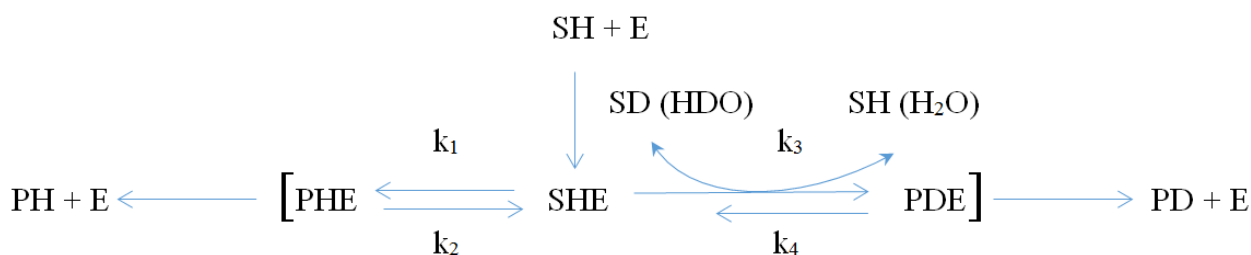


Рисунок 2.2 – Фракционирование дейтерия при  $k_1 \approx k_2$ ;  $k_3 \gg k_4$ ;  $k_3 \gg k_1$

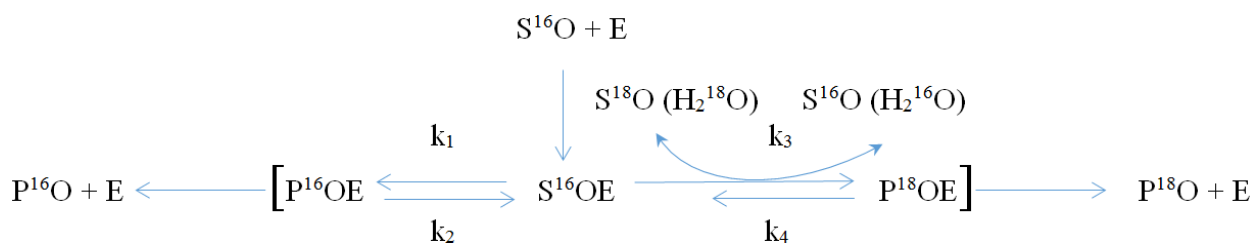
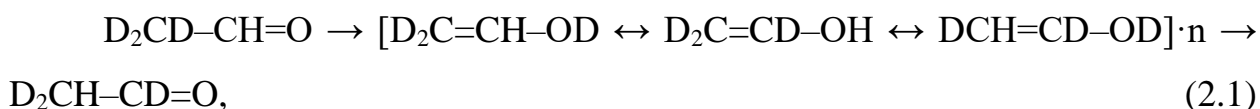


Рисунок 2.3 – Фракционирование изотопа кислорода-18 при  $k_1 \approx k_2$ ;  $k_3 \gg k_4$ ;  $k_3 \gg k_1$ .

Фракционирование изотопов в ферментных системах реализуется в возбужденных фермент-субстратных комплексах (типа  $\text{S}^n\text{XE}$ , рисунок 2.1), когда величина энергии, необходимая для замещения легких изотопов на тяжелые значительно снижается. При этом, в случае более энергетически выгодного распада фермент-субстратного комплекса с тяжелыми изотопами будет наблюдаться существенное смещение реакции в сторону образования продукта, содержащего тяжелый изотоп ( $\text{P}^{n+m}\text{X}$ ). Особенно это выражено при наличии обратимости переходного состояния в системе  $[\text{P}^n\text{XE} \leftrightarrow \text{S}^n\text{XE}]$ , когда скорость прямой и обратной реакций будут одинаковыми, но значительно меньшими, чем прямая реакция в переходном состоянии системы  $[\text{S}^n\text{XE} \leftrightarrow$

$P^{n+m}XE$ ], что в целом приведет к достоверному увеличению концентрации тяжелого изотопа в продуктах химической реакции. Описанные механизмы подтверждаются наличием выявленных аналогичных внутримолекулярных перестроек (быстрая изомеризация кетоенола) при фотодиссоциации ацетальдегида, обогащенного по дейтерию ( $CD_3CHO$  [108]):



где  $n \geq 20$  (количество изомеризаций кетоенола)

Учитывая, что энергия, необходимая для внутримолекулярных перестроек в фермент-субстратном комплексе, ниже, чем энергия, требующаяся для изомеризации кетоенола, вероятность фракционирования тяжелых изотопов значительно возрастает пропорционально количеству перестроений в системе  $[P^nXE \leftrightarrow S^nXE]$ , что указывает на высокую вероятность фракционирования тяжелых изотопов в естественных условиях.

Следует отметить, что дополнительная возможность фракционирования наблюдается для тяжелых изотопов водорода и кислорода в составе возбужденного фермент-субстратного комплекса за счет связывания  $^2H$  и  $^{18}O$  из растворителя (воды –  $HDO$  [14, 109, 110] или  $H_2^{18}O$ ), в котором протекают все химические процессы (рис. 2.2 и 2.3). Последнее может приводить к более значительному и распространенному фракционированию этих изотопов в гетерогенных системах [111-114].

Наглядным примером изучения вышеуказанного влияния скорости химических процессов при различных соотношениях легких и тяжелых изотопов на функционирование органоидов и субклеточных структур является оценка интенсивности энергетического обмена в митохондриях, позволяющая характеризовать результирующий эффект воздействия изотопных флуктуаций на метаболизм [17-19]. При этом замена дейтерия на протий приводит по данным ряда исследований к ускорению протонных потоков в митохондрии и,

следовательно, к усилению продукции отдельных субстратов, обеспечивая, в том числе, и более высокий энергообмен, повышая тем самым резистентность клетки к неблагоприятному внешнему или внутреннему воздействию. Влияние изотопного обмена на каталитические комплексы в некоторых органоидах изменяет не только интенсивность метаболических процессов на клеточном уровне, но и существенно модифицирует резистентность и/или реактивность ткани в целом.

Последнее объясняется тем, что одной из ключевых особенностей метаболизма в эукариотических клетках является компарментализация реакций, протекающих в различных органеллах, наиболее критичное влияние изотопного  $^2\text{H}/^1\text{H}$  обмена будет характерно для митохондрий, генерирующих и использующих универсальные восстановительные субстраты, которые широко участвуют в окислительно-восстановительных реакциях как самого органоида, так и цитозоля, поддерживая синтез, редокс-гомеостаз, обеспечивая трансдукцию внутриклеточных сигналов, генерацию аденозинтрифосфата и др. При этом, атомы дейтерия, присутствующие, например, в составе углеводов, в результате метаболических превращений, связанных с системой  $\text{NADH}_2$  и  $\text{NADPH}+\text{H}$  могут мигрировать из цитозоля и обратно, включаясь в состав аминокислот, жирных кислот, пентозофосфатного остова нуклеиновых кислот, обогащая таким образом пул тяжелых изотопов в органических соединениях, что также представляет собой частный случай  $^2\text{H}/^1\text{H}$  фракционирования [115, 116]. Клетка, находящаяся в различном функциональном состоянии, характеризуется особым уровнем энергетических и синтетических потребностей, которые могут меняться в определенном диапазоне модифицируя цепочки метаболических превращений с выраженной конкуренцией за пируватный фонд, сопровождаясь изменением соотношений частей пируватного фонда, которые избирательно извлекаются для энергетики клетки и синтеза метаболитов, требующихся в данной ситуации, обуславливая селекцию изотопов [22].

Колебания изотопного состава на организменном уровне и, вероятно, формирование противоположного физиологическому градиенту нового изотопного  $^2\text{H}/^1\text{H}$  градиента ( $\delta\text{D}_{\text{"висцеральные органы"}} > \delta\text{D}_{\text{"плазма крови"}}$ ) могут приводить к усилению активности гуморальных и клеточных защитных систем, приводящих к неспецифическому феномену повышения резистентности в результате прекондиционирования, в ходе которой потенцируются защитные механизмы и реализуется передачи информации через вторичные мессенджеры.

Описанные процессы могут приводить к повышению скорости транскрипции и синтеза белков теплового шока, антиоксидантных ферментов (например, супероксиддисмутазы и каталазы), увеличению содержания антиноцицептивных факторов и низкомолекулярных восстановительных эквивалентов антиоксидантной системы, изменению продукции активных форм кислорода и свободных радикалов, изменению активности ионных каналов ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) и соотношения транспортеров энергетических субстратов в мембранах [116, 117]. Потребление обедненной дейтерием воды приводит к изменениям параметров электроэнцефалограммы во время сна, которые напоминают эффекты норадреналина и ингибиторов обратного захвата серотонина [118].

В ряде работ [24, 26, 119] указано на разнонаправленное воздействие реакций изотопного обмена на функциональную активность гетерогенных систем, их нативные свойства и структурную организацию. Тем не менее, большинство эффектов, сопряженных с изменениями изотопного состава элементов в организме, все также остаются изученными не в полной мере [28], что, прежде всего, касается влияния пониженных (по отношению к природному уровню) концентраций тяжелых нерадиоактивных изотопов на гетерогенные системы. Последнее нередко связано с традиционным объяснением кинетических изотопных эффектов, которое базируется на представлении об увеличении их выраженности, пропорциональном концентрации тяжелых изотопов. При этом нередко не учитываются в полной

мере изотопные эффекты, связанные с целенаправленным понижением концентрации тяжелых нерадиоактивных изотопов по отношению к их природному содержанию и возникающие в сложноорганизованных гетерогенных системах при формировании различных изотопных градиентов [120].

По литературным данным, среди исследований, описывающих изменения в соотношении изотопов, наиболее часто встречаются работы, посвященные влиянию различных концентраций дейтерия на гетерогенные системы, что объясняется более выраженными изотопными различиями в массах ядер  $^1\text{H}$  и  $^2\text{H}$  по сравнению с аналогичными показателями соотношения атомного веса у стабильных изотопов кислорода, углерода и азота [121, 122].

## 2.2 Изучение влияния изотопного состава среды на изменение энергии химической связи гетерогенной системы [121]

При сравнительном анализе ряда данных экспериментальных исследований была выявлена следующая закономерность (таблица 2.1): возникновение изотопного шока характерно в тех случаях, когда высока вероятность образования связей с нечетным количеством нейтронов (нескомпенсированным нейтроном) или при наличии в системе химического элемента (обычно металла), имеющего нескомпенсированный нейтрон/нейтроны.

При изучении вероятности возникновения данной закономерности, называемой далее нейтронным эффектом, было установлено, что возможным механизмом его реализации может являться изменение спина ядер атомов в зависимости от количества нейтронов. Это, в свою очередь, способно влиять и на реакционную способность химической связи, образуемой изотопами, имеющими суммарную нескомпенсированность по нейтронам.

Таблица 2.1 – Закономерность возникновения изотопного резонанса в биологических объектах путем вероятной реализации нейтронного эффекта.

Изотопный резонанс отсутствует при А	Изотопный резонанс отсутствует при Б	Изотопный резонанс наблюдается при В	Изотопный резонанс отсутствует при Г	Изотопный резонанс наблюдается при Д
$^{12}\text{C}-^1\text{H}$ : $6n-7p = -1$ Спин: $0^+ + \frac{1}{2}^+ = \frac{1}{2}^{++}$	$^{12}\text{C}-\text{D}$ : $7n-7p = 0$ Спин: $0^+ + 1^+ = 1^{++}$			
	$^{13}\text{C}-^1\text{H}^{[125]}$ : $7n-7p = 0$ Спин: $\frac{1}{2}^- + \frac{1}{2}^+ = 1^{-+}$	$^{13}\text{C}-\text{D}^{[16]}$ : $8n-7p = 1$ Спин: $\frac{1}{2}^- + 1^+ = 1\frac{1}{2}^{-+}$		
$^{14}\text{N}-^1\text{H}$ : $7n-8p = -1$ Спин: $1^+ + \frac{1}{2}^+ = 1\frac{1}{2}^{++}$	$^{14}\text{N}-\text{D}$ : $8n-8p = 0$ Спин: $1^+ + 1^+ = 2^{++}$			
	$^{15}\text{N}-^1\text{H}^{[125]}$ : $8n-8p = 0$ Спин: $\frac{1}{2}^- + \frac{1}{2}^+ = 1^{-+}$	$^{15}\text{N}-\text{D}$ : $9n-8p = 1$ Спин: $\frac{1}{2}^- + 1^+ = 1\frac{1}{2}^{-+}$		
$^{16}\text{O}-^1\text{H}$ : $8n-9p = -1$ Спин: $0^+ + \frac{1}{2}^+ = \frac{1}{2}^{++}$	$^{17}\text{O}-^1\text{H}$ : $9n-9p = 0$ Спин: $5/2^+ + \frac{1}{2}^+ = 3^{++}$	$^{18}\text{O}-^1\text{H}^{[125]}$ : $10n-9p = 1$ Спин: $0^+ + \frac{1}{2}^+ = \frac{1}{2}^{++}$		
	$^{16}\text{O}-\text{D}$ : $9n-9p = 0$ Спин: $0^+ + 1^+ = 1^{++}$	$^{17}\text{O}-\text{D}$ : $10n-9p = 1$ Спин: $5/2^+ + 1^+ = 3\frac{1}{2}^{++}$	$^{18}\text{O}-\text{D}$ : $11n-9p = 2$ Спин: $0^+ + 1^+ = 1^{++}$	
$^{32}\text{S}-^1\text{H}$ : $16n-17p = -1$ Спин: $0^+ + \frac{1}{2}^+ = \frac{1}{2}^{++}$	$^{32}\text{S}-\text{D}$ : $17n-17p = 0$ Спин: $0^+ + 1^+ = 1^{++}$	$^{34}\text{S}-^1\text{H}$ : $18n-17p = 1$ Спин: $0^+ + \frac{1}{2}^+ = \frac{1}{2}^{++}$	$^{34}\text{S}-\text{D}$ : $19n-17p = 2$ Спин: $0^+ + 1^+ = 1^{++}$	
	$^{12}\text{C}-^{12}\text{C}$ : $12n-12p = 0$ Спин: $0^+ + 0^+ = 0^{++}$	$^{12}\text{C}-^{13}\text{C}$ : $13n-12p = 1$ Спин: $0^+ + \frac{1}{2}^- = \frac{1}{2}^{+-}$		
	$^{12}\text{C}-^{14}\text{N}$ : $13n-13p = 0$ Спин: $0^+ + 1^+ = 1^{++}$	$^{12}\text{C}-^{15}\text{N}$ : $14n-13p = 1$ Спин: $0^+ + \frac{1}{2}^- = \frac{1}{2}^{+-}$		
		$^{13}\text{C}-^{14}\text{N}$ : $14n-13p = 1$ Спин: $\frac{1}{2}^- + 1^+ = 1\frac{1}{2}^+$	$^{13}\text{C}-^{15}\text{N}^{[125-127]}$ : $15n-13p = 2$ Спин: $\frac{1}{2}^- + \frac{1}{2}^- = 1^{--}$	
	$^{12}\text{C}-^{16}\text{O}$ : $14n-14p = 0$ Спин: $0^+ + 0^+ = 0^{++}$	$^{12}\text{C}-^{17}\text{O}$ : $15n-14p = 1$ Спин: $0^+ + 5/2^+ = 5/2^+$	$^{12}\text{C}-^{18}\text{O}$ : $16n-14p = 2$ Спин: $0^+ + 0^+ = 0^{++}$	
		$^{13}\text{C}-^{16}\text{O}$ : $15n-14p = 1$ Спин: $\frac{1}{2}^- + 0^+ = \frac{1}{2}^{-+}$	$^{13}\text{C}-^{17}\text{O}$ : $16n-14p = 2$ Спин: $\frac{1}{2}^- + 5/2^+ = 3^{-+}$	$^{13}\text{C}-^{18}\text{O}^{[125]}$ : $17n-14p = 3$ Спин: $\frac{1}{2}^- + 0^+ = \frac{1}{2}^{-+}$



Продолжение таблицы 2.1

Изотопный резонанс отсутствует при А	Изотопный резонанс отсутствует при Б	Изотопный резонанс наблюдается при В	Изотопный резонанс отсутствует при Г	Изотопный резонанс наблюдается при Д
	$^{14}\text{N}-^{16}\text{O}$ : $15n-15p = 0$ Спин: $1^+ + 0^+ = 1^{++}$	$^{14}\text{N}-^{17}\text{O}$ : $16n-15p = 1$ Спин: $1^+ + 5/2^+ = 3\frac{1}{2}^{++}$	$^{14}\text{N}-^{18}\text{O}$ : $17n-15p = 2$ Спин: $1^+ + 0^+ = 1^{++}$	
		$^{15}\text{N}-^{16}\text{O}^{[129]}$ : $16n-15p = 1$ Спин: $\frac{1}{2}^- + 0^+ = \frac{1}{2}^{-+}$	$^{15}\text{N}-^{17}\text{O}$ : $17n-15p = 2$ Спин: $\frac{1}{2}^- + 5/2^+ = 3^-$ +	$^{15}\text{N}-^{18}\text{O}^{[125]}$ : $18n-15p = 3$ Спин: $\frac{1}{2}^- + 0^+ = \frac{1}{2}^{-+}$
	$^{40}\text{Ca}^{[11]}$ : $20n-20p = 0$ Спин: $0^+$			$^{43}\text{Ca}^{[11]}$ : $23n-20p = 3$ Спин: $7/2^-$
	$^{24}\text{Mg}^{[128]}$ : $12n-12p = 0$ Спин: $0^+$	$^{25}\text{Mg}^{[128]}$ : $13n-12p = 1$ Спин: $5/2^+$	$^{26}\text{Mg}^{[128]}$ : $14n-12p = 2$ Спин: $0^+$	
				$^{63}\text{Cu}-^{18}\text{O}$ : $44n-37p = 7$ Спин: $3/2^- + 0^+ = 3/2^-$ +
				$^{63}\text{Cu}$ : $34n-29p = 5$ Спин: $3/2^-$
				$^{65}\text{Cu}$ : $36n-29p = 7$ Спин: $3/2^-$
			$^{64}\text{Zn}^{[131]}$ : $34n-30p = 4$ Спин: $0^+$	$^{67}\text{Zn}^{[132]}$ : $37n-30p = 7$ Спин: $5/2^-$
			$^{66}\text{Zn}^{[131]}$ : $36n-30p = 6$ Спин: $0^+$	
			$^{238}\text{U}^{[130]}$ : $146n-92p = 54$ Спин: $0^+$	$^{235}\text{U}^{[130]}$ : $143n-92p = 51$ Спин: $7/2^-$

*Примечание:* D – дейтерий; x – целое число; А:  $n - p = -1$ ; Б:  $n - p = 0$ ; В:  $n - p = 1$ ; Г:  $n - p = 2$  или  $n - p = 2x$ ; Д:  $n - p = 2x+1$ ; спин – суммарный спин; n – нейтрон; p – протон.

При анализе вероятности возникновения данной закономерности, называемой далее нейтронный эффект было установлено, что механизмом его реализации, является способность некомпенированного нейтрона

модифицировать спин ядра в атомах, а, следовательно, влиять и на реакционную способность химической связи, образуемой изотопами, имеющими суммарную нескомпенсированность по нейтронам:

1. Возникновение нейтронного эффекта в гетерогенных системах наблюдается при наличии химических связей между атомами, у которых имеется суммарное преобладание нейтронов над протонами, выражаемое нечетными положительными числами (1, 3, 5, 7 и т.д.):  $N_n - N_p = 2k + 1$ , где  $k \in Z$ ,  $n$  – нейтрон,  $p$  – протон.

2. Возникновение нейтронного эффекта в гетерогенных системах наблюдается при наличии химических связей между атомами, у которых имеется дробный результирующий спин ядер:  $2k \neq A\text{-спин} + A'\text{-спин} \neq 2k + 1$ , где  $k \in Z$ ,  $A$ -спин – спин атома;

3. Возникновение нейтронного эффекта в гетерогенных системах наблюдается при наличии химических связей между атомами, у которых имеется противоположный знак спина ядер:  $R\text{-спин} = +$ , где «+» и «-» представляют собой четность ядра атома.

4. Наиболее благоприятные условия для возникновения максимального изотопного резонанса в гетерогенных системах наблюдаются при сочетании всех трех условий, что подтверждается экспериментальными данными [125].

5. В атомах металлов при отсутствии ковалентных или координационных связей величина изотопного резонанса пропорциональна свойствам атома металла: разнице нейтронов и протонов его образующих, спину ядра и четности ядра.

Принципиально объяснить механизм возникновения нейтронного эффекта можно нарушением баланса по массе в системах с равновесным зарядом.

Равновесие по массе в атоме достигается как за счет взаимодействия протонов и нейтронов, так и нейтронов попарно между собой (2.2):

$$\text{a.m. } [p^+ + n^0] \approx 1:1 \text{ (равновесная масса),}$$

$$\text{a.m. } [n_i^0 + n_{i+1}^0] = 1:1 \text{ (равновесная масса)}. \quad (2.2)$$

При этом в триадах протон, электрон и нейтрон наблюдается равновесие по заряду и по массе. Более сильное взаимодействие заряженных частиц (протон и электрон) по сравнению с массовыми эффектами объясняет отсутствие дисбаланса по массе в ядрах атомов с меньшим количеством нейтронов, чем протонов. В то же время наличие нескомпенсированного по массе нейтрона может приводить к возникновению масс-зависимого дисбаланса в системах с равновесным зарядом, что характерно для некоторых тяжелых изотопов или связей, ими образуемыми:  $[p^+ + e^- + n_i^0] \cdot n_{i+1}^0 = 0$  (равновесная масса), но  $\neq 1:1$  (неравновесная масса).

Влияние нескомпенсированного по массе нейтрона ( $n_{i+1}^0$ ) реализуется не на все ядро одновременно, а стохастически по времени на каждую триаду (протон-электрон-нейтрон), что приводит к возникновению эффекта масс (пропорционального минимум половине равновесного протон-нейтронного взаимодействия), приводящего опосредованно к изменению силы взаимодействия заряженных частиц (протон-электрон). Последнее находит подтверждение в том, что именно водородные связи чрезвычайно чувствительны к распределению электронной плотности по всей молекуле в целом [133], поэтому локальное ослабление и усиление протон-электронного взаимодействия может приводить к возникновению туннельного эффекта [134].

Кроме того, вероятно, в системе с 3 нейтронами описанный эффект также реализуется ввиду невозможности парных нейтронов компенсировать масс-флуктуации нескомпенсированного нейтрона в объеме атома, тогда как в изотопах с преобладанием нейтронов над протонами на 5 и более (7, 9 и т.д.) возможно возникновение частичного равновесия масс за счет определенного распределения в пространстве этих нейтронов, что может снижать выраженность нейтронного эффекта.

Другим механизмом, способным увеличить скорость ферментативной реакции во много раз, является способность нескомпенсированного по массе

нейтрона инициировать квантовое туннелирование за счет вовлечения одной из описанных выше атомных триад в этот процесс с последующим высвобождением энергии достаточной для образования новой химической связи, что способно резко ускорить образование субстратов. Наличие подобного эффекта объясняется феноменом возникновения «изотопного шока» в гетерогенных системах при наличии тяжелых нерадиоактивных изотопов определенных макро- и микроэлементов, а также экспоненциальное усиление этих проявлений при комбинировании различных фракций изотопов в гетерогенных объектах.

Описанное выше вполне вероятно, так как имеются примеры коллективного протонного туннелирования в некоторых системах (Zundel-like complex,  $[\text{HO}\cdots\text{D}\cdots\text{OH}]$ ) [135], так как при наличии электрон-ядерного магнитного взаимодействия в селективных по электронному спину реакциях, проявляется избирательность и по ядерному спину.

Необходимо учитывать, что в гетерогенных системах в составе молекул реализация нейтронного эффекта будет происходить не на чистых (изолированных) изотопах, а в составе групп атомов, связанных ковалентными и нековалентными взаимодействиями. Поэтому расчет нейтронного эффекта должен осуществляться как минимум на атомную пару, имеющую перекрывание электронных облаков. В связи с этим, не будет выявляться линейного нарастания нейтронного эффекта при линейном утяжелении изотопов, образующих химическую связь (например, для связи  $^{13}\text{C}-\text{H}$  Нейтронного эффекта равен 0 и вероятность возникновения изотопного резонанса отсутствует [136], тогда как для связи  $^{13}\text{C}-\text{D}$  Нейтронного эффекта равен 1 и высока вероятность возникновения изотопного резонанса, также как и для связи  $^{18}\text{O}-\text{H}$  Нейтронного эффекта равен 1, а, следовательно, также ожидается изотопный резонанс, тогда как для связи  $^{18}\text{O}-\text{D}$  Нейтронного эффекта равен 2, а следовательно изотопный резонанс не ожидается). Этим можно объяснить неоднозначные результаты многих авторов при обогащении гетерогенных систем тяжелыми изотопами и их смесями [137].

Подтверждением этого на практике можно, например, считать обогащение раковых клеток  $^{13}\text{C}$  и  $\text{D}$ , когда ожидаемо возникновение изотопной резонансной пары ( $^{13}\text{C}$ - $\text{D}$  Нейтронного эффекта равен 1). Подобное фракционирование  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$  и  $^1\text{H}/^2\text{H}$  с накоплением тяжелых атомов сопровождается появлением дополнительного энергетического и метаболического преимущества у онкоцитов перед обычными клетками с естественным изотопным составом ( $^{12}\text{C}$ - $\text{H}$  Нейтронного эффекта -1 - отсутствует).

Кроме того, увеличение энергии связи и частоты колебаний ядра при уменьшении межъядерного расстояния может происходить с различной скоростью и интенсивностью в связях [138], образованных изотопами с парными нейтронами ( $^{12}\text{C}$ - $\text{D}$ ,  $^{18}\text{O}$ - $\text{D}$ ) и изотопов с нескомпенсированным нейтроном ( $^{13}\text{C}$ - $\text{D}$ ). При этом, с течением времени наблюдается увеличение в различиях начальной и энергии перед туннелированием. Ограничение свободы в ковалентно-связанных резонансных парах атомов (имеющих нескомпенсированный нейтрон) приводит к возрастанию внутренней атомной энергии, обеспечивающей разрыв связи без необходимости достижения энергии активации. Все это, вероятно, объясняет наличие нейтронного эффекта, как одного из механизмов реализации туннельного эффекта при ферментативном катализе.

На основании всего вышеизложенного можно заключить, что фракционирование изотопов в гетерогенных системах является лишь предпосылкой для возникновения изотопного резонанса, который наблюдается только в том случае, когда реализуется нейтронный эффект, связанный с особенностями инкорпорирования тяжелых изотопов в молекулы и прежде всего, их взаимодействием с другими легкими и тяжелыми изотопами. Поэтому при чрезмерном обогащении среды только тяжелыми изотопами нейтронный эффект, а, следовательно, и изотопный резонанс могут отсутствовать, например, в парах  $^{18}\text{O}$ - $\text{D}$ ,  $^{34}\text{S}$ - $\text{D}$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ ,  $^{12}\text{C}$ - $^{18}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}$ - $^{17}\text{O}$ ,  $^{14}\text{N}$ - $^{18}\text{O}$ ,  $^{15}\text{N}$ - $^{17}\text{O}$ .

При низких концентрациях дейтерия в окружающей среде для реализации необходимого изотопного эффекта и выживания организму требуется значительно большее накопление  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  [31, 129, 139], чем  $^{18}\text{O}$  и  $^{34}\text{S}$ , т.е.  $\delta^{13}\text{C}_{(\text{organism})} \gg \delta^{13}\text{C}_{(\text{environment})}$  и  $\delta^{15}\text{N}_{(\text{organism})} \gg \delta^{15}\text{N}_{(\text{environment})}$ , тогда как  $\delta^{18}\text{O}_{(\text{organism})} \leq \delta^{18}\text{O}_{(\text{environment})}$  [140-143] и аналогично для  $\delta^{34}\text{S}_{(\text{organism})} \leq \delta^{34}\text{S}_{(\text{environment})}$ . Кроме того, более выраженный изотопный резонансный эффект  $^{17}\text{O}$  и  $^{18}\text{O}$  по сравнению с  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  [125], вероятно, обусловлен более активным участием атомов кислорода в работе функционально активных групп ( $^{-17/18}\text{O}-^1\text{H}$ ) по сравнению с атомами азота и особенно углерода. Поэтому модификация естественной среды путем ее обогащения  $^{18}\text{O}$  будет приводить к усилению каталитической активности или увеличению скорости транскрипции, сопровождающееся увеличением количества метаболически активных молекул в клетке или качественным повышением их резистентности к неблагоприятным интрацеллюлярным воздействиям; тогда как обогащение естественной среды путем введения в ее состав  $^{13}\text{C}$  и  $^{15}\text{N}$  скорее сопровождается меньшим изотопным резонансом за счет замедления неспецифического распада молекулярных структур при изотопном утяжелении отдельных химических групп (гетероциклы, изопреноидные, конденсированные полициклические и полиненасыщенные структуры, нековалентные взаимодействия в макромолекулярных комплексах).

В связи с этим изотопный шок более ожидаем в метаболически активных клетках и тканях, например, в период их деления, роста, но только в тех случаях, когда белый шум по амплитуде энергетических колебаний составляет примерно 50 % от энергетического потенциала клетки, инициируя таким образом возникновение стохастического резонанса. Поэтому один и тот же изотоп может давать резонанс в разные фазы клеточного цикла, но в различных концентрациях и с разной степенью выраженности или же наоборот – ингибировать клеточные эффекты при слишком слабом (менее 40 %) и чрезмерно сильном (более 60%) воздействии. Этим же объясняется

способность отдельных комбинаций изотопов в определенный клеточный цикл вызывать явление супер резонанса, описанного Р.А. Зубаревым [125].

### 2.3 Физико-математическое обоснование влияния некомпенсированного нейтрона на энергию ковалентной связи [136]

Для описания влияния изотопного состава ферментов на биологическую активность микроорганизмов нами выдвигается гипотеза, что стимулирующее либо подавляющее влияние фермента связано с деформацией химической связи при изменении изотопного состава и связанному с этой деформацией изменению энергии, соответствующей валентной связи. Изменение энергии химической связи обусловлено несколькими факторами, рассмотренными ниже. С этой целью рассмотрим два атома, связанные ковалентной связью, расположенные на равновесном расстоянии  $a$ . Локализованное состояние электрона в атомах имеет волновые функции с экспоненциальной асимптотикой в виде затухающей экспоненты. Следовательно, в месте расположения электронов, потенциал, создаваемый атомными остовами, расположенными на концах связи, можно представить в виде суперпозиции кулоновских потенциалов атомных остовов, т.е., ядер и сферически симметричных заполненных внутренних электронных оболочек, и экспоненциально спадающих потенциалов, обусловленных асимптотиками волновых функций внешних электронов.

$$V(r) = \frac{Ze^2}{r} + e^2 \frac{\exp(-\kappa r)}{r} \quad (2.3)$$

где  $\kappa$  – величина, обратная радиусу атома. В месте локализации валентных электронов в вышеприведенной формуле можно пренебречь вторым слагаемым, и считать, что первый атом создает в месте расположения

валентных электронов потенциал  $V_1(r) = \frac{Z_1 e^2}{r}$ , а второй атом создает в месте

расположения валентных электронов потенциал  $V_2(r) = \frac{Z_2 e^2}{|a-r|}$ .

Следовательно, потенциал в месте расположения валентных электронов можно выбрать в виде:

$$U(r) = \frac{Z_1 e^2}{r} + \frac{Z_2 e^2}{a-r}, \quad 0 \leq r \leq a \quad (2.4)$$

где, в целях упрощения, модуль разности векторов  $|a-r|$  заменен на  $a-r$ . Мы считаем, что такая замена вполне допустима, поскольку потенциал (2.4) является эмпирическим. В вышеприведенных формулах  $Z_1, Z_2$  – безразмерные константы, имеющие смысл зарядов атомных остовов в единицах, заряда электрона  $e$ .  $r, a-r$  – расстояния от валентного электрона до первого и второго атомных остовов. Обычно используемый для расчета межатомных взаимодействий потенциал Леннарда-Джонса сильно усложняет расчеты, именно поэтому нами выбран потенциал (2.4).

Валентные электроны располагаются в таком месте, где их потенциальная энергия взаимодействия с атомными остовами минимальна. Расстояние, на котором находится этот минимум энергии находится из формулы:

$$\frac{dU}{dr} = 0. \quad (2.5)$$

Минимум энергии взаимодействия электрона с атомными остовами расположен на прямой, соединяющей атомные остовы 1 и 2, что отвечает представлению о локализованной валентной связи.

Подставляя (2.5) в (2.4), получаем:



$$\frac{Z_1 e^2}{r^2} - \frac{Z_2 e^2}{(a-r)^2} = 0. \quad (2.6)$$

Решаем это уравнение относительно искомого равновесного расстояния  $r_0$ , на первом этапе получаем [136]:

$$(a-r)\sqrt{Z_1} = r\sqrt{Z_2}, \quad a\sqrt{Z_1} = r\sqrt{Z_1} + r\sqrt{Z_2} \quad (2.7)$$

откуда расстояние, на котором находится валентный электрон от атома номер 1 равно:

$$r_0 = a \frac{\sqrt{Z_1}}{\sqrt{Z_1} + \sqrt{Z_2}}. \quad (2.8)$$

Аналогично выражению (2.8), расстояние на котором находится валентный электрон от атома номер 2, равно [136]:

$$a - r_0 = a \frac{\sqrt{Z_2}}{\sqrt{Z_1} + \sqrt{Z_2}}. \quad (2.9)$$

При этом, энергия валентного электрона в равновесном положении равна [136]:

$$U(r) = \frac{Z_1 e^2}{r} + \frac{Z_2 e^2}{a-r} \quad (2.10)$$

$$U'(r) = -\frac{Z_1 e^2}{r^2} + \frac{Z_2 e^2}{(a-r)^2} = 0 \quad (2.11)$$

$$(a-r)\sqrt{Z_1} = r\sqrt{Z_2} \quad (2.12)$$

$$r = a \frac{\sqrt{Z_1}}{\sqrt{Z_1} + \sqrt{Z_2}} \quad (2.13)$$

$$a - r = a \frac{\sqrt{Z_2}}{\sqrt{Z_1} + \sqrt{Z_2}} \quad (2.14)$$

$$U_{min} = \frac{Z_1 e^2}{a \sqrt{Z_1}} (\sqrt{Z_1} + \sqrt{Z_2}) + \frac{Z_2 e^2}{a \sqrt{Z_2}} (\sqrt{Z_1} + \sqrt{Z_2}) = \frac{\sqrt{Z_1} e^2}{a} (\sqrt{Z_1} + \sqrt{Z_2}) + \frac{\sqrt{Z_2} e^2}{a} (\sqrt{Z_1} + \sqrt{Z_2}) = \frac{e^2}{a} (\sqrt{Z_1} + \sqrt{Z_2})^2 \quad (2.15)$$

Равновесное положение электрона определяет химическую активность соединения, которую можно оценить, вычислив энергию взаимодействия электрона с атомными остовами. Химическая активность валентной связи определяется не только взаимным расположением атомов 1 и 2, но и взаимодействием атомных остовов с парой валентных электронов. Чем ниже энергия, тем менее активна химическая связь, поэтому тем больше внешняя энергия требуется для активации ковалентной химической связи. На расстояние между атомами и энергию химической связи влияет несколько факторов:

1) Кулоновское взаимодействие валентных электронов, которое слабо зависит от изотопного состава химических элементов, поэтому в настоящей статье поправки, связанные с энергией кулоновского взаимодействия валентных электронов;

2) Аналогично первому, взаимодействие магнитных моментов валентных электронов также от изотопного состава соединения зависит слабо;

3) Взаимодействие магнитных моментов валентных электронов с магнитными моментами ядер атомов, которое в значительной степени определяется изотопным составом, поскольку для разных изотопов одного и того же химического элемента магнитные моменты ядер атомов могут отличаться весьма значительно. Магнитный момент ядра атома связан с его

спином гиромагнитным отношением, поэтому магнитные моменты ядер атомов пропорциональны их спинам. Данные эффекты взаимодействия будут нами учитываться, так как валентные электроны взаимодействуют с магнитными моментами обоих атомов, образующих химическую связь, поэтому изменение любого из них приводит к изменению энергии химической связи.

4) Взаимодействие магнитных моментов ядер атомов, приводящее к изменению расстояния между ними.

5) Эффект влияния размеров ядра на энергию валентного электрона. У разных изотопов одного и того же химического элемента разное количество нейтронов, т.е. разный размер ядра атома, что приводит к искажению кулоновского потенциала ядер атомов и как следствие к изменению энергии электрона.

6) Еще одним эффектом, вызывающим изменение расстояния между атомами, являются их тепловые колебания. Предполагаем, что колебания происходят вблизи положения равновесия по гармоническому закону с частотой  $\omega$ , определяемой параметрами потенциальной ямы, в которой находятся атомы, т.е. в конечном счете параметрами межатомных взаимодействий. Следовательно, амплитуда тепловых колебаний атомов будет зависеть только от их массы и температуры.

Рассмотрим вначале фактор № 3, т.е., взаимодействие магнитных моментов валентных электронов с магнитными моментами ядер атомов. Энергия взаимодействия с магнитным моментом ядра первого атома равна [136]:

$$U(r) = \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3} - \frac{3(\mu_1 r)(\mu_2 r)}{r^5}. \quad (2.16)$$

здесь  $\mu_1 r = \mu_1 r \cos \theta_1$ ,  $\mu_2 r = \mu_2 r \cos \theta_2$ ,  $0 \leq \theta_1, \theta_2 \leq \pi$

В следствие тепловых колебаний углы  $\theta_1, \theta_2$  между радиус-вектором  $r$ , соединяющего атомы 1 и 2 и магнитными моментами  $\bar{\mu}_1$  и  $\bar{\mu}_2$  меняются случайным образом с нулевым средним значением. Поэтому усреднение выражения (6) по тепловым колебаниям атомов приводит к обращению в ноль второго слагаемого. Усредненное значение  $\bar{U}_1(r) = \frac{\mu_1 \mu_2}{r^3}$  можно записать в виде  $\bar{U}_1(r) = \frac{\zeta_1 e^2 a^2}{r^3}$ , где  $\zeta_1$  – эмпирическая величина, которая для диполь-дипольного взаимодействия играет ту же роль, что и заряд  $Z_1$  атомного остова первого атома.

Аналогично, взаимодействие магнитного момента валентного электрона со вторым атомом, приводит к дополнительному вкладу в его энергию, которая равна  $\bar{U}_2(r) = \frac{e^2 \zeta_2 a^2}{(a-r)^3}$ , где,  $\zeta_2$  – величина, аналогичная  $\zeta_1$  для второго атома. Множитель  $a^2$  в обоих выражениях введен из соображений размерности. Указанные взаимодействия приводят к появлению дополнительного вклада в энергию взаимодействия валентного электрона с первым и вторым атомами [136]:

$$U(r) = \frac{Z_1 e^2}{r} + \frac{Z_2 e^2}{a-r} + \frac{\zeta_1 e^2 a^2}{r^3} + \frac{\zeta_2 e^2 a^2}{(a-r)^3}. \quad (2.17)$$

Два последних слагаемых малы по сравнению с первыми по двум причинам. Во-первых, они описывают взаимодействие магнитного типа, которое нерелятивистски мало по сравнению с взаимодействием электрического типа, т.е., первым и вторым слагаемым. Во-вторых, эти слагаемые быстрее убывают с расстоянием по закону  $1/r^3$ , что характерно для диполь-дипольного взаимодействия, которое спадает быстрее, чем кулоновское взаимодействие, которое убывает с расстоянием по закону  $1/r$ .

Это позволяет нам разделить потенциальную энергию взаимодействия (2.17) на два слагаемых:

$$\text{Доминирующую часть: } U_0(r) = \frac{z_1 e^2}{r} + \frac{z_2 e^2}{a-r} \quad (2.18)$$

$$\text{И малую поправку: } \Delta U(r) = \frac{e^2 \zeta_1 a^2}{r^3} + \frac{e^2 \zeta_2 a^2}{(a-r)^3} \quad (2.19)$$

Откуда:

$$U(r) = U_0(r_0) + \Delta U(r) \quad (2.20)$$

Наличие дополнительного слагаемого  $\Delta U(r)$  потенциального взаимодействия изменяет как расположение валентного электрона, так и его энергию.

Новое положение электрона, обусловленное его магнитным взаимодействием с ядрами находится из условия  $\frac{dU}{dr} = 0$

Выполняя дифференцирование выражения (2.17), получаем [136]:

$$\frac{z_1 e^2}{r^2} - \frac{z_2 e^2}{(a-r)^2} + \frac{e^2 \zeta_1 a^2}{r^4} \times 3 - \frac{e^2 \zeta_2 a^2}{(a-r)^4} \times 3 = 0 \quad (2.21)$$

Поскольку выше было установлено, что энергия взаимодействия магнитных диполей электрона с атомными остовами меньше их кулоновского взаимодействия, следует, что учет взаимодействия магнитных моментов приведет к незначительному смещению положения электрона. Следовательно, искать решение уравнения (2.21) следует в виде:

$$r = r_0 + \Delta r, \quad \Delta r \ll r_0 \quad (2.22)$$

где  $\Delta r$  - малая поправка к  $r_0$  возникающая вследствие смещения электрона из положения равновесия, вследствие его взаимодействия с магнитными моментами ядер. Подставляя  $r = r_0 + \Delta r$  в (2.21) получаем:

$$\frac{Z_1}{(r_0 + \Delta r)^2} - \frac{Z_2}{(a - r_0 - \Delta r)^2} + \frac{3\zeta_1 a^2}{(r_0 + \Delta r)^4} - \frac{3\zeta_2 a^2}{(a - r_0 - \Delta r)^4} = 0 \quad (2.23)$$

Для нахождения смещения  $\Delta r$  выполним разложение по малому параметру  $\Delta r/r_0$  в каждом из четырех слагаемых:

Первое слагаемое:

$$\frac{1}{(r_0 + \Delta r)^2} = \frac{1}{r_0^2 \times \left(1 + \frac{\Delta r}{r_0}\right)^2} \approx \frac{1}{r_0^2} \times \left(1 - \frac{2\Delta r}{r_0}\right) = \frac{1}{r_0^2} - \frac{2\Delta r}{r_0^3} \quad (2.24)$$

Второе слагаемое:

$$\begin{aligned} \frac{1}{(a - r_0 - \Delta r)^2} &= \frac{1}{(a - r_0)^2 \times \left(1 - \frac{\Delta r}{a - r_0}\right)^2} \approx \\ &\approx \frac{1}{(a - r_0)^2} \times \left[1 + \frac{2\Delta r}{a - r_0}\right] = \frac{1}{(a - r_0)^2} + \frac{2\Delta r}{(a - r_0)^3} \end{aligned} \quad (2.25)$$

Третье слагаемое:

$$\frac{1}{(r_0 + \Delta r)^4} + \frac{1}{r_0^3 \times \left(1 + \frac{\Delta r}{r_0}\right)^4} \approx \frac{1}{r_0^3} \times \left(1 - \frac{4\Delta r}{r_0}\right) = \frac{1}{r_0^4} - \frac{4\Delta r}{r_0^5} \quad (2.26)$$

Четвертое слагаемое:

$$\begin{aligned} \frac{1}{(a - r_0 - \Delta r)^4} &= \frac{1}{(a - r_0)^4 \times \left(1 - \frac{\Delta r}{a - r_0}\right)^4} = \frac{1}{(a - r_0)^4} \times \left[1 + \frac{4\Delta r}{a - r_0}\right] = \\ &= \frac{1}{(a - r_0)^4} + \frac{4\Delta r}{(a - r_0)^5} \end{aligned} \quad (2.27)$$

В выше приведенных разложениях по малому параметру использовались формулы приближенных вычислений для 1 и 3 слагаемых:

$$\frac{Z_1 e^2}{(r_0 + \Delta r)^2} \approx \frac{Z_1 e^2}{r_0^2} \left(1 - \frac{2\Delta r}{r_0}\right) \quad (2.28)$$

$$\frac{3\zeta_1 e^2}{(r_0 + \Delta r)^4} \approx \frac{\zeta_1 e^2}{r_0^4} \left(1 - \frac{4\Delta r}{r_0}\right) \quad (2.29)$$

и аналогичные формулы для 2 и 4 слагаемых.

Получим [136]:

$$\begin{aligned} \frac{dU}{dr} = & \frac{Z_1}{r_0^2} - \frac{2\Delta r Z_1}{r_0^3} - \frac{Z_2}{(a-r_0)^2} + \frac{2\Delta r Z_2}{(a-r_0)^3} + \frac{3\zeta_1 a^2}{r_0^4} - \frac{12\zeta_1 a^2}{r_0^5} \times \\ & \times \Delta r - \frac{3\zeta_2 a^2}{(a-r_0)^4} + \frac{12\zeta_2 a^2}{(a-r_0)^5} \times \Delta r = 0 \end{aligned} \quad (2.30)$$

Выше, при определении равновесного расстояния была получена формула (2.8), которая позволяет упростить последнее выражение (2.30):

$$-\frac{2Z_1 \Delta r}{r_0^3} + \frac{2Z_2 \Delta r}{(a-r_0)^3} + \frac{3\zeta_1 a^2}{r_0^4} - \frac{12\zeta_1 a^2 \Delta r}{r_0^5} - \frac{3\zeta_2 a^2}{(a-r_0)^4} + \frac{12\zeta_2 a^2}{(a-r_0)^5} \times \Delta r = 0 \quad (2.31)$$

Отсюда (2.31) получаем:

$$\begin{aligned} -\frac{2Z_1}{r_0^3} \times \Delta r + \frac{2Z_2}{(a-r)^3} \times \Delta r - \frac{12\zeta_1 a^2}{r_0^5} \times \Delta r + \frac{12\zeta_2 a^2}{(a-r_0)^5} \times \Delta r = \\ = \frac{3\zeta_2 a^2}{(a-r_0)^4} - \frac{3\zeta_1 a^2}{r_0^4}. \end{aligned} \quad (2.32)$$

Отсюда, смещение электрона из положения равновесия под влиянием магнитных моментов ядер изотопов равно:

$$\Delta r = \frac{\frac{3\zeta_2 a^2}{(a-r_0)^4} - \frac{3\zeta_1 a^2}{r_0^4}}{\frac{2Z_2}{(a-r)^3} - \frac{2Z_1}{r_0^3} - \frac{12\zeta_1 a^2}{r_0^5} + \frac{12\zeta_2 a^2}{(a-r_0)^5}} \quad (2.34)$$

Рассчитаем изменение энергии валентного электрона, обусловленное его взаимодействием с магнитными моментами ядер:

$$\Delta E = U(r_0 + \Delta r) - U_0(r_0). \quad (2.35)$$

Поскольку отношение  $\Delta r/r_0$  мало и поправка к потенциалу  $\Delta U$  также мала, то при вычислении поправки к энергии можно заменить  $\Delta U(r_0 + \Delta r)$  на  $U(r_0)$ .

Далее разность потенциалов  $U_0(r_0 + \Delta r) - U_0(r_0)$  можно разложить по указанному выше малому параметру. Таким образом, выражение для поправки к энергии может быть записано в следующей форме:

$$\begin{aligned} \Delta E = U(r_0 + \Delta r) - U_0(r_0) &= U(r_0) + \frac{dU(r_0)}{dr} \Delta r - U_0(r_0) = \frac{Z_1 e^2}{r_0} + \frac{Z_2 e^2}{a - r_0} + \\ &+ \frac{\zeta_1 e^2 a^2}{r_0^3} + \frac{\zeta_2 e^2 a^2}{(a - r_0)^3} + \frac{dU_0 \Delta r}{dr_0} + \frac{d\Delta U}{dr_0} \Delta r - U_0(r_0) = \Delta U(r_0) + \frac{d\Delta U(r_0)}{dr} \Delta \end{aligned} \quad (2.36)$$

В (2.36) первое слагаемое описывает смещение потенциальной энергии валентного электрона по вертикали (увеличение энергии), второе - по горизонтали в следствие смещения (рисунок 2.4).

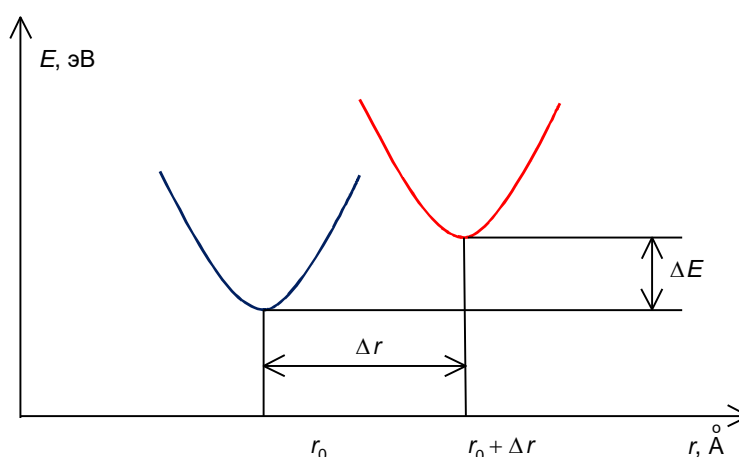


Рисунок 2.4 – Изменение энергии валентного электрона, обусловленное его взаимодействием с магнитными моментами ядер



Рассмотрим теперь фактор №4 (взаимодействие магнитных моментов ядер атомов), который приводит к уменьшению расстояния между атомами, в следствие взаимодействия магнитных моментов их ядер, что приводит к увеличению суммарного потенциала обоих взаимодействующих ядер в точке равновесного положения электрона, т.е. к активизации химической связи.

Поскольку для органических соединений характерна ковалентная связь, то в качестве модельного потенциала, описывающего взаимодействие атомов друг с другом выбирается потенциал Леннарда-Джонса:

$$U_{12} = U_0 \left[ \left( \frac{a_0}{r} \right)^{12} - 2 \left( \frac{a_0}{r} \right)^6 \right] \quad (2.37)$$

где  $U_{12}$  - потенциальная энергия взаимодействия атомов 1 и 2. А  $U_0$  и  $a_0$  - параметры.

Равновесное положение атомов друг относительно друга определяется минимумом потенциальной энергии  $U_{12}$ , приравнивая производную  $\frac{dU_{12}}{dr}$  к 0:

$$\frac{dU_{12}}{dr} = 0 \quad (2.38)$$

$$U_0 \left[ 12 \left( \frac{a_0}{r} \right)^{13} - 12 \left( \frac{a_0}{r} \right)^7 \right] = 0 \quad (2.39)$$

Находим, что параметр  $a_0$  имеет смысл равновесного расстояния между атомами.

Величина минимальной потенциальной энергии взаимодействия  $U_{12min} = -U_0$ , что позволяет трактовать величину  $U_0$  как энергию связи атомов 1 и 2.

Учтем, что при замене атомов их изотопами с ненулевыми значениями магнитных моментов ядер возникает дополнительная энергия взаимодействия, равная:

$$\Delta U_{12}(r) = \frac{ba_0^3}{r^3} \quad (2.40)$$

откуда:

$$U_{12}(r) = U_0 \left[ \left( \frac{a_0}{r} \right)^{12} - 2 \left( \frac{a_0}{r} \right)^6 \right] + \frac{ba_0^3}{r^3} \quad (2.41)$$

где  $a_0$  - первоначальное расстояние,  $b$  - параметр, имеющий размерность энергии, который характеризует величину диполь-дипольного взаимодействия ядер.

Мы считаем, что магнитные моменты атомов 1 и 2 в следствие теплового движения свободно вращаются вокруг оси, соединяющей атомы 1 и 2 и образуют с этой осью углы  $\theta_1$  и  $\theta_2$ , меняющиеся в интервале от 0 до  $2\pi$ , поэтому среднее значение косинусов этих углов равны 0.

Новое расстояние между атомами 1 и 2 определяется, как и раньше, через минимум потенциальной энергии. Уже не будет  $a_0$  и определяется из (2.41):

$$\frac{dU}{dr} = -12 \frac{U_0}{a_0} \left[ \left( \frac{a_0}{r} \right)^{13} - \left( \frac{a_0}{r} \right)^7 \right] - 3 \frac{ba_0^3}{r^4} = 0 \quad (2.42)$$

Полученное уравнение можно переписать в виде:

$$-4 \frac{U_0}{a_0} \left[ \left( \frac{a_0}{r} \right)^{13} - \left( \frac{a_0}{r} \right)^7 \right] - 3 \frac{ba_0^3}{r^4} = 0 \quad (2.43)$$

Ищем решение последнего уравнения в виде:

$r = a_0 + \Delta r$ , где  $\Delta r \ll a_0$ , преобразуем два первых слагаемых в (2.43)

[136]:

$$\begin{aligned} \left(\frac{a_0}{r}\right)^{13} - \left(\frac{a_0}{r}\right)^7 &= \left(\frac{a_0}{a_0 + \Delta r}\right)^{13} - \left(\frac{a_0}{a_0 + \Delta r}\right)^7 \approx \\ &\approx \left(1 - 13\frac{\Delta r}{a_0}\right) - 1 + 7\frac{\Delta r}{a_0} = -6\frac{\Delta r}{a_0} \end{aligned} \quad (2.44)$$

Для оставшегося слагаемого выражение получаем аналогично.

Уравнение для нового расстояния между атомами 1 и 2 можно записать в виде:

$$-4\frac{U_0}{a_0}\left(-6\frac{\Delta r}{a_0}\right) - \frac{b}{a_0}\left(1 - 4\frac{\Delta r}{a_0}\right) = 0 \quad (2.45)$$

или

$$24\frac{U_0}{a_0^2}\Delta r + 4\frac{b}{a_0^2}\Delta r = \frac{b}{a_0} \quad (2.46)$$

Следует упомянуть, что поскольку взаимодействие магнитных моментов атомов 1 и 2 имеет характер притяжения, то постоянная  $b < 0$ .

Следовательно, дополнительное взаимодействие между атомами, приводит к уменьшению расстояния между ними.

Откуда находим искомую поправку к расстоянию между атомами  $\Delta r$ :

$$\Delta r = \frac{b}{a_0} \cdot \frac{1}{24\frac{U_0}{a_0^2} + 4\frac{b}{a_0^2}} \quad (2.47)$$

$$\Delta r = a_0 \frac{b}{24U_0 + 4b} \approx a_0 \frac{b}{24U_0} \quad (2.48)$$

Рассчитаем изменение энергии связи между атомами, обусловленное изменением расстояния между атомами:

$$\begin{aligned}\Delta E &= U(a_0 + \Delta r) - U_0(a_0) = \\ &= U_0(a_0 + \Delta r) + \Delta U(a_0 + \Delta r) - U_0(a_0)\end{aligned}\quad (2.49)$$

Последнюю формулу можно записать в виде [136]:

$$\begin{aligned}\Delta E &= U_0(a_0) + \Delta r \left( \frac{dU_0}{dr} \right)_{a_0} + \Delta U(a_0) + \Delta r \left( \frac{d\Delta U}{dr} \right)_{a_0} - \\ &- U_0(a_0) = \Delta U(a_0)\end{aligned}\quad (2.50)$$

при выводе формулы (2.50) второе слагаемое обращается в 0, поскольку  $a_0$  - это равновесное расстояние между атомами, предпоследнее слагаемое имеет порядок  $\Delta r^2$  и мало по сравнению с остальными слагаемыми.

Тогда

$$\Delta E = -\frac{ba_0^3}{a_0^3} = -b \quad (2.51)$$

$$b < 0, \Delta r < 0 \quad (2.52)$$

Для вычисления изменения энергии валентного электрона используем следующую формулу:

$$\Delta E_e = \frac{Z_1 e^2}{r} + \frac{Z_2 e^2}{a-r} \quad (2.53)$$

В последней формуле  $r$  определяет положение валентного электрона, в отличие от ранее оно определяло расстояние между атомами.  $a$  - это новое равновесное расстояние между атомами. Чтобы избежать путаницы,

обозначим ранее рассчитанное изменение расстояния между атомами через  $\Delta a$ . Т.е.:  $a = a_0 - \Delta a$

Тогда изменение потенциальной энергии электрона равно:

$$\Delta E_e = \frac{Z_1 e^2}{r} + \frac{Z_2 e^2}{a-r} - \frac{Z_1 e^2}{r} - \frac{Z_2 e^2}{a_0-r} = \frac{Z_2 e^2}{a-r} - \frac{Z_2 e^2}{a_0-r} \quad (2.54)$$

Преобразуем первое слагаемое в этой формуле:

$$\frac{Z_1 e^2}{a_0 - \Delta a - r} = \frac{Z_2 e^2}{a_0 - r} \frac{1}{1 - \frac{\Delta a}{a_0 - r}} \approx \frac{Z_2 e^2}{a_0 - r} \left( 1 + \frac{\Delta a}{a_0 - r} \right) = \frac{Z_2 e^2}{a_0 - r} + \frac{Z_2 e^2 \Delta a}{(a_0 - r)^2} \quad (2.55)$$

Тогда используя рассчитанное ранее найденное равновесное расстояние  $r$ , получаем окончательную формулу для расчета изменения энергии электрона вследствие изменения расстояния между атомами 1 и 2

$$\Delta E = \frac{Z_2 \Delta r}{(a_0 - r)^2} \quad (2.56)$$

Где  $\Delta r$  это смещение положения электрона вследствие изменения расстояния между атомами:

$$\Delta r = \Delta a \frac{\sqrt{Z_1}}{\sqrt{Z_1} + \sqrt{Z_2}} \quad (2.57)$$

Рассмотрим эффект №5 (влияния размеров ядер на энергию валентного электрона).

Механизм этого взаимодействия следующий: при добавлении нейтронов в ядро его размеры растут, а заряд остается прежним. Следовательно, увеличивается время пребывания электрона в ядре, поскольку вследствие волновой природы электронов, участвующих в образовании валентной связи,

они частично заходят внутрь ядра. Поскольку размеры ядра изменяются, то изменяется и область электростатического взаимодействия электрона с ядром. Для расчета поправки энергии электрона вследствие указанного эффекта используем квантово-механическую теорию возмущений.

Электростатический потенциал внутри заряженного ядра изотопа равен:

$$\varphi(r) = \begin{cases} \frac{3Ze}{2R} - \frac{Zer^2}{2R^3}, & r \leq R \\ \frac{Ze}{r}, & r > R \end{cases} \quad (2.58)$$

где  $R$  - радиус ядра, при этом ядро принято для упрощения сферическим.

Потенциальная энергия взаимодействия валентного электрона с электростатическим полем ядра равна:

$$U(r) = e\varphi(r) \quad (2.59)$$

При присоединении дополнительных нейтронов к ядру изменяется потенциал электростатического поля внутри ядра, при этом вне ядра потенциал не изменяется, следовательно, для того чтобы подсчитать изменение энергии валентного электрона при увеличении размеров ядра, необходимо учитывать только взаимодействие электронов с ядром только во время нахождения электрона внутри ядра.

Для расчета энергии взаимодействия электрона с ядром, при его нахождении внутри ядра, используем квантово-механическую теорию возмущений. Искомая энергия равна:

$$E = \langle \psi | U(r) | \psi \rangle \quad (2.60)$$

где  $\psi(r)$  - волновая функция валентного электрона.

Считая, что валентный электрон находится в S состоянии, запишем его волновую функцию в виде:

$$\psi(r) = \frac{1}{\sqrt{8\pi a_B^3}} e^{-r/2a_B} \quad (2.61)$$

где  $a_B$  радиус орбиты электрона, который совпадает с боровским радиусом и равен 0,529 Å для атома водорода.

Часть энергии электрона, находящегося в S состоянии, обусловленная его пребыванием внутри ядра равна:

$$E = \int U(r) |\psi(r)|^2 d^3r \quad (2.62)$$

где  $U(r) = \frac{3Ze^2}{2R} - \frac{Ze^2 r^2}{2R^3}$ , и интегрирование производится в пределах объема ядра.

Выполняя интегрирование, получаем:

$$E = \int_0^R \left( \frac{3Ze^2}{2R} - \frac{Ze^2 r^2}{2R^3} - \frac{Ze^2}{r} \right) \frac{1}{8\pi a_B^3} e^{-r/a_B} \cdot 4\pi r^2 dr \quad (2.63)$$

Учитывая, что радиус орбиты электрона  $a_B$  намного больше радиуса ядра  $R$ , т.е.  $R \ll a_B$ , то последний интеграл можно оценить по теореме о среднем:

$$E = \frac{Ze^2}{4R} \left( \frac{R}{a_B} \right)^3 - \frac{Ze^2 R^2}{4a_B^3} - \frac{Ze^2}{6R} \left( \frac{R}{a_B} \right)^3 = -\frac{Ze^2}{6R} \left( \frac{R}{a_B} \right)^3 = -\frac{Ze^2 R^2}{6a_B^3} \quad (2.64)$$

Приведенная формула дает тот вклад в энергию электрона, который обусловлен движением внутри ядра.

Влияние размеров ядра при изменении изотопного состава может быть получено из предыдущей формулы, если считать, что увеличение размеров

ядра мало по сравнению с самим радиусом ядра.  $R=R_0+\Delta R$  и  $\Delta R \ll R_0$ . Тогда изменение энергии при замене изотопа может быть описано формулой:

$$\Delta E = E(r_0 + \Delta r) - E(r_0) = \frac{dE}{dR_0} \cdot \Delta R \quad (2.65)$$

$$\Delta E = -\frac{Ze^2R_0}{3a_B^3} \Delta R \quad (2.66)$$

что в целом подтверждает возможность реализации нейтронного эффекта за счет делокализации электронной плотности в ядрах тяжелых нерадиоактивных изотопов, даже при нулевом (а также другом целочисленном) значении спина ядра и отсутствии у него магнитного момента.

Рассмотрим фактор б):

Предполагая, что имеет место закон равномерного распределения энергии по степеням свободы, из которого следует, что среднее значение полной энергии атома равно  $3/2 kT$  и что средняя потенциальная энергия колебания равна средней кинетической энергии (теорема Вириала), находим, что:

$$\frac{m\omega^2 A^2}{2} = \frac{3kT}{2} \quad (2.67)$$

где  $m$  - масса атома, которую приближенно можно считать массой ядра,  $A^2$  - среднее значение квадрата амплитуды колебаний,  $k$  - постоянная Больцмана,  $T$  - абсолютная температура.

Из последней формулы (2.67) находим, что средняя амплитуда колебаний равна:

$$A = \frac{1}{\omega} \sqrt{\frac{3kT}{m}} \quad (2.68)$$



При изменении изотопного состава масса ядра приобретает добавку  $\Delta m$ , тогда увеличение массы приводит к уменьшению амплитуды колебаний на величину:

$$\Delta A = \frac{\Delta m}{2m\omega} \sqrt{\frac{3kT}{m}} \quad (2.69)$$

где  $m$  - масса легкого изотопа.

Считая, что это уменьшение колебания амплитуды приблизительно равно уменьшению расстояния между атомами, находим, что равновесное положение валентного электрона сдвигается на такую же величину в сторону, противоположную тяжелому изотопу.

Выше была получена формула (2.57) для равновесного положения электрона, находящегося между атомами, где  $\Delta r$  это смещение положения электрона вследствие изменения расстояния между атомами:

$$\Delta r = \Delta A \frac{\sqrt{Z_1}}{\sqrt{Z_1} + \sqrt{Z_2}}. \quad (2.70)$$

где  $\Delta A$  приводится формулой (2.69).

Увеличение энергии вследствие изменения расстояния было рассчитано ранее в формуле (2.56).

## 2.4 Выводы к Главе 2

1. Доказано, что механизмом реализации нейтронного эффекта, является способность некомпенсированного нейтрона модифицировать спин ядра в атомах, а, следовательно, влиять и на реакционную способность химической связи, образуемой изотопами, имеющими суммарную некомпенсированность по нейтронам

2. Установлено, что еще одним механизмом, способным увеличить скорость ферментативной реакции во много раз, является способность некомпенсированного по массе нейтрона инициировать квантовое туннелирование за счет вовлечения одной из описанных выше атомных триад в этот процесс с последующим высвобождением энергии достаточной для образования новой химической связи

3. Доказано, что увеличение энергии электрона пропорционально  $\sqrt{T}$ , т.е. нейтронный эффект оказывается температурно-зависимым в отличие от ранее рассчитанных эффектов взаимодействия магнитных моментов, которые от температуры не зависели.

### **Глава 3 Физико-математическое моделирование и исследование процессов влияния $^2\text{H}/^1\text{H}$ соотношения в органических средах на энергию разрыва водородных связей в двухцепочечной молекуле**

3.1 Физико-математическая модель молекулы, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников и учитывающая энергию разрыва связи между комплементарными парами [144]

Концентрация дейтерия играет важную роль в метаболических процессах гетерогенных систем [144-158]. К настоящему времени достаточно подробно изучены различные эффекты, вызываемые водой с пониженным содержанием дейтерия, в связи с этим, важно изучить долгосрочные эффекты введения воды с пониженным изотопным  $^2\text{H}/^1\text{H}$  составом, а также возможное влияние на двухцепочечные молекулы [159]. Известно, что энергия связи дейтерия на  $\sim 134$  кал/моль выше энергии связи протия, следовательно, дейтерий образует на 5% более прочную водородную связь [160]. Проникновение атома дейтерия вместо протия в водородную связь двойной спирали дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии может вызвать временный сбой в передаче информации, скорее всего, из-за задержки открытия водородной связи. Атомы дейтерия попадают в водородные связи двойных спиралей дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии из-за быстрого изотопного обмена протия-дейтерия с окружающими молекулами воды [161]. При естественном содержании дейтерия в воде (156 ppm) вероятность попадания дейтерия в каждую из возможных водородных связей мала и составляет примерно  $2 \cdot 10^{-4}$  [159]. Помимо флуктуационных закручиваний оси спирали и поворотов соседних пар азотистых оснований в двухцепочечной молекуле, происходит открытие и закрытие отдельных пар азотистых оснований [162]. Этот процесс приводит к изменению конформации и играет важную роль в реакциях двухцепочечных молекул с химическими агентами. Замена атома протия

дейтерием влияет на процесс открытия пар оснований за счет увеличения энергии, необходимой для разрыва связи. На сегодняшний день проведение эксперимента, который позволил бы оценить влияние атома дейтерия на процессы раскрытия пар оснований, затруднен. Теоретическое изучение этих процессов возможно с использованием методов математического моделирования. Одним из ключевых условий возможности применения математической модели дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии является учет открытых состояний. Существующие математические модели двухцепочечных молекул обсуждаются в ряде обзоров [162-164]. Однако, чтобы описать эффекты, вызванные введением атомов дейтерия между парами оснований, была выбрана усовершенствованная модель Л.В. Якушевич [165-168], которая позволяет принимать во внимание энергии водородных связей между парами азотистых оснований. Благодаря введению дополнительного члена эта модель позволяет учитывать эффекты диссипации, вызванные вязкостью среды, окружающей двухцепочечную молекулу. Кроме того, в модели в связи с введением константы крутящего момента данного участка сахарно-фосфатной цепи косвенно учитываются взаимодействия между соседними парами оснований. Еще один аргумент в пользу выбора механической модели Л.В. Якушевич для описания роли атомов дейтерия в процессе открытия и закрытия пар оснований – то, что радиальные модели кручения способны принимать во внимание искажения структуры двухцепочечной молекулы, вызванное внешним торсионным напряжением. Однако большинство физико-химических экспериментов проводится на двухцепочечных молекулах без таких искажений. Можно предположить, что поведение релаксированных молекул одинаково хорошо описывается радиальной и радиально-торсионной моделями [162].

Для моделирования процессов образования и динамики открытых состояний мы будем использовать математическую модель, описывающую вращательное движение азотистых оснований вокруг сахарофосфатной

цепи молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии [169, 163 (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2017660682)]. Эта математическая модель включает в себя уравнения Ньютона:

$$I_1^i \frac{d^2 \varphi_1^i(t)}{dt^2} = K_1^i [\varphi_1^{i-1}(t) - 2\varphi_1^i(t) + \varphi_1^{i+1}(t)] - \delta^i (k_{12}^i R_1^i (R_1^i + R_2^i) \sin \varphi_1^i + k_{12}^i R_1^i R_2^i \sin(\varphi_1^i - \varphi_2^i)) + F_1^i(t), i = \overline{2, n-1}, \quad (3.1)$$

$$I_1^1 \frac{d^2 \varphi_1^1(t)}{dt^2} = K_1^1 [\varphi_1^2(t) - \varphi_1^1(t)] - \delta^1 (k_{12}^1 R_1^1 (R_1^1 + R_2^1) \sin \varphi_1^1 + k_{12}^1 R_1^1 R_2^1 \sin(\varphi_1^1 - \varphi_2^1)) + F_1^1(t), \quad (3.2)$$

$$I_1^n \frac{d^2 \varphi_1^n(t)}{dt^2} = K_1^n [\varphi_1^{n-1}(t) - \varphi_1^n(t)] - \delta^1 (k_{12}^n R_1^n (R_1^n + R_2^n) \sin \varphi_1^n + k_{12}^n R_1^n R_2^n \sin(\varphi_1^n - \varphi_2^n)) + F_1^n(t), \quad (3.3)$$

$$I_2^i \frac{d^2 \varphi_2^i(t)}{dt^2} = K_2^i [\varphi_2^{i-1}(t) - 2\varphi_2^i(t) + \varphi_2^{i+1}(t)] + \delta^i (k_{12}^i R_2^i (R_1^i + R_2^i) \sin \varphi_2^i - k_{12}^i R_1^i R_2^i \sin(\varphi_2^i - \varphi_1^i)) + F_2^i(t), i = \overline{2, n-1}, \quad (3.4)$$

$$I_2^1 \frac{d^2 \varphi_2^1(t)}{dt^2} = K_2^1 [\varphi_2^2(t) - \varphi_2^1(t)] + \delta^1 (k_{12}^1 R_2^1 (R_1^1 + R_2^1) \sin \varphi_2^1 - k_{12}^1 R_1^1 R_2^1 \sin(\varphi_2^1 - \varphi_1^1)) + F_2^1(t), \quad (3.5)$$

$$I_2^n \frac{d^2 \varphi_2^n(t)}{dt^2} = K_2^n [\varphi_2^{n-1}(t) - \varphi_2^n(t)] + \delta^1 (k_{12}^n R_2^n (R_1^n + R_2^n) \sin \varphi_2^n - k_{12}^n R_1^n R_2^n \sin(\varphi_2^n - \varphi_1^n)) + F_2^n(t). \quad (3.6)$$

где:

$\varphi_j^i(t)$  - угловое отклонение  $i$ -го азотистого основания  $j$ -й цепи, отсчитываемое против часовой стрелки в момент времени  $t$ ;

$I_j^i$  - инерция вращения  $i$ -го азотистого основания  $j$ -й цепи;

$R_j^i$  - расстояние от центра инерции  $i$ -го азотистого основания  $j$ -й цепи до сахарофосфатной цепи;

$K_j^i$  - константа, характеризующая крутящий момент  $i$ -го сегмента  $j$ -й сахарофосфатной цепи;

$k_{12}^i$  - константа, характеризующая упругие свойства связи  $i$ -й пары азотистых оснований оснований;

$F_j^i(t)$  - внешнее воздействие на  $i$ -е азотистое основание  $j$ -й цепи по длительности, равной  $t$ ,

$n$  - количество пар оснований азота в системе.

Величина внешней силы принята как  $F_j^i(t) = -\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t) + F_0 \cos \omega t$ , где слагаемое  $-\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t)$  моделирует эффекты диссипации после взаимодействия с водой, окружающей двухцепочечную молекулу, часть  $F_0 \cos \omega t$  - внешнее периодическое воздействие.

В уравнениях (3.1-3.6) первое слагаемое справа от знака равенства описывает силу, действующую на  $i$ -е азотное основание сахаро-фосфатной цепи, вторым слагаемым является сила от дополнительного азотистого основания, а третьим слагаемым – внешнее воздействие.

Таким образом, уравнения (3.1-3.6) позволяют моделировать водородную связь в  $i$ -й паре ( $\delta^i = 1, k_{12}^i = k_{12}^{H,i}$ ), дейтериевую связь ( $\delta^i = 1, k_{12}^i = k_{12}^{D,i}$ ) и разрыв этой связи ( $\delta^i = 0$ ).

Будем считать, что разрыв между парами оснований возникает, если потенциальная энергия связи в этих парах превышает некоторое критическое значение  $E_{cr}^H$  для водородных связей и  $E_{cr}^D$  для дейтериевых связей, но если потенциальная энергия в паре с нарушенной связью меньше, чем критическое значение, то связь восстанавливается.

Добавив начальные условия к уравнениям (3.1-3.6), получим [144]:

$$\varphi_1^i(0) = \varphi_{1,0}^i, \frac{d\varphi_1^i}{dt}(0) = \varphi_{1,1}^i, \quad (3.7)$$

$$\varphi_2^i(0) = \varphi_{2,0}^i, \frac{d\varphi_2^i}{dt}(0) = \varphi_{2,1}^i, i = \overline{1, n}. \quad (3.8)$$

Для определенности будем считать, что при  $t = 0$  и что система находится в равновесии, т. е. в начальных условиях (3.7-3.8):

$$\varphi_{1,0}^i = \varphi_{1,1}^i = \varphi_{2,1}^i = 0, \varphi_{2,0}^i = \pi, i = \overline{1, n}. \quad (3.9)$$

Задача (3.1-3.8) является задачей Коши для системы  $2n$  обыкновенных дифференциальных уравнений. В данной работе все исследования проводились на основе численного решения этой системы.

На рисунке 3.1 представлены графики угловых отклонений азотистых оснований в течение периода времени  $[0, t = 3,0 \cdot 10^{-10} \text{ с}]$  1-й цепи молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты.

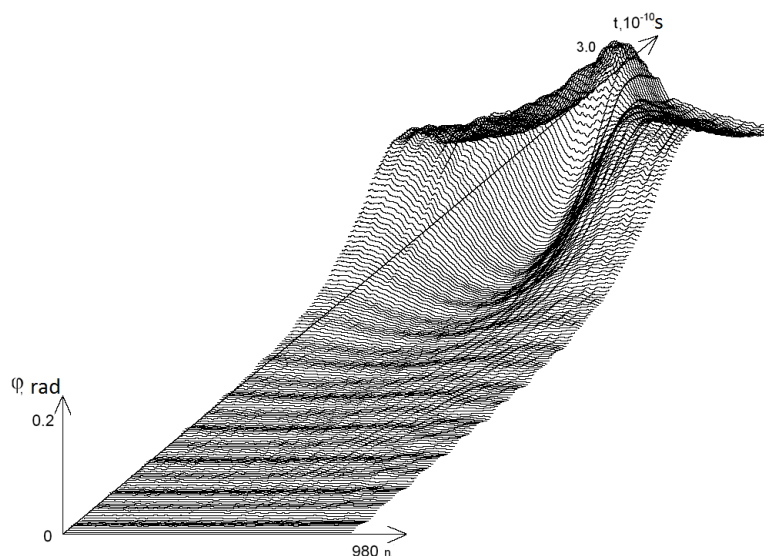


Рисунок 3.1 – Графики угловых отклонений 1-й цепи азотистых оснований двухцепочечной молекулы за период времени:  $[0, t = 3,0 \cdot 10^{-10} \text{ с}]$ .

Было изучено влияние обмена  $^2\text{H}/^1\text{H}$  на формирование и динамику открытых на примере гена, кодирующего интерферон альфа 17.

Для этого гена  $n = 980$ , значения коэффициентов уравнений (3.1-3.6) показаны в Таблице 1 (данные взяты из [165]),  $F_0 = 0,526 \cdot 10^{-22}$  Дж,  $\omega = 0,4 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$ .

Таблица 3.1 – Коэффициенты уравнения (3.1-3.6).

Тип базы	$A$	$T$	$G$	$C$
$I \cdot 10^{-44}, \text{ kg} \cdot \text{ m}^2$	7,61	4,86	8,22	4,11
$R, \text{ \AA}$	5,80	4,80	5,70	4,70
$K \cdot 10^{-18}, \text{ J}$	2,35	1,61	2,27	1,54
$k_{12}^H \cdot 10^{-2}, \text{ N/m}$	6,20	6,20	9,60	9,60
$\beta \cdot 10^{-34}, \text{ J} \cdot \text{ s}$	4,25	2,91	4,10	2,79

Обозначим  $P_0$ , как вероятность образования открытых состояний в молекуле, в которой все пары азотистых оснований связаны водородными связями,  $P_i$ ,  $i = \overline{1, n}$  – вероятность появления открытых состояний в двухцепочечной молекуле, в которой в  $i$ -е азотистое основание одной пары любой водородной связи будет заменено на дейтерий.

Вероятности  $P_0$  и  $P_i$ ,  $i = \overline{1, n}$ , искали на основе численного решения задачи (3.1-3.8). Для этого мы создали множество точек  $t_j = jT$ ,  $j = \overline{1, m}$ ,  $T = T/m$  в отрезке  $[0, T]$ . Затем мы вычислили при  $t = t_j$  отношение  $q_j$  количества пар оснований с разорванной связью к общему количеству пар оснований  $n$ , тогда значение  $P_k$  будет равно среднему арифметическому значению по точкам  $t_j$  этого отношения:

$$P_i = m^{-1} \left( \sum_{j=1}^m q_j \right) \quad (3.10)$$

Так как дейтериевая связь на 5% сильнее, чем водородная, [25], мы взяли  $E_{cr}^D = k^D \cdot E_{cr}^H$ ,  $k_{12}^{D,i} = k^D \cdot k_{12}^{H,i}$ ,  $k^D = 1,05$ ,  $K^D = 1,05$ .

Для различных значений  $E_{cr}^H$  рассчитывались значения  $P_0$  и  $P_i$ ,  $i = \overline{1, n}$ . Расчеты выполнены с точностью  $10^{-6}$  для  $T = 3,0 \cdot 10^{-10} \text{ с}$ ,  $T = 0,0001 \cdot 10^{-10} \text{ с}$ .



Для проведения расчетов на основе математической модели была разработана компьютерная программа. Он работает следующим образом: когда атом дейтерия входит в водородные связи между первой парой оснований гена, кодирующего интерферон альфа, решается 17 980 уравнений (методом Рунге – Кутты 4-го порядка) для вычисления средней вероятности появления открытых состояний в гене, затем аналогичный расчет выполняется для второй пары оснований и т. д.

Динамика открытых состояний молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии и влияние на нее  $^2\text{H}/^1\text{H}$  обмена проиллюстрированы на рис. 2, зоны открытых состояний выделены цветом. Рисунок 3.2 соответствует энергии  $E_{cr}^H = 0,31 \cdot 10^{-22} \text{ Н} \cdot \text{м}$ .

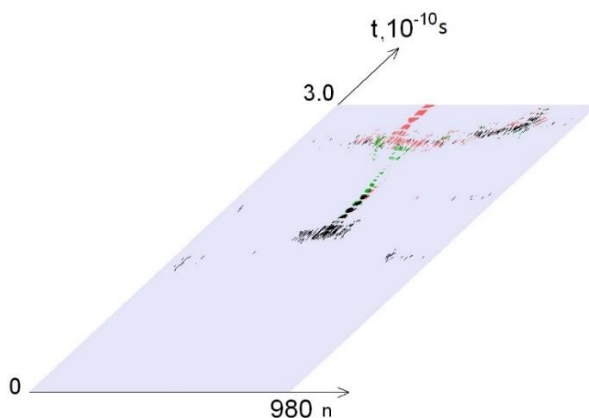


Рисунок 3.2 – Динамика возникновения открытых состояний для последовательности полипептидов интерферона альфа 17,  $E_{cr}^H = 0,31 \cdot 10^{-22} \text{ Н} \cdot \text{м}$ .

*Примечание:* зеленые точки показывают динамику открытых состояний, когда дейтерий был помещен в  $i_{\min}$  (365 пар оснований, Таблица 3.2), красными точками показана динамика открытых состояний, когда дейтерий помещался в  $i_{\max}$  (711 пары оснований, Таблица 3.2) и черные точки представляют собой значения совпадения для  $i_{\min}$  и  $i_{\max}$ .

В таблице 3.2 приведены данные о значениях  $P_0$ ,  $i_{\min}$  и  $i_{\max}$  числа пар азотистых оснований, замещение которых в водородной связи на дейтериевую

связь приводит к наименьшему и наибольшему значениям вероятности возникновения открытого состояния  $P_{i_{min}}$  и  $P_{i_{max}}$ .

Таблица 3.2 – Вероятности появления открытых состояний между различными азотистыми основаниями в двухцепочечной молекуле в зависимости от одиночной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$

$E_{cr}^H \cdot 10^{-22} \text{ N}\cdot\text{m}$	$P_0$	$i_{min}$ , or nCS	$i_{max}$	$P_{i_{min}}$	$P_{i_{max}}$
0,30	0,0158002	498	544	0,0140623	0,0185293
0,31	0,0135005	365	711	0,0111363	0,0157753
0,32	0,0107263	475	555	0,0098598	0,0124513
0,33	0,0089972	858	405	0,0085322	0,0105687
0,34	0,0069408	299	435	0,0065120	0,0082811
0,35	0,0070181	512	383	0,0051732	0,0073687
0,36	0,0067221	80	459	0,0054978	0,0072946
0,37	0,0060742	102	651	0,0051911	0,0066520
0,38	0,0036320	191	451	0,0035676	0,0046222
0,39	0,0036706	553	506	0,0031209	0,0043160
0,40	0,0027459	688	422	0,0026089	0,0032148
0,41	0,0020461	284	487	0,0019833	0,0029466
0,42	0,0024118	526	341	0,0022690	0,0025324
0,43	0,0018781	676	509	0,0018024	0,0018882
0,44	0,0015812	284	429	0,0014226	0,0018898
0,45	0,0012137	678	422	0,0011902	0,0012356
0,46	0,0010036	284	422	0,0009866	0,0010921
0,47	0,0009419	284	422	0,0009282	0,0009590
0,48	0,0006775	284	422	0,0006355	0,0007785
0,49	0,0005409	284	422	0,0004716	0,0005861
0,50	0,0001030	284	422	0,0000739	0,0002028
0,51	0,0000386	58	422	0,0000297	0,0000598

Продолжение таблицы 3.2

$E_{cr}^H \cdot 10^{-22}$ N·m	$P_0$	$i_{min}$ , or nCS	$i_{max}$	$P_{i_{min}}$	$P_{i_{max}}$
0,52	0,0000279	284	395, 403, 404, 411, 422, 513	0,0000273	0,0000284
0,53	0,0000252	284	411, 422	0,0000243	0,0000261
0,54	0,0000151	52, 53, 58, 73, 93, 108, 127, 204, 284	334, 345, 353, 358, 359, 361, 362, 376, 378, 383, 388, 389, 392, 395, 403, 404, 411, 444, 513	0,0000148	0,0000153
0,55	0,0000142	58, 108, 284	353	0,0000138	0,0000145
0,56	0,0000132	58	353, 395, 404, 411	0,0000127	0,0000135
0,57	0,0000120	58	353, 395, 403, 404, 411	0,0000114	0,0000124
0,58	0,0000104	58	353	0,0000090	0,0000111
0,59	0,0000000	nCS = 980	-	0,0000000	-

Примечание: CS - это закрытое состояние ( $P_{CS} = 0$ ).

3.2 Физико-математическое моделирование возникновения разрывов водородных связей между парами азотистых оснований в двухцепочечной молекуле в зависимости от изотопного  $^2\text{H}/^1\text{H}$  состава сред [144]

Последовательность полипептидов, кодирующая интерферон альфа 17 (IFNA17) и содержащая 980 пар нуклеотидов, условно разделена на три равные части: I часть (с 1-го по 327-е основание,  $n = 327$ ), II часть (с 328-го по 653-е основание,  $n = 326$ ) и III часть (с 654 по 980 основания,  $n = 327$ ). Для всей

последовательности полипептидов мы подсчитали вероятности ( $P_i$ ) появления открытых состояний между различными азотистыми основаниями в двухцепочечной молекуле в зависимости от одной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  в паре оснований каждой области последовательности полипептидов. Все  $P_i$  были расположены от  $P_{\text{imin}}$  до  $P_{\text{imax}}$ , и каждый из них сравнивался с  $P_0$ , который определяли, как вероятность возникновения ОС, когда все водородные связи в дезоксирибонуклеиновой кислоте в конденсированном состоянии составляют  $^1\text{H}$ . По порядковому номеру каждой пары нуклеотидных оснований определялась ее принадлежность к I части, II части или III части IFNA17, а затем определялось количество пар азотистых оснований из диапазонов «Максимум» и «Минимум» для всей последовательности полипептидов и ее частей. Азотистые основания, которые имели  $P_{\text{imax}}$ , и пары оснований с более высоким  $P_i$  были выбраны как представители максимального диапазона («Максимум»). Азотистые основания, содержащие  $P_{\text{imin}}$ , и пары оснований с более низким  $P_i$  были выбраны как образцы минимального диапазона («Minimum»). Диапазоны «Максимум» и «Минимум» были найдены различными методами, представленными ниже: методом децилей [170], методом квартилей [170] и новым методом – алгоритмом.

Децильный метод:

(1)  $i \in$  диапазон «Максимум» (верхний 10-й дециль,  $\text{Dec}_{10}$ ):

$$P_i \geq P_{\text{imax}} - 1/10 \cdot (P_{\text{imax}} - P_{\text{imin}}) \Rightarrow n_{\text{max}} = \sum n P_i;$$

(2)  $i \in$  диапазон «Минимум» (нижний 1-й дециль,  $\text{Dec}_1$ ):

$$P_i \leq P_{\text{imin}} + 1/10 \cdot (P_{\text{imax}} - P_{\text{imin}}) \Rightarrow n_{\text{min}} = \sum n P_i.$$

Квартильный метод \*:

(1)  $i \in$  диапазон «Максимум» (1-й квартиль диапазона «Максимум»,  $Q1\text{-max}$ ):

$$P_i \geq P_{\text{imax}} - 1/4 \cdot (P_{\text{imax}} - P_0) \Rightarrow n_{\text{max}} = \sum n P_i;$$

(2)  $i \in$  диапазон «Минимум» (4-й квартиль диапазона «Минимум»,  $Q4\text{-min}$ ):

$$P_i \leq P_{imin} + 1/4 \cdot (P_0 - P_{imin}) \Rightarrow n_{min} = \sum nP_i.$$

\* Примечание: математическое описание других квартилей:

- a.  $i \in$  диапазон Q2-max:  $P_{imax} - 1/4 \cdot (P_{imax} - P_0) > P_i \geq P_{imax} - 1/2 \cdot (P_{imax} - P_0)$ ;
- b.  $i \in$  диапазон Q3-max:  $P_{imax} - 1/2 \cdot (P_{imax} - P_0) > P_i \geq P_{imax} - 3/4 \cdot (P_{imax} - P_0)$ ;
- c.  $i \in$  диапазон Q4-max:  $P_{imax} - 3/4 \cdot (P_{imax} - P_0) > P_i > P_0$ ;
- d.  $i \in$  диапазон Q1-min:  $P_{imin} + 3/4 \cdot (P_0 - P_{imin}) < P_i < P_0$ ;
- e.  $i \in$  диапазон Q2-min:  $P_{imin} + 1/2 \cdot (P_0 - P_{imin}) < P_i \leq P_{imin} + 3/4 \cdot (P_0 - P_{imin})$ ;
- f.  $i \in$  диапазон Q3-min:  $P_{imin} + 1/4 \cdot (P_0 - P_{imin}) < P_i \leq P_{imin} + 1/2 \cdot (P_0 - P_{imin})$ ;

III. Алгоритм:

(1)  $i \in$  диапазон «Максимум»:

a. если  $P_{imax} - 1/10 \cdot (P_{imax} - P_{imin}) \geq P_0 + 1/2 \cdot (P_{imax} - P_0)$  и  $P_{imax} > P_0 \geq P_{imin} \geq 0$ :  $P_i \geq P_{imax} - 1/10 \cdot (P_{imax} - P_{imin}) \Rightarrow n_{max} = \sum nP_i$ ; или иначе:

b. если  $P_{imax} - 1/10 \cdot (P_{imax} - P_{imin}) < P_0 + 1/2 \cdot (P_{imax} - P_0)$  и  $P_{imax} > P_0 \geq P_{imin} \geq 0$ :  $P_i \geq P_{imax} - 1/4 \cdot (P_{imax} - P_0) \Rightarrow n_{max} = \sum nP_i$ ;

(2)  $i \in$  диапазон «Минимум»:

a. если  $P_{imax} - 1/10 \cdot (P_{imax} - P_{imin}) \geq P_0 + 1/2 \cdot (P_{imax} - P_0)$  и  $P_{imax} > P_0 \geq P_{imin} \geq 0$ :  $P_i \geq P_{imax} - 1/10 \cdot (P_{imax} - P_{imin}) \Rightarrow n_{max} = \sum nP_i$ ; или по-другому:

b. если  $P_{imax} - 1/10 \cdot (P_{imax} - P_{imin}) < P_0 + 1/2 \cdot (P_{imax} - P_0)$  и  $P_{imax} > P_0 \geq P_{imin} \geq 0$ :  $P_i \geq P_{imax} - 1/4 \cdot (P_{imax} - P_0) \Rightarrow n_{max} = \sum nP_i$  или по-другому:

c.  $P_{imax} = P_{imin} = \sum P_{i \in Q2-Q4-min} = P_i = 0$ :  $n_{min} = 0$

где:  $n_{min}$  - номера пар азотистых оснований ( $i$ ), которые были включены в диапазон «Минимум»;  $n_{max}$  - это число  $i$ , которое было включено в диапазон «Maximum»; если  $P_i \leq P_{imin} + 3/4 \cdot (P_0 - P_{imin})$ :  $i \in$  диапазону от Q2-min до Q4-min (Q2-Q4-min).

Диапазон значений  $E_{cr}^H$  составлял от 0,30 до 0,59, при этом изменение энергии, учитываемое при расчете открытых состояний, во всем диапазоне было равномерным и равным 0,01 (табл. 2).

Кроме того, для точного определения количества  $n_{min}$  и  $n_{max}$  пар азотистых оснований в диапазоне от 0,30 до 0,59 (где каждый  $E_{thr}^H$  имел

$n_{\min}$  или  $n_{\max}$  больше 0 для всего гена), их количество также было рассчитано для меньших диапазонов  $E_{cr}^H$ :

- а. от 0,30 до 0,43, выбранные из III части, которая в этом диапазоне имела суммарное значение  $n_{\max}$  более 0;  $n_{\max}$ , измеренный децильным методом, составил 203 (рис. 3.3), квартильным методом - 88 (рис. 3.4), а алгоритмом - 87 (рис. 3.5);
- б. от 0,44 до 0,59, выбранные из III части, которая в этом диапазоне имела суммарное значение  $n_{\max}$  равное 0;  $n_{\max}$ , измеренный каждым подходом: методом децилей, методом квартилей или алгоритмом, всегда равнялся 0 (рис. 3.3).

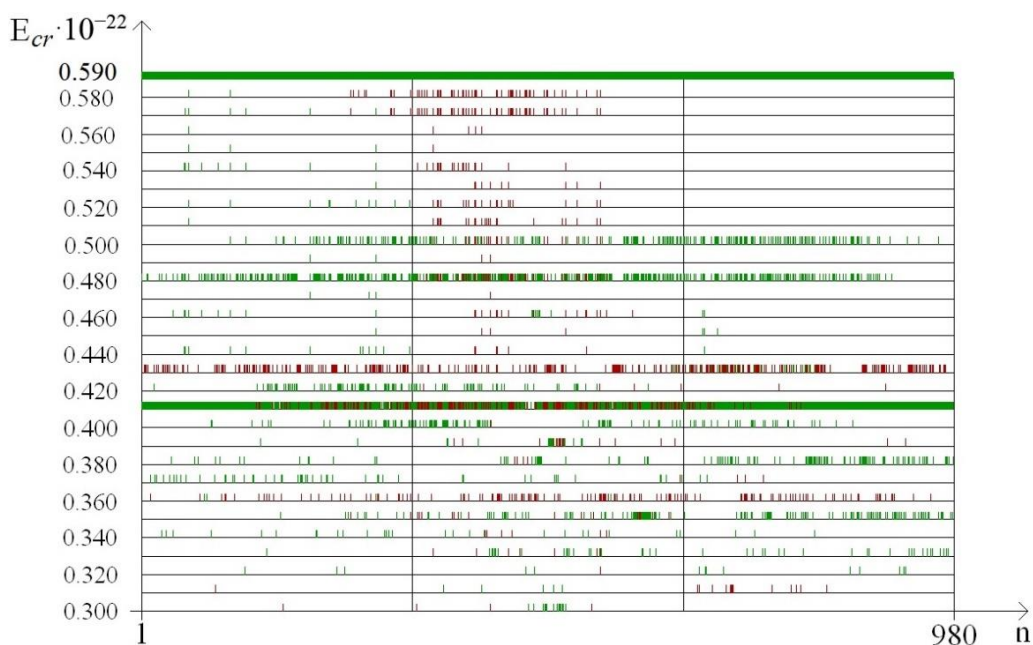


Рисунок 3.3 – График распределения пар азотистых оснований (которое было рассчитано децильным методом) в различных частях интерферона альфа 17 (IFNA17), приводящее после однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  к экстремальной частоте возникновения открытого состояния.

*Примечание:* красная точка - это расположение атома дейтерия в молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты, которое приводит к максимальной вероятности появления открытого состояния (диапазон); зеленая точка - это расположение атома дейтерия в двухцепочечной молекуле, которое приводит к минимальной вероятности появления открытого состояния (диапазон).

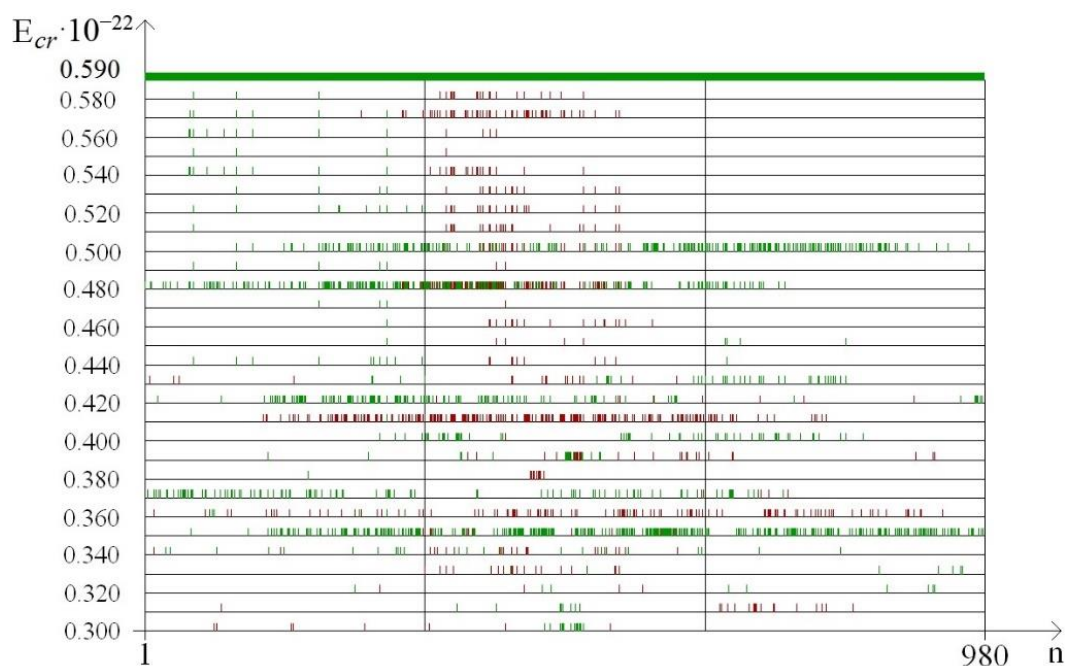


Рисунок 3.4 – График распределения пар азотистых оснований (которое было рассчитано методом квартилей) в различных частях интерферона альфа 17 (IFNA17), приводящее после однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  к экстремальной частоте возникновения открытого состояния.

*Примечание:* красная точка - это расположение атома дейтерия в молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты, которое приводит к максимальной вероятности появления открытого состояния (диапазон); зеленая точка - это расположение атома дейтерия в двухцепочечной молекуле, которое приводит к минимальной вероятности появления открытого состояния (диапазон).

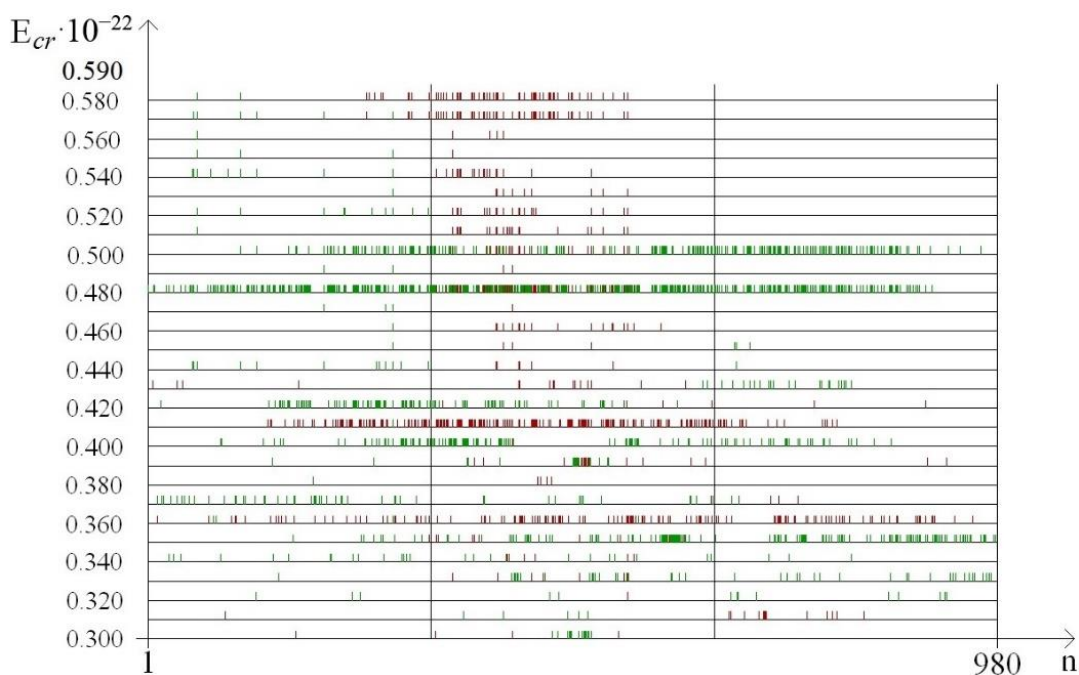


Рисунок 3.5 – Распределение в различных частях интерферона альфа 17 (IFNA17) пар азотистых оснований (которое было рассчитано алгоритмом), приводящее после однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  к экстремальной частоте возникновения открытого состояния.

*Примечание:* красная точка - это расположение атома дейтерия в молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты, которое приводит к максимальной вероятности появления открытого состояния (диапазон); зеленая точка - это расположение атома дейтерия в двухцепочечной молекуле, которое приводит к минимальной вероятности появления открытого состояния (диапазон).

После этого мы использовали некоторые статистические методы, чтобы уточнить достоверность различий между  $n_{\min}$  и  $n_{\max}$  трех частей последовательности полипептидов.

Критерий  $\chi^2$  с поправкой Йейтса ( $\chi^2_{\text{Yates}}$ ) был применен для таблицы 3.3 непредвиденных обстоятельств  $2 \times 2$  (где степени свободы ( $\nu$ ) =  $(2-1) \cdot (2-1) = 1$ ).



Таблица 3.3 – Критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса.

	S	F	
A	<i>a</i>	<i>b</i>	$N_A$
B	<i>c</i>	<i>d</i>	$N_B$
	$N_S$	$N_F$	$N$

где A и B - ряды по частям гена: I, II или III; S - столбец  $n_{\min}$  диапазона «Минимум» или  $n_{\max}$  диапазона «Максимум»; F - столбец оставшегося числа пар нуклеотидов; *a* и *c* представляют собой  $n_{\min}$  диапазона «Минимум» или  $n_{\max}$  диапазона «Максимум» в каждой сравниваемой части последовательности полипептидов в определенном диапазоне  $E_{\text{thr}}^H$ ; *b* и *d* равны общему количеству пар нуклеотидов части гена  $n_{\min}$  диапазона «Минимум» или  $n_{\max}$  диапазона «Максимум» в каждой сравниваемой части последовательности полипептидов в определенном диапазоне  $E_{\text{thr}}^H$ ;  $N_A = a + b$ ;  $N_B = c + d$ ;  $N_S = a + c$ ;  $N_F = b + d$ ;  $N = N_A + N_B + N_S + N_F$ .

$$\chi^2_{\text{Yates}} = N \cdot (|ad - bc| - N/2)^2 / N_A \cdot N_B \cdot N_S \cdot N_F.$$

$\chi^2$ , скорректированный по принципу Бонферрони ( $\chi^2_B$ ), использовался для таблицы непредвиденных обстоятельств  $3 \times 2$  (где 3 - строки, 2 - столбцы,  $\nu = (3-1) \cdot (2-1) = 2$ ).

Для сравнения  $n_{\min}$  диапазона «Минимум» или  $n_{\max}$  диапазона «Максимум» в определенном диапазоне  $E_{\text{cr}}^H$  для двух частей последовательности полипептидов, которые являются взаимно независимыми, применяли дисперсионный анализ Краскела – Уоллиса по рангам (KWt). Медианный тест (Mt) использовали для сравнения  $n_{\min}$  диапазона «Минимум» или  $n_{\max}$  диапазона «Максимум» в определенном диапазоне  $E_{\text{cr}}^H$  для двух частей последовательности полипептидов, которые являются взаимно независимыми (рисунок 3.4).

Было обнаружено, что количество  $n_{\min}$  и  $n_{\max}$  открытых состояний для каждой части последовательности полипептидов было различным в описанных выше диапазонах  $E_{\text{cr}}^H$  (таблица 3.4).

В диапазоне  $E_{\text{cr}}^H$  от 0,30 до 0,59 наибольшее число  $n_{\max}$  было во II части, например, при подсчете децильным методом ( $\chi^2_{\text{в}}: p < 0,001$ )  $n_{\max}$  во II части было в 2,76 и 2,89 раза выше, чем в I и III частях соответственно, но для квартильного метода ( $\chi^2_{\text{в}}: p < 0,001$ )  $n_{\max}$  во II части было в 5,35 и 6,69 раза выше, а по алгоритму ( $\chi^2_{\text{в}}: p < 0,001$ )  $n_{\max}$  во II части было в 4,74 и 5,94 раза выше по сравнению с I частью и III частью соответственно (таблица 3.4).

При этом, в том же диапазоне  $E_{\text{cr}}^H$  во II части IFNA17 наибольшее число  $n_{\min}$  также было только в том случае, если оно было подсчитано с помощью алгоритма ( $\chi^2_{\text{в}}: p < 0,002$ ), который показал, что  $n_{\min}$  во II части было в 1,22 и в 1,30 раза выше, чем в I и III частях соответственно.

При этом число  $n_{\min}$ , рассчитанное методом квартилей, оказалось выше в I части по сравнению со II и III частью на 9,2% и 48,5% соответственно ( $\chi^2_{\text{в}}: p < 0,001$ , таблица 3.4).

Следует отметить, что  $n_{\min}$ , рассчитанное децильным методом при одинаковых условиях, не имело различий во всех частях гена ( $\chi^2_{\text{в}}: p > 0,2$ ).

Таблица 3.4. – Количество  $n_{\min}$  и  $n_{\max}$  в двухцепочечной молекуле, зависящее от одиночной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$ , которое подсчитывали с помощью различных подходов в некоторых диапазонах  $E_{\text{cr}}^H$ .

Диапазон of $E_{\text{cr}}^H \cdot 10^{-22}$ Н · м, n	Часть IFNA17	Приближение		
		Децильный метод	Квартильный метод	Алгоритм
1	2	3	4	5
0,30–0,59 $n_{\max}$ .	I	212	110	109
	II	586 #	589 #	517 #
	III	203 □	88 □	87 □
0,30–0,59 $n_{\min}$	I	998	1124	386

Продолжение таблицы 3.4

1	2	3	4	5
	II	1014	1029 *	472 #
	III	1080	757 #, □	363 □
0,30–0,43 n <sub>max</sub> .	I	195	92	92
	II	321 #	285 #	252 #
	III	203 □	88 □	87 □
0,30–0,43 n <sub>min</sub>	I	439	556	162
	II	444	543	235 #
	III	550 #, □	310 #, □	162 □
0,44–0,59 n <sub>max</sub> .	I	17	18	17
	II	265 #	304 #	265 #
	III	0 #, □	0 #, □	0 #, □
0,44–0,59 n <sub>min</sub>	I	559	568	224
	II	570	486 #	237
	III	530	447 #	201

Примечание: \* - значение  $p(\chi^2_{Yates}) < 0,05$  по сравнению с аналогичным значением  $n$  в части I, измеренным тем же методом; # - значение  $p(\chi^2_{Yates}) < 0,01$  по сравнению с аналогичным значением  $n$  в части I, измеренным тем же методом; - это  $p$ -значение  $(\chi^2_{Yates}) < 0,01$  по сравнению с аналогичным  $n$  из II части, измеренным тем же методом.

Сравнение общего числа  $n_{max}$  концов гена (сумма I части и III части) с количеством пар оснований диапазона «Максимум» в центральной части последовательности полипептидов показало, что вторая часть имела больше  $n_{max}$ , чем оба конца IFNA17, что в 1,41 раза больше по методу децилей ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ ), в 2,97 раза больше по методу квартилей ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ ) и в 2,64 раза больше по алгоритму ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ ). При этом, количество азотистых оснований диапазона «Минимум» не имело разницы между концами и

центральной частью последовательности полипептидов, рассчитанными децильным методом ( $p\chi^2_{Yates} = 0,057$ ), но разница  $n_{min}$ , рассчитанная методом квартилей, была значимой ( $p\chi^2_{Yates} = 0,012$ ) и превышала разницу по алгоритму ( $p\chi^2_{Yates} = 0,0001$ ).

Сравнение количества азотистых оснований диапазона «Максимум» в зависимости от каждого  $E_{cr}^H$  (от 0,30 до 0,59) в разных частях последовательности полипептидов показало разницу, и если это было подсчитано децильным методом, методом квартилей или по алгоритму, то  $p_{KWt}$  и  $p_{Mt}$  всегда были меньше 0,0001 (рис. 3.3-3.5). В отличие от него, количество азотистых оснований диапазона «Минимум» не имело разницы при подсчете децильным методом ( $p_{KWt} = 0,223$ ;  $p_{Mt} = 0,325$ , рисунок 3), но разница была обнаружена для  $n_{min}$ , вычисленного методом квартилей ( $p_{KWt} = 0,046$ ;  $p_{Mt} = 0,079$ , рис. 3.4) и по алгоритму ( $p_{KWt} = 0,034$ ;  $p_{Mt} = 0,111$ , рис. 3.5). Кроме того, несоответствие между  $n_{max}$  концов последовательности полипептидов IFNA17 и количеством пар оснований диапазона «Максимум» в его центре также было подтверждено децильным методом, методом квартилей и алгоритмом ( $p_{KWt} < 0,001$ ;  $p_{Mt} < 0,001$ ). Однако при всех подходах к  $n_{min}$  не было достигнуто каких-либо значительных  $p_{KWt}$  или  $p_{Mt}$ , и каждое  $p_{KWt}$  и  $p_{Mt}$  было больше 0,12 в этом диапазоне  $E_{cr}^H$ .

В то же время в диапазоне более высокого  $E_{cr}^H$  (от 0,44 до 0,59) наибольшее количество пар оснований диапазона «Максимум» было также во II части ( $\chi^2_B$ :  $p < 0,001$ ), например, число  $n_{max}$ , рассчитанное по формуле каждого метода во II части последовательности полипептидов было более чем в 15,5 раз выше, чем в его I части ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ , таблица 3.4). Более того, для III части IFNA17 вообще не было нуклеотидов в диапазоне «Максимум» для этих энергий, поэтому  $n_{max}$  центральной части гена также более чем в 15,5 раз выше, чем  $n_{max}$  его концов ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ ). Сравнение  $n_{max}$  в трех частях последовательности полипептида, в зависимости от каждого  $E_{cr}^H$  от 0,44 до 0,59, указало на значительную разницу между ними, и если она была рассчитана децильным методом, методом квартилей или алгоритмом, то  $p_{KWt}$

и  $p_{Mt}$  всегда будут меньше 0,0001 (рис. 3.3–3.5). В отличие от этого, если  $n_{min}$  было рассчитано децильным методом ( $\chi^2_B: p > 0,5$ ) и алгоритмом ( $\chi^2_B: p > 0,2$ ), количество азотистых оснований в диапазоне «Минимум» не имело различий между тремя частями IFNA17, но разница была обнаружена путем подсчета методом квартилей ( $\chi^2_B: p < 0,002$ , таблица 3.4).

Кроме того, не было статистического неравенства  $n_{min}$  между II частью и III частью ( $p\chi^2_Y$  составляет от 0,0816 до 0,1947 в зависимости от метода подсчета), концами и центром последовательности полипептидов ( $p\chi^2_Y$  составляет от 0,1699 до 0,3313 в зависимости от метода подсчета), но при вычислении квартильным методом количество пар оснований в диапазоне «Минимум» I части было выше по сравнению со II частью и III частью на 16,9% ( $p\chi^2_{Yates} = 0,0099$ ) и 27,1% ( $p\chi^2_{Yates} = 0,0001$ ) соответственно (Таблица 3.4). При сравнении  $n_{min}$  в I, II и III частях IFNA17, в зависимости от каждого  $E_{cr}^H$  от 0,44 до 0,59, была обнаружена значительная разница между ними, которая равна  $p_{KWt} = 0,0034$  и  $p_{Mt} = 0,0080$ , если рассчитывать децильным методом,  $p_{KWt} = 0,0006$  и  $p_{Mt} < 0,0001$  - методом квартилей, а также  $p_{KWt} = 0,0002$  и  $p_{Mt} < 0,0001$  – алгоритмом. Сравнение концов и центра гена, в зависимости от каждого  $E_{cr}^H$  в этом диапазоне энергий, выявило значительные различия между значениями  $n_{max}$  и  $n_{min}$  всеми методами подсчета (для  $n_{max}$ :  $p_{KWt}$  было меньше 0,0001, а  $p_{Mt}$  - от 0,0001 до 0,0010; для  $n_{min}$ :  $p_{KWt}$  были от 0,0003 до 0,0060, а  $p_{Mt}$  - от 0,0012 до 0,0131).

В диапазоне  $E_{cr}^H$  от 0,30 до 0,43 по децильному методу ( $\chi^2_B: p < 0,001$ , рис. 3.3) во II части IFNA17 общее нуклеотидное число диапазона «Максимум» было выше, чем  $n_{max}$  I части в 1,65 раза ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ ) и  $n_{max}$  III части в 1,58 раза ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ ). Метод квартилей продемонстрировал ( $\chi^2_B: p < 0,001$ , рис. 3.4), что в этом диапазоне энергий у II части последовательности полипептидов общее количество  $n_{max}$  значительно выше по сравнению с  $n_{max}$  I части (в 3,10 раза,  $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ ), или III части (в 3,24 раза  $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ ). Согласно алгоритму ( $\chi^2_B: p < 0,001$ , рисунок 3.5), аналогичное число во II части

IFNA17 было выше, чем  $n_{\max}$  I части в 2,74 раза ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ ) и  $n_{\max}$  III части в 2,89 раза ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ , таблица 3.4).

Сравнение количества пар оснований диапазона «Минимум» среди трех частей последовательности полипептидов показало различия с помощью децильного метода ( $\chi^2_B: p < 0,002$ ), метода квартилей ( $\chi^2_B: p < 0,001$ ) и алгоритма ( $\chi^2_B: p < 0,001$ ). Более того, часть гена, включающая наибольшее значение  $n_{\min}$ , различалась в зависимости от метода подсчета, например, при расчете децильным методом в III части было наибольшее количество  $n_{\min}$  на 25,3% и 23,9% больше, чем в части I ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0002$ ) и II части ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0005$ ) соответственно, а если он был рассчитан методом квартилей, то I часть имела наибольшее значение  $n_{\min}$ : на 79,4% больше, чем III часть ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ ), но не II часть ( $p\chi^2_{Yates} = 0,74$ ), а при подсчете по алгоритму у II части было наибольшее количество  $n_{\min}$ : на 45,1% больше, чем у I части и III части ( $p\chi^2_{Yates} = 0,0002$ , Таблица 3.4). Кроме того,  $n_{\max}$  в I, II и III частях IFNA17 в зависимости от каждого  $E_{cr}^H$  (от 0,30 до 0,43) часто были неодинаковыми, например, при подсчете децильным методом ( $p_{Kwt} = 0,0493$ ,  $p_{Mt} = 0,0764$ , рисунок 3.3), методом квартилей ( $p_{Kwt} = 0,0335$ ,  $p_{Mt} = 0,0244$ , рис. 3.4) или алгоритмом ( $p_{Kwt} = 0,0220$ ,  $p_{Mt} = 0,0293$ , рис. 3.5). Количество пар оснований диапазона «Минимум», зависящие от аналогичных условий в этих частях гена не имело различий, например, рассчитанные децильным методом ( $p_{Kwt} = 0,491$ ,  $p_{Mt} = 0,424$ ), методом квартилей ( $p_{Kwt} = 0,386$ ,  $p_{Mt} = 0,135$ ), либо по алгоритму ( $p_{Kwt} = 0,308$ ,  $p_{Mt} = 0,215$ ).

Различие в количестве азотистых оснований диапазона «Максимум» между концом и центром последовательности полипептидов было выражено сильнее:  $p\chi^2_{Yates}$  было меньше 0,0001, если  $n_{\max}$  рассчитывали децильным методом, методом квартилей или алгоритмом. Более того, сравнение конца последовательности полипептидов с центром (в зависимости от каждого  $E_{cr}^H$ ) показало, что  $p_{Kwt}$  были меньше 0,05 для  $n_{\max}$ , рассчитанного методом квартилей (0,0475) или алгоритмом (0,0295), а  $p_{Mt}$  были меньше чем 0,05 для  $n_{\max}$ , рассчитанного децильным методом и алгоритмом (оба равны 0,0233). С

другой стороны, в этом диапазоне энергий (в зависимости от каждого  $E_{cr}^H$ )  $n_{min}$  на концах IFNA17 по сравнению с его количеством в центральной части последовательности полипептидов не имело различий по децильному методу ( $p_{Kwt} = 0,505$ ,  $p_{Mt} = 0,449$ ), квартильному методу ( $p_{Kwt} = 0,382$ ,  $p_{Mt} = 0,449$ ) или алгоритму ( $p_{Kwt} = 0,420$ ,  $p_{Mt} = 0,449$ ).

Также следует отметить, что среди трех частей последовательности полипептидов (вне зависимости от диапазона энергий) различия между общим количеством  $n_{max}$  и  $n_{min}$  были наименьшими во II части последовательности полипептидов: от 38,3% (диапазон  $E_{cr}^H$ : 0,30 – 0,43,  $n_{min} > n_{max}$ ) до 115,1% (диапазон  $E_{cr}^H$ : 0,44–0,59,  $n_{min} > n_{max}$ ) при подсчете децильным методом от 59,8% (диапазон  $E_{cr}^H$ : 0,44–0,59,  $n_{min} > n_{max}$ ) до 90,5% (диапазон  $E_{cr}^H$ : 0,30–0,43,  $n_{min} > n_{max}$ ) – квартильным методом от 7,2% (диапазон  $E_{cr}^H$ : 0,30–0,43,  $n_{min} < n_{max}$ ) до 11,8% (диапазон  $E_{cr}^H$ : 0,44–0,59,  $n_{min} < n_{max}$ ) – по алгоритму. В отличие от этого, более высокие различия между общим количеством  $n_{max}$  и  $n_{min}$  чаще наблюдались в III части последовательности полипептидов, считая децильным методом, или в I части - методом квартилей (таблица 3.4).

Хотя, теоретически не должно быть различий в трех частях (I, II и III) IFNA17 между количествами  $n_{min}$  или  $n_{max}$  ОС, зависящих от одной замены  $^2H/^1H$ , потому что каждая часть фактически имела одинаковое количество пар азотистых оснований в образующей ее дезоксирибонуклеиновой кислоты [171], математическое моделирование показало гораздо более существенные различия между их количеством в описываемых участках последовательности полипептидов. Появление в какой-либо части последовательности полипептидов некоторого значительного колебания количества пар нуклеотидов как с более высоким  $P_i$ , так и с более низким  $P_i$  по сравнению с  $P_0$  (что коррелирует с основной частотой открытых состояний) приводит к более высокому риску изменения функциональной активности всей дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии. [172]. Это возможно благодаря тому, что стабильность двухцепочечной молекулы поддерживается водородной связью между комплементарными азотистыми

основаниями и нековалентным взаимодействием, образованным с соседними основаниями [50]. Поэтому флуктуационное открытие даже одного азотистого основания в двухцепочечной молекулы может привести к разрыву всей нековалентной связи в детерминированной части последовательности полипептидов [51, 172]. Более того, снижение  $P_i$  в любой части гена ниже существующего уровня  $P_0$  также может быть сильным негативным фактором, поскольку спонтанное переключение оснований является необходимой частью некоторых катализируемых процессов с участием дезоксирибонуклеиновой кислоты [39, 173]. Так, для каталитической активности ДНК-гликозилазы,  $\delta$ -оксогуанин-ДНК-гликозилазы I и алкиладенин-ДНК-гликозилазы (которые являются важными ферментами репарации двухцепочечной молекулы [174]), а также ферментов семейства ДНК-метилтрансфераз и  $\beta$ -глюкозилтрансферазы (которые обеспечивают селективную модификацию дезоксирибонуклеиновой кислоты [175]) необходимо определить естественную частоту возникновения открытых состояний. Все указанные ферменты взаимодействуют с двухцепочечной молекулой только в соответствии с полностью вывернутым из спиральной структуры азотистым основанием из-за предшествующего появления открытого состояния в специфической области гена [176-179]. Кроме того, скорость прохождения пузырей транскрипции также зависит от существенной частоты открытых состояний в селективной части гена [162, 180-182]. Кроме того, как замедление, так и ускорение динамики двухцепочечной молекулы из-за изменения скорости появления открытого состояния играют значительную роль в нарушении опосредованного переноса заряда (взаимодействие  $\text{CH} - \pi$ ) дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии, что может привести к дисфункциональной активности ферментов репарации [43, 46, 183], и, как следствие, к увеличению количества мутаций.

В нашем исследовании продемонстрирована различная чувствительность разных частей IFNA17 к однократной замене  $^2\text{H}/^1\text{H}$ , что проявляется в различно выраженных изменениях частоты их открытых



состояний. Среди трех описанных выше подходов к подсчету количества азотистых оснований, которые могут быть включены в диапазон «Максимум» или «Минимум» в зависимости от частоты открытого состояния, возникающего после однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  в указанной паре оснований дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии, следует выделить алгоритм. Этот вывод можно объяснить наименьшим количеством ложноположительных и ложноотрицательных результатов, если мы используем алгоритм по сравнению с децильными или квантильными методами подсчета азотистых оснований. Например, в I и III частях IFNA17 в диапазоне  $E_{\text{cr}}^{\text{H}}$  от 0,30 до 0,43, количество пар оснований «Минимума», рассчитанное в соответствии с децильным и квантильным методами, были разными ( $p\chi^2\text{Yates} \leq 0,0002$ ), но это может быть связано с многочисленными ложноположительными результатами в данных, рассчитанных децильным методом при  $E_{\text{cr}}^{\text{H}}$ : 0,38 ( $n_{\text{min}}$  были 13 и 80) и 0,41 ( $n_{\text{min}}$  составляли 266 и 308 в I и III частях соответственно, рис. 3.3), а также методом квантилей при  $E_{\text{cr}}^{\text{H}}$ : 0,35 ( $n_{\text{min}}$  было 283 и 202), 0,36 ( $n_{\text{min}}$  было 26 и 1), 0,37 ( $n_{\text{min}}$  было 154 и 36), 0,42 ( $n_{\text{min}}$  было 66 и 8) и 0,43 ( $n_{\text{min}}$  было 3 и 25 в I и III части соответственно, рисунок 3.4). Это наблюдалось из-за сдвигов  $P_0$  между крайними значениями  $P_i$ : ближе к  $P_{\text{min}}$  или к  $P_{\text{max}}$  в зависимости от  $E_{\text{cr}}^{\text{H}}$  (рис. 3.6, 3.7), что приводило к ложноположительным и ложноотрицательным результатам в расчетах. В отличие от этих методов, алгоритм учитывал упомянутые сдвиги  $P_0$  (рис. 3.8), что фактически позволило избежать ложных результатов и не выявило разницы между I и III частями последовательности полипептидов в этом диапазоне энергий ( $p\chi^2\text{Yates} = 0,954$ ).

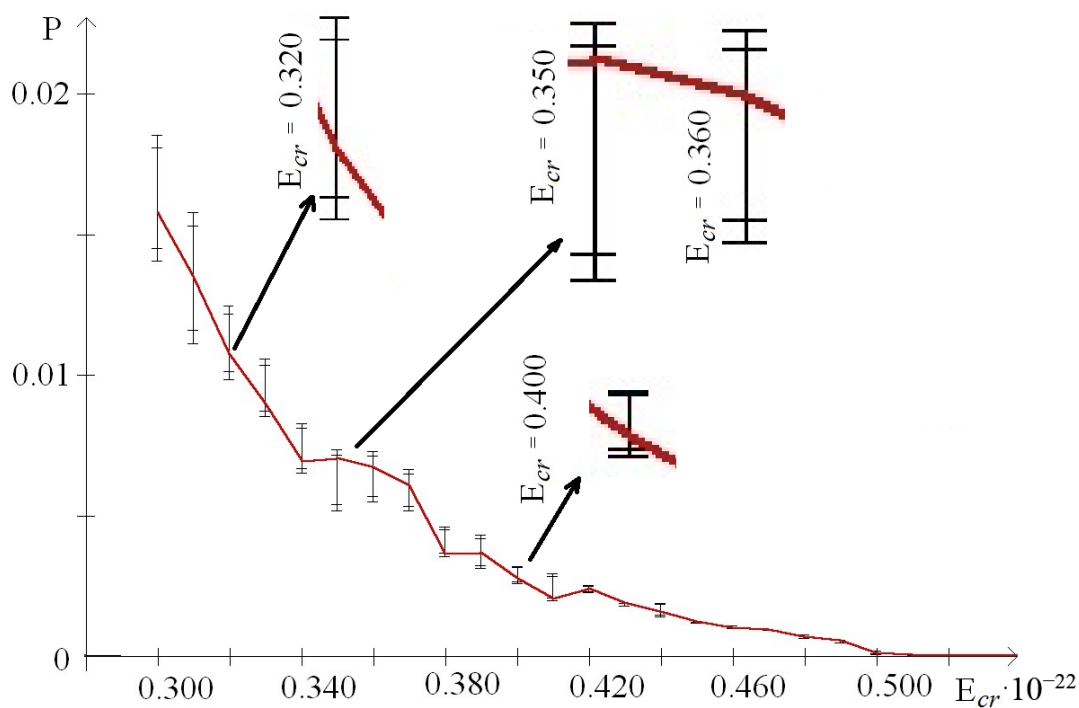


Рисунок 3.6 – Зависимость появления открытых состояний в IFNA17 в зависимости от энергии диссоциации Н-связи в естественных условиях и после однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  (с градацией частоты появления открытых состояний по децильному методу).

*Примечание:* для каждой энергии диссоциации Н-связи: 1-й штрих - это  $P_{\text{imax}}$ , 2-й штрих - нижняя граница диапазона «Максимум», 3-й штрих - верх диапазона «Минимум»; 4-й перекрестный штрих -  $P_{\text{imin}}$ ; красная линия - частота появления открытых состояний при условии, что все водородные связи в двухцепочечной молекуле равны  $^1\text{H}$  ( $P_0$ ).

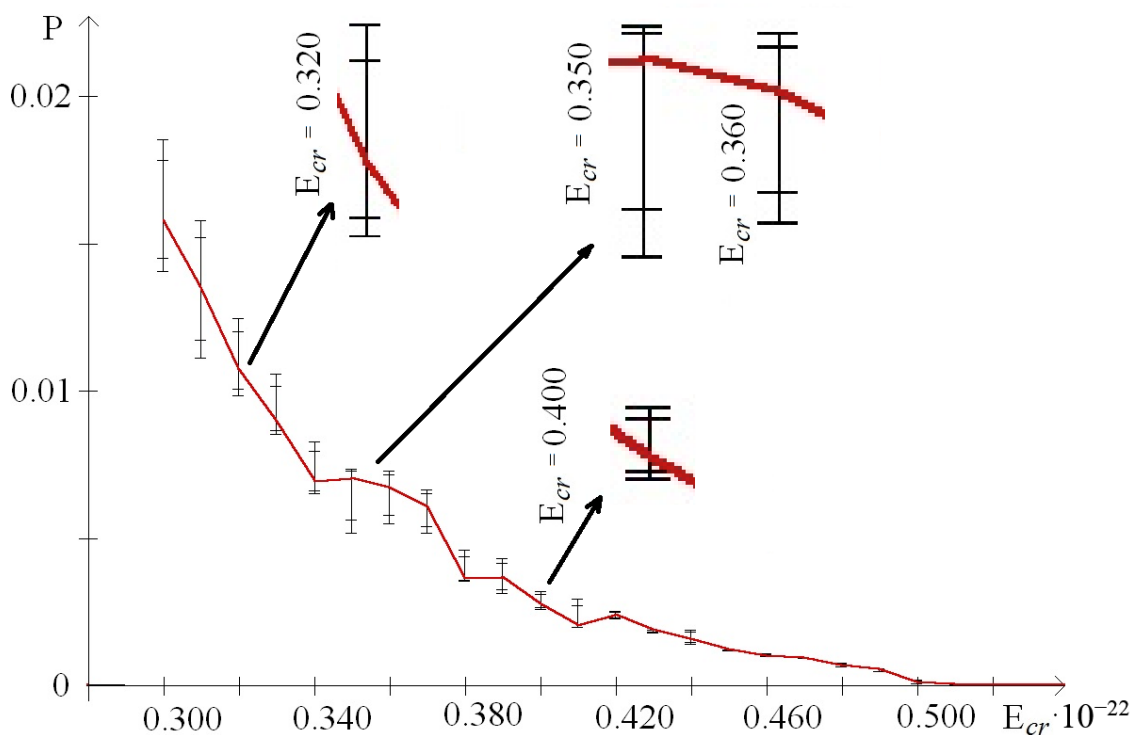


Рисунок 3.7 – Зависимость появления открытых состояний в IFNA17 в зависимости от энергии диссоциации Н-связи в естественных условиях и после однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  (с градацией частоты появления открытых состояний по квартильному методу).

*Примечание:* для каждой энергии диссоциации Н-связи: 1-й штрих - это  $P_{\text{max}}$ , 2-й штрих - нижняя граница диапазона «Максимум», 3-й штрих - верх диапазона «Минимум»; 4-й перекрестный штрих -  $P_{\text{min}}$ ; красная линия - частота появления открытых состояний при условии, что все водородные связи в двухцепочечной молекуле равны  $^1\text{H}$  ( $P_0$ ).

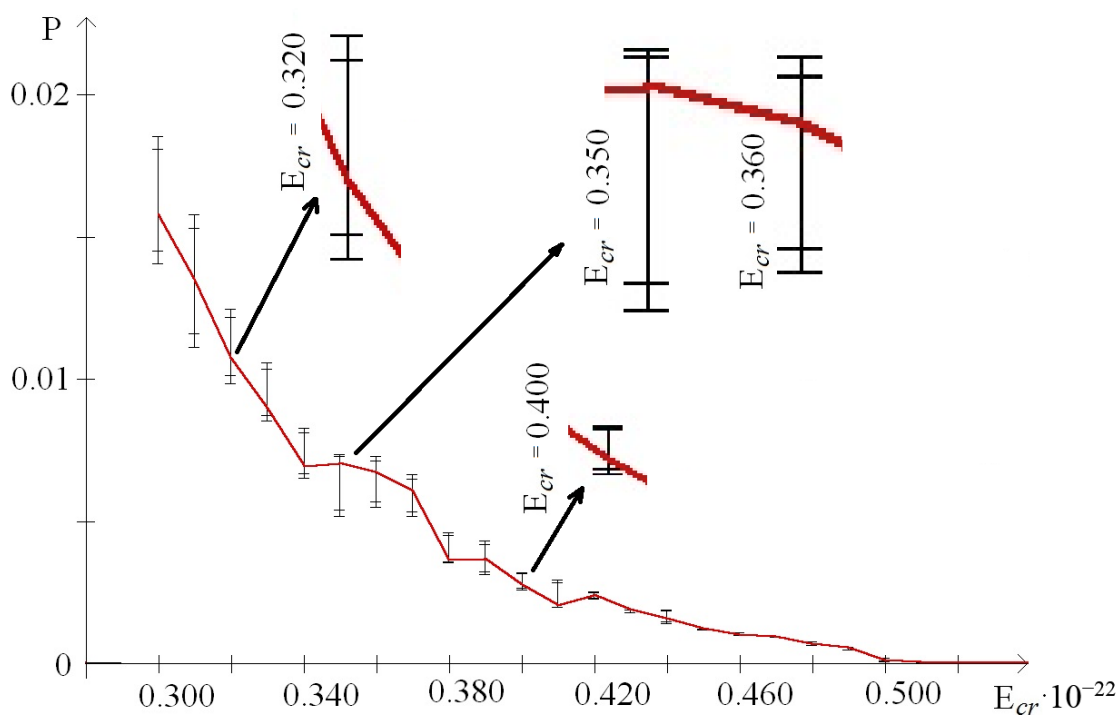


Рисунок 3.8. Зависимость появления открытых состояний в IFNA17 в зависимости от энергии диссоциации Н-связи в естественных условиях и после однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  (с градацией частоты появления открытых состояний по алгоритму).

*Примечание:* для каждой энергии диссоциации Н-связи: 1-й штрих - это  $P_{\text{imax}}$ , 2-й штрих - нижняя граница диапазона «Максимум», 3-й штрих - верх диапазона «Минимум»; 4-й перекрестный штрих -  $P_{\text{imin}}$ ; красная линия - частота появления открытых состояний при условии, что все водородные связи в двухцепочечной молекуле равны  $^1\text{H}$  ( $P_0$ ).

С другой стороны, подход, сокращающий количество ложноположительных результатов, дает возможность обнаружить существенные различия между частотой открытых состояний в IFNA17 из-за единственной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  в выделенных частях последовательности полипептидов. Хотя в диапазоне  $E_{\text{cr}}^{\text{H}}$  от 0,30 до 0,43 в I и II частях последовательности полипептидов количество азотистых оснований «Minimum», вычисленное децильным методом, не имело статистической разницы ( $p\chi^2_{\text{Yates}} = 0,85$ ), как и рассчитанные аналогичные количества

азотистых оснований тех же частей по методу квартилей ( $p\chi^2_{Yates} = 0,74$ )  $n_{min}$ , которые были получены с помощью алгоритма и имели достоверную разницу ( $p\chi^2_{Yates} = 0,0002$ ). Поскольку последний подход уменьшал общее количество пар оснований из-за исключения ложноположительных результатов: при  $E_{cr}^H$  0,38 и 0,41 это было на 277 и 209 ложных  $n_{min}$  меньше, чем рассчитано децильным методом (рис. 3.3); при  $E_{cr}^H$  0,35–0,37 и 0,42–0,43 это было на 424 и 347 ложных  $n_{min}$  меньше, чем по квартильному методу в I и II частях соответственно (рис. 3.4). Однако, при этом новый алгоритм позволил уменьшить ложноотрицательные результаты, например, при подсчете  $n_{min}$  на концах последовательности полипептидов и его центральной части при  $E_{cr}^H$  0,32–0,33 и 0,40 (по сравнению с методом квартилей, рис. 4, 5), что повышает надежность подхода. Другим примером целесообразности использования алгоритма для обработки данных исследования является обнаружение разницы между  $n_{min}$  концов и центром IFNA17 ( $p\chi^2_{Yates} < 0,0001$ ), в отличие от использования метода децилей ( $p\chi^2_{Yates} = 0,565$ ).

Более того, более эффективное использование алгоритма для определения  $n_{max}$  в I, II и III частях IFNA17 подтвердило самые низкие  $p$ -значения ( $p_{Kwt} = 0,0220$ ,  $p_{Mt} = 0,0293$ ) по сравнению с аналогичными  $p$ -значениями, найденными для  $n_{max}$ , которые были отфильтрованы децильным и квартильным методами. Более того,  $p$ -значения  $n_{max}$  между концами и центром гена были как  $p_{Kwt}$ , так и  $p_{Mt}$  менее 0,05 (0,0295 и 0,0233, соответственно), если они были подсчитаны только с помощью алгоритма. Наибольшее количество ложноположительных результатов  $n_{max}$ , вычисленных децильным методом, было при  $E_{cr}^H$  0,43 (рис. 3.3), наибольшее количество ложноотрицательных результатов  $n_{max}$ , отфильтрованных с помощью квартильного метода, было при  $E_{cr}^H$  0,36 (рис. 3.4).

В диапазоне  $E_{cr}^H$  от 0,44 до 0,59 разница между данными, отфильтрованными тремя методами, также была значительной, а алгоритм показал более высокую эффективность при обработке частоты возникновения открытых состояний. Например, количество  $n_{max}$  в центральной части гена,

отфильтрованной с помощью нового алгоритма, было на 39  $n_i$  (что можно рассматривать как ложноположительные результаты в соответствии с надежной оценкой) меньше, чем  $n_{\max}$ , подсчитанное методом квартилей. Однако более выраженные различия были между  $n_{\min}$  (Таблица 3.4), что объясняется конвергенцией  $P_{i\max}$  и  $P_{i\min}$ , а также  $P_0$  и  $0$  в диапазоне более высоких энергий (рис. 3.8). Например, децильный метод приводит к множеству ложноположительных результатов  $n_{\min}$  при  $E_{cr}^H$  0,46 и 0,59, также метод квартилей - при  $E_{cr}^H$  0,55 и 0,59, который спровоцировал среди  $n_{\min}$  трех частей гена (каждая из которых имела одни и те же собственные данные  $P_i$ ) полностью различные  $p$ -значения:  $\chi^2_B$ :  $p > 0,5$  (метод децилей),  $\chi^2_B$ :  $p < 0,002$  (метод квартилей) и  $\chi^2_B$ :  $p > 0,2$  (алгоритм).

В отличие от более низкого диапазона  $E_{cr}^H$ , когда методы квартиля давали как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты максимальных количеств азотистых оснований (как  $n_{\max}$ , так и  $n_{\min}$ ), в более высоком диапазоне  $E_{cr}^H$  они гораздо чаще вызывают ложноположительные результаты в диапазоне «Минимум», что обусловлено следующими свойствами частоты возникновения открытых состояний двухцепочечной молекулы:  $P_{i\max} \rightarrow P_{i\min}$  и  $P_0 \rightarrow 0$ , так что все эти  $p$  обратно коррелируют с  $E_{cr}^H$  (Таблица 3.2). В целом, все эти практические примеры подтвердили вывод о возможности использования алгоритма как более эффективного метода фильтрации описываемых данных исследования по сравнению с чистыми методами квартиля. Что касается вышеупомянутой информации, в дальнейшем данные будут отобраны только с помощью алгоритма.

Тем не менее, несмотря на одинаковую длину I, II и III частей IFNA17, данные исследования, отобранные каждым из методов, указали на статистически значимые различия  $n_{\max}$  и  $n_{\min}$  концов последовательности полипептидов и ее центра, что подтвердило гетерогенную чувствительность на рассматриваемых участках последовательности полипептидов до однократной замены  $^2H/^1H$ . Примечательно, что в диапазоне  $E_{cr}^H$  от 0,30 до 0,43 центральная часть последовательности полипептидов наиболее

подвержена как колебаниям  $n_{\max}$  (более чем в 2,73 раза), так и  $n_{\min}$  (в 1,45 раза) по сравнению с I и III частями. При этом в более высоком диапазоне энергий (0,44–0,59) II часть IFNA17 достоверно отличалась от ее частей I и III по количеству пар азотистых оснований только в диапазоне «Максимум» (более чем в 15,58 раз), но не было разницы между  $n_{\min}$ , из-за крайностей конвергенции частот возникновения открытых состояний в дезоксирибонуклеиновой кислоте.

Все описанные колебания  $n_{\max}$  и  $n_{\min}$  после однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  могут привести к повреждению дезоксирибонуклеиновой кислоты из-за замедления скорости образования пузырьков (особенно денатурационных пузырьков, не связанных со сверхспиральным стрессом, имеющих более 4 пар оснований), включая точки связывания специфических белков (например, ферментов репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты [105, 173]), или из-за огромной скорости переворота азотистых оснований молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии, которая может сопровождаться увеличением как скорости модификации их химической структуры, так и несоответствия взаимодействию белок-ДНК [184-187].

Наши данные демонстрируют возможность более высокого риска поражения последовательности полипептидов на всей ее длине из-за однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  преимущественно в центральной части IFNA17 во всех исследованных критических энергиях (от 0,30 до 0,59), которые показывают аномальную скорость возникновения открытых состояний, что проявлялось чаще в его увеличении (на 24%), чем в уменьшении. Судя по частоте встречаемости  $P_{\max}$  в диапазоне  $E_{\text{cr}}^{\text{H}}$  от 0,44 до 0,59, однократное введение дейтерия в III части гена фактически не вызывало никаких изменений по сравнению с собственной частотой открытых состояний в отличие от однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  в I или II части. Таким образом, после введения дейтерия в III часть преобладает  $n_{\min}$ , что может привести к резкому замедлению образования областей с разорванными водородными связями в

двухцепочечной молекуле, в котором более 4 азотистых оснований участвуют в генерации предшествующего состояния денатурации, требуемого специфическими ДНК-связывающими ферментами [184, 187], и может быть предшественником функционального нарушения системы репарации дезоксирибонуклеиновой кислоты.

Известно, что разные части дезоксирибонуклеиновой кислоты имеют неравенство в соотношении аденин-тимин / гуанин-цитозин (А-Т / G-C). В IFNA17 часть I имеет 163 пары оснований А-Т и 164 G-C, часть II содержит 186 пар оснований А-Т и 140 пар оснований G-C, а часть III имеет 236 пар оснований А-Т и 91 G-C [165]. Несмотря на то, что I часть имеет минимальное количество пар АТ, а часть III - максимальное количество пар АТ (по сравнению друг с другом), наиболее существенное изменение частоты открытых состояний в IFNA17 было обнаружено после однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  во II части последовательности полипептидов (содержавшей промежуточное процентное содержание А-Т) во всех исследованных диапазонах энергий (наблюдалось в обоих диапазонах  $E_{\text{cr}}^{\text{H}}$ : от 0,30 до 0,43 и от 0,44 до 0,59, табл. 4). Все это определенно указывает на то, что не только общее количество (или процент) азотистых оснований А-Т влияет на частоту открытых состояний [188], но и конкретная последовательность оснований А-Т и G-C в модели двухцепочечной молекулы может приводить как к увеличению, так и к уменьшению количества открытых состояний в последовательности полипептидов.

Таким образом, все описанные случаи динамики двухцепочечной молекулы подтвердили гетерогенную чувствительность IFNA17 к обмену  $^2\text{H}/^1\text{H}$  в зависимости от энергии внешних воздействий на последовательность полипептидов. Исследование также показало, что однократное введение дейтерия в IFNA17 даже в III части последовательности полипептидов, которая находится вне кодирующей области (от 50-го до 619-го нуклеотидных оснований [189, 190]), может влиять на скорость транскрипции, изменяя динамику скручивания двухцепочечной молекулы из-за уменьшения



количества открытых состояний в других частях последовательности полипептидов. Более того, кодирующая область IFNA17, которая более актуальна для I и II частей, является наиболее чувствительной частью последовательности полипептидов при единственной замене  $^2\text{H}/^1\text{H}$ . Однако у нашего исследования были некоторые ограничения. Одно из них заключалось в том, что все результаты были получены в рамках математической модели, основанной на уравнениях Ньютона и представляющей задачу Коши для системы  $2n$  обыкновенных дифференциальных уравнений, не полностью учитывающих вклад взаимодействий ДНК-белок. Второе ограничение - увеличение изменчивости данных в области низких энергий (менее 0,30) из-за свойств системы  $2n$  обыкновенных дифференциальных уравнений. Тем не менее, мы не рассматриваем эти ограничения как непреодолимое препятствие и считаем, что этот подход можно обобщить и использовать для более сложных моделей динамики двухцепочечной молекулы.

В целом, исследование с помощью математического моделирования продемонстрировало значительное неравенство (в зависимости от одной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  в дезоксирибонуклеиновой кислоте в конденсированном состоянии) между тремя частями гена, сходными по длине, с частотой встречаемости открытых состояний как с более высоким  $P_i$ , так и с более низким  $P_i$  по сравнению с естественным  $P_0$ . Пары оснований с  $P_i$ , значительно превышающим  $P_0$ , могут обеспечить больший риск мутации (из-за изменения соотношения констант равновесия реакции открытия денатурационного пузыря в различных частях двухцепочечной молекулы, включая термодинамические показатели при связывании точки специфических ферментов [162, 191, 192]), тогда как пары нуклеотидов с  $P_i$  значительно ниже, чем  $P_0$ , могут привести к резкому замедлению транскрипции или репликации по сравнению с естественным уровнем сбоя в этих важных процессах [105, 181, 182]. Кроме того, в ходе исследования было обнаружено, что в диапазоне энергий диссоциации водородной связи более 0,58 Дж и приближенном к 0,59 Дж открытых состояний дезоксирибонуклеиновой кислоты в

конденсированном состоянии не встречались в IFNA17, и только близкие состояния пар азотистых оснований были выявлены во всем гене.

Одним из преимуществ нового алгоритма является уменьшение количества как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов в данных, отобранных с помощью этого подхода, по сравнению с другими методами. Таким образом, данные исследования указали на статистически значимые различия количества пар азотистых оснований, которые могут быть включены в крайние диапазоны («Максимум» или «Минимум») в зависимости от частоты встречаемости открытых состояний, в концах гена и его центре, поэтому динамика двухцепочечной молекулы подтвердила ее гетерогенную чувствительность к одиночной замене  $^2\text{H}/^1\text{H}$  в зависимости от энергии внешних воздействий на ген. Также было показано, что однократная замена дейтерия в IFNA17 даже за пределами кодирующей области (от 50-й до 619-й пары оснований), например, в части III гена, вероятно, может влиять на скорость транскрипции, изменяя динамику двухцепочечной молекулы за счет уменьшения количества открытых состояний в других частях гена.

### 3.3 Исследование условий возникновения областей различной длины с деформированными водородными связями между парами азотистых оснований двухцепочечной молекулы

Основная причина, по которой форма двухцепочечной молекулы представляет собой двойную спираль, вероятно, заключается в стабильности, для сохранения генетической информации этой ключевой молекулы [36] за счет взаимодействий водородных связей между парными основаниями А-Т и G-C.

Несмотря на достаточную прочность структуры двойной спирали дезоксирибонуклеиновой кислоты, в ней может происходить расплетение сахаро-фосфатных цепочек. в молекулярной и клеточной биологии гибридизация и дегибридизация дезоксирибонуклеиновой кислоты являются

фундаментальными процессами. В физиологическом диапазоне температур самопроизвольное возникновение открытых состояний (разрывов водородных связей между парами азотистых оснований), а также пузырей (областей с несколькими открытыми состояниями подряд) происходит редко. В основном, эти процессы инициируют специализированные ферменты, в момент, когда генетический код доступен для молекулярных механизмов считывания информации. Возникновение открытых состояний и пузырей происходит во время транскрипции, репликации, рекомбинации, восстановления или связывания любого фермента на отдельных цепях [166].

Локальные разрывы водородных связей между парами азотистых оснований в дуплексе, обычно называемые областями с деформированными водородными связями, могут наблюдаться при любой температуре, однако при комнатной температуре являются редким событием, где доля открытых пар оснований в двухцепочечной молекуле составляет  $10^{-6}$ - $10^{-5}$  для пар А-Т [49], и, вероятно, на порядок меньше для пар G-C [51]. Вероятность их образования (и их размер) увеличивается с ростом температуры [51, 52], при этом, количество областей с деформированными водородными связями увеличивается при приближении к так называемой температуре денатурации или плавления. Из-за неоднородности последовательностей, в сегментах с высоким содержанием А-Т наблюдается меньшая стабильность, чем в сегментах с высоким содержанием G-C, первые имеют тенденцию плавиться при более низких температурах [188]. Как следствие, в макромолекуле могут наблюдаться спонтанные области возникновения открытых состояний при физиологических температурах в участках, богатых А-Т парами из-за тепловых колебаний [162]. Первым этапом перед решением задачи динамики в нуклеосоме или хроматине (где двухцепочечная молекула связана, например, с гистонами) является понимание процессов внутренней динамики дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии.

Попадание атома дейтерия в водородные связи между парами азотистых оснований двухцепочечной молекулы может оказывать влияние на

термодинамические характеристики как в месте его локализации, так и на отдаленных участках [193]. Произвести оценку этих изменений можно только с помощью математического моделирования. Так, ранее нами было показано, что атомы дейтерия, попадая в водородные связи между парами азотистых оснований молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии могут оказывать влияние на вероятности возникновения открытых состояний (разрывов водородных связей между основаниями) [194.]. Кроме того, в работе [195] доказано, что вероятность возникновения открытых состояний зависит как от концентрации дейтерия в окружающей молекулу жидкой среде, так и от критической энергии разрыва водородных связей.

известно, что изменение содержания дейтерия в живых системах оказывает влияние на метаболические процессы в них [23, 25, 156]. причем, это касается как повышенных [9, 196], так и пониженных концентраций дейтерия относительно природного уровня [157, 197-201].

целью данного этапа работы являлось исследование влияния единичных замен протия на дейтерий в молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии на вероятность возникновения областей с деформированными водородными связями.

Для моделирования процессов образования областей с деформированными водородными связями в двойной спирали двухцепочечной молекулы будем использовать математическую модель, описанную в п. 3.1. На рисунке 3.9 представлены графики угловых отклонений азотистых оснований в течение периода времени  $[0, \tau = 2,0 \cdot 10^{-10} \text{ с}]$  1-й цепи двухцепочечной молекулы.

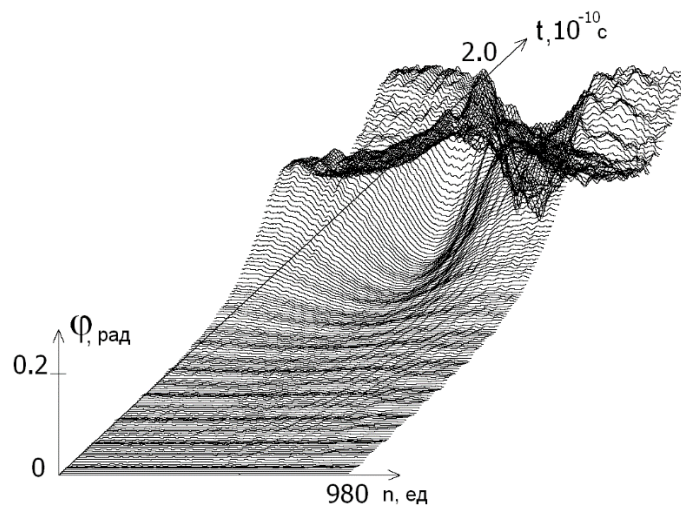


Рисунок 3.9 – Графики угловых отклонений 1-й цепи азотистых оснований двухцепочечной молекулы за период времени:  $[0, t = 2,0 \cdot 10^{-10} \text{ с}]$ .

Динамика открытых состояний двухцепочечной молекулы и влияние на нее  $^2\text{H}/^1\text{H}$  обмена проиллюстрирована на рисунке 3.10, зоны открытых состояний выделены цветом.

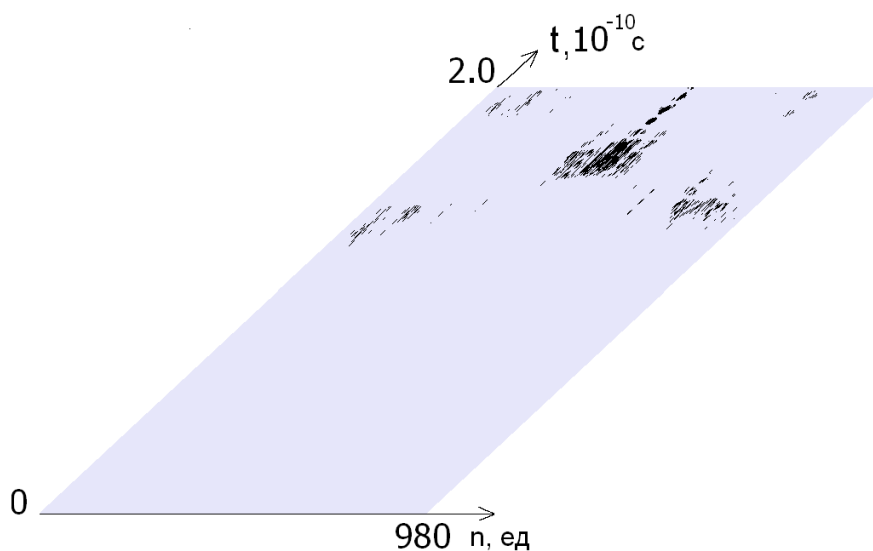


Рисунок 3.10 – Динамика возникновения открытых состояний для последовательности полипептидов интерферона альфа 17,  $E_{cr}^H = 0,2 \cdot 10^{-22} \text{ Н} \cdot \text{ м}$ .

Для расчетов величины вероятности возникновения областей с деформированными водородными связями при попадании атома дейтерия в водородные связи между парами азотистых оснований выбирали несколько точек их локализации с наибольшим отличием вероятности возникновения открытых состояний от  $P_0$  - вероятности возникновения открытых состояний, когда в системе отсутствуют атомы дейтерия.

Выбранные номера точек локализации и соответствующие им вероятности возникновения открытых состояний при различных энергиях разрыва водородной связи представлены в таблице 3.5:

Таблица 3.5 – Номера точек локализации и соответствующие им вероятности возникновения открытых состояний при различных энергиях разрыва водородной связи

$E \cdot 10^{-25}$ Н·м	$P_0$	$P_{020}$	$P_{284}$	$P_{301}$	$P_{353}$	$P_{376}$
270	0,0173477	0,0178338	0,0178174	0,0169029	0,0168469	0,0170676
280	0,0132254	0,0132540	0,0133761	0,0127093	0,0131500	0,0130869
290	0,0106987	0,0108056	0,0108302	0,0108006	0,0107960	0,0106176

В таблице 3.6 для различных энергий разрыва водородной связи между парами азотистых оснований в молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты рассчитаны вероятности образования областей с деформированными водородными связями различной длины при наличии и отсутствии атома дейтерия в водородных связях. Где  $i$  – номер пары оснований, между которыми одна из водородных связей заменена на дейтериевую,  $P_0$  – вероятность возникновения областей с деформированными водородными связями данной длины в отсутствие атомов дейтерия,  $P_i$  – вероятность образования областей с деформированными водородными связями данной

длины при наличии атома дейтерия в водородных связях в  $i$ -й паре оснований,  $P_0/P_i$  – отношение.

Таблица 3.6 – вероятность образования областей с деформированными водородными связями при различной локализации атома дейтерия для разных энергий разрыва водородной связи

$E \cdot 10^{-25}$ Н·м	Длина пузыря	$P_0$	$i$	$P_i$	$P_0/P_i$
1	2	3	4	5	6
270	21	0,0002338	20	0,0001488	1,571
	24	0,0001073	284	0,0000587	1,828
	8	0,0004390	301	0,0004857	0,904
	15	0,0000446	353	0,0000685	0,651
	16	0,0000951	376	0,0001476	0,644
280	12	0,0002017	20	0,0001954	1,032
	17	0,0001072	284	0,0000971	1,104
	27	0,0000789	301	0,0000984	0,801
	13	0,0000812	353	0,0001565	0,519
	15	0,0001369	376	0,0000937	1,461
290	24	0,0000079	20	0,0000276	0,286
	15	0,0000434	284	0,0000300	1,447
	12	0,0002139	301	0,0001947	1,098
	17	0,0000426	353	0,0000267	1,595
	27	0,0000702	376	0,0002460	0,284

Из таблиц 3.5 и 3.6 видно, что соотношение  $P_0/P_i$  (для пузырей определенной длины) для конкретных  $P_i$  может значительно отличаться от вероятности возникновения открытых состояний. Если внедрение дейтерия приводит к уменьшению открытых состояний, то не обязательно, что вероятность возникновения областей с деформированными водородными

связями всех длин также уменьшится. Например, для  $E = 270 \cdot 10^{-25}$  Н·м отношение вероятностей возникновения открытых состояний  $P_0/P_{376} = 1,016$ , а для областей с разорванными водородными связями длиной 16 отношение  $P_0/P_{376} = 0,644$ . Для той же энергии  $P_0/P_{20} = 0,973$ , а для пузырей длиной 21 отношение  $P_0/P_{20} = 1,571$ . Таким образом, внедрение дейтерия влияет на образование областей с разорванными водородными связями определенной длины в большей степени, чем на образование открытых состояний.

### 3.4 Выводы к Главе 3

1. В рамках механической модели двухцепочечной молекулы были проведены оценочные эксперименты по влиянию изотопного обмена  $^2\text{H}/^1\text{H}$  в водородных связях между парами азотистых оснований на неравномерное распределение вероятностей открытых состояний по длине последовательности полипептидов, продемонстрирована неодинаковая чувствительность разных частей IFNA17 к однократной замене  $^2\text{H}/^1\text{H}$ , что проявляется в различно выраженных изменениях частоты их областей денатурации.

2. Исследована роль дейтерия в образовании областей с деформированными водородными связями. Показано, что вероятность образования длинных областей с разорванными водородными связями зависит от места локализации атома дейтерия в последовательности нуклеотидов в молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии, кроме того, установлено, что возможность более высокого риска поражения последовательности полипептидов на всей его длине из-за однократной замены  $^2\text{H}/^1\text{H}$  преимущественно в центральной части IFNA17 во всех исследованных критических энергиях (от 0,30 до  $0,59 \cdot 10^{-22}$  Дж), которые показывают аномальную скорость возникновения открытых состояний, что проявлялось чаще в его увеличении (на 24%), чем в уменьшении.



## Глава 4 Практическое применение методов модификации изотопного состава среды

4.1 Методика исследования реактивности гетерогенных систем при модификации изотопного  $^2\text{H}/^1\text{H}$  состава сред [145]

Изотопный состав среды оказывает существенное влияние на жизнедеятельность филогенетически отдаленных организмов [123, 202-206], так как сверхнизкие концентрации тяжелых нерадиоактивных изотопов ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$  и  $^{18}\text{O}$  и др.) способны воздействовать на функциональную активность биологических молекулярных систем [12, 207, 208]. В биообъектах особый интерес представляет исследование эффектов, вызванных изменением в среде соотношения  $^2\text{H}/^1\text{H}$ , формируемого парой изотопов с сильно различающимися массами и широко распространенными в живых системах [8, 19, 196, 209-212]. Благодаря современным высокоэффективным методам получения обедненной дейтерием воды (ректификация воды в колоннах [213, 214], метод электролитического разделения [215], диффузия водорода через палладиевые мембраны [216, 217]). Эти исследования получили широкое распространение. Известно, что ион водорода – ключевой элемент энергетического метаболизма любой клетки, осуществляющей окислительное фосфорилирование, поскольку формирование трансмембранного градиента протонов является важнейшим фактором функционирования АТФ-синтазы.

Объекты исследования выбирали с учетом результатов сравнения способности прокариотических и эукариотических организмов адаптироваться к модификации изотопного  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -состава среды культивирования, ориентируясь, в частности, на значительную эволюционную отдаленность *S. Cerevisiae* и *R. erythropolis*. Этот фактор в контексте энергетического метаболизма подразумевает у них принципиально разную локализацию клеточных структур, участвующих в создании трансмембранного градиента протонов, который необходим для

функционирования АТФ-синтазы. При этом у бактерий этот градиент формируется на цитоплазматической мембране и ее производных, а у дрожжевых грибов – на внутренней мембране митохондрий.

Цель исследования – оценка уровня продукции CO<sub>2</sub> и динамики роста биомассы прокариот (бактерий *Rhodococcus erythropolis* VKM Ac2017D, Россия (далее *R*)) и эукариот (дрожжей штамма *Saccharomyces cerevisiae* OenofermC2, Франция (далее *S*)) в средах культивирования с различной концентрацией дейтерия.

Культивирование микроорганизмов осуществляли в жидких минеральных средах с конечными концентрациями дейтерия 10, 50, 100 и 150 ppm. В качестве единственного субстрата углерода и энергии использовали сахарозу (146 мМ) [35]. Инокуляцию сред биомассой родококка осуществляли до концентрации, соответствующей оптической плотности 0,10–0,12 усл. ед. ( $5,0\text{--}5,9 \times 10^7$  КОЕ/мл), инокуляцию сахаромикетами до концентрации, соответствующей оптической плотности 2,16–2,20 усл. ед. ( $2,1\text{--}2,9 \times 10^8$  КОЕ/мл), проводили с учетом рекомендуемых производственных инструкций культивирования исследуемого штамма *S* OenofermC2 [218]. Продукцию CO<sub>2</sub> регистрировали с помощью цифрового датчика газообразной углекислоты CO<sub>2</sub>-ВТА (Vernier, США). Приборная погрешность измерений продукции CO<sub>2</sub> составляла не более  $\pm 1\%$ .

Динамику роста микроорганизмов определяли по оптической плотности клеточных суспензий при длине волны 670 нм на спектрофотометре Leki SS2107 (Финляндия). Приборная погрешность измерений оптической плотности составляла не более  $\pm 0,5\%$ .

Содержание CO<sub>2</sub> измеряли ежедневно с 1-х по 9-е сут., оптическую плотность измеряли на 1-е, 4-е и 9-е сут. Экспериментальные сосуды с культурой дрожжей находились в неподвижном состоянии температурном оптимуме при  $38,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$  с культурой бактерий – в условиях встряхивания на орбитальном шейкере (120 об./мин) при оптимальной для данного штамма температуре  $25,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Воду с пониженным содержанием дейтерия

получали на установке ЛВ-1 в бизнес-инкубаторе Кубанского государственного университета. Концентрацию дейтерия в полученной воде определяли (3 повтора для каждого образца) на импульсном ЯМР-спектрометре JEOL JNM-ECA 400 MHz (Япония) [219].

4.2 Результаты исследования оптической плотности и энергетического запаса гетерогенных систем при модификации изотопного  $^2\text{H}/^1\text{H}$  состава их внешней и внутренней сред [145]

В таблице 4.1 представлены результаты измерения оптической плотности клеточных суспензий микроорганизмов в процессе роста на жидких питательных средах с различным изотопным составом.

Таблица 4.1 – Оптическая плотность клеточных суспензий микроорганизмов в процессе роста на жидких питательных средах с различным изотопным составом

$^2\text{H}$ , ppm $M \pm m$	1-е сут.		4-е сут.		9-е сут.	
	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>	<i>S</i>	<i>R</i>
10	2,16 ± 0,053	0,12 ± 0,003	2,23 ± 0,067	1,72 ± 0,043*	2,43 ± 0,049	1,88 ± 0,039*
50	2,19 ± 0,048	0,10 ± 0,003	2,27 ± 0,045	1,89 ± 0,040*	2,38 ± 0,061	1,80 ± 0,037*
100	2,20 ± 0,062	0,12 ± 0,004	2,25 ± 0,056	1,29 ± 0,023*	2,34 ± 0,047	1,34 ± 0,034*
150	2,19 ± 0,045	0,11 ± 0,002	2,28 ± 0,048	1,41 ± 0,035	2,39 ± 0,053	1,62 ± 0,049

Примечание: \* –  $p < 0,05$  по сравнению с группой 150 ppm (*S* или *R*) в соответствующие сутки

Максимальный прирост концентрации клеточной биомассы  $R$  к 4-м сут. роста был отмечен на среде с содержания дейтерия 50 ppm, что могло быть обусловлено ускоренным прохождением цикла роста в периодической культуре с некоторым его замедлением на 9-е сут. Минимальный рост на протяжении всего периода культивирования наблюдался на среде с концентрацией дейтерия 100 ppm. Наибольший рост  $R$  VKM Ac2017D был обнаружен в средах с концентрацией дейтерия 50 ppm и менее, что могло быть опосредовано более благоприятными условиями их метаболизма при данном изотопном  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -соотношении [220]. Полученные данные соответствуют математической модели, описывающей результаты разных авторов [125, 202]:

$$f(x) = \begin{cases} 100\% + A \sin\left(\frac{\pi x}{150}\right), & x \in [0, 150], \\ 100\% + B \sin\left(\frac{\pi}{150}(x - 150)\right), & x \in [150, 300], \\ 100\% - \frac{\pi B}{150}(x - 300), & x \in [300, C], \end{cases} \quad (4.1)$$

где  $B > A$ ,  $C = \frac{1.5 \times 10^4}{\pi B} + 300\%$ .

Продукция  $\text{CO}_2$  как интегральный показатель биологической активности клеток была более выражена у  $R$  по сравнению с таковой у дрожжей. Пик продукционной активности углекислоты у  $R$  был отмечен на 2-е–3-и сут. роста с дальнейшим постепенным его понижением к 9-м сут. (рис. 4.1), а для  $S$  нарастание выделения  $\text{CO}_2$  завершалось к 4-м–5-ь сут. с его снижением к 7-м сут. и последующим вторичным повышением газовыделения (рис. 4.2).

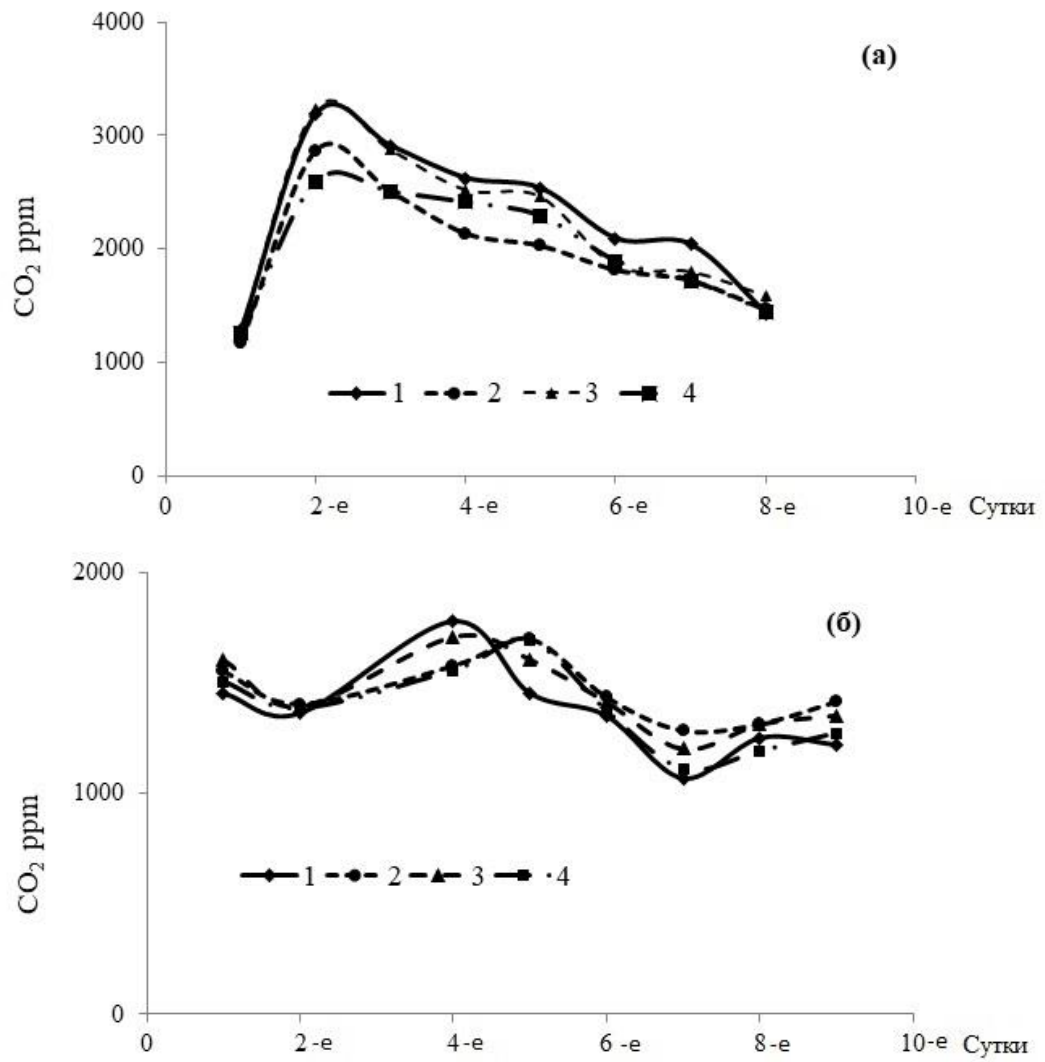


Рисунок 4.1 – Зависимость содержания CO<sub>2</sub> в газовой фазе сосуда культивирования при росте *R* (а) и *S* (б) при различных концентрациях дейтерия 10, 50, 100, 150 ppm (1–4 соответственно) от времени.

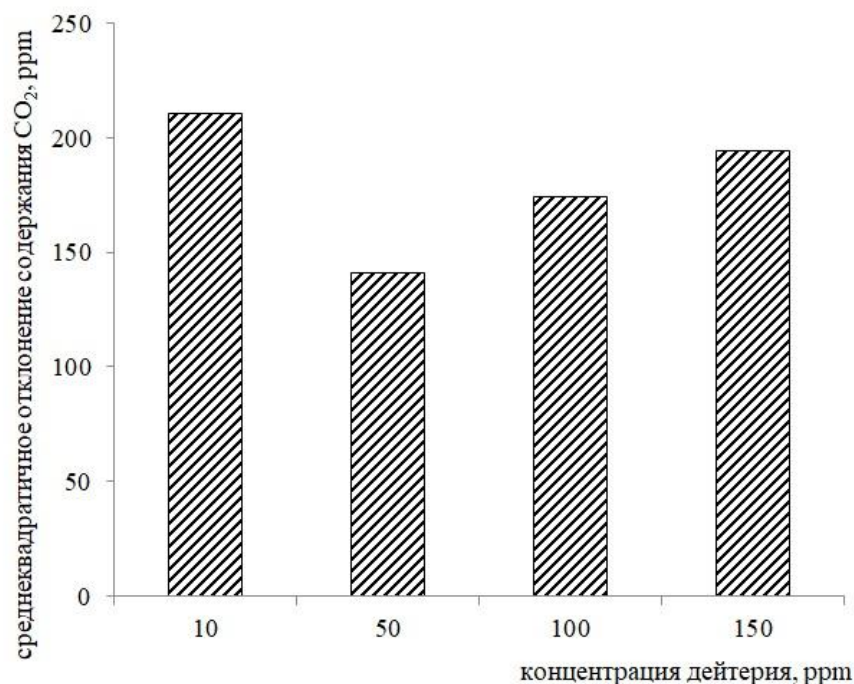


Рисунок 4.2 – Диаграмма среднеквадратичного отклонения содержания CO<sub>2</sub> в газовой фазе сосуда культивирования при росте *S* при различных концентрациях дейтерия.

Наблюдаемые особенности объясняются тем, что период снижения продукции CO<sub>2</sub> соответствует наступлению стационарной фазы. При этом два пика продукции углекислоты у дрожжей могут быть связаны с более сложным характером катаболизма углеводов данными организмами.

При достаточном количестве кислорода и наличии углеводного субстрата в среде родококки и дрожжи выделяют CO<sub>2</sub> и демонстрируют прирост биомассы за счет окислительного декарбоксилирования пирувата и работы цикла трикарбоновых кислот. В то же время при недостатке конечного акцептора электронов дрожжи в отличие от родококков могут участвовать в процессе брожения, прежде всего спиртового, в результате которого под действием пируватдекарбоксилазы также образуется CO<sub>2</sub>. Динамика концентрации CO<sub>2</sub> в газовой фазе сосуда культивирования показана на рис. 4.3, 4.4.

Также следует отметить, что хотя, при в целом, сходной форме динамики кривых выделения CO<sub>2</sub> (у родококков логарифмические функции

находились в диапазоне уравнений от  $y_{\min} = 1,17\ln(x) + 0,22, R^2 = 0,89$  до  $y_{\max} = 1,66\ln(x) + 0,27, R^2 = 0,84$ ; для сахаромикетов аналогичные функции были в диапазоне от  $y_{\min} = 0,12\ln(x) + 2,19, R^2 = 0,90$  до  $y_{\max} = 0,23\ln(x) + 2,14, R^2 = 0,83$ ) в течение ростового эксперимента прокариоты проявили более высокую вариабельность его продукции согласно данным среднеквадратичного отклонения содержания  $\text{CO}_2$  в газовой фазе сосуда, показатели которого у дрожжей были ниже на 61,9–74,5 % (рис. 4.4).

Это отличие, на наш взгляд, обусловлено более совершенными механизмами адаптации эукариотических дрожжевых микроорганизмов *S. cerevisiae* к вариациям изотопного  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -состава среды, по сравнению с таковыми у прокариотических клеток *R*. Следует отметить, что для обоих исследуемых микроорганизмов была характерна более активная продукция  $\text{CO}_2$  в фазу логарифмического роста в средах с концентрацией дейтерия 10 ppm, чем в средах с концентрациями 50, 100, 150 ppm.

Для сравнительной оценки динамики роста на каждом этапе рассчитывали удельную скорость роста микроорганизмов ( $\mu, \text{ч}^{-1}$ ) по формуле [221]  $\mu = 2,3(\lg X_i - \lg X_0) / (t_i - t_0)$ , где  $X_i$  и  $X_0$  – концентрации клеток в моменты времени  $t_i$  и  $t_0$  соответственно. При этом удельная метаболическая активность, принятая в 1-е сут. эксперимента у обоих микроорганизмов за 100%, у прокариот последовательно снижалась в течение всего эксперимента и составляла на 4-е сут. 11%–21% (соответственно  $\mu=0,0330$ – $0,0408 \text{ ч}^{-1}$ ), а на 9-е сут. 7%–11% (соответственно  $\mu=0,0003$ – $0,0012 \text{ ч}^{-1}$ ), что отражало постепенное замедление биохимических процессов по мере перехода из лаг-фазы в фазу экспоненциального роста, далее в стационарную и фазу отмирания.

У *S* аналогичный показатель характеризовался отсутствием отрицательной динамики на 4-е сут. (98%–119% или  $\mu=0,0003$ – $0,0006 \text{ ч}^{-1}$ ) и достаточно постепенным снижением на 9-е сут. (75–84 % или  $\mu$  равным  $0,0003$ – $0,0007 \text{ ч}^{-1}$ ). Это свидетельствует о менее резких колебаниях метаболической активности в зависимости от концентрации клеток.

Сверхнизкую концентрацию дейтерия в среде следует рассматривать как стрессовый фактор, в данном случае влияющий на сопряжение начальных этапов катаболизма сахаров, характерный для обоих видов микроорганизмов (гликолиз), и образование АТФ. В качестве показателя дисбаланса живой системы оценивали среднеквадратичное отклонение концентрации  $\text{CO}_2$ , существенно зависящее от уровня эволюционной организации исследуемых микроорганизмов при их культивировании в средах с различным изотопным  $^2\text{H}/^1\text{H}$ -составом. При этом больший разброс значений среднеквадратичного отклонения был отмечен у *S*.

Полученные результаты могут быть объяснены существенными в геохронологическом масштабе колебаниями концентрации дейтерия в гидросфере с достоверным ее возрастанием [222, 223], что подтверждается данными исследований, проведенных на оз. Восток в Антарктиде [224]. Все это, возможно, имело значение в процессе эволюции микроорганизмов, которая происходила при более низких концентрациях дейтерия в окружающей среде. При этом у прокариот и эукариот могли сформироваться различные адаптационные механизмы к определенным значениям пониженных соотношений D/H, что подтверждается в том числе особенностями продукции  $\text{CO}_2$  и ростовой активности *R* и *S*.

#### 4.3 Выводы к главе 4

1. Определены уровень продукции  $\text{CO}_2$  и динамика прироста биомассы бактерий *Rhodococcus erythropolis* VKM Ac2017D (Россия) и дрожжей штамма *Saccharomyces cerevisiae* OenofermC2 (Франция) в средах культивирования с по-разному сниженной (от 10 до 150 ppm) концентрацией дейтерия.

2. Показано, что в средах с концентрацией дейтерия 50 ppm и менее выявлен наибольший прирост биомассы родококков. Отмечено, что



продукция  $\text{CO}_2$  как интегральный показатель биологической активности клеток более выражена у родококков по сравнению с дрожжами.

3. Обнаружено, что при в целом схожей динамике кривых выделения  $\text{CO}_2$  прокариоты проявили более широкую временную динамику его продукции.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основными результатами работы является:

1. Рассмотрено влияние модификации изотопного состава внешней и внутренней сред гетерогенных систем на некоторые их физические параметры, так, показано, что термодинамическая неравноценность изотопных соединений приводит к неравномерному распределению изотопов водорода. Кроме того, изучен изотопный эффект, обусловленный более устойчивым взаимодействием дейтерированной сольватирующей оболочки и непосредственно гетерогенной системы. Установлено, что возникновение нейтронного эффекта в гетерогенных системах наблюдается при наличии ковалентных связей между атомами, у которых имеется суммарное преобладание нейтронов над протонами, выражаемое нечетными положительными числами (1, 3, 5, 7 и т.д.):  $N_n - N_p = 2k + 1$ , где  $k \in Z$ ,  $n$  – нейтрон,  $p$  – протон.

2. Впервые доказано, что физические процессы и эффекты, вызванные воздействием модификации изотопного ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{34}\text{S}$  и др.) состава внешней среды на гетерогенные системы обусловлены изменением энергии ковалентной связи в случае наличия нескомпенсированного нейтрона в паре ядер, которая в свою очередь будет зависеть от следующих факторов:

- валентные электроны взаимодействуют с магнитными моментами обоих атомов, образующих ковалентную связь, поэтому изменение любого из них приводит к изменению энергии химической связи.
- взаимодействие магнитных моментов ядер атомов, приводящее к изменению расстояния между ними (дано аналитическое решение).
- эффект влияния размеров ядра на энергию валентного электрона (дано аналитическое решение).

3. Методом Рунге-Кутты четвертого порядка проведены расчеты на основе математической модели, описывающей возникновение и динамику

областей с разорванными водородными связями между парами комплементарных азотистых оснований двухцепочечной молекулы. Кроме того, в рамках рассмотренной математической модели возможно описание появления таких областей и восстановление их закрытой структуры.

4. В рамках физико-математической модели дезоксирибонуклеиновой кислоты в конденсированном состоянии, представленной механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников, позволяющая исследовать ее динамику, обусловленную вращательным движением азотистых оснований вокруг пентозо-фосфатного двунитевого остова были проведены оценочные эксперименты по влиянию изотопного обмена  $^2\text{H}/^1\text{H}$  в водородных связях между парами азотистых оснований на неравномерное распределение вероятностей возникновения областей с разорванными водородными связями по длине последовательности полипептидов (от 2 до 40 пар азотистых оснований). Установлено, что попадание атома дейтерия в водородные связи между парами азотистых оснований за счет изменения энергии связи, вызывает изменение критической энергии разрыва водородных связей (от 0,3 до  $0,59 \cdot 10^{-22}$  Дж).

5. Экспериментально показано наличие эффектов, вызванных изменением в средах соотношения  $^2\text{H}/^1\text{H}$  (от 10 до 150 ppm), формируемого парой изотопов с сильно различающимися массами и широко распространённых в живых системах.

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю профессору М.Г. Барышеву за поддержку и помощь в постановке цели и задач исследования. Автор благодарит доцента С.С. Джимака и профессора А.А. Басова за неоценимую поддержку и помощь в обсуждении полученных результатов, а также А.А. Свидлова за помощь в изучении математической модели молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Oerter, E. J. *In situ* monitoring of H and O stable isotopes in soil water reveals ecohydrologic dynamics in managed soil systems / E. J. Oerter, G. Bowen // *Ecohydrology*. – 2017. – Vol. 10. – № 4. – e1841.
2. D/H isotope ratios in the global hydrologic cycle / S. P. Good, D. Noone, N. Kurita [et al.] // *Geophys. Research Lett.* – 2015. – Vol. 42. – № 12. – P. 5042–5050.
3. Walter, W. D. Applications of stable isotope analysis in mammalian ecology / W. D. Walter, C. M. Kurle, J. B. Hopkins // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. – 2014. – Vol. 50. – № 3. – P. 287–290.
4. Hobson, K. A. Extending an indicator: Year-round information on seabird trophic ecology from multiple-tissue stable-isotope analyses / K. A. Hobson, A. L. Bond // *Marine Ecology Progress Series*. – 2012. – Vol. 461. – P. 233–243.
5. Comparative characteristics of the isotopic D/H composition and antioxidant activity of freshly squeezed juices from fruits and vegetables grown in different geographical regions / M.I. Bykov, S.S. Dzhimak, A.A. Basov [et al.] // *Voprosy Pitaniia*. – 2015. – V. 84. – № 4. – P. 89–96.
6. Galimov, E. M. Life is a product of molecular ordering “machine” / E. M. Galimov // *Geochemistry International*. – 2014. – Vol. 52. – Is. 13. – P. 1190–1196.
7. Ивлев, А. А. Короткопериодические колебания изотопного состава углерода CO<sub>2</sub> выдыхаемого воздуха в различных функциональных состояниях человека / А. А. Ивлев, Ю. А. Князев, М. Ф. Логачев // *Биофизика*. – 1996. – Т. 41. – № 2. – С. 508.
8. Influence of Deuterium-Depleted Water on Hepatorenal Toxicity / Dzhimak S.S., Basov A.A., Elkina A.A. [et al.] // *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.* – 2018. – Vol. 13. – № 2. – P. e69557. – DOI: 10.5812/jjnpp.69557
9. Изотопные эффекты D<sub>2</sub>O в биологических системах / В. Н. Лобышев, Л. П. Калиниченко – М.: Наука, 1978.

10. Buchachenko, A. L. Chemistry of enzymatic ATP synthesis: an insight through the isotope window / A. L. Buchachenko, D. A. Kouznetsov, N. N. Breslavskaya // *Chem. Rev.* – 2012. – Vol. 112. – № 4. – P. 2042–2058.
11. Calcium induced ATP synthesis: isotope effect, magnetic parameters and mechanism / A. L. Buchachenko, D. A. Kuznetsov, N.N. Breslavskaya, [et al.] // *Chem. Physics Lett.* – 2011. – Vol. 505. – P. 130–134.
12. Magnetic isotope of magnesium accelerates ATP hydrolysis catalyzed by myosin / V. K. Koltover, R. D. Labyntseva, S. O. Kosterin [et al.] // *Biophysics.* – 2016. – Vol. 61. – № 2. – C. 200–206.
13. Magnetic-isotope effect of magnesium in the living cell / V. K. Koltover, L. V. Avdeeva, E. A. Kudryashova [et al.] // *Doklady Biochemistry and Biophysics.* – 2012. – Vol. 442. – № 1. – P. 12–14.
14. Buchachenko, A. L. Hydrogen isotope effects and atom tunneling / A. L. Buchachenko, E. M. Pliss // *Russian Chemical Reviews.* – 2016. – Vol. 85. – № 6. – C. 557–564.
15. Shchepinov, M.S. Reactive oxygen species, isotope effect, essential nutrients, and enhanced longevity / M. S. Shchepinov // *Rejuvenation research.* – 2007. – Vol. 10. – № 1. – P. 47–59.
16. Li, X. Yeast longevity promoted by reversing aging-associated decline in heavy isotope content / X. Li, M. P. Snyder // *npj Aging and Mechanisms of Disease.* – 2016. – № 2. – P. 16004. – DOI:10.1038/npjamd.2016.4.
17. Darad, R. Effects of heavy water on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation / R. Darad, A. S. Aiyar // *Journal of Biosciences.* – 1982. – Vol. 4. – № 2. – P. 159–166.
18. Kolesova O.E. Relationship between natural concentration of heavy water isotopologs and rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation by mitochondria / O. E. Kolesova, I. A. Pomytkin // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 2006. – Vol. 142. – № 5. – P. 570–572.
19. Influence of deuterium depleted water on the isotope D/H composition of liver tissue and morphological development of rats at different periods of

ontogenesis / Basov A. A., Elkina A. A., Samkov A. A. [et al.] // Iranian Biomedical Journal. – 2019. – Vol. 23. – № 2. – P. 129–141. – DOI: 10.29252/.23.2.129.

20. The Role of the Canonical Wnt-Signaling Pathway in Morphogenesis and Regeneration of the Adrenal Cortex in Rats Exposed to the Endocrine Disruptor Dichlorodiphenyltrichloroethane during Prenatal and Postnatal Development / N. V. Yaglova, D. A. Tsomartova, S. S. Obernikhin [et al.] // Biol Bull Russ Acad Sci. – 2019. – Vol. 46. – P. 74–81. – <https://doi.org/10.1134/S1062359018060122>

21. Development perspectives of new generation medications based on the redox system regulators / S. A. Shahmardanova, O. N. Gulevskaya, P. A. Galenko-Yaroshevsky [et al.] // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. – 2016. – Vol. 2. – № 4. – P. 95–102.

22. Submolecular regulation of cell transformation by deuterium depleting water exchange reactions in the tricarboxylic acid substrate cycle / L. G. Boros, D. P. D'Agostino, H. E. Katz [et al.] // Medical Hypotheses. – 2016. – Vol. 87. – P. 69–74.

23. Изменение резистентности головного мозга крыс к гипоксии при замещении дейтерия на протий в жидких средах / С. В. Козин, А. А. Кравцов, А. А. Елкина [и др.] // Биофизика. – 2019. – Т. 64. – № 2. – С. 362–370.

24. *In Vitro* Study of Deuterium Effect on Biological Properties of Human Cultured Adipose-Derived Stem Cells / A. Zlatska, I. Gordiienko, R. Vasyliiev [et al.] // Scientific World Journal. – 2018. – P. 5454367. – DOI: 10.1155/2018/5454367.

25. Deuterium-Depleted Water as Adjuvant Therapeutic Agent for Treatment of Diet-Induced Obesity in Rats / T. Halenova, I. Zlatskiy, A. Syroeshkin [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – № 1. – P. 23.

26. Letuta, U. G. Magnetosensitivity of bacteria *E. coli*: magnetic isotope and magnetic field effects / U. G. Letuta, V. L. Berdinskiy // Bioelectromagnetics. – 2017. – Vol. 38. – № 8. – P. 581–591.

27. Effect of Systemic Subnormal Deuterium Level on Metabolic Syndrome Related and other Blood Parameters in Humans: A Preliminary Study / G. Somlyai, I. Somlyai, I. Fórizs [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – P. 1376.
28. Shchepinov, M. S. Do "heavy" eaters live longer? / M. S. Shchepinov // *BioEssays*. – 2007. – Vol. 29. – P. 1247–1256. – DOI: 10.1002/bies.2068.
29. Deuterium-depleted water influence on the isotope  $^2\text{H}/^1\text{H}$  regulation in body and individual adaptation / A. Basov, L. Fedulova, M. Baryshev [et al.] // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11. – № 8. – P. 1903. – DOI:10.3390/nu11081903.
30. Changes in Prooxidant-Antioxidant System Indices in the Blood and Brain of Rats with Modelled Acute Hypoxia which Consumed a Deuterium-Depleted Drinking Diet / A. A. Basov, S. V. Kozin, I. M. Bikov [et al.] // *Biol Bull Russ Acad Sci*. – 2019. – Vol. 46. – P. 531–535. – <https://doi.org/10.1134/S1062359019060049>
31. Isotopic niche reflects stress-induced variability in physiological status / A. M. L. Karlson, M. Reutgard, A. Garbaras [et al.] // *Royal Society Open Science*. – 2018. – Vol. 5. – № 2. – P. 17139.
32. Increase in stable isotope ratios driven by metabolic alterations in amphipods exposed to the beta-blocker propranolol / C. Ek, A. Garbaras, Z. Yu [et al.] // *PLoS ONE*. – 2019. – Vol. 14. – № 5. – P. e0211304.
33. Somlyai, G. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells / G. Somlyai // *FEBS Letters*. – 1993. – Vol. 1,2. – P. 1–4.
34. Effect of Drinking Ration with Reduced Deuterium Content on Brain Tissue Prooxidant-Antioxidant Balance in Rats with Acute Hypoxia Model / A. A. Kravtsov, S. V. Kozin, E. R. Vasilevskaya [et al.] // *Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences*. – 2018. – Vol. 8. – № 2. – P. 42–51.
35. The effect of water isotopic composition on *Rhodococcus erythropolis* biomass production / A. A. Samkov, S. S. Dzhimak, M. G. Barishev [et al.] // *Biophysics*. – 2015. – Vol. 60. – № 1. – P. 107–112.
36. Molecular biology of the cell / B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, [et al.] // New York: Garland Science. – 2002.

37. Frank-Kamenetskii, M. New and views: How the double helix breathes / M. Frank-Kamenetskii // *Nature*. – 1987. – Vol. 328. – P. 17.
38. Feklistov, A. Structural basis for promoter-10 element recognition by the bacterial RNA polymerase sigma subunit / A. Feklistov, S. A. Darst // *Cell*. – 2011. – Vol. 147. – P. 1257–1269.
39. Liu, X. Lock and key to transcription: sigma-DNA interaction / X. Liu, D. A. Bushnell, R. D. Kornberg // *Cell*. – 2011. – V. 147. – P. 1218–1219.
40. Eley, D.D. Semiconductivity of organic substances. Part 9. Nucleic acid in the dry state / D. D. Eley, D. I. Spivey // *Transactions of the Faraday Society*. – 1962. – Vol. 58. – P. 411–415.
41. Armitage, B. Photocleavage of Nucleic Acids / B. Armitage // *Chemical Reviews*. – 1998. – Vol. 98. – P. 1171–1200.
42. Kino, K. Possible cause of G-C→C-G transversion mutation by guanine oxidation product, imidazolone / K. Kino, H. Sugiyama // *Chemistry & Biology*. – 2001. – Vol. 8. – P. 369–378.
43. Wagenknecht, H.-A. Electron transfer processes in DNA: mechanisms, biological relevance and applications in DNA analytics / H.-A. Wagenknecht // *Natural Product Reports*. – 2006. – Vol. 23. – P. 973–1006.
44. Kawanishi, S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging / S. Kawanishi, Y. Hiraku, S. Oikawa // *Mutation Research*. – 2001. – Vol. 488. – P. 65–76.
45. Genereux, J. C. DNA-mediated Charge Transport in Redox Sensing and Signaling / J. C. Genereux, A. K. Boal, J. K. Barton // *Journal of American Chemical Society*. – 2010. – Vol. 132. – P. 891–905.
46. DNA charge transport as a first step in coordinating the detection of lesions by repair proteins / P. A. Sontz, T. P. Mui, J. O. Fuss [et al.] // *PNAS USA*. – 2012. – Vol. 109. – P. 1856–1861.
47. Sontz, P. A. DNA Charge Transport for Sensing and Signaling / P. A. Sontz, N. B. Muren, J. K. Barton // *Accounts of Chemical Research*. – 2012. – Vol. 45. – P. 1792–1800.



48. Gueron, M. Studies of base pair kinetics by NMR measurement of proton exchange / M. Gueron, J.-L. Leroy // *Methods in Enzymology*. – 1995. – Vol. 261. – P. 383–413.
49. von Hippel, P. H. Fifty years of DNA "breathing": reactions on old and new approaches / P. H. von Hippel, N. P. Johnson, A. H. Marcus // *Biopolymers*. – 2013. – Vol. 99. – P. 923–954.
50. Frank-Kamenetskii, M. D. Fluctuations in the DNA double helix: A critical review / M. D. Frank-Kamenetskii, S. Prakash // *Phys Life Rev.* – 2014. – Vol. 11. – P. 153–170.
51. Krueger, A. Sequence-dependent basepair opening in DNA double helix / A. Krueger, E. Protozanova, M. D. Frank-Kamenetskii // *Biophys. J.* – 2006. – Vol. 90. – P. 3091–3099.
52. Palmeri, J. Thermal denaturation of actuating  $\lambda$ -DNA chains: the role of bending rigidity in bubble nucleation / J. Palmeri, M. Manghi, N. Destainville // *Phys. Rev. E.* – 2008. – Vol. 77. – P. 011913.
53. Nagapriya, K. S. Thermal denaturation spectroscopy of DNA thermal denaturation / K. S. Nagapriya, A. K. Raychaudhuri // *Biophys. J.* – 2010. – Vol. 99. – P. 2666–2675.
54. Destainville, N. Microscopic mechanism for experimentally observed anomalous elasticity of DNA in 2D / N. Destainville, M. Manghi, J. Palmeri // *Biophys. J.* – 2009. – Vol. 96. – P. 4464–4469.
55. Quantifying supercoiling-induced denaturation bubbles in DNA / J. Adamcik, J.-H. Jeon, K. J. Karczewski [et al.] // *Soft Matter*. – 2012. – Vol. 8. – P. 8651–8658.
56. Watson, J. D. Molecular structure of nucleic acids / J. D. Watson, F. H. C. Crick // *Nature*. – 1953. – Vol. 171. – P. 737–738.
57. Meyer, R. R. The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli* / R. R. Meyer, P. S. Laine // *Microbiol. Rev.* – 1990. – Vol. 54. – P. 342–380.

58. Yan, J. Localized single-stranded bubble mechanism for cyclization of short double helix DNA / J. Yan, J. F. Marko // *Phys. Rev. Lett.* – 2004. – Vol. 93. – P. 108108.
59. Chakrabarti, B. Nonlinear elasticity of an  $\alpha$ -helical polypeptide / Chakrabarti B., Levine A. J. // *Phys. Rev. E.* – 2005. – Vol. 71. – P. 031905.
60. Manghi, M. Coupling between denaturation and chain conformations in DNA: stretching, bending, torsion and finite size effects / M. Manghi, J. Palmeri, N. Destainville // *J. Phys.: Condens. Matter.* – 2009. – Vol. 21. – P. 034104.
61. Lohman, T. M. Mechanisms of helicase-catalyzed DNA unwinding / T. M. Lohman, K. P. Bjornson // *Annu. Rev. Biochem.* – 1996. – Vol. 65. – P. 169–214.
62. Fye, R. M. Exact method for numerically analyzing a model of local denaturation in superhelically stressed DNA / R. M. Fye, C. J. Benham // *Phys. Rev. E.* – 1999. – Vol. 59. – P. 3408–3426.
63. Jost, D. Bubble statistics and positioning in superhelically stressed DNA / D. Jost, A. Zubair, R. Everaers // *Phys. Rev. E.* – 2011. – Vol. 84. – P. 031912.
64. Bundschuh, R. Dynamics of intramolecular recognition: Base-pairing in DNA/RNA near and far from equilibrium / R. Bundschuh, U. Gerland // *Eur. Phys. J. E* – 2006. – Vol. 19. – P. 319–329.
65. Frank-Kamenetskii, M. D. Triplex DNA structures / M. D. Frank-Kamenetskii, S. M. Mirkin // *Annu. Rev. Biochem.* – 1995. – Vol. 64. – P. 65–95.
66. McMurray, C. T. DNA secondary structure: A common and causative factor for expansion in human disease / C. T. McMurray // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol. 96. – P. 1823–1825.
67. Quadruplex DNA: sequence, topology and structure / S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34. – P. 5402–5415.
68. Theoretical study of kinetics of zipping phenomena in biomimetic polymers / A. Jayaraman, E. E. Santiso, C. K. Hall [et al.] // *Phys. Rev. E.* – 2007. – Vol. 76. – P. 011915.

69. Tuerk, C. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase / C. Tuerk, L. Gold // *Science*. – 1990. – Vol. 249. – P. 505–510.
70. Ellington, A. D. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands / A. D. Ellington, J. W. Szostak // *Nature*. – 1990. – Vol. 346. – P. 818–822.
71. Rapid chiral assembly of rigid DNA building blocks from molecular nanofabrication / R. P. Goodman, I. A. T. Schaap, C. F. Tardin [et al.] // *Science*. – 2005. – Vol. 310. – P. 1661–1665.
72. Rothemund, P. W. K. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns / P. W. K. Rothemund // *Nature*. – 2006. – Vol. 440. – P. 297–302.
73. Construction of a 4 zeptoliters switchable 3D DNA box origami / R. M. Zadegan, M. D. E. Jepsen, K. E. Thomsen [et al.] // *ACS Nano*. – 2012. – Vol. 6. – P. 10050–10053.
74. Maiti, S. Fluorescence correlation spectroscopy: Diagnostics for sparse molecules / S. Maiti, U. Haupts, W.W. Webb // *PNAS USA*. – 1997. – V. 94. – P. 11753–11757.
75. Bonnet, G. Kinetics of conformational fluctuations in DNA hairpin-loops / G. Bonnet, O. Krichevsky, A. Libchaber // *PNAS USA*. – 1998. – V. 95. – P. 8602–8606.
76. Gueron, M. A single mode of DNA base-pair opening drives imino proton exchange / M. Gueron, M. Kochoyan, J.-L. Leroy // *Nature*. – 1987. – Vol. 328. – P. 89–92.
77. Altan-Bonnet, G. Bubble dynamics in double-stranded DNA / G. Altan-Bonnet, A. Libchaber, O. Krichevsky // *Phys. Rev. Lett.* – 2003. – Vol. 90. – P. 138101.
78. Chaikin, P. M. of condensed matter physics / P. M. Chaikin, T. C. Lubensky. – Cambridge University Press, 1995.
79. Wartell, R. M. Equilibrium denaturation of natural and of periodic synthetic DNA molecules / R. M. Wartell, E. W. Montroll // *Adv. Chem. Phys.* – 1972. – Vol. 22. – P. 129–203.

80. Yakushevich, L. V. Nonlinear physics of DNA / L. V. Yakushevich. – Wiley, 2004.
81. Muto, V. Microwave and thermal generation of solitons in DNA / V. Muto, A. C. Scott, P. L. Christiansen // *J. Phys.* – 1989. – Vol. 50. – P. 217–222.
82. Christiansen, P. L. On a Toda lattice model with a transversal degree of freedom / P. L. Christiansen, P. C. Lomdahl, V. Muto // *Nonlinearity*. – 1990. – Vol. 4. – P. 477–501.
83. Christiansen, P. L. Nonlinear models of DNA dynamics / P. L. Christiansen, V. Muto, // *Physica D*. – 1993. – Vol. 68. – P. 93–96.
84. Nature of the open state in long polynucleotide double helices: possibility of soliton excitations / S. W. Englander, N. R. Kallenbach, A. J. Heeger [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1980. – Vol. 77. – P. 7222–7226.
85. Scott, A. C. A nonlinear Klein-Gordon equation / A. C. Scott // *Am. J. Phys.* – 1969. – Vol. 37. – P. 52–61.
86. Yomosa, S. Soliton excitations in deoxyribo-nucleic acid (DNA) double helices / S. Yomosa // *Phys. Rev. A*. – 1983. – Vol. 27. – P. 2120–2125.
87. Manghi M. Physics of base-pairing dynamics in DNA / M. Manghi, N. Destainville // *Physics Reports*. – 2016. – 631. – P. 1–41. – DOI: 10.1016/j.physrep.2016.04.001.
88. Takeno, S. Topological solitons and modulated structure of bases in DNA double helices / S. Takeno, S. Homma // *Prog. Theor. Phys.* – 1983. – Vol. 70. – P. 308–311.
89. Yakushevich, L. V. Is DNA a nonlinear dynamical system where solitary conformational waves are possible? / L.V. Yakushevich // *J. Biosciences*. – 2001. – Vol. 26. – P. 305–313.
90. Yakushevich, L. V. Nonlinear dynamics of topological solitons in DNA / L. V. Yakushevich, A. V. Savin, L. I. Manevitch // *Phys. Rev. E*. – 2002. – Vol. 66. – P. 016614.
91. Gaeta, G. Solitons in the Yakushevich model of DNA beyond the contact approximation / G. Gaeta // *Phys. Rev. E*. – 2006. – Vol. 74. – P. 021921.

92. Cadoni, M. Composite model for DNA torsion dynamics / M. Cadoni, R. De Leo, G. Gaeta // *Phys. Rev. E.* – 2007. – Vol. 75. – P. 021919.
93. Gaeta, G. Solitary waves in twist-opening models of DNA dynamics / G. Gaeta, L. Venier // *Phys. Rev.* – 2008. – Vol. 78. – P. 011901.
94. Tabi, C. B. Modulational instability and pattern formation in DNA dynamics with viscosity / C. B. Tabi, A. Moharnadou, T. C. Kofane // *J. Comp. Theor. Nanoscience.* – 2008. – Vol. 5. – P. 647–654.
95. Vasumathi, V. Base pair opening and bubble transport in a DNA double helix induced by a protein molecule in a viscous medium / V. Vasumathi, M. Daniel // *Phys. Rev. E.* – 2009. – Vol. 80. – P. 061904.
96. Vanitha, M. Internal nonlinear dynamics of a short lattice DNA model in terms of propagating kink-antikink solitons / M. Vanitha, M. Daniel // *Phys. Rev. E.* – 2012. – Vol. 85. – P. 041911.
97. Dauxois, T. Entropy-driven DNA denaturation / T. Dauxois, M. Peyrard, A. R. Bishop // *Phys Rev E.* – 1993. – Vol. 47. – P. R44–R47.
98. Peyrard, M. Nonlinear dynamics and statistical physics of DNA / M. Peyrard // *Nonlinearity.* – 2004. – Vol. 17. – P. R1–R40.
99. Joyeux, M. Dynamical model based on  $\pi$ -stacking enthalpies for homogeneous and inhomogeneous DNA thermal denaturation / M. Joyeux, S. Buyukdagli // *Phys Rev E.* – 2005. – Vol. 72. – P. 051902.
100. Kalosakas, G. Non-exponential decay of base-pair opening fluctuations in DNA / G. Kalosakas, K. Rasmussen, A. R. Bishop // *Chem. Phys. Lett.* – 2006. – Vol. 432. – P. 291–295.
101. A nonlinear dynamic model of DNA with a sequence-dependent stacking term / B. S. Alexandrov, V. Gelev, Y. Monisova [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37. – P. 2405–2410.
102. Buyukdagli, S. Towards more realistic dynamical models for DNA secondary structure / S. Buyukdagli, M. Sanrey, M. Joyeux // *Chem. Phys. Lett.* – 2006. – Vol. 419. – P. 434–438.

103. Buyukdagli, S. Theoretical investigation of finite size effects at DNA melting / S. Buyukdagli, M. Joyeux // *Phys Rev E*. – 2007. – Vol. 76. – p 021917.
104. Tiwary, P. From metadynamics to dynamics / P. Tiwary, M. Parrinello // *Phys. Rev. Lett.* – 2013. – Vol. 111. – P. 230602.
105. Sicard, F. DNA denaturation bubbles: free-energy landscape and nucleation/closure rates / F. Sicard, N. Destainville, M. Manghi // *J. Chem. Phys.* – 2015. – Vol. 142. – P. 034903.
106. Slow closure of denaturation bubbles in DNA: twist matters / A.K. Dasanna, N. Destainville, J. Palmeri [et al.] // *Phys. Rev. E*. – 2013. – Vol. 87. – P. 052703.
107. Strand diffusion-limited closure of denaturation bubbles in DNA / A.K. Dasanna, N. Destainville, J. Palmeri [et al.] // *EPL*. – 2012. – Vol. 98. – P. 38002.
108. Near-threshold H/D exchange in CD<sub>3</sub>CHO photodissociation / B. R. Heazlewood, A. T. Maccarone, D. U. Andrews [et al.] // *Nature Chemistry*. – 2011. – Vol. 3. – № 6. – P. 443–448 – DOI: 10.1038/nchem.1052.
109. Bond energies in polyunsaturated acids and kinetics of co-oxidation of protiated and deuterated acids / Z. S. Andrianova, A. L. Buchachenko, N. N. Breslavskaya [et al.] // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2016. – Vol. 90. – № 10. – P. 1936–1941.
110. Deuterium transfer in the bioconversion of glucose to ethanol studied by specific isotope labeling at the natural abundance level / G. J. Martin, B. L. Zhang, N. Naulet [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 1986. – Vol. 108. – № 17. – P. 5116–5122.
111. Zhang, X. Large D/H variations in bacterial lipids reflect central metabolic pathways / X. Zhang, A. L. Gillespie, A. L. Sessions // *PNAS*. – 2009. – Vol. 106. – № 31. – P.12580–12586.
112. Stable-isotope probing reveals that hydrogen isotope fractionation in proteins and lipids in a microbial community are different and species-specific / C. R. Fischer, B. P. Bowen, C. Pan [et al.] // *ACS Chem. Biol.* – 2013. – Vol. 8. – № 8. – P. 1755–1763.

113. Applications of deuterium oxide in human health / W. C. Bila, R. M. S. Mariano, V. R. Silva [et al.] // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. – 2017. – Vol. 53. – № 4. – P. 327–343.

114. Lewis, E. R. Large competitive kinetic isotope effects in human 15-lipoxygenase catalysis measured by a novel HPLC method / E. R. Lewis, E. Johansen, T. R. Holman // *Journal of the American Chemical Society*. – 1999. – Vol. 121. – Is. 6. – P. 1395–1396.

115. Pollak N. The power to reduce: pyridine nucleotides—small molecules with a multitude of functions / N. Pollak, C. Dolle, M. Ziegler // *Biochem. J.* – 2007. – Vol. 402. – P. 205–218.

116. Tracing Compartmentalized NADPH Metabolism in the Cytosol and Mitochondria of Mammalian Cells / C. A. Lewis, S. J. Parker, B. P. Fiske [et al.] // *Molecular Cell*. – 2014. – Vol. 55. – P. 253–263.

117. Sormendi, S. Hypoxia pathway proteins as central mediators of metabolism in the tumor cells and their microenvironment / S. Sormendi, B. Wielockx // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 40. – DOI: 10.3389/fimmu.2018.00040.

118. Deuterium content of water increases depression susceptibility: the potential role of a serotonin-related mechanism / T. Strekalova, M. Evans, A. Chernopiatko [et al.] // *Behavioural Brain Research*. – 2015. – Vol. 277. – P. 237–244.

119. Luo, A.-L. Research progress of biological effects of deuterium-depleted water / A.-L. Luo, Y.-L. Zheng, F.-S. Cong // *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*. – 2018. – Vol. 38. – № 4. – P. 467–471.

120. Correction of metabolic processes in rats during chronic endotoxemia using isotope (D/H) exchange reactions / Dzhimak S.S., Basov A.A., Fedulova L.V. [et al.] // *Biology Bulletin*. – 2015. – Vol. 42. – № 5. – P. 440–448. – DOI: 10.1134/S1062359015050064.

121. Механизмы взаимодействия стабильных изотопов с биологическими объектами с учетом некомпенсированного нейтрона в

химических связях / А. А. Елкина, Е. Н. Тумаев, А. А. Басов [и др.] // Биофизика. – 2020. – Т. 65. – № 5. – С. 1034–1040. – DOI: 10.31857/S0006302920050221.

122. Letuta, U. G. The influence of low magnetic fields and magnesium isotopes on E. coli bacteria / U. G. Letuta, S. N. Letuta, V. L. Berdinskiy // Biophysics. – 2017. – Vol. 62. – № 6. – P. 935–941.

123. The effect of the deuterium depleted water on the biological activity of the eukaryotic cells / A. V. Syroeshkin, N. V. Antipova, A. V. Zlatska [et al.] // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2018. – V. 50. – P. 629–633.

124. Hydrogen and oxygen stable isotope ratios of milk in the United States / L. A. Chesson, L. O. Valenzuela, S. P. O’Grady [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2010. – Vol. 58. – P. 2358–2363.

125. Xie, X. Isotopic Resonance Hypothesis: Experimental Verification by Escherichia coli Growth Measurements / X. Xie, R. A. Zubarev // Scientific reports. – 2015. – Vol. 5. – P. 9215. – DOI: 10.1038/srep09215.

126. Crotty, F. V. Differential growth of the fungus Absidia cylindrospora on <sup>13</sup>C/<sup>15</sup>N-labelled media / F. V. Crotty, R. P. Blackshaw, P. J. Murray // Rapid Comm Mass Spectrom. – 2011. – Vol. 25. – P. 1479–1484.

127. Diet discrimination factors are inversely related to  $\delta^{15}\text{N}$  and  $\delta^{13}\text{C}$  values of food for fish under controlled conditions / C. A. Dennis, M. A. MacNeil, J. Y. Rosati [et al.] // Rapid Comm Mass Spectrom. – 2010. – Vol. 24. – P. 3515–3520. – DOI:10.1002/rcm.4807.

128. Buchachenko, A. L. Efficiency of ATP synthase as a molecular machine / A. L. Buchachenko, D. A. Kouznetsov // Biophysics. – 2008. – Vol. 53. № 3. – P. 219–222.

129. Andriukonis, E. Kinetic <sup>15</sup>N-isotope effects on algal growth / E. Andriukonis, E. Gorokhova // Scientific reports. – 2017. – Vol. 7. – P. 44181. – DOI: 10.1038/srep44181.



130. The role of a magnetic effect in uranium isotope fractionation / O. B. Lysenko, Y. N. Demikhov, N. A. Skul'skii [et al.] // Russian Journal of Physical Chemistry. – 2014. – Vol. 8. – № 6. – P. 870–873.

131. Летута У. Г. Магниточувствительность бактерий *E. Coli* в присутствии изотопов цинка / У. Г. Летута Д. М. Шайлина // Доклады Академии наук. – 2018. – Vol. 479. – Vol. 5. – P. 585–588.

132. Летута, У. Г. Влияние магнитного поля и изотопов цинка на колониобразующую способность и элементный состав бактерий *E. coli* / У. Г. Летута, В. Л. Бердинский // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2018. – Vol. 9. – P. 1732–1737.

133. Sobczyk, L. H/D isotope effects in hydrogen bonded systems / L. Sobczyk, M. Obrzud, A. Filarowski // Molecules. – 2013. – Vol. 18. – P. 4467–76.

134. Xin, Y.-B. Research progress of hydrogen tunneling in two-dimensional materials / Y.-B. Xin, Q. Hu, D.-H. Niu [et al.] // Acta Physica Sinica. – 2017. – Vol. 66. – № 5. – P. 056601.

135. Drechsel-Grau, C. Exceptional isotopic-substitution effect: breakdown of collective proton tunneling in hexagonal ice due to partial deuteration / C. Drechsel-Grau, D. Marx // Angew Chem Int Ed Engl. – 2014. – Vol. 53. – P. 10937–40. – DOI: 10.1002/anie.201405989

136. Влияние на энергию ковалентной связи изотопного состава формирующих ее ядер / С. С. Джимаков, Г. Ф. Копытов, А. А. Елкина [и др.] // Известия вузов. Физика. – 2020. – Т. 63. – № 11. – С. 81–89. – DOI: 10.17223/00213411/63/11/81

137. Uphaus, R. A. A living organism of unusual isotopic composition. Sequential and cumulative replacement of stable isotopes in *Chlorella vulgaris* / R. A. Uphaus, E. Flaumenhaft, J. J. Katz // Biochim. Biophys. Acta. – 1967. – Vol. 141. – P. 625–632.

138. Sarsa, A. Isotopic Effects on Covalent Bond Confined in a Penetrable Sphere / A. Sarsa, J.M. Alcaraz-Pelegrina, C. Le Sech // Journal of Physical Chemistry B. – 2015. – Vol. 119. – № 45. – P. 14364–14372.

139. Symes, C. Isotope ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^2\text{H}$ ) diet–tissue discrimination in African grey parrot *Psittacus erithacus*: implications for forensic studies / C. Symes, F. Skhosana, M. Butler [et al.] // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. – 2017. – Vol. 53. – № 6. – P. 580–596. – DOI: 10.1080/10256016.2017.1319832.

140. Borek, E. Anomalous growth of microorganisms produced by changes in isotopes in their environment / E. Borek, D. Rittenberg // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1960. – Vol. 46. – P. 777–782.

141. Hydrogen and Oxygen Stable Isotope Fractionation in Body Fluid Compartments of Dairy Cattle According to Season, Farm, Breed, and Reproductive Stage / Abeni, F., Petrera F, Capelletti M [et al.] // *PLoS ONE*. – 2015. – Vol. 10. – № 5. – P. e0127391. – DOI:10.1371/journal.pone.0127391.

142. Limits and possibilities in the geolocation of humans using multiple isotope ratios (H, O, N, C) of hair from east coast cities of the USA / L. M. Reynard, N. Burt, H. E. C. Koon [et al.] // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. – 2016. – Vol. 52. – № 4–5. – P. 498–512.

143. Kirsanow K. Oxygen and hydrogen isotopes in rodent tissues: Impact of diet, water and ontogeny / K. Kirsanow, N. Tuross // *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*. – 2011. – Vol. 310. – Is. 1–2. – P. 9–16.

144. Inequality in the frequency of the open states occurrence depends on single  $2\text{H}/1\text{H}$  replacement in DNA / A. Basov, M. Drobotenko, A. Svidlov [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – Is. 16. – P. 3753. – DOI: 10.3390/molecules25163753.

145. Influence of the Environmental Isotope Composition Modification on Growth and Metabolic Activity of *Rhodococcus* and *Saccharomyces* / N. N. Volchenko, A. A. Samkov, V. V. Malyshko [et al.] // *Biology Bulletin*. – 2020. – Vol. 47. – № 4. – P. 326–330. – DOI: 10.1134/S1062359020040135.

146. Comparative analysis of the different dyes' potential to assess human normal and cancer cell viability in vitro under different d/h ratios in a culture medium / I. A. Zlatskiy, A. V. Zlatska, N. V. Antipova [et al.] // *The Scientific World*

Journal. – 2020. – Vol. 2020. – P. 2373021. – DOI:  
<https://doi.org/10.1155/2020/2373021>

147. Yavari, K. Deuterium Depleted Water Inhibits the Proliferation of Human MCF7 Breast Cancer Cell Lines by Inducing Cell Cycle Arrest / K. Yavari, L. Kooshesh // Nutrition and Cancer. – 2019. – Vol. 71. – № 6. – P. 1019–1029. – <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1595048>.

148. Effect of the deuterium on efficiency and type of adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells *in vitro* / A. Zlatska, R. G. Vasyliiev, I. M. Gordiienko [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – № 10. – P. 5217. – <https://doaj.org/article/f96f906e0e07494481f24dc46e91e952>.

149. Synergistic effects of deuterium depleted water and *Mentha longifolia* L. essential oils on sepsis-induced liver injuries through regulation of cyclooxygenase-2 / A. Rasooli, F. Fatemi, R. Hajihosseini [et al.] // Pharmaceutical Biology. – 2019. – Vol. 57. – № 1. – P. 125–132. – doi:10.1080/13880209.2018.1563622.

150. Anti-inflammatory effects of deuterium-depleted water plus *rosa damascena* mill. Essential oil via cyclooxygenase-2 pathway in rats / F. Fatemi, A. Golbodagh, R. Hojihosseini [et al.] // Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2020. – Vol. 17 – № 1. – P. 99–107. – doi: 10.4274 / tjps.24381.

151. Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a *C. elegans* model / D. S. Avila, G. Somlyai, I. Somlyai [et al.] // Toxicol Lett. – 2012. – Vol. 211. – P. 319–324. – DOI: 10.1016/j.toxlet.2012.04.014.

152. Effect of Deuterium-Depleted Water on Selected Cardiometabolic Parameters in Fructose-Treated Rats / R. Rehakova, J. Klimentova, M. Cebova, [et al.] // Physiol. Res. – 2016. – Vol. 65. – № 3. – P. S401–S407. – DOI: 10.33549/physiolres.933440/.

153. Effect of deuterium water on blood values and digestibility of nutrients of rhesus macaque / N.V. Gaponov, S.V. Svistunov, Bondarenko, N.N. [et al.] // Bulletin of the national academy of sciences of the republic of Kazakhstan. – 2020. – Vol. 2. – P. 22–28. – DOI: 10.32014/2020.2518-1467.37.

154. Isotope exchange of deuterium for protium in rat brain tissues changes brain tolerance to hypoxia / S. V. Kozin, A.A. Kravtsov, A.A. Elkina [et al.] // *Biophysics*. – 2019. – Vol. 64. – № 2. – P. 272–278. DOI:10.1134/S0006350919020106

155. Neuroprotective Effects of Deuterium-Depleted Water (ODD) Against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Oxidative Stress in Differentiated PC12 Cells Through the PI3K/Akt Signaling Pathway / Y. Wu, D. Qin, H. Yang [et al.] // *Neurochem Res*. – 2020. – Vol. 45. – № 5. – P. 1034–1044. – DOI:10.1007/s11064-020-02978-4.

156. Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during 2H/1H isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes. / A. A. Basov, L. V. Fedulova, E. R. Vasilevskaya [et al.] // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – № 22Ю – P. 4101. – <https://doi.org/10.3390/molecules24224101>

157. Anticancer effect of deuterium depleted water - Redox disbalance leads to oxidative stress / X. Zhang, M. Gaetani, Chernobrovkin A. [et al.] // *Molecular and Cellular Proteomics*. – 2019. – Vol. 18. – № 12. – P. 2373–2387. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001455>

158. Mitochondrial Dysfunctions: A Red Thread across Neurodegenerative Diseases / S. Stanga, A. Caretto, M. Boido [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – P. 3719. <https://doi.org/10.3390/ijms21103719>.

159. Pedersen, L. G. Deuterium and its role in the machinery of evolution / L.G. Pedersen, L. Bartolotti, L. Li // *Journal of Theoretical Biology*. – 2006. – Vol. 238. – № 4. – P. 914–918. – DOI: 10.1016/j.jtbi.2005.07.002.

160. Reaser, P. B. Determination of deuterium oxide in water by measurement of freezing point / P.B. Reaser, G.E. Burch // *Science*. – 1958. – Vol. 128. – № 3321. – P. 415–416. – DOI: 10.1126/science.128.3321.415.

161. Parmon, V. N. On the possibility of observing kinetic isotopic effects in the life cycles of living organisms at ultralow concentrations of deuterium / V. N.

Parmon // *Her. Russ. Acad. Sci.* – 2015. – Vol. 85. – № 2. – P. 170–172. – DOI: 10.1134/S1019331615020057/10.1134/S1019331615020057.

162. Shigaev, A. S. Theoretical and experimental investigations of DNA open states / A. S. Shigaev, O. A. Ponomarev, V. D. Lakhno // *Mathematical Biology and Bioinformatics.* – 2013. – Vol. 8. – № 2. – P. 553–664.

163. Дроботенко, М. И. Расчет вращательных движений в двухцепочечной молекуле ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ / М. И. Дроботенко, А. А. Свидлов, М. Г. Барышев, С. С. Джимаков // Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2017660682, заявл. 31.07.2017; зарегистрировано в Реестре программ для ЭВМ 22.09.2017.

164. Vologodskii, A. DNA melting and energetics of the double helix / A. Vologodskii, M. D. Frank-Kamenetskii // *Physics of Life Reviews.* – 2018. – Vol. 25. – P. 1–21. – DOI: 10.1016/j.plrev.2017.11.012.

165. Yakushevich, L. V. Forced Oscillations of DNA Bases / L. V. Yakushevich, L. A. Krasnobaeva // *Biophysics.* – 2016. – Vol. 61. – № 2. – P. 241–250. – DOI: 10.1134/S000635091602024X.

166. Grinevich, A. A. The influence of the DNA torque on the dynamics of transcription bubbles in plasmid PTTQ18 / A. A. Grinevich, L. V. Yakushevich // *Journal of Theoretical Biology.* – 2018. – Vol. 453. – P. 68–77. – DOI: 10.1016/j.jtbi.2018.04.036.

167. Mathematical Model for Basepair Opening in a DNA Double Helix / M. I. Drobotenko, S. S. Dzhimak, A. A. Svidlov [et al.] // *Biophysics.* – 2018. – 63(2). – P. 177–182. – DOI: 10.1134/S0006350918020069.

168. Grinevich, A. A. On the modeling of the motion of a transcription bubble under constant torque / A. A. Grinevich, L.V. Yakushevich // *Biophysics.* – 2016. – Vol. 61. – № 4. – P. 539–546. – DOI: 10.1134/S0006350916040126.

169. Mathematical modeling of open states in a double-stranded DNA molecule depending on  $^2\text{H}/^1\text{H}$  ratio / S. S. Dzhimak, M. I. Drobotenko, A. A. Basov [et al.] // *Mathematical Biology and Bioinformatics.* – 2019. – Vol. 14. – № 2. – P. 612–624. – DOI: 10.17537/2019.14.612.

170. Agarwal B.L. Basic Statistics / B.L. Agarwal // New Delhi: New Age International. – 2009. – P. 832.
171. Coman, D. Probing hydrogen bonding in a DNA triple helix using protium-deuterium fractionation factors / D. Coman, I. M. Russu // J Am Chem Soc. – 2003. – Vol. 125. – № 22. – P. 6626-6627.
172. Yakushevich, L. V. Trajectories of the DNA kinks in the sequences containing CDS regions / L. V. Yakushevich, L. A. Krasnobaeva // Math. Biol. Bioinf. – 2017. – Vol. 12. – № 1. – P. 1–13. – DOI: 10.17537/2017.12.1.
173. Lindahl, V. Sequence dependency of canonical base pair opening in the DNA double helix / V. Lindahl, A. Villa, B. Hess // PLoS Comput Biol. – 2017. – Vol. 13. – № 4. – P.e1005463. – DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005463.
174. Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damages DNA / A. Banerjee, W. Yang, M. Karplus [et al.] // Nature. – 2005. – Vol. 434. – P. 612–618. – DOI: 10.1038/nature03458.
175. Lariviere, L. A base-flipping mechanism for the T4 phage beta-glucosyltransferase and identification of a transition-state analog / L. Lariviere, S. Morera // J. Mol. Biol. – 2002. – Vol. 324. – P. 483–490. – DOI: 10.1016/s0022-2836(02)01091-4.
176. Dynamic opening of DNA during the enzymatic search for a damaged base / C. Cao, Y. L. Jiang, J. T. Stivers, [et al.] // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2004. – Vol. 11. – P. 1230–1236. – DOI:10.1038/nsmb864.
177. Cheng, X. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping / X. Cheng, R. J. Roberts // Nucleic Acids Res. – 2001. – Vol. 29. – P. 3784–3795. – DOI:10.1093/nar/29.18.3784.
178. Grinevich, A. A. Motion of DNA open states influenced by random force / A. A. Grinevich, A. A. Ryasik, L. V. Yakushevich // Computer Research and Modeling. – 2015. – Vol. 7. – № 6. – P. 1295–1307. – DOI: 10.20537/2076-7633-2015-7-6-1295-1307.
179. Kantorovitz, M. R. Computing DNA duplex instability profiles efficiently with a two-state model: trends of promoters and binding sites / M. R.

Kantorovitz, Z. Rapti, V. Gelev, [et al.] // BMC Bioinformatics. – 2010. – Vol. 11. – P. 604. – DOI: 10.1186/1471-2105-11-604.

180. Metzler, R. Single DNA denaturation and bubble dynamics/ R. Metzler, T. Ambjornsson, A. Hanke [et al.] // J. Phys. Condens. Matter. – 2009. – Vol. 21. – № 034111. – P. 14. – DOI:10.1088/0953-8984/21/3/034111.

181. van Erp, T. S. Bubbles and denaturation in DNA / T. S. van Erp, S. Cuesta-López., M. Peyrard // Eur. Phys. J. E. – 2006. – Vol. 20. – P. 421–434. – DOI:10.1140/epje/i2006-10032-2.

182. Yakushevich, L. V. Ensemble of DNA Kinks / L. V. Yakushevich, L. A. Krasnobaeva // EPJ Web of Conferences. – 2019. – Vol. 224. – P. 03005. – DOI: 10.1051/epjconf/201922403005.

183. Shin, D. S. DNA repair without flipping out / D. S. Shin, J. A. Tainer // Nature. – 2015. – Vol. 527. – P.168–169. – DOI:10.1038/nature15646.

184. Priyakumar, U. D. Computational approaches for investigating base flipping in oligonucleotides / U. D. Priyakumar, A. D. MacKerell // Chem Rev. – 2006. – Vol. 106. – № 2. – P. 489–505. – DOI: 10.1021/cr040475z.

185. Dow, B.J. Defining the role of nucleotide flipping in enzyme specificity using <sup>19</sup>F NMR / B. J. Dow, S. S. Malik, A. C. Drohat // J. Am. Chem. Soc. – 2019. – Vol. 141. – № 12. – P. 4952–4962. – DOI:10.1021/jacs.9b00146.

186. Hong, S. DNA base flipping: a general mechanism for writing, reading, and erasing DNA modifications / S. Hong, X. Cheng // Adv Exp Med Biol. – 2016. – Vol. 945. – P. 321–341. – DOI: 10.1007/978-3-319-43624-1\_14.

187. Grosjean H. DNA and RNA modification enzymes: structure, mechanism, function and evolution / H. Grosjean // CRC Press. – 2018. – P. 682.

188. Non-random DNA fragmentation in next-generation sequencing / M. S. Poptsova, I. A. Il'icheva, D. Y. Nechipurenko [et al.] // Scientific Reports. – 2014. – Vol. 4. – P. 4532. – DOI: 10.1038/srep04532.

189. Enhanced anti-HCV activity of interferon alpha 17 subtype / A. Dubois, C. Francois, V. Descamps [et al.] // Virology. – 2009. – Vol. 6. – P. 70. – DOI: 10.1186/1743-422X-6-70.

190. GenBank: Homo sapiens interferon alpha 17 (IFNA17), mRNA. Available online: URL [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_021268.2](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_021268.2) (accessed on 29 March 2020)

191. Localization of denaturation bubbles in random DNA sequences / T. Hwa, E. Marinari, K. Sneppen, [et al.] // PNAS. – 2003. – Vol. 100. – № 8. – P. 4411–4416. – DOI: 10.1073/pnas.0736291100.

192. Brovarets, O. O. Surprising Conformers of the Biologically Important A·T DNA Base Pairs: QM/QTAIM Proofs / O. O. Brovarets, K. S. Tsiupa, D. M. Hovorun // Front. Chem. – 2018. – DOI: 10.3389/fchem.2018.00008.

193. Inequality in the frequency of the open states occurrence depends on single 2H/1H replacement in DNA / A. Basov, M. Drobotenko, A. Svidlov [et al.] // Molecules. – 2020. – Vol. 25. – Is. 16. – P. 3753. – DOI: 10.3390/molecules25163753.

194. Влияние единичных замен протия на дейтерий в молекуле ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ на возникновение открытых состояний / С. С. Джимак, А. А. Свидлов, А. А. Басов [и др.] // Биофизика. – 2018. – Т. 63. – № 4. – С. 643–647.

195. Mathematical Modeling of Open State in DNA Molecule Depending on the Deuterium Concentration in the Surrounding Liquid Media at Different Values of Hydrogen Bond Disruption Energy / S. S. Dzhimak, M. I. Drobotenko, A. A. Basov [et al.] // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2018. – Vol. 483. – P. 359–362. – DOI: 10.1134/S1607672918060169.

196. The reversible effect of deuteration on tissue fluid and biopolymers in normal and tumor tissues of mice / A. V. Kosenkov, M. V. Gulyaev, V. I. Lobyshev [et al.] // Biophysics. – 2018. – Vol. 63. – № 5. – P. 820–824.

197. Функциональная активность митохондрий в водной среде с уменьшенным содержанием дейтерия / Н.В. Лобышева, С.В. Нестеров, Ю.А. Скоробогатова, [и др.] // Биофизика. – 2020. – Т. 65. – № 2. – С. 315–319.



198. Dependence of Biocatalysis on D/H Ratio: Possible Fundamental Differences for High-Level Biological Taxons / I. Zlatkiy, T. Pleteneva, A. Skripnikov [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – P. 4173.

199. Изменение функциональной активности пероксидазы хрена и бычьего сывороточного альбумина в средах с различным изотопным  $2\text{H}/1\text{H}$  составом / С. В. Козин, А. А. Кравцов, К. К. Туроверов [и др.] // *Биофизика*. – 2020. – Т. 65. – № 2. – С. 229–236.

200. Time-dependent effect of deuterium depletion on tumor growth and metastasis / N. V. Yaglova, S. S. Obernikhin, V. V. Yaglov [et al.] // *Russian Open Medical Journal*. – 2020. – Vol. 9. – № 2. – P. e0210.

201. Changes in prooxidant-antioxidant system indices in the blood and brain of rats with modelled acute hypoxia which consumed a deuterium-depleted drinking diet / A. A. Basov, S. V. Kozin, I. M. Bikov [et al.] // *Biology Bulletin*. – 2019. – Vol. 46. – №. 6. – P. 531–535. – DOI: 10.1134/S1062359019060049.

202. Gorokhova, E. Shifts in rotifer life history in response to stable isotope enrichment: testing theories of isotope effects on organismal growth / E. Gorokhova // *Roy. Soc. Open Sci*. – 2017. – Vol. 4. – P. 160810.

203. Multiple increase in productivity of the yeast at reducing the fraction of  $\text{D}_2\text{O}$  in water / S. M. Pershin, E. Sh. Ismailov, M. M. Dibirova [et al.] // *Dokl. Biochem. Biophys*. – 2017. – V. 476. – P. 299–302.

204. Влияние питьевого рациона с пониженным содержанием дейтерия на показатели эстрального цикла и адаптационные возможности организма у крыс-самок в предстарческом возрасте / А. И. Шихлярова, Г. В. Жукова, О. И. Кит [et al.] // *Мед. вестн. Сев. Кавказа*. – 2018. – Т. 13. – № 1. – С. 85–90.

205. Natality and mortality with reduced RED-OX potential drinking water / P. D. Kolesnichenko, K. M. Reznikov, O. A. Efremova, [et al.] // *J. Intern. Pharmaceut. Res*. – 2018. – V. 45. – P. 450–453.

206. Research regarding the effect of deuterium depleted water from diluent on sows'fecundity / G. Nacu, P. C. Boisteanu, L. M. Pop [et al.] // *Sci. Papers-series d-animal Sci*. – 2018. – Vol. 61. – № 1. – P. 149–153.

207. Изучение влияния воды с модифицированным изотопным (D/H) составом на репродуктивную функцию, формирование и развитие потомства крыс / И. М. Чернуха, Л. В. Федулова, Е. А. Котенкова, [и др.] // *Вопр. питания.* – 2016. – № 5. – С. 36–43.
208. Letuta, U. G. Magnetic-dependent ATP pool in *Escherichia coli*. / U. G. Letuta // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2017. – V. 474. – P. 196–199.
209. Isotopic effects of low concentration of deuterium in water on biological systems / A. A. Kirkina, V. I. Lobyshev, O. D. Lopina [et al.] // *Biophysics.* – 2014. – Vol. 59. – № 2. – P. 326–333.
210. Xie, X. Effects of Low-Level Deuterium Enrichment on Bacterial Growth / X. Xie, R. A. Zubarev // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol. 9. – № 7. – P. e102071.
211. O'Brien, D. M. Stable isotope ratios as biomarkers of diet for health research / D. M. O'Brien // *Annual Review of Nutrition.* – 2015. – Vol. 35. – № 1. – P. 565–594.
212. Lobyshev, V. I. Biphasic response of biological objects on variation of low deuterium concentration in water / V. I. Lobyshev // *Intern. J. High Dilution Res.* – 2018. – V. 17. – № 2. – P. 12–13.
213. Аунг, Т. М. Эффективность разделения изотопов водорода ректификацией воды в колоннах с пленочным и затопленным режимами работы насадки / Т. М. Аунг, И. Л. Селиваненко // *Хим. пром-сть сегодня.* – 2017. – № 2. – С. 3–10.
214. Система водоснабжения с получением легкой воды на базе ядерного опреснительного комплекса / Р. А. Александров, Н. И. Лагунцов, И. М. Курчатова [и др.] // *Атом. энергия.* – 2018. – Т. 124. – № 6. – С. 336–339.
215. Способы получения воды с пониженным содержанием дейтерия / М. Г. Барышев, С. Н. Болотин, В. Ю. Фролов, [и др.] // *Экол. вест. науч. центров Черноморск. эконом. сотрудничества.* – 2013. – № 1. – С. 13–17.
216. Hydrogen Permeability of a Foil of Pd–Ag Alloy Modified with a Nanoporous Palladium Coating / I. S. Petriev, S. N. Bolotin, V. Y. Frolov [et al.] // *Bull. Russ. Acad. Sci: Phys.* – 2018. – Vol. 82. – № 7. – P. 807–810.

217. Kinetic Characteristics of Hydrogen Transfer Through Palladium-Modified Membrane / I. S. Petriev, V. Y. Frolov, S. N. Bolotin [et al.] // Russ. Phys. J. – 2018. – Vol. 60. – № 9. – P. 1611–1617.

218. Belo, I. Fed-Batch Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* in a hyperbaric bioreactor / I. Belo, R. Pinheiro, M. Mota // Biotech. Prog. – 2003. – Vol. 19. – № 2. – P. 665–671.

219. Application of NMR spectroscopy to the determination of low concentrations of nonradioactive isotopes in liquid media / S. S. Dzhimak, A. A. Basov, G. F. Kopytov [et al.] // Russ. Phys. J. – 2015. – Vol. 58. – №. 7. – P. 923–929.

220. A stable isotope biomarker of marine food intake captures associations between n-3 fatty acid intake and chronic disease risk in a Yup'ik study population, and detects new associations with blood pressure and adiponectin / D. M. O'Brien, A. R. Kristal, S. H. Nash [et al.] // J. Nutrition. – 2014. – V. 144. – № 5. – P. 706–713.

221. Перт, С. Д. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С. Д. Перт // Мир, Москва. – 1978. – 330 с.

222. The influence of diet and water on the stable oxygen and hydrogen isotope composition of Chironomidae (Diptera) with paleoecological implications / Y. V. Wang, D. M. O'Brien, J. Jenson [et al.] // Oecologia. – 2009. – Vol. 160. – № 2. – P. 225–233.

223. Gorokhova, E. Individual growth as a non-dietary determinant of the isotopic niche metrics / E. Gorokhova // Meth. Ecol. Evol. – 2018. – Vol. 9. – № 2. – P. 269–277.

224. Stable water isotopic composition of the Antarctic Subglacial Lake Vostok: implications for understanding the lake's hydrology / A. A. Ekaykin, V. Y. Lipenkov, A. V. Kozache [et al.] // Isotop. Envir. Health Stud. – 2016. – Vol. 52. – P. 468–476.