

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЮЖНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи



Джимак Степан Сергеевич

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ ДИНАМИКИ СОСТОЯНИЙ ГРУППЫ
ГЕТЕРОГЕННЫХ КОНДЕНСИРОВАННЫХ ВЕЩЕСТВ ПРИ
МОДИФИКАЦИИ ИЗОТОПНОГО СОСТАВА СРЕДЫ И ВНЕШНЕМ
МЕХАНИЧЕСКОМ ВОЗДЕЙСТВИИ**

Специальность 1.3.8 – Физика конденсированного состояния

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Научный консультант
д.б.н., канд. физ.-мат. наук,
профессор М.Г. Барышев,
профессор РАН

Краснодар 2022

Содержание

Введение	4
Глава 1 Основные теории механического моделирования гетерогенных систем и влияния изотопного состава среды на их физические параметры..	11
1.1 Обзор физико-математических моделей, позволяющих прогнозировать изменения физических свойств органических веществ в зависимости от внешних и внутренних условий их нахождения.....	11
1.2 Анализ физических эффектов, возникающих в гетерогенных системах при модификации изотопного состава жидких сред	26
1.3 Выводы к главе 1.....	32
Глава 2 Физико-математическое моделирование и исследование процессов влияния внешних воздействий на природу изменений физических свойств молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты.	34
2.1 Создание новой физико-математической модели органической молекулы, состоящей из двух цепочек упорядоченных ансамблей взаимодействующих маятников.....	34
2.2 Исследование закономерностей, возникающих при моделировании влияния вязкости внешней среды на диссипацию энергии колебательных движений азотистых оснований молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты.....	49
2.3 Теоретическое исследование влияния внешнего торсионного момента на динамику молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты, с учетом известных экспериментальных данных	61
2.4 Теоретическое исследование влияния ВЧ и СВЧ воздействия на природу изменений собственной частоты колебаний молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты.....	79
2.5 Выводы к главе 2.....	91
Глава 3 Физико-математическое моделирование и исследование закономерностей влияния изотопного $^2\text{H}/^1\text{H}$ состава среды на энергию разрыва водородных связей в двухцепочечной молекуле.....	95

3.1 Моделирование возникновения разрывов водородных связей в органической молекуле в зависимости от концентрации дейтерия в окружающей жидкой среде.....	95
3.2 Теоретическое исследование влияния единичных замен протия на дейтерий в водородных связях органической молекулы на изменение ее механических параметров.....	109
3.3 Исследование закономерностей влияния концентрации дейтерия на возникновение областей с разорванными водородными связями в органической молекуле	118
3.4 Выводы к главе 3.....	127
Глава 4 Физико-математические основы новой теории, объясняющей процессы изменения энергии химической связи между парами атомов стабильных изотопов.....	130
4.1 Исследование закономерностей неравновесного распределения стабильных изотопов в гетерогенных системах и изменения физических свойств конденсированных веществ.....	130
4.2 Исследование механизмов, обеспечивающих изменение энергии химической связи между парами атомов стабильных изотопов, содержащих азот.	138
4.3 Выводы к главе 4.....	153
Глава 5 Практическое применение методов модификации изотопного состава жидких сред.....	155
5.1 Способ и методики для определения концентрации ^2H , ^{17}O и ^{13}C в жидких средах на импульсном ЯМР-спектрометре.....	155
5.2 Исследование и разработка электрохимического способа снижения концентрации дейтерия в жидких средах, создание экспериментальной установки.....	179
5.3 Разработка методов воздействия изотопного состава среды на показатели гетерогенных систем.....	189
5.4 Выводы к главе 5.....	204
Основные результаты и выводы.....	216
Список литературы.....	219

Введение

Исследование влияния внешних факторов на гетерогенные системы, таких как периодическое силовое воздействие, вязкость и изотопный состав среды является крайне актуальным направлением в науке. Наиболее ярким примером таких гетерогенных систем является молекула дизооксирибонуклеиновой кислоты, представляющая собой сложную динамическую структуру, основной задачей которой является хранение и передача генетической информации, записанной с помощью последовательности нуклеотидов в двойной спирали. Требование сохранности генетического кода должно быть удовлетворено при любых пространственных конфигурациях молекулы. В естественном состоянии она всегда содержит некоторое количество областей с разорванными водородными связями, которые наблюдаются либо между единичной парой комплементарных азотистых оснований (называемых также открытыми состояниями), либо между множеством нуклеотидов, формирующих пузыри денатурации [1]. Описанные явления возникают в результате механических деформаций молекулы, обусловленных ее динамикой [2].

Открытые состояния при увеличении количества разрывов могут переходить в пузырьки денатурации [3], а также вызывать изменение конформации молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты. Кроме того, наличие пузырей может способствовать возникновению изотопного обмена (в частности дейтерий-протиевого ($^2\text{H}/^1\text{H}$) обмена) в дуплексе, что в нативных условиях может приводить к общей нестабильности молекулярной структуры дизооксирибонуклеиновой кислоты и к снижению ее резистентности к внешним повреждающим факторам вследствие большей конформационной доступности азотистых оснований [4].

Известно, что модификация изотопного состава гетерогенных систем является поводом для возникновения термодинамических, кинетических и туннельных изотопных эффектов, которые сопровождаются замедлением или ускорением физико-химических процессов.

Механические модели играют важную роль для теоретического исследования внутренней подвижности молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты. В этом случае азотистые основания представляют в виде маятников, а взаимодействия между основаниями описывают с помощью замены водородных связей на упругие связи. Такой подход был предложен в работе [5].

Результаты исследований на базе механических моделей динамики молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты перспективны для использования в молекулярных нанотехнологиях, в том числе молекулярной электронике за счет создания теоретической основы расчета резонансной частоты ее колебаний.

В данном диссертационном исследовании получены следующие основные результаты: разработана физико-математическая модель, использующая 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; установлено, что присутствие атома дейтерия в последовательности нуклеотидов за счет изменения энергии водородных связей между парами азотистых оснований, может приводить – как к увеличению, так и уменьшению вероятности возникновения областей денатурации различной длины; обоснован механизм изменения энергии химической связи пары стабильных изотопов при наличии нечетного числа нескомпенсированных нейтронов.

Таким образом, актуальность результатов, представленных в работе, обусловлена необходимостью разработки основ новой теории, объясняющей изменение энергии химической связи между парами стабильных изотопов, и методов прогнозирования механических движений дезоксирибонуклеиновой кислоты при изменении вязкости внешней среды, частоты внешнего механического воздействия и изотопного состава среды.

Цель диссертационной работы – провести комплекс теоретических и экспериментальных исследований, выявить закономерности динамики механических движений двухцепочечной молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты при модификации изотопного состава среды и внешнем механическом воздействии.

В ходе выполнения работы необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать физико-математическую модель молекулярной динамики дезоксирибонуклеиновой кислоты с учетом энергии разрыва водородных связей и возможностью возникновения деформированных водородных связей между парами комплементарных маятников.

2. Исследовать физические свойства, проявляющиеся при периодическом внешнем воздействии на молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты, представленную двумя цепочками упорядоченных ансамблей взаимодействующих маятников.

3. Разработать основы новой феноменологической теории, объясняющей физические механизмы, обуславливающие изменение энергии химической связи при наличии нескомпенсированного нейтрона в парах стабильных изотопов.

4. Провести численные эксперименты по исследованию эффектов, вызванных изменением вязкости среды и внешним торсионным воздействием на физические параметры органической молекулы, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников.

5. Создать программный комплекс для расчета влияния изотопного $^2\text{H}/^1\text{H}$ соотношения на вероятность возникновения разрывов водородных связей между парами комплементарных маятников двухцепочечной молекулы.

6. Экспериментально исследовать эффекты, вызванные модификацией изотопного состава среды в гетерогенных системах.

7. Теоретически исследовать параметры процесса и разработать научно-технологические основы модификации изотопного ($^2\text{H}/^1\text{H}$) состава неорганических жидкостей.

8. Разработать экспресс методики определения концентрации стабильных изотопов в жидких средах на основе спектроскопии ядерного магнитного резонанса.

Научная новизна диссертационной работы определяется основными результатами, приведенными ниже:

1. Впервые 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 может приводить – в зависимости от значения энергии разрыва водородной связи – как к увеличению, так и уменьшению вероятности возникновения открытых состояний.

2. Впервые обнаружена следующая закономерность – изотопные эффекты в органических системах могут возникать в случаях образования химических связей между стабильными изотопами при суммарном количестве нейтронов больше, чем протонов на нечетное число, т.е. при наличии в системе нечетного числа нескомпенсированных нейтронов.

3. Впервые показано, что вероятность образования пузырьков денатурации определенной длины зависит от локализации атома дейтерия в молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты и может существенно отличаться от вероятности возникновения открытых состояний в целом.

4. Продемонстрирована зависимость частоты и амплитуды собственных колебаний молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты как от специфичной последовательности нуклеотидов (на примере гомологичных участков каждого типа азотистых оснований), так и от различной длины гомологичных последовательностей.

5. Разработаны научно-технологические основы модификации изотопного ($^2\text{H}/^1\text{H}$) состава неорганических жидкостей, создана промышленная установка для производства обедненной дейтерием воды на основе физико-химического способа разделения изотопов водорода;

6. Разработан новый метод количественного определения концентрации ^2H с помощью ЯМР спектроскопии и применением лантаноидного сдвигающего реагента, добавляемого в зонд в качестве внешнего ЯМР стандарта, относительно которого проводится измерение.

Положения, выносимые на защиту:

1. Физико-математическая модель, использующая аналогию между молекулой дезоксирибонуклеиновой кислоты и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников, позволяющая учитывать механические внешние воздействия, вязкость и изотопный состав среды.

2. В рамках апробированной физико-математической модели возможно появление открытых состояний между парами азотистых оснований и восстановление их закрытой структуры. При наличии единичных $^2\text{H}/^1\text{H}$ замен в водородных связях, в нормальных условиях, энергии разрыва связей $E_{\text{кр}}^{\text{H}}$ в диапазоне от $0,2 \cdot 10^{-22}$ Н·м до $0,32 \cdot 10^{-22}$ Н·м вероятность разрыва связи между комплементарными азотистыми основаниями увеличивается на 0,22-0,60%.

3. Частота и амплитуда собственных колебаний органической молекулы, состоящей из двух цепочек упорядоченных ансамблей взаимодействующих маятников, при внешних периодических воздействиях с частотой в диапазоне от $0,4 \cdot 10^6$ с⁻¹ до $0,4 \cdot 10^{12}$ с⁻¹, зависит от специфичной последовательности маятников.

4. В рамках разработанной физико-математической модели установлена следующая закономерность – при увеличении коэффициентов уравнений, характеризующих вязкость среды в 4 раза, происходит стабилизация угловых колебаний ансамблей взаимодействующих маятников в диапазоне времени $[0; 0,5 \cdot 10^{-9}$ с], а уменьшение этих же коэффициентов уравнений в 10 раз приводит к увеличению скорости угловых отклонений маятников и деформации цепочек молекулы в диапазоне времени $[0; 6 \cdot 10^{-9}$ с].

5. Возникновение областей различной длины с деформированными водородными связями между парами азотистых оснований двухцепочечной молекулы зависит от локализации, времени воздействия и величины внешнего торсионного момента, лежащего в диапазоне от 13 до 21 пН·нм. Результаты моделирования показали, что значения торсионного момента, необходимого для возникновения зон открытых состояний в некоторых случаях близки к экспериментально измеренным (11 ± 4 пН·нм).

6. Комплекс программных средств для расчета частоты (в диапазоне от $0,4 \cdot 10^6$ с⁻¹ до $0,4 \cdot 10^{12}$ с⁻¹) вращательных движений азотистых оснований и амплитуды угловых отклонений (от 0 до π), вероятности возникновения пузырьков денатурации, нелинейных возбуждений в молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты с учетом $^2\text{H}/^1\text{H}$ -обмена, влияния $^2\text{H}/^1\text{H}$ соотношения в среде на энергию связей между парами азотистых оснований.

7. Снижение относительно природного уровня ($\delta\text{D} = -37$ ‰) содержания дейтерия в среде для инкубации микроорганизмов до $\delta\text{D} = -371$ и $\delta\text{D} = -544$ ‰, приводит к увеличению функциональной активности гетерогенных систем, что сопровождается увеличением выхода клеточной биомассы *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д на 1,5 мг/л и 2 мг/л соответственно.

Практическая значимость работы:

Разработана физико-математическая модель, позволяющая производить расчеты влияния различных концентраций дейтерия в окружающей молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты среде на возникновение разрывов водородных связей между парами азотистых оснований.

Описанная модель позволяет изучать молекулярную динамику дезоксирибонуклеиновой кислоты при различных показателях реологического поведения нуклеоплазмы, что необходимо для более глубокого понимания процессов неравновесной физики активного вещества в гетерогенных системах. Установлено, что под влиянием внешней периодической силы молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты может совершать колебательные движения с характерной для этой молекулы специфической («собственной») частотой, которая отличается от частоты внешнего воздействия. Показано, что одиночный $^2\text{H}/^1\text{H}$ обмен даже вне кодирующей области гена, вероятно, может влиять на скорость транскрипции, изменяя динамику двухцепочечной молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты из-за уменьшения количества открытых состояний в других частях гена.

Создана высокоэффективная промышленная установка для снижения концентрации дейтерия в неорганических жидкостях. Разработан новый метод определения концентрации дейтерия в жидких средах с помощью ЯМР спектроскопии.

Разработан ряд программных продуктов для реализации вычислительных аспектов при использовании разработанных биомеханических моделей (свидетельства о государственной регистрации программ для ЭВМ №2017660682, 2018662244, 2019667043, 2021617416).

Результаты работы включены в программу дисциплины «Экология стабильных изотопов» магистерской подготовки по направлению 03.04.03 «Радиофизика (радиофизические методы по областям применения (экология))».

Личный вклад автора

Вклад автора в формулировку проблемы, в постановку задач исследований и интерпретации результатов является определяющим. Сформулирована математическая модель, описывающая влияние концентрации дейтерия в окружающей жидкой среде на возникновение открытых состояний между азотистыми основаниями двухцепочечной молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты. 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. Автором разработана установка для снижения концентрации

дейтерия в неорганических жидкостях. Разработана методика определения концентрации дейтерия в жидких средах с помощью ЯМР спектроскопии, основанная на применении лантаноидного сдвигающего реагента, добавляемого в зонд в качестве внешнего ЯМР стандарта, относительно которого проводится измерение.

Апробация работы

Основные результаты диссертации были доложены автором лично на следующих международных конференциях и семинарах: International Symposium and Summer School Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter (St. Petersburg, РФ, 2010); Всероссийская научная школа-семинар «Физика и применение микроволн» Волны-2011 (Москва, РФ, 2011); International Symposium and Summer School Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter (St. Petersburg, РФ, 2011); VI Международный Конгресс «Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине» (Санкт-Петербург, РФ, 2012); Международная конференция «Структура воды: физические и биологические аспекты» (Санкт-Петербург, РФ, 2013); XXI Международная конференция «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта-Гурзуф, Украина, 2013); Всероссийская школа-семинар «Физика и применение микроволн» (Москва, РФ, 2013); 11th meeting Nuclear Magnetic Resonance in Condensed Matter (Saint Petersburg, РФ, 2014); Международный форум «Крым Hi-Tech – 2014» (Севастополь, РФ, 2014); Ninth Annual Conference on the Physics, Chemistry and Biology of Water (Pamporovo, Bulgaria, 2014); The 3rd International Congress on Deuterium Depletion (Budapest, Hungary, 2015); VII Международный конгресс "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине" (Санкт-Петербург, РФ, 2015); V Съезд биофизиков России (Ростов-на-Дону, РФ 2015); International Conference of Society for Endocrinology BES (Edinburgh, UK, 2015); XXIV Международная конференция «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта-Гурзуф, РФ, 2016); VIII Международный конгресс "Слабые и сверхслабые поля и излучения в биологии и медицине" (Ростов-на-Дону, РФ 2018); The 4rd International Congress on Deuterium Depletion (Hungary, Budapest, 2019); VI Съезд биофизиков России (РФ, Сочи, 2019); XIV Международный биотехнологический форум-выставка «РОСБИОТЕХ-2020» (РФ, Москва 2020); 3-я всероссийская конференция «Физика водных растворов» (РФ, Москва 2020); 16th Bioinformatics and Computational Biology Conference (Salerno, Italy 2021); 4-я всероссийская конференция «Физика водных растворов» (РФ, Москва 2021).

Публикации

Автором по теме диссертации опубликовано 55 работ, в том числе 21 статья в рецензируемых российских и международных изданиях из списка ВАК и библиографических баз Scopus и Web of Science, 3 патента РФ, зарегистрированы 4 государственных свидетельства на программы ЭВМ.

Результаты доложены и обсуждены на 21 всероссийской и международной конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертация содержит Введение, 5 глав, Выводы и Список цитируемой литературы (311 ссылок). Материал изложен на 263 страницах и сопровождается 70 рисунками и 15 таблицами.

1 Основные теории механического моделирования гетерогенных систем и влияния изотопного состава среды на их физические параметры

1.1 Обзор физико-математических моделей, позволяющих прогнозировать изменения физических свойств органических веществ в зависимости от внешних и внутренних условий их нахождения

Исследование различных сложных динамических биологических систем сейчас является достаточно актуальным направлением в физике и биологии, в частности, исследование дизоксирибонуклеиновой кислоты, поскольку сама молекула состоит из колеблющихся между собой структурных элементов: сахаро-фосфатных оснований. Основным интересом представляют вращательные колебания, ответственные за появление открытых состояний – разрывов водородных связей между парами оснований. Размер открытых оснований может колебаться от одного до нескольких пар оснований, такое явление принято называть «дыханием» дизоксирибонуклеиновой кислоты.

Остановимся подробнее на структуре дизоксирибонуклеиновой кислоты, составными частями каждого нуклеотида являются сахар, фосфат и основание. Рассмотрим взаимодействие между двумя соседними нуклеотидами из одной цепи, эти связи являются сильными ковалентными связями, и они моделируются гармоническими потенциалами. Между нуклеотидами, которые принадлежат к разным цепям существуют слабые водородные связи. Существование сильной силы означает, что смещения вдоль направления этой силы очень малы. Следовательно, мы можем предположить, что силы притяжения и отталкивания почти равны, и соответствующая потенциальная энергия, или сокращенно потенциал, должна моделироваться симметричной функцией. Типичным примером является хорошо известная функция $f(x) = kx^2/2$. Такой потенциал называется гармоническим. Его первая производная представляет силу, которая, очевидно, является линейной функцией. С другой стороны, если эти силы

слабы, то соответствующие смещения, т.е. значения x , велики, а силы отталкивания и притяжения больше не равны. Для моделирования таких потенциалов нам нужны несимметричные функции. Распространенным примером является функция $F(x) = D(e^{-ax} - 1)^2$, называемая потенциалом Морзе. Этот потенциал не является гармоническим, и соответствующая сила не является линейной функцией. Модели, включающие по крайней мере одно ангармоническое взаимодействие, называются нелинейными. Следовательно, слабые взаимодействия являются источниками нелинейных членов и, следовательно, такие системы являются нелинейными. Поскольку эти слабые силы являются общими для биологических систем, фокусируемся только на нелинейных моделях.

Важное предположение впервые в 1980 г. сделали Ингландер и соавторы [6]: нелинейные эффекты могут играть важную роль в динамике дизоксирибонуклеиновой кислоты. Принципиальная возможность образования открытых состояний в дизоксирибонуклеиновой кислоты была показана методом водородно-третиевого обмена. Согласно модели, дизоксирибонуклеиновой кислоты может быть представлена в виде двух линейных цепочек маятников (сахаро-фосфатные основания), соединенных пружинами (взаимодействия между основаниями) как показано на рисунке 1.1.

Полная энергия описанной системы в зависимости от углов поворота θ_n задается следующим гамильтонианом (1.1):

$$H = \sum \left[\frac{mh^2}{2} \left(\frac{d\theta_n}{dt} \right)^2 + \frac{S}{2} (\theta_n - \theta_{n-1})^2 + mgh(1 - \cos \theta_n) \right] \quad (1.1)$$

где

$d\theta_n$ – угол поворота n -го маятника,

S – коэффициент крутильной жесткости маятника,

m, h – масса и длина маятников,

g – гравитационная постоянная.

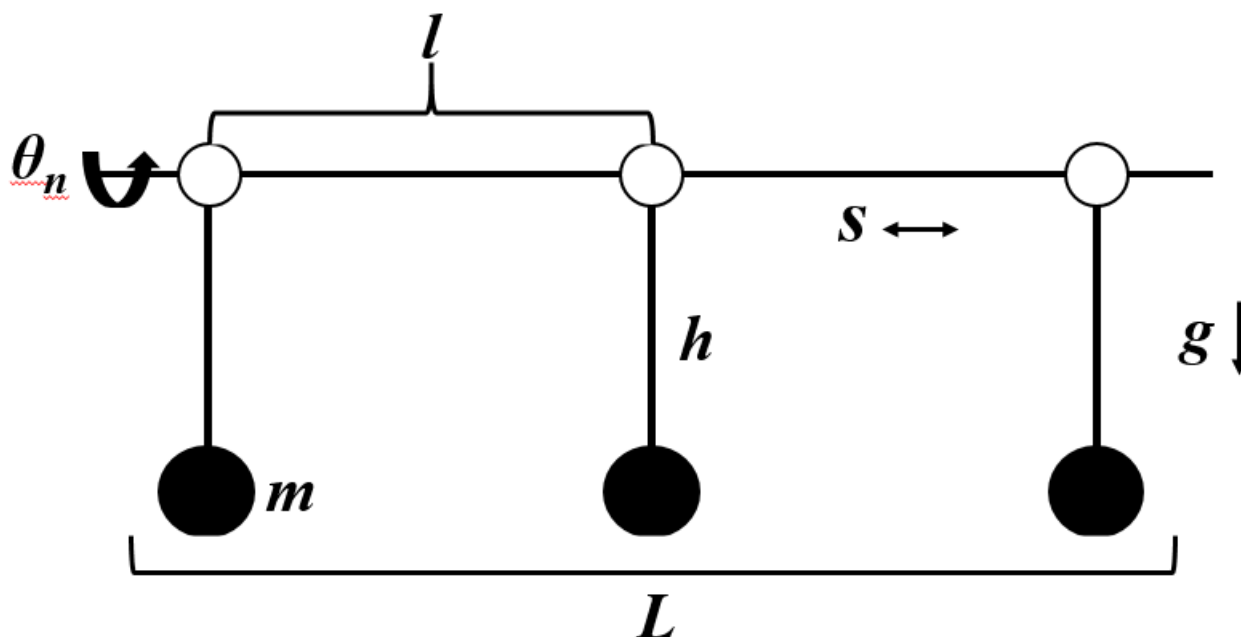


Рисунок 1.1 – Механический аналог двойной спирали, представляющий собой линейные цепочки маятников (оснований), соединенных пружинами (сахаро-фосфатными стержнями)

Поэтому дифференциальное уравнение движения n -го маятника имеет следующий вид (1.2):

$$mh^2 \frac{d^2\theta_n}{dt^2} = S(\theta_n - 2\theta + \theta_{n-1}) + mgh \sin \theta_n, \quad (1.2)$$

Решением уравнения (1.2) является выражение:

$$\theta_n = 4 \arctan \left[\exp\left(\frac{2nl}{L}\right) \right], \quad L = 2l \sqrt{\frac{S}{mgh}}, \quad (1.3)$$

где

l – расстояние между двумя соседними маятниками. Функция $\theta_n \equiv \theta(n)$

является солитоном излома.

Данное решение интерпретируем как движение открытого состояния вдоль цепочки дизооксирибонуклеиновой кислоты. Если жесткость $S \gg mgh$, то ширина солитона равна множеству постоянных решетки. Проворачивание только одного из маятников через 2π в пределах одной постоянной решетки потребовало бы значительной энергии пружины; таким образом, солитон распространяется на толщину L . Для большей толщины затраты потенциальной энергии слишком велики, что приводит к сохранению солитона неповрежденным.

Модель, разработанная Ингландером и соавторами, была улучшена сначала Йомосой [7, 8], а затем уже усовершенствована Хоммой и Такено [9], рассмотрев дискретную модель плоских ротаторов, они показали, что помимо солитонов, которые описывают повороты оснований, существуют достаточно большие отклонения углов поворота между соседними парами оснований. Из этого замечания Хоммой и Такено был сделан вывод об обязательном учете дискретных эффектов при изучении динамики дизооксирибонуклеиновой кислоты.

Биомеханический подход также в своих работах использовала Л.В. Якушевич. Ей в 1989 году было предложено одно из лучших теоретических моделей дизооксирибонуклеиновой кислоты, которые рассматривают открытое состояние как результат вращения пар оснований [10]. Согласно данной модели, дизооксирибонуклеиновой кислоты представляет собой две цепочки дисков, которые связаны между собой продольными и поперечными пружинками. Основания дизооксирибонуклеиновой кислоты – диски, взаимодействие между основаниями – пружинки. Эта модель учитывает водородные связи между парами оснований, а также стэкинг между соседними парами оснований, недостаток данной модели состоит в том, что не учитываются колебания оснований в крайних парах (Рис. 1.2).

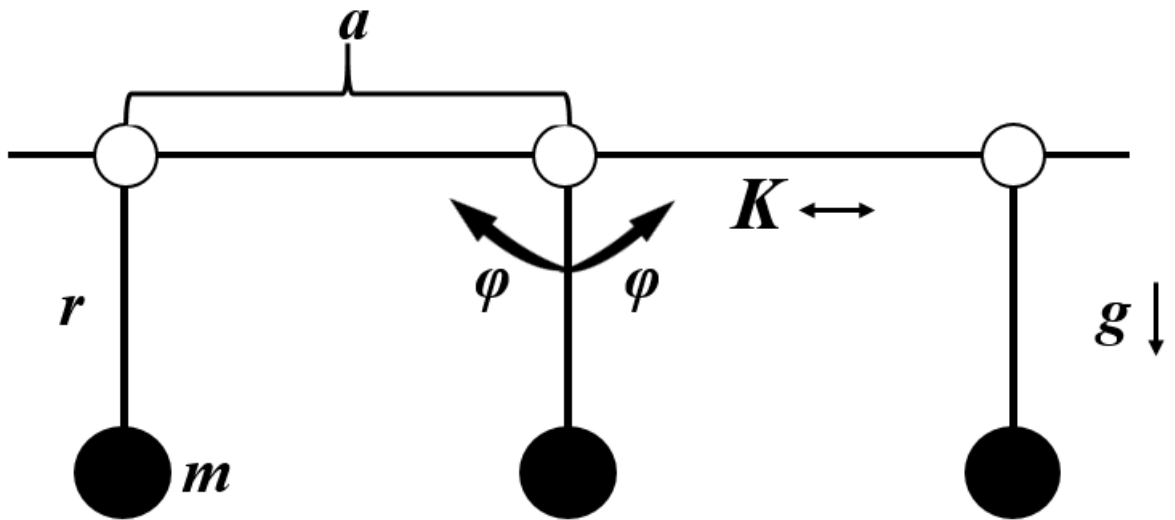


Рисунок 1.2 – Модель Л.В. Якушевич

В своей работе Л.В. Якушевич рассматривала фрагмент молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты, состоящий из трех пар оснований и полагала, что происходит только колебание центральной n -ой пары оснований, а пары оснований по краям ($(n-1)$ -ое и $(n+1)$ -ое) зафиксированы, причем колебание происходит только в горизонтальной плоскости. Функция Лагранжа такой системы имеет вид:

$$L_{single\ pair} = \frac{1}{2} \left[I_1 \left(\frac{d\varphi_1}{dt} \right)^2 + I_2 \left(\frac{d\varphi_2}{dt} \right)^2 \right] - K_{1-2} [r_1(r_1 + r_2 + a)(1 - \cos \varphi_1) + r_2(r_1 + r_2 + a)(1 - \cos \varphi_2) - r_1 r_2 (1 - \cos(\varphi_1 + \varphi_2)) + \frac{a^2}{2}] \quad (1.4)$$

где

$\varphi_1(t)$ и $\varphi_2(t)$ – углы отклонения 1-го и 2-го маятников;

I_1 и I_2 – моменты инерции этих маятников;

K_{1-2} — жесткость горизонтальной пружины, соединяющей маятники;

r_1 и r_2 — длины маятников;

a – расстояние между массами маятников в положении равновесия ($\varphi_1 = \varphi_2$).

Уравнения, соответствующие данной функции, имеют следующий вид:

$$\begin{cases} I_1 \left(\frac{d\varphi_1}{dt} \right)^2 = -U_1 \sin \varphi_1 + U_{1-2} \sin(\varphi_1 + \varphi_2) - (S_1^{(-)} + S_1^{(+)}) \varphi_1 - \beta_1 \frac{d\varphi_1}{dt}, \\ I_2 \left(\frac{d\varphi_2}{dt} \right)^2 = -U_2 \sin \varphi_2 + U_{1-2} \sin(\varphi_1 + \varphi_2) - (S_2^{(-)} + S_2^{(+)}) \varphi_2 - \beta_2 \frac{d\varphi_2}{dt}. \end{cases} \quad (1.5)$$

где

β_1 и β_2 – коэффициенты диссипации.

При развитии данной модели, Якушевич Л.В. ввела дополнительные члены в уравнения и получила [1.5]:

$$\begin{aligned} & I_{1,n} \frac{d^2 \varphi_{1,n}(t)}{dt^2} - K'_{1,n} [\varphi_{n+1,1}(t) - 2\varphi_{n,1}(t) + \varphi_{n-1,1}(t)] \\ & - k_{1-2,n} R_{1,n} (R_{1,n} + R_{2,n}) \sin \varphi_{n,1} \\ & - k_{1-2,n} R_{1,n} R_{2,n} \sin(\varphi_{n,1} - \varphi_{n,2}) = -\beta_{1,n} \frac{d\varphi_{n,1}(t)}{dt} + F_0 \cos(\Omega t), \\ & I_{2,n} \frac{d^2 \varphi_{2,n}(t)}{dt^2} - K'_{2,n} [\varphi_{n+1,2}(t) - 2\varphi_{n,2}(t) + \varphi_{n-1,2}(t)] - k_{1-2,n} R_{2,n} (R_{1,n} + \\ & R_{2,n}) \sin \varphi_{n,2} - k_{1-2,n} R_{1,n} R_{2,n} \sin(\varphi_{n,2} - \varphi_{n,1}) = -\beta_{2,n} \frac{d\varphi_{n,2}(t)}{dt} + \\ & + F_0 \cos(\Omega t), \end{aligned} \quad (1.6)$$

где:

$\varphi_{i,n}(t)$ – угловое отклонение n -го азотистого основания i -й цепочки;

$I_{i,n}$ – момент инерции n -го азотистого основания i -ой цепочки;

$R_{i,n}$ – расстояние от центра масс n -го азотистого основания i -й цепочки до сахаро-фосфатной цепочки;

$K'_{i,n}$ – константа, характеризующая крутильную жесткость сахаро-фосфатной цепочки;

$k_{1-2,n}$ – константа, характеризующая взаимодействие между основаниями внутри пар;

F_0 и Ω – амплитуда и частота внешнего периодического поля соответственно;

n – номер основания в последовательностях S и S_k .

При их решении введен ряд упрощений и усреднений. В частности, были

усреднены коэффициенты $I_{1,n}, I_{2,n}, K'_{1,n}, K'_{2,n}, R_{1,n}, R_{2,n}, k_{1-2,n}$ методом концентраций. И были получены следующие уравнения:

$$\begin{aligned} \bar{I}_1 \frac{d^2 \varphi_{1,n}(t)}{dt^2} - \bar{K}'_1 [\varphi_{n+1,1}(t) - 2\varphi_{n,1}(t) + \varphi_{n-1,1}(t)] - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 (\bar{R}_1 + \bar{R}_2) \sin \varphi_{n,1} \\ - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_{n,1} - \varphi_{n,2}) = -\bar{\beta}_1 \frac{d\varphi_{n,1}(t)}{dt} + F_0 \cos(\Omega t), \\ \bar{I}_2 \frac{d^2 \varphi_{1,n}(t)}{dt^2} - \bar{K}'_2 [\varphi_{n+1,2}(t) - 2\varphi_{n,2}(t) + \varphi_{n-1,2}(t)] - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_{12} (\bar{R}_1 + \\ \bar{R}_2) \sin \varphi_{n,2} - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_{n,2} - \varphi_{n,1}) = -\bar{\beta}_2 \frac{d\varphi_{n,2}(t)}{dt} + F_0 \cos(\Omega t), \quad (1.7) \end{aligned}$$

Как показано в нашей работе [11] усреднение коэффициентов уравнений приводит к уменьшению в 100 раз величины амплитуды угловых колебаний азотистых оснований.

Якушевич Л.В. получила аналитическое решение данной модели при усреднении коэффициентов уравнений. Было получено аналитическое решение в виде кинка:

$$\varphi_{1,\Omega}(t) = A_{1,\Omega} \cos(\Omega t + \varphi_{01}), \quad (1.8)$$

где

$$A_{1,\Omega} = \frac{f_{01}}{\sqrt{[(\omega_{01}^2 - \Omega^2)^2 + (\delta_{1,\Omega})^2]}} - \text{амплитуда},$$

$$\varphi_{01} = \arctan\left(-\frac{2\delta_{1,\Omega}}{(\omega_{01}^2 - \Omega^2)}\right) - \text{фаза}.$$

Однако, данное решение не учитывает спиральный характер структуры ДНК и взаимодействие угловых смещений азотистых оснований. Кроме того, решение типа кинк может быть получено только в случае однородной синтетической ДНК.

На основе модели Якушевич Л.В. было предложено учесть спиральную структуру дезоксирибонуклеиновой кислоты, добавляя в уравнение член, учитывающий торсионную связь между n-м диском на одной цепи и (n+h)-м диском на другой, где 2h – длина витка спирали в единицах основания [12, 13].

Введение в Гамильтониан члена, который отвечает за «геликоидальное» взаимодействие, с одной стороны, учитывает спирадную структуру, а с другой способно качественнее описать динамику молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты. В дальнейшем модель Якушевич претерпевала несколько изменений, в частности, стало учитываться влияние внешней среды за счет появлений коэффициентов диссипации. В работе [14] Якушевич, Савин и Маневича показали, что в рассматриваемой асимметричной модели двойной цепи дизооксирибонуклеиновой кислоты могут существовать три типа топологических солитонов, имитирующих локализованные состояния с открытыми парами оснований. Солитоны могут перемещаться вдоль макромолекулы с постоянной скоростью, меньшей скорости звука, а также они устойчивы по отношению к тепловым колебаниям.

Результаты численных расчетов показали, что данная модель солитонов может объяснять структуру молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты.

На основе модели Л.В. Якушевич появилось множество других, особенностью которых является использование торсионного момента для описания открытых состояний. Такие модели в последствии получили название Y-модели.

Модели, представленная выше, являются угловыми, такие модели предсказывают движение солитонов по цепочке дизооксирибонуклеиновой кислоты. Хорошо известным примером трансляционных моделей является модель Пейярда -Бишопа (PB) [15, 16], а также две ее расширенные версии. Они представляют собой геликоидальные модели PB (HPB) и модель Пейярда -Бишопа-Доксуа (PBD). Основным требованием к трансляционному подходу является описание комплементарных Н-связей с помощью нелинейного потенциала. Нелинейность данного потенциала доказывается работами по инфракрасной спектроскопии дизооксирибонуклеиновой кислоты, такие низкочастотные колебательные моды водородных связей оснований были названы «дыханием» дизооксирибонуклеиновой кислоты. Модель Пейрара-Бишопа предполагает, что молекула дизооксирибонуклеиновой кислоты

состоит из двух цепочек полинуклеотидов и представляет собой две цепочки дисков, которые связаны между собой продольными и поперечными пружинами. продольные взаимодействия представляют собой сильные ковалентные связи, моделируемые гармоническими потенциалами. Поперечные взаимодействия между нуклеотидами, принадлежащими к разным цепям, являются слабыми водородными взаимодействиями, требующими ангармонического потенциала. Примером, используемым для модели РВ, является потенциал Морзе:

$$V_M(u_n - v_n) = D[e^{-a(u_n - v_n)} - 1]^2, \quad (1.9)$$

где параметры D и a - глубина и обратная ширина потенциальной ямы Морзе соответственно. Координаты u_n и v_n представляют собой поперечные смещения нуклеотидов в положении n от их положений равновесия вдоль направления водородной связи. Гамильтониан такой системы равен:

$$H = \sum \left\{ \frac{m}{2} (\dot{u}_n^2 + \dot{v}_n^2) + \frac{k}{2} [(u_n - u_{n-1})^2 + (v_n - v_{n-1})^2] \right\} + V_M(u_n - v_n), \quad (1.10)$$

где $m = 300$ а. е. м. $= 5,1 \cdot 10^{-25}$ кг - масса нуклеотида, k - константа гармонического взаимодействия, в то время как \dot{u}_n и \dot{v}_n представляют соответствующие скорости. Первые два члена представляют собой соответственно кинетическую и потенциальные энергии продольной пружины. Потенциал Морзе отвечает за нелинейность данной системы и описывает слабые водородные связи. Для удобства были введены новые координаты, представляющие синфазные и внефазовые поперечные движения:

$$x_n = \frac{(u_n + v_n)}{\sqrt{2}}, \quad y_n = \frac{(u_n - v_n)}{\sqrt{2}}, \quad (1.11)$$

которые преобразует гамильтониан (1.10) в (1.12):

$$H = \sum \left\{ \frac{m}{2} (\dot{x}_n^2 + \dot{y}_n^2) + \frac{k}{2} [(x_n - x_{n-1})^2 + (y_n - y_{n-1})^2] \right\} + V_M(y_n) \quad (1.12)$$

Согласно уравнению (1.11) и рисунку 1.3, можем заключить, что $x_n(t)$ и $y_n(t)$ описывают синфазные и внефазные колебания пары нуклеотидов в положении n соответственно. Другими словами, $x_n(t)$ представляет колебание центра масс нуклеотидов, в то время как $y_n(t)$ – их растяжение.

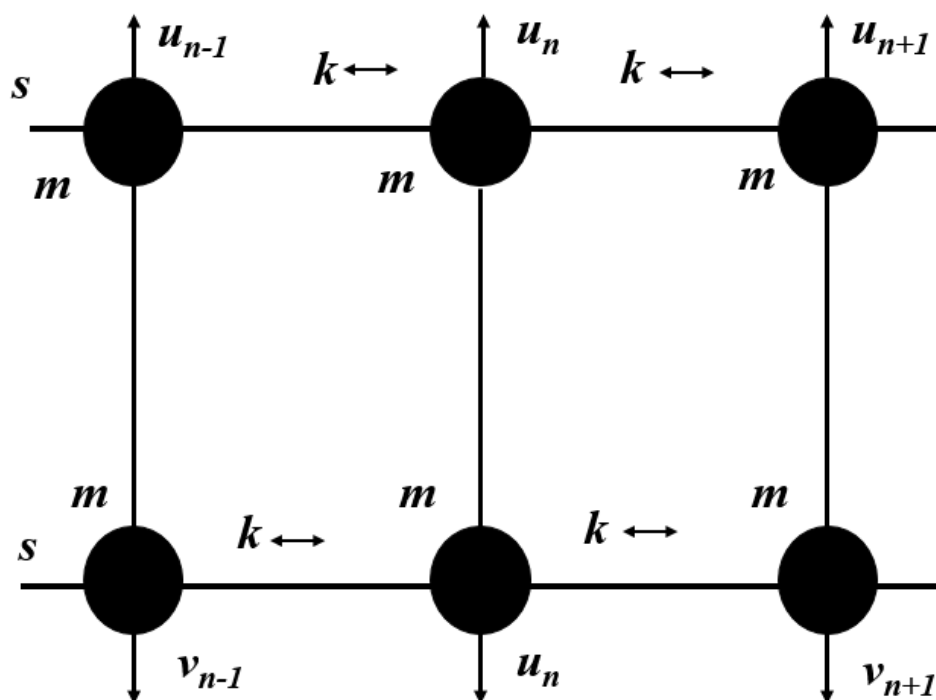


Рисунок 1.3 – Сегмент молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты, показывающий как ковалентные взаимодействия, определяемые параметром k , так и водородные связи, моделируемые потенциалом Морзе

Фактически, модель РВ является частным случаем модели НРВ, которая будет объяснена ниже. Теперь достаточно указать, что функция $x_n(t)$ представляет собой линейную волну, в то время как $y_n(t)$ является нелинейной. Важно знать, что $y_n(t)$ зависит не от температуры, а от ее среднего значения $\langle y \rangle$ [17-19]. Эта модель может объяснить денатурацию дидоксирибонуклеиновой кислоты, а это означает, что величина, которая

может отражать степень денатурации молекул дизоксирибонуклеиновой кислоты в растворе, представляет собой среднее растяжение водородных связей [19]. Температура плавления, заданная численной обработкой, значительно выше, чем температура, соответствующая непрерывному приближению. Это, безусловно, указывает на большую роль дискретности в динамике дизоксирибонуклеиновой кислоты [19].

Рассмотрим усовершенствованные модели Пейярда-Бишопа (PB) – это геликоидальные модели PB (HPB) и модель Пейярда-Бишопа-Доксуа (PBD). В модели PBD гармоническая потенциальная энергия была заменена ангармонической следующим образом:

$$\frac{k}{2}(y_n - y_{n-1})^2 \Rightarrow \frac{k}{2}[1 + \rho e^{-\alpha(y_n + y_{n-1})}](y_n - y_{n-1})^2, \quad (1.13)$$

где

ρ и α - константы [20].

Это выражение можно рассматривать как гармоническое взаимодействие с переменной константой связи [21].

В рамках данной модели показано, что среднее растяжение водородных связей $\langle y \rangle$ зависит от температуры. Это демонстрирует преимущество модели PBD по сравнению с теми, которые предполагают гармоническую аппроксимацию. Функция $\langle y \rangle$ сначала медленно увеличивается, а потом резко возрастает, данный участок графика представляет собой денатурацию. В случае модели PBD денатурация протекает довольно резко и происходит при более низких температурах. Чтобы быть более точным, авторы сравнили два случая в пределах потенциала, заданного уравнением (1.13), что площадь $\alpha = 0$ (модель PB) и $\alpha \neq 0$ (модель PBD), и продемонстрировали преимущество последнего. Отметим, что функция $\langle y \rangle$ также зависит от остальных параметров, существующих в модели, таких как D и a , описывающих потенциал Морзе. Некоторые комбинации дают очень резкое увеличение даже для гармонического случая, а также слишком низкую температуру плавления

[22, 23].

Хронологически первое и наиболее важное усовершенствование модели РВ было сделано Доксуа и др. [24], и это то, что называем моделью НРВ. В уравнение (1.12) был введен новый термин, описывающий геликоидальные взаимодействия, и гамильтониан перепишем следующим образом:

$$H = \sum \left\{ \frac{m}{2} (\dot{u}_n^2 + \dot{v}_n^2) + \frac{k}{2} [(u_n - u_{n-1})^2 + (v_n - v_{n-1})^2] + \right. \\ \left. + \frac{K}{2} [(u_n - v_{n+h})^2 + (u_n - v_{n-h})^2] + D [e^{-a(u_n - v_n)} - 1]^2 \right\}, \quad (1.14)$$

где

K – гармоническая постоянная геликоидальной пружины. Как оговаривалось выше, геликоидальность означает, что после поворота на π нуклеотид, принадлежащий одной цепи в позиции n , будет близок как к $(n+h)$ -му, так и $(n-h)$ -му нуклеотидам другой цепи [24].

Полный математический анализ, включающий множество математических деталей, можно найти в [25], очень кратко рассмотрим основные выводы. Уравнения (1.11) и (1.14) приводят к двум несвязанным динамическим уравнениям движения, линейному и нелинейному. Ограничимся нелинейным, который представляет собой выражение:

$$m\ddot{y}_n = k(y_{n+1} + y_{n-1} - 2y_n) - K(y_{n+h} + y_{n-h} - 2y_n) + \\ + 2\sqrt{2}aD(e^{-a\sqrt{2}y_n} - 1)e^{-a\sqrt{2}y_n}. \quad (1.15)$$

Конечно, это дискретное дифференциальное уравнение в частных производных, и наша цель - получить его решение, т.е. функцию $y_n(t)$. Предполагаем, что колебания нуклеотидов достаточно велики, чтобы быть ангармоническими, но все же достаточно малы для преобразования, чтобы быть действительными:

$$y_n = \varepsilon \Phi_n; \quad (\varepsilon \ll 1) \quad (1.16)$$

Для решения уравнения (1.15) используем полудискретное приближение, что означает волновые решения вида:

$$\Phi_n(t) = F_1(\xi)e^{i\theta_n} + \varepsilon[F_0(\xi) + F_2(\xi)e^{i2\theta_n}] + cc + O(\varepsilon^2) \quad (1.17)$$

и

$$\xi = (\varepsilon nl, \varepsilon t), \quad \theta_n = nql - \omega t, \quad (1.18)$$

где

$l = 0,34$ нм - расстояние между двумя соседними нуклеотидами в одной цепи,

ω – оптическая частота линейного приближения;

$q = 2\pi/\lambda$ – волновое число, cc представляет собой комплексно сопряженные

члены, а функция F_0 является действительной. Это модулированная волна, где

F_1 является непрерывной функцией, представляющей огибающую, в то время

как компонент несущей $e^{i\theta_n}$ является дискретным. Математической основой

для уравнения (1.17) является метод множественного масштаба или метод разложения по производным [26, 27].

Приводит к дисперсионному соотношению:

$$\omega^2 = \frac{4}{m} \left[a^2 D + k \sin^2 \left(\frac{ql}{2} \right) + K \cos^2 \left(\frac{qhl}{2} \right) \right], \quad (1.19)$$

выражение для групповой скорости $V_S = d\omega/dq$ и так далее. Особое значение

имеет тот факт, что функции F_0 и F_2 могут быть выражены через F_1 , в то время

как последняя является решением хорошо известного разрешимого

нелинейного уравнения Шредингера (NLSE):

$$iF_{1\tau} + PF_{1SS} + Q|F_1|^2F_1 = 0, \quad (1.20)$$

где

τ и S - новые временные и пространственные координаты. Здесь P и Q - коэффициент дисперсии и коэффициент нелинейности соответственно. Для $PQ > 0$ решение уравнения (1.20) равно:

$$F_1(S, \tau) = A_0 \sec\left(\frac{S - u_e \tau}{L_e}\right) \exp\frac{iu_e(S - u_c \tau)}{2P}, \quad (1.21)$$

что приводит к окончательному решению [24]:

$$y_n(t) = 2A \sec\left(\frac{nl - V_e t}{L}\right) \{\cos(\Theta nl - \Omega t) + \\ + A \sec\left(\frac{nl - V_e t}{L}\right) \left[\frac{\mu}{2} + \delta \cos(2(\Theta nl - \Omega t))\right]\}. \quad (1.22)$$

Выражение для $A \equiv \varepsilon A_0, L \equiv L_e / \varepsilon$, волновое число Θ огибающей скорости V_e и частота Ω приведены в [24].

Чтобы построить график функции $y_n(t)$, значения всех параметров должны быть известны или, по крайней мере, оценены. Их две группы: математические (ε, u_e, u_c) и внутренние параметры (k, K, a, D, q) . Было высказано предположение [28], что длина волны охватывает целое число периодов l :

$$q = \frac{2\pi}{\lambda}, \quad \lambda = Nl, \quad N \text{ integer}. \quad (1.23)$$

Следовательно, можно принять N в качестве внутреннего параметра вместо q . Обратите внимание, что зависимость от ε может быть устранена [24]. Это то, чего можно было ожидать, поскольку это только рабочий параметр, который мы используем для различения больших и малых терминов в расширении ряда (1.17).

Проблема с математическими параметрами практически решена с использованием идеи когерентного режима [25, 28], предполагая, что скорости огибающей и несущей волны равны:

$$V_e = \frac{\Omega}{\Theta}. \quad (1.24)$$

Это означает, что функция $y_n(t)$ одинакова в любой позиции n . Другими словами, волна сохраняет свою форму во времени, что указывает на возможную стабильность [28]. Обратите внимание, что уравнение (1.22) является однофазной функцией, если выполняется уравнение (1.24).

На сегодняшний день разработано множество различных нелинейных моделей дизооксирибонуклеиновой кислоты, различаются они в основном своей подробностью: модели упругого стержня и квантовые модели дизооксирибонуклеиновой кислоты [29-35]. Образование открытых состояний [36] можно объяснить на основании вращения азотистых оснований вокруг сахарофосфатного остова (модель Л.В. Якушевич), либо на основании сдвига азотистых оснований в направлении, перпендикулярном оси вращения молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты (модель Пейярда-Бишопа и другие). Динамика моделей дизооксирибонуклеиновой кислоты описывается нелинейными уравнениями, которые допускают аналитическое решение в виде солитонов и кинков. Если же мы учитываем дискретность, то это позволит получить решение в виде бризеров. Последние могут быть как стационарными, так и мобильными. Необходимо отметить, что изучению физических свойств молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты посвящено огромное количество публикаций. Так, хорошо изучена температурная зависимость гибкости ДНК в присутствии сил растяжения и расстегивания [37]. Считается, что двухцепочечная ДНК обладает внутренней жесткостью на изгиб [38-40]. Одним из важных факторов, влияющих на прочность молекулы являются термически генерируемые пузырьки денатурации [41]. Причем,

подобные пузырьки возникают при считывании информации с молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты, поэтому изучение их свойств является крайне важной и актуальной задачей [42-46]. Одним из факторов, влияющих на образование пузырьков денатурации является величина торсионного момента, действующего на двойную спираль молекулы [47]. Измерению его величины также посвящен ряд работ [48-50].

1.2 Анализ физических эффектов, возникающих в гетерогенных системах при модификации изотопного состава жидких сред

Изотопные эффекты разделяют на первичные и вторичные. Первичный изотопный эффект возникает при изотопном замещении атома, непосредственно участвующего в реакции, что приводит к изменению константы скорости или равновесия химической реакции. Вторичными называют эффекты, связанные с изотопным замещением атомов, не принимающих непосредственного участия в химических реакциях.

Уменьшение нулевой энергии колебаний, обусловленное увеличением массы реагирующего атома, является основной причиной уменьшения скорости химической реакции с участием более тяжелого изотопа, в частности дейтерия. Однако, для объяснения эффекта увеличения кинетического изотопного эффекта необходимо рассмотреть туннельный эффект. Вероятность туннельного перехода для частицы массы m на расстояние, определяемое шириной барьера l , выражается уравнением

$$G = G_0 \exp(-a\sqrt{ml}) \quad (1.25)$$

Из формы уравнения (1.25) видно, что доля частиц, преодолевающих энергетический барьер по туннельному механизму, зависит от ширины барьера и массы туннелирующей частицы, т. е. этот эффект чувствителен к изотопному замещению реагирующих атомов [51]. Увеличение кинетического изотопного эффекта и уменьшение константы скорости реакции в данном

случае связаны с увеличением массы дейтрона по сравнению с массой протона, что приводит к уменьшению вероятности туннельного перехода.

Увеличение массы легкого атома осциллятора при дейтерировании ведет к уменьшению частот молекулярных, в том числе нулевых колебаний примерно в 1,4 раза. Это приводит к уменьшению нулевых колебаний в тяжелой воде. Так, с учетом ангармоничности, энергия нулевых колебаний в H_2O составляет $4634,32 \text{ см}^{-1}$, или $13,25 \text{ ккал/моль}$, а D_2O – $3388,67 \text{ см}^{-1}$, или $9,69 \text{ ккал/моль}$. Уменьшение ангармоничности колебаний в тяжелой воде объясняется увеличением приведенной массы двухатомного осциллятора [51].

Известно, что многие физические и химические процессы в живых системах сопровождаются изотопным фракционированием атомов биологически значимых элементов, прежде всего H, C, O и N [52]. Изменения соотношения тяжелых и более легких изотопов биогенных элементов являются основой для возникновения как квантовых (туннельных), так и термодинамических и, как следствие, кинетических изотопных эффектов, проявляющихся в естественных условиях ускорением, замедлением или разветвлением метаболических реакций, а также изменением скорости поступления метаболитов по транспортным каналам, приводящих к локальному флуктуационному увеличению пула биологически активных веществ [53] в отдельных компартментах или органоидах клетки. Кроме того, изменение естественного изотопного соотношения в некоторых структурных компонентах живых систем сопровождается модификацией механизмов отдельных биохимических реакций, что обусловлено у животных и растений, например, компартментализацией [54] и в целом может приводить, в том числе к более быстрому возникновению адаптации при воздействии различных стрессовых факторов.

В ряде исследований изучены некоторые проявления изотопных эффектов отдельных элементов в естественных условиях [55]. Знание и понимание механизмов возникновения изотопных эффектов, например, представляет также интерес для понимания особенностей и реконструкции

физиологических процессов в растениях и животных в зависимости от их географического происхождения и места обитания [56]. Такой подход позволяет использовать полученные в исследованиях значения концентрации различных изотопов для характеристики биообъектов [57], в том числе и для выяснения особенностей биохимических процессов и механизмов реакций, а также реконструкции климатических, физиологических, экологических и природоохранных условий в определенный период жизнедеятельности организма [58-60].

На данный момент существует достаточный объем экспериментальных данных о различном соотношении легких и тяжелых изотопов биогенных элементов в биообъектах в зависимости от среды обитания [61, 62], однако, нерешенным при изучении обмена нерадиоактивных изотопов водорода, кислорода, углерода и других остается вопрос, посвященный объяснению возможных механизмов их влияния на живые объекты, особенно при комбинированном (поли-изотопном) воздействии, что необходимо как для выяснения закономерностей изотопного действия и прогнозирования конечных биоэффектов в организме, при естественных или искусственно создаваемых колебаниях изотопного состава, так и для создания новых способов (поли-)изотопной коррекции метаболических нарушений, наблюдающихся при воздействии различных стрессовых факторов (химических, физических [63] или эмоциональных) на организм [64].

Это актуально в настоящее время в связи с появившимися возможностями коррекции соотношения легких и тяжелых изотопов биогенных элементов в организме путем создания пищевого и питьевого рациона с модифицированным изотопным составом [65, 66]. Причем, изменение изотопного состава пищевых продуктов может происходить как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения концентрации содержащихся в них тяжелых изотопов [67, 68]. Последнее особенно актуально в связи с показанной возможностью влияния различных соотношений легких и тяжелых изотопов водорода на адапционный

потенциал организма [69-72]. Прогнозирование изменений абсолютных значений и направленности изотопного градиента при различных состояниях системы особенно актуально, в связи с разной скоростью изотопного обмена в тканях внутренних органов при различной их метаболической активности, в том числе, при гендерных, возрастных, температурных отличиях у особей одного и того же вида [73]. Поэтому целенаправленное изменение соотношения тяжелых и легких изотопов (например, дейтерия/протия) в биологических средах и внутренних органах может обеспечить возможность превентивного повышения адаптационного потенциала организма за счет модификации интенсивности обменных процессов, что объясняется как потенциально наибольшим кинетическим изотопным эффектом, возникающим при фракционировании атомов водорода, связанным с различиями их масс (^1H и ^2H), так и ожидаемым положительным биологическим воздействием на организм, обусловленным выведением тяжелых изотопов, обладающих выраженными изотопными кинетическими эффектами [51].

Необходимо отметить, что крупным открытием является доказательство наличия парамагнитных изотопных эффектов у некоторых металлов (кальция, магния, цинка), принимающих участие в биокатализе [74-79], в которых показано изменение активности ферментов, регулирующих энергообмен и передачу генетической информации в клетках, в зависимости от изотопного состава среды [80, 81].

Для более полного представления об эффектах, наблюдающихся при накоплении отдельных фракций тяжелых или легких изотопов, следует рассмотреть ключевые механизмы реализации их биоэффектов. Подобный подход требует детального анализа, так как разными научными группами было показано, что как снижение содержания тяжелых изотопов по сравнению с естественным фоном окружающей среды, так и их повышение в одинаковом диапазоне в примерно одной и той же степени выраженности способны влиять

(стимулировать или угнетать) на метаболические процессы в организме [82-87].

Фракционирование изотопов в ферментных системах реализуется в возбужденных фермент-субстратных комплексах в момент, когда значительно снижается значение энергии, необходимое для замещения легких изотопов на тяжелые. В случае возникновения более энергетически выгодного распада фермент-субстратного комплекса с тяжелыми изотопами будет наблюдаться заметный сдвиг реакции в сторону образования продукта с тяжелым изотопом. Наиболее выражено это при наличии обратимости в системе $P^nXE \leftrightarrow S^nXE$ (данном случае скорость обратной и прямой реакции будет равна), но значительно меньше, чем прямая реакция в переходном состоянии системы $S^nXE \leftrightarrow P^{n+m}XE$. Данная закономерность приведет к увеличению концентрации тяжелого изотопа в продуктах химической реакции. Вышеописанные процессы подтверждаются присутствием обнаруженных подобных внутримолекулярных перестроек при фотоциссоциации ацетальдегида с повышенным содержанием дейтерия. Так как необходимая для внутримолекулярных перестроек в фермент-субстратном комплексе энергия меньше, чем энергия необходимая для изомеризации кетенола, то вероятность фракционирования тяжелых изотопов возрастет относительно количеству перестроений в системе $P^nXE \leftrightarrow S^nXE$, что, в свою очередь, свидетельствует о высокой вероятности фракционирования тяжелых изотопов в естественных условиях. Кроме того, вероятность фракционирования возрастает для тяжелых изотопов ^{18}O и 2H в составе возбужденного фермент-субстратного комплекса за счет связывания ^{18}O и 2H из растворителя (воды $^1H^2HO$ или $H_2^{18}O$), в котором протекают биохимические процессы, что, в свою очередь может приводить к более распространенному фракционированию этих изотопов в естественных условиях.

Важно отметить, что клетка, в зависимости от функционального состояния отличается характерным уровнем биосинтетических и энергетических потребностей. Данные потребности могут изменяться в

ограниченном диапазоне, преобразовывая цепочки метаболических превращений с конкуренцией за пируватный фонд, что, в свою очередь, сопровождается изменением соотношения частей пируватного фонда, которые извлекаются для синтеза метаболитов и энергетики клетки, требующихся в данном случае, обуславливая селекцию изотопов [88-93].

Изменения изотопного D/H состава гетерогенных системах зачастую могут быть вызваны различным соотношением дейтерия и протия в питьевом и пищевом рационах, наблюдающихся как при миграции живых организмов, так и при использовании искусственно полученных рационов с пониженным содержанием тяжелых нерадиоактивных изотопов биогенных элементов, прежде всего дейтерия.

Колебания изотопного состава на организменном уровне и, вероятно, формирование противоположного физиологическому градиенту нового изотопного D/H градиента ($\delta D_{\text{висцеральные органы}} > \delta D_{\text{плазма крови}}$) могут приводить к усилению активности гуморальных и клеточных защитных систем, приводящих к неспецифическому феномену повышения резистентности организма в результате прекондиционирования, в ходе которой потенцируются защитные механизмы на клеточном уровне 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 (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) и соотношения транспортеров энергетических субстратов в мембранах [94, 95]. Кроме того, использование у мышей питьевого рациона, обедненного по дейтерию, противодействует поведенческим, транскрипционным и пролиферативным изменениям, типичным для депрессивноподобного состояния. В том числе потребление

обедненной дейтерием воды приводит к изменениям параметров электроэнцефалограммы во время сна, которые напоминают эффекты норадреналина и ингибиторов обратного захвата серотонина [96].

Несмотря на все возрастающую распространенность исследований влияния низких концентраций дейтерия на живые системы, авторы этих работ преимущественно рассматривают изменения изотопного соотношения D/H в плазме крови и не уделяют достаточно внимания сравнительному изучению концентраций дейтерия в тканях и жидкостях организма в случае активного употребления воды с модифицированным изотопным составом со сниженным содержанием дейтерия [97-102].

В целом влияние обедненного по дейтерию питьевого рациона на изотопный состав тканей и морфофункциональные показатели у многоклеточных организмов исследовано недостаточно, но, тем не менее, данная область представляет особый интерес, так как изучение морфофункционального статуса является одним из основных информативных показателей индивидуального развития организма, состояния его здоровья, а потребление обедненного по дейтерию питьевого рациона оказывает влияние на адаптационные возможности организма в различные периоды онтогенеза. Важным в такого рода научной работе представляется выбор объекта исследования, который бы позволял должным образом оценить всю многогранность влияния реакций изотопного обмена на биологические системы, поэтому в научной литературе можно встретить исследования различных одноклеточных и многоклеточных организмов [103-107], что, однако, нередко представлено в дискретном виде, без учета генетической гетерогенности особей и не подвергалось мета-анализу.

Вместе с тем, помимо описанных выше термодинамических и кинетических эффектов, указывающих на определенное преимущество в использовании энергетических характеристик при описании изотопных эффектов, при наличии легких изотопов биогенных элементов, возможен механизм, реализуемый за счет квантового эффекта туннелирования

определенных тяжелых изотопов, а также ковалентно связанных атомов легких и тяжелых изотопов.

1.3 Выводы к главе 1

Из вышеприведенного анализа литературных данных можно сделать следующие выводы:

1. Отсутствие высокопроизводительных инструментов для измерения механических свойств молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты ограничивает изучение ее механических движений. По этой причине, особо важным методом исследования молекулярной динамики данной молекулы является математическое моделирование на основе механических моделей.

2. Рассмотренные математические модели механических движений молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты допускают большое число упрощений при аналитическом решении. Эти упрощения приводят к специфическим решениям, существование которых часто возможно лишь при учете данных упрощений.

3. В большинстве моделей не учтено влияние вязкости внешней среды, окружающей молекулу. А также отсутствует возможность расчета влияния изотопного состава среды на динамику молекулы и зон открытых состояний.

4. Из рассмотренных данных о влиянии изотопного состава среды на параметры гетерогенных систем, следует что на сегодняшний день отсутствует четкая теория, описывающая физические механизмы наблюдаемых изотопных эффектов.

2 Физико-математическое моделирование и исследование процессов влияния внешних воздействий на природу изменений физических свойств молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты

2.1 Создание новой физико-математической модели органической молекулы, состоящей из двух цепочек упорядоченных ансамблей взаимодействующих маятников

Основной функцией молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты является хранение и передача генетической информации, которая записана в виде последовательности нуклеотидов в двойной спирали. Основной функцией молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты является хранение и передача генетической информации, которая записана в виде последовательности нуклеотидов в двойной спирали [108]. Молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты представляет собой сложную динамическую систему, состоящую из различных колебательных структурных элементов: пентозо-фосфатный полимер с азотистыми основаниями в качестве боковых групп [109]. При моделировании динамики молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты необходимо учитывать, как собственные колебания нитей, так и вращательные колебания оснований вокруг пентозо-фосфатных цепочек. Эти колебания непосредственно связаны с процессом открытия-закрытия отдельных пар азотистых оснований [110] и формированием открытых состояний, которые представлены несколькими соседними парами азотистых оснований [111] с разорванными водородными связями, соединяющими комплементарно азотистые основания внутри этих пар. Как правило молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты содержит некоторое количество открытых пар оснований [112]. Это явление известно как «дыхание дезоксирибонуклеиновой кислоты» и является важным элементом ее функционирования.

Для теоретического исследования вращательных колебаний оснований и изучения их роли в открытии пар азотистых оснований, часто используются

методы молекулярной динамики [113-115]. Однако, методы молекулярной динамики являются слишком громоздкими [116]. Более простым подходом является использование механической модели дизооксирибонуклеиновой кислоты [111, 117]. При этом основания дизооксирибонуклеиновой кислоты представляют в виде маятников, а взаимодействия между основаниями описывают с помощью замены водородных связей на упругие связи. Этот подход был разработан позже в работах Л.В. Якушевич [118, 119], Cuenda [120], Kalosakas [121, 122]. Все эти работы позволили развить механическую модель описания динамики дизооксирибонуклеиновой кислоты, учесть различные эффекты асимметрии, спиральности, диссипации и неоднородности молекулы. Однако, все вышеописанные модели динамики образования открытых состояний дизооксирибонуклеиновой кислоты используют большое количество упрощений.

В рамках данной работы рассмотрена математическая модель, использующая аналогию между молекулой дизооксирибонуклеиновой кислоты и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников, позволяющая исследовать ее динамику, обусловленную вращательным движением азотистых оснований вокруг пентозо-фосфатного двунитевого остова. Рассмотрено влияние на характер решения таких факторов, как неоднородность цепочки азотистых оснований, свойства связи в комплементарных парах и образование открытых состояний. Показано, что такие упрощения модели, как усреднение характеристик цепочки азотистых оснований или упрощение вида связи в их комплементарных парах существенно влияют на вид решения, снижая достоверность получаемых результатов. Поэтому разработанный подход к решению задачи вращательной динамики молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты в большей степени соответствует ее истинной биомеханике. Показано, что в рамках апробированной математической модели возможно появление открытых состояний между парами азотистых оснований и восстановление их закрытой структуры.

В данном разделе проведено исследование влияния различных упрощений механической модели, описывающей динамику двухцепочечной молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты, на характер решения.

Для описания вращательных движений азотистых оснований вокруг пентозо-фосфатных нитей будем использовать аналогию между молекулой дизоксирибонуклеиновой кислоты и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников. При этом вращающимся маятникам соответствуют азотистые основания, а упругой нити, к которой прикреплены эти маятники, – пентозо-фосфатные цепочки молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты; водородной связи пары комплементарных азотистых оснований соответствует упругая связь пары маятников (Программа ЭВМ № 2018662244).

Поведение этой механической системы описывается уравнениями Ньютона:

$$I_1^i \frac{d^2 \varphi_1^i(t)}{dt^2} = K_1^i [\varphi_1^{i-1}(t) - 2\varphi_1^i(t) + \varphi_1^{i+1}(t)] - k_{12}^i R_1^i (R_1^i + R_2^i) \sin \varphi_1^i - k_{12}^i R_1^i R_2^i \sin(\varphi_1^i - \varphi_2^i) + F_1^i(t), i = \overline{2, n-1}, \quad (2.1)$$

$$I_1^1 \frac{d^2 \varphi_1^1(t)}{dt^2} = K_1^1 [\varphi_1^2(t) - \varphi_1^1(t)] - k_{12}^1 R_1^1 (R_1^1 + R_2^1) \sin \varphi_1^1 - k_{12}^1 R_1^1 R_2^1 \sin(\varphi_1^1 - \varphi_2^1) + F_1^1(t), \quad (2.2)$$

$$I_1^n \frac{d^2 \varphi_1^n(t)}{dt^2} = K_1^n [\varphi_1^{n-1}(t) - \varphi_1^n(t)] - k_{12}^n R_1^n (R_1^n + R_2^n) \sin \varphi_1^n - k_{12}^n R_1^n R_2^n \sin(\varphi_1^n - \varphi_2^n) + F_1^n(t), \quad (2.3)$$

$$I_2^i \frac{d^2 \varphi_2^i(t)}{dt^2} = K_2^i [\varphi_2^{i-1}(t) - 2\varphi_2^i(t) + \varphi_2^{i+1}(t)] - k_{12}^i R_2^i (R_1^i + R_2^i) \sin \varphi_2^i - k_{12}^i R_1^i R_2^i \sin(\varphi_2^i - \varphi_1^i) + F_2^i(t), i = \overline{2, n-1}, \quad (2.4)$$

$$I_2^1 \frac{d^2 \varphi_2^1(t)}{dt^2} = K_2^1 [\varphi_2^2(t) - \varphi_2^1(t)] - k_{12}^1 R_2^1 (R_1^1 + R_2^1) \sin \varphi_2^1 - k_{12}^1 R_1^1 R_2^1 \sin(\varphi_2^1 - \varphi_1^1) + F_2^1(t), \quad (2.5)$$

$$I_2^n \frac{d^2 \varphi_2^n(t)}{dt^2} = K_2^n [\varphi_2^{n-1}(t) - \varphi_2^n(t)] - k_{12}^n R_2^n (R_1^n + R_2^n) \sin \varphi_2^n - k_{12}^n R_1^n R_2^n \sin(\varphi_2^n - \varphi_1^n) + F_2^n(t), \quad (2.6)$$

Здесь:

$\varphi_j^i(t)$ – угловое отклонение i -го маятника j -й цепочки, отсчитываемое против часовой стрелки, в момент времени t ,

I_j^i – момент инерции i -го маятника j -й цепочки,

R_j^i – расстояние от центра масс i -го маятника j -й цепочки до нити,

K_j^i – константа, характеризующая крутящий момент i -го участка j -й нити,

k_{12}^i – константа, характеризующая упругие свойства связи i -й пары маятников,

$F_j^i(t)$ – внешнее воздействие на i -й маятник j -й цепочки в момент времени t ,

n – количество пар маятников в рассматриваемой системе.

В уравнениях (2.1)-(2.6) первое слагаемое справа от знака равенство описывает воздействие на i -й маятник со стороны упругой нити, второе и третье слагаемые – со стороны парного маятника, четвертое слагаемое – внешнее воздействие.

К уравнениям (2.1)-(2.6) добавим начальные условия:

$$\varphi_1^i(0) = \varphi_{1,0}^i, \frac{d\varphi_1^i}{dt}(0) = \varphi_{1,1}^i, \quad (2.7)$$

$$\varphi_2^i(0) = \varphi_{2,0}^i, \frac{d\varphi_2^i}{dt}(0) = \varphi_{2,1}^i, i = \overline{1, n}. \quad (2.8)$$

Задача (2.1)-(2.6) представляет собой задачу Коши для системы $2n$ обыкновенных дифференциальных уравнений, решение которой существует и определяется единственным образом [123].

Решение задачи (2.1)-(2.6) зависит от многих факторов. В настоящей работе на примере гена, кодирующего интерферон alpha 17, исследуется влияние на решение таких факторов, как неоднородность цепочки маятников, характер связи в парах маятников и образование открытых состояний. Для этого гена $n = 980$, значения коэффициентов уравнений (2.1)-(2.6) приведены в таблице 2.1 (данные взяты из [117]), внешняя сила, как и в [117] взята в виде

$$F_j^i(t) = -\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t) + F_0 \cos \omega t \quad (\text{первое слагаемое описывает эффекты диссипации, второе – внешнее периодическое воздействие}), F_0 = 0,526 \cdot 10^{-22} \text{ Дж}, \omega = 0,4 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}.$$

Таблица 2.1 – Коэффициенты уравнений (2.1)-(2.6)

Вид основания	A	T	G	C
$I \cdot 10^{-44}$, кг·м ²	7,61	4,86	8,22	4,11
R , Å	5,80	4,80	5,70	4,70
$K \cdot 10^{-18}$, Дж	2,35	1,61	2,27	1,54
$k_{12} \cdot 10^{-2}$, Н/м	6,20	6,20	9,60	9,60
$\beta \cdot 10^{-34}$, Дж·с	4,25	2,91	4,10	2,79

Будем считать также, что при $t=0$ система находится в равновесии, то есть в начальных условиях (2.7-2.8)

$$\varphi_{1,0}^i = \varphi_{1,1}^i = \varphi_{2,1}^i = 0, \varphi_{2,0}^i = \pi, i = \overline{1, n} \quad (2.9)$$

Задача (2.1)-(2.6) может быть решена с помощью стандартных численных методов (например, метода Рунге-Кутты); в настоящей работе все исследования проводились на основе таких численных решений.

Часто при моделировании динамики молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты используют различные упрощающие предположения. Важнейшие из них – усреднение характеристик в цепочках молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты и упрощение характера связи между основаниями. Рассмотрим влияние этих упрощений на решение.

Систему уравнений (2.1)-(2.6) с коэффициентами из таблицы 2.1 назовём неоднородной. Вместе с ней будем рассматривать усреднённую систему уравнений, у которой коэффициенты равны средним значениям (2.10)-(2.11):

$$I_1^i = I_1^{\text{cp}}, I_2^i = I_2^{\text{cp}}, K_1^i = K_1^{\text{cp}}, K_2^i = K_2^{\text{cp}} \quad (2.10)$$

$$k_{12}^i = k_{12}^{\text{cp}}, R_1^i = R_1^{\text{cp}}, R_2^i = R_2^{\text{cp}}, i = \overline{1, n}. \quad (2.11)$$

Связь в парах маятников будем называть упрощённой, если в уравнениях (2.1)-(2.2) заменить выражение $\sin(\varphi_1^i - \varphi_2^i)$ на $\sin \varphi_1^i$, а $\sin(\varphi_2^i - \varphi_1^i)$ – на $\sin \varphi_2^i$ для всех $i = \overline{1, n}$ [177]. Таким образом, в случае упрощённой связи влияние на i -й маятник со стороны парного маятника заменяется влиянием отклонения i -го маятника от положения равновесия.

Представим результаты численных экспериментов по выяснению влияния упрощающих предположений на решение. Результаты представлены в виде графиков, по горизонтали откладывается номер маятника, по вертикали – угловые отклонения (или их скорости) в радианах, причём, для второй цепочки вместо угловых отклонений φ_2^i – значения $\pi - \varphi_2^i$.

Приведём результаты для трёх значений времени: $t_1 = 0,03 \cdot 10^{-10}$ с, $t_2 = 1,7 \cdot 10^{-10}$ с и $t_3 = 10,0 \cdot 10^{-10}$ с.

От того момента, когда внешнее периодическое воздействие вывело систему из состояния равновесия, времени прошло мало, поэтому влияния упрощающих предположений на решение невелико.

На рисунках 2.1 и 2.2 приведены соответственно графики зависимости угловых отклонений и скоростей угловых отклонений первой цепочки от

параметров уравнений 1-6 (толстая линия – усреднённые параметры, тонкая линия – неоднородные).

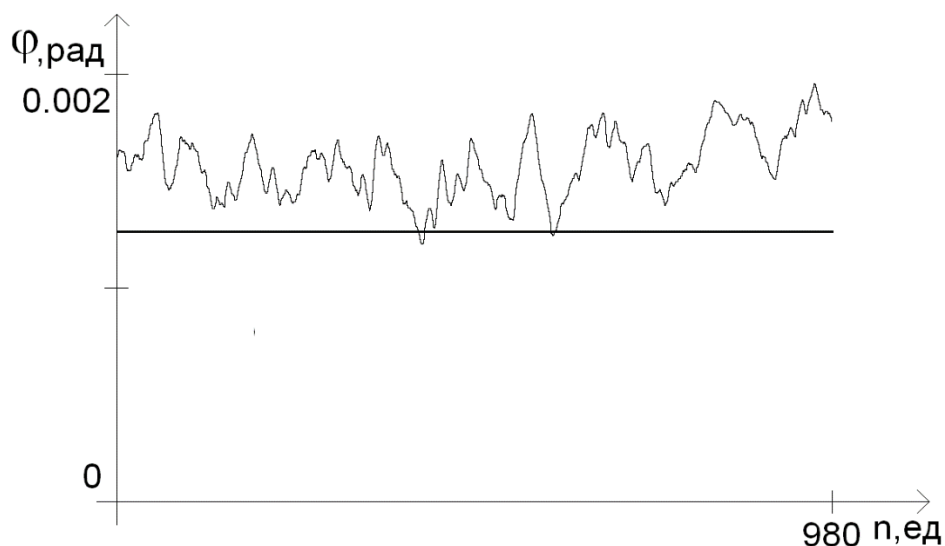


Рисунок 2.1 – Зависимости угловых отклонений первой цепочки маятников от параметров уравнений 1-6 (толстая линия – усреднённые параметры, тонкая линия – неоднородные) для значения времени t_1 .

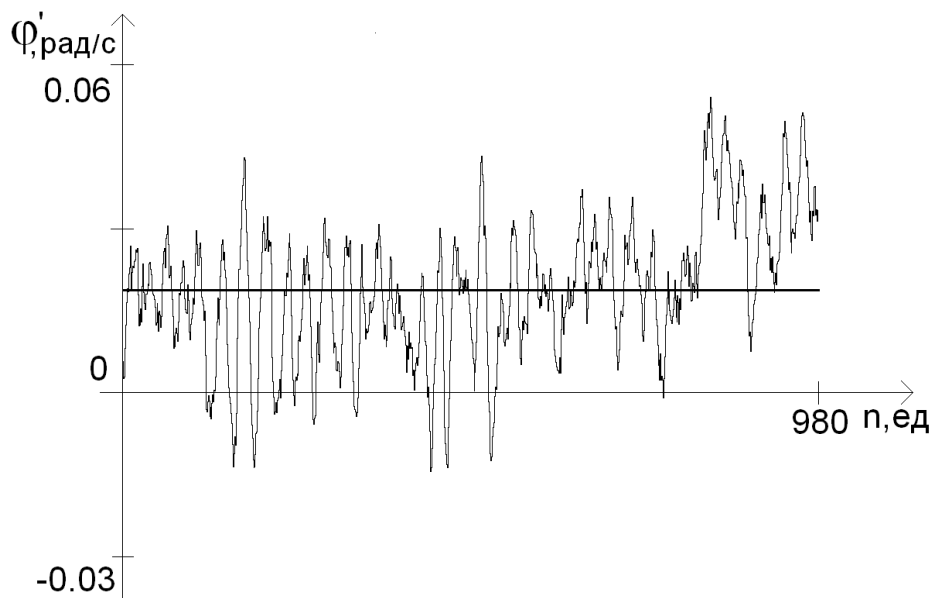


Рисунок 2.2 – Скорости угловых отклонений первой цепочки в зависимости от параметров уравнений 1-6 (толстая линия – усреднённые параметры, тонкая линия – неоднородные) для значения времени t_1 .

Из этих рисунков видно, что усреднение коэффициентов уравнений (2.1)-(2.6) сильнее влияет на изменение амплитуды скорости угловых отклонений, чем угловых отклонений.

На рисунке 2.3 приведены графики угловых отклонений первой цепочки неоднородной системы с обычной связью (тонкая линия) и с упрощённой (толстая линия).

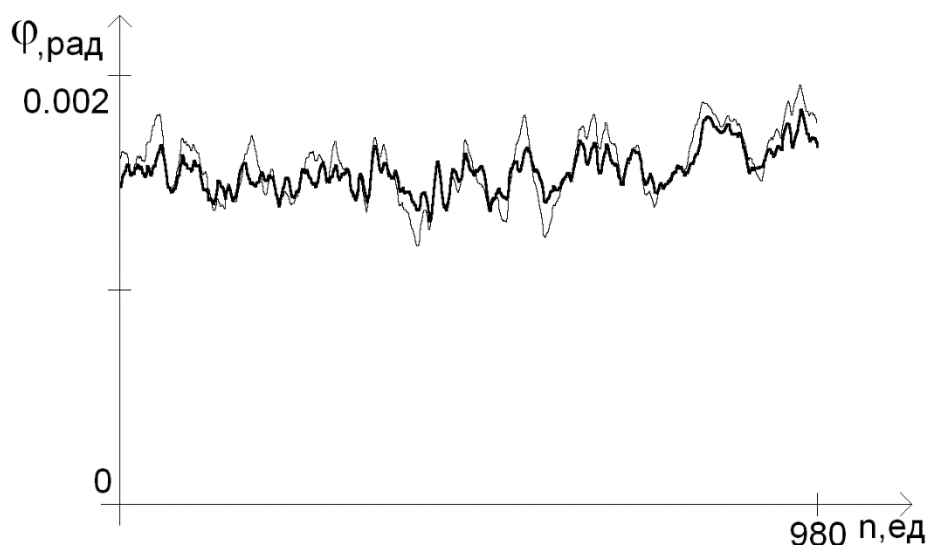


Рисунок 2.3 – Зависимости угловых отклонений первой цепочки неоднородной системы от характера связи – с обычной связью (тонкая линия) и с упрощённой (толстая линия) для значения времени t_1 .

Отличие угловых отклонений невелико (Рис. 2.3). Так же мало отличаются и скорости угловых отклонений, из чего видно, что влияние упрощающего предположения о связи в парах маятников в этом случае несущественно.

При росте времени влияние рассмотренных факторов на характер решения задачи (2.1)-(2.6) резко изменяется.

Решение усреднённой системы приобретает периодический характер, совпадающий с приведённым в [177].

Неоднородная система ведёт себя по-другому. График скоростей угловых отклонений неоднородной системы (Рис. 2.2) показывает, что разные участки цепочки могут двигаться с разной скоростью и в противоположных направлениях. В системах с упрощённой связью это не приводит к качественным изменениям решения, так как цепочки «не видят» друг друга. В системах с обычной связью цепочки взаимодействуют между собой и это приводит к резкому изменению характера решения.

На рисунке 2.4 приведены графики угловых отклонений 1-й (тонкая линия) и 2-й (толстая линия) цепочек неоднородной системы с упрощённой связью.

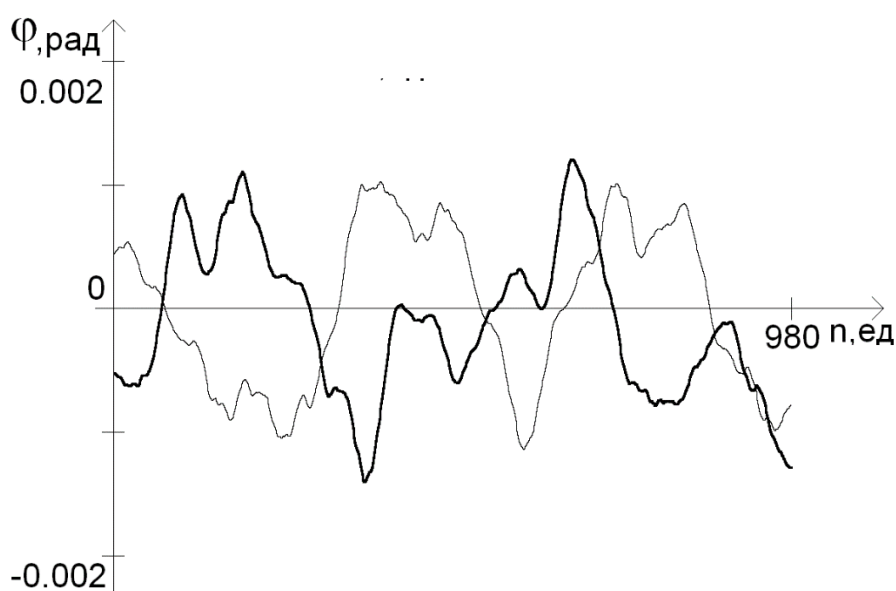


Рисунок 2.4 – Зависимости угловых отклонений 1-й (тонкая линия) и 2-й (толстая линия) цепочек неоднородной системы от характера водородной связи (с упрощённой связью для значения времени t_2).

На рисунке 2.5 приведены графики угловых отклонений 1-й (тонкая линия) и 2-й (толстая линия) цепочек неоднородной системы с обычной связью. Видно, что амплитуда угловых отклонений увеличилась примерно в 100 раз, достигая величины почти 0,2 рад.

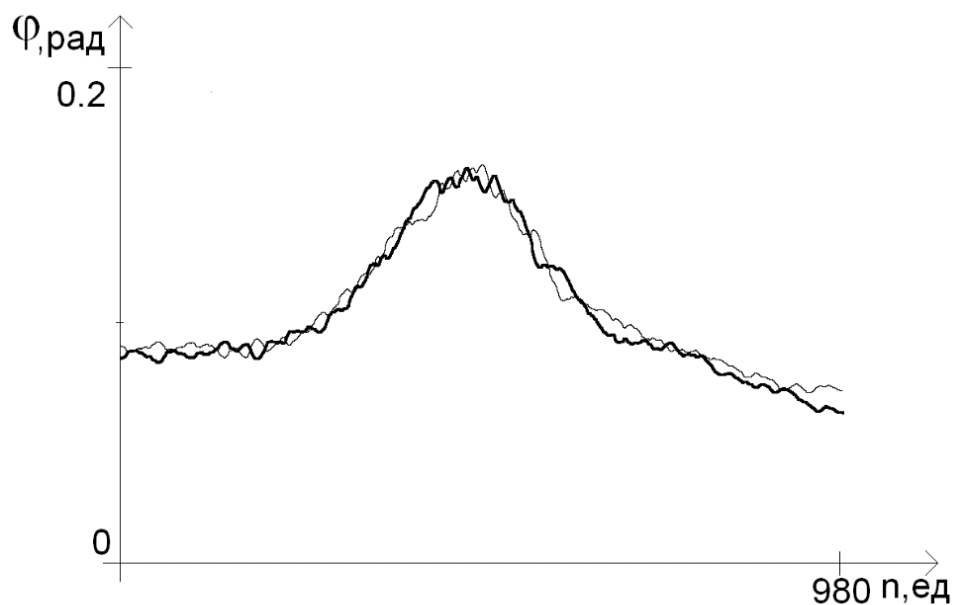


Рисунок 2.5 – Зависимости угловых отклонений 1-й (тонкая линия) и 2-й (толстая линия) цепочек неоднородной системы от характера водородной связи (с обычной связью для значения времени t_2).

На рисунке 2.6 приведены графики угловых отклонений 1-й цепочки неоднородной системы с обычной связью на промежутке $[0, t_2]$.

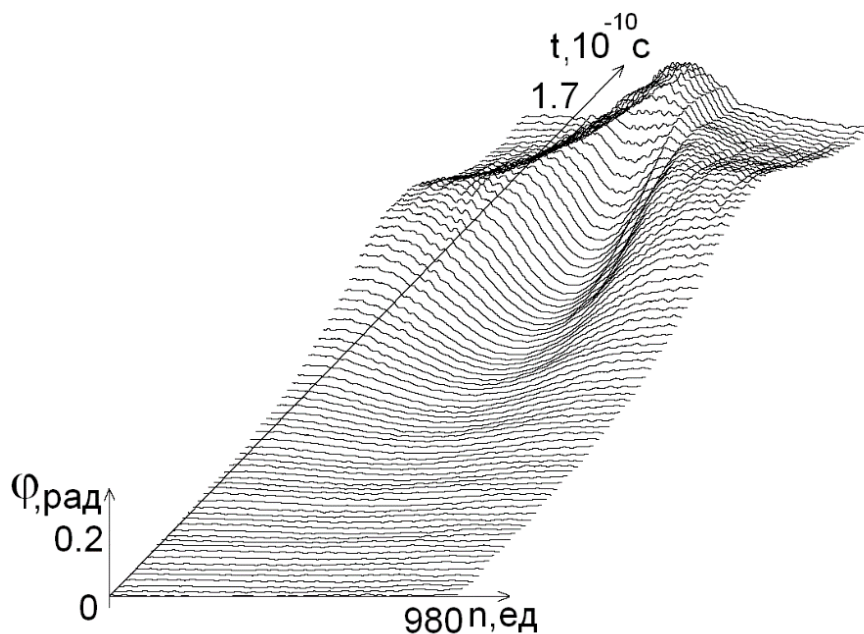


Рисунок 2.6 – Зависимости амплитуды угловых отклонений 1-й цепочки неоднородной системы с обычной связью от времени на промежутке $[0, t_2]$.

На рисунке 2.7 приведены графики угловых отклонений 1-й (тонкая линия) и 2-й (толстая линия) цепочек неоднородной системы с обычной связью для значения времени t_3 .

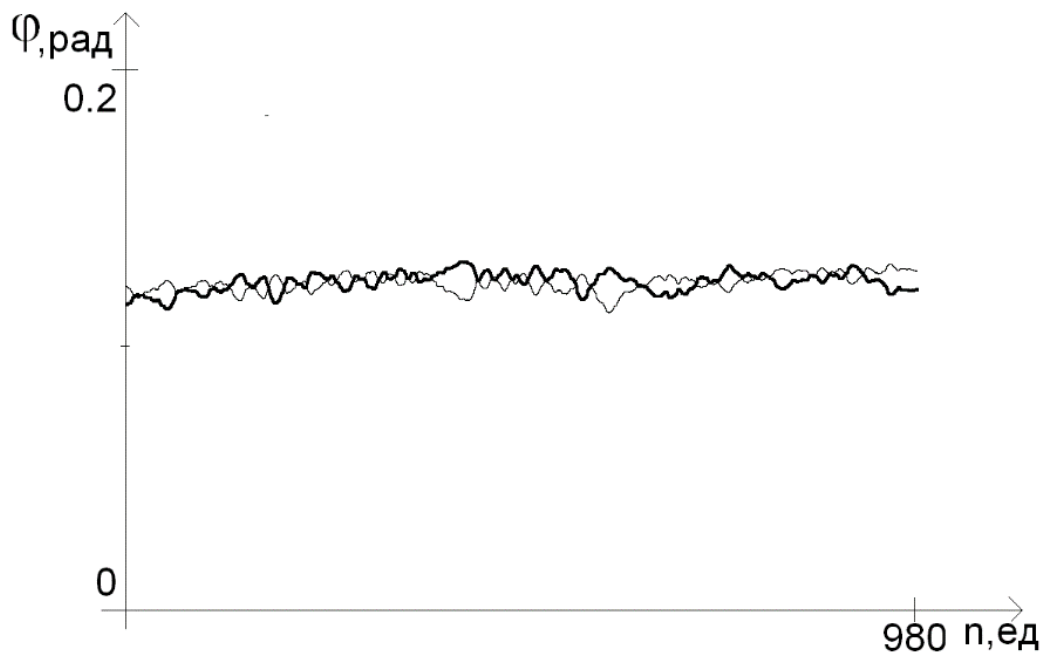


Рисунок 2.7 – Зависимости величины угловых отклонений 1-й (тонкая линия) и 2-й (толстая линия) цепочек от неоднородного характера системы с обычной связью для значения времени t_3 .

На рисунке 2.8 приведены графики угловых отклонений 1-й цепочки неоднородной системы с обычной связью на промежутке $[0, t_3]$.

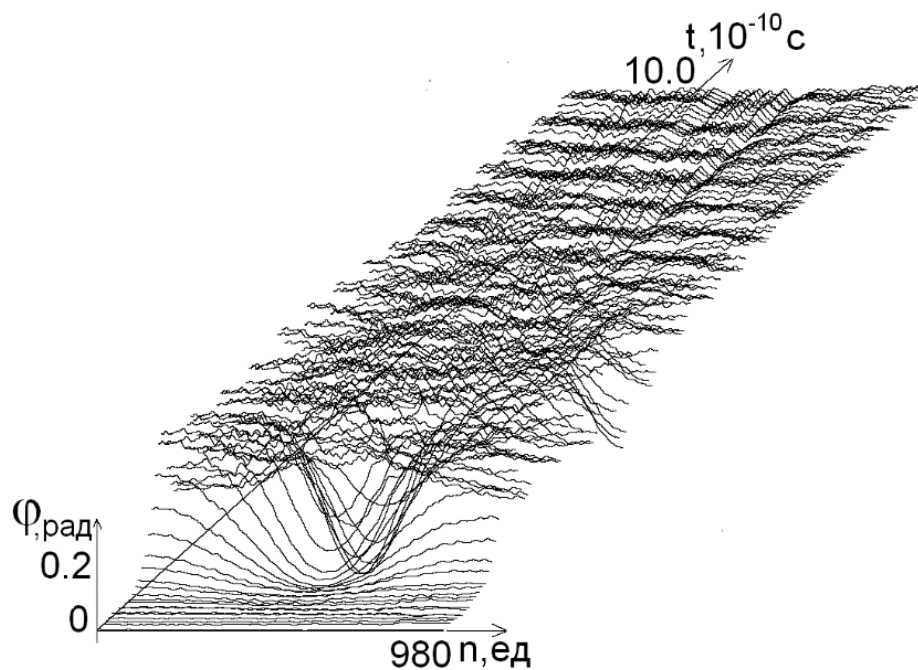


Рисунок 2.8 – Зависимость величины угловых отклонений 1-й цепочки от времени при неоднородном характере системы с обычной связью между парами комплементарных маятников на промежутке времени $[0, t_3]$.

Из рисунков 2.7 и 2.8 видно, что при больших временах решение можно представить в виде суммы 3-х слагаемых:

- 1-е слагаемое – константа равная примерно 0,13 рад для первой нити и $(\pi - 0,13)$ рад – для второй;
- 2-е слагаемое описывает колебания с частотой примерно равной $2 \cdot 10^{-10} \text{с}^{-1}$, которая, заметим, не зависит от частоты ω внешнего периодического воздействия. Амплитуда этих колебаний стремится к нулю при возрастании значения времени t ;
- 3-е слагаемое описывает высокочастотные колебания с малой амплитудой.

Из приведённых результатов следует, что неоднородность цепочки маятников и характер связи в парах маятников являются важными факторами, определяющими решение системы (2.1)-(2.6).

В системе (2.1)-(2.6) не учитывается возможность разрыва связей в парах маятников. Образование таких разрывов (открытых состояний) может

существенно влиять на поведение системы маятников. Кроме того, образование и динамика открытых состояний представляет самостоятельный интерес для исследования динамики молекул дизоксирибонуклеиновой кислоты.

Обычно для описания открытых состояний применяется синус-уравнение Гордона и его частное решение – «кинк» [1, 108, 117]. Такой подход имеет ряд недостатков. Во-первых, разрыву связей соответствуют угловые отклонения на 180° от положения равновесия; неясно, как с помощью «кинков» описать «закрытие» разрывов. Кроме того, уравнение синус-Гордона моделирует упрощённую связь в парах маятников, что, приводит к существенному изменению характера решения.

В рамках задачи (2.1)-(2.6) возможно моделирование разрывов в парах маятников при превышении потенциальной энергии связи в этих парах некоторого критического значения $E_{кр}$. Именно, если потенциальная энергия связи i -й пары маятников превышает $E_{кр}$, то связь считается разорванной; в этом случае 2-е и 3-е слагаемые в правой части соответствующих уравнений приравниваются к нулю.

Численные расчёты проводились для модельного значения $E_{кр} = 0,23 \cdot 10^{-22}$ Н·м. Расчёты показали, что учёт открытых состояний приводит к заметному увеличению максимальных значений амплитуды угловых отклонений и, следовательно, к увеличению числа пар маятников, у которых потенциальная энергия связи превосходит $E_{кр}$.

На рисунке 2.9 приведены графики угловых отклонений 1-й цепочки на промежутке $[0, t]$, $t = 1,7 \cdot 10^{-10}$ с с учётом возникновения открытых состояний; видны отличия от рисунка 2.6, на котором приведено то же решение без учёта открытых состояний.

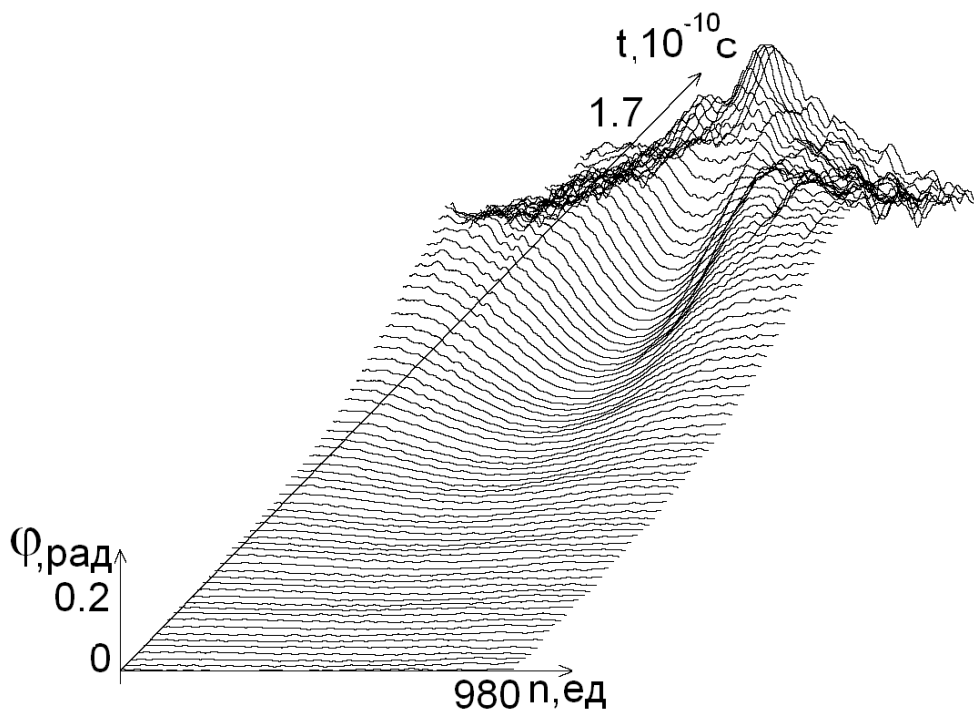


Рисунок 2.9 – Зависимость угловых отклонений 1-й цепочки от времени на промежутке $[0, t_3]$ с учётом возникновения открытых состояний.

На рисунке 2.10 изображены участки возникновения открытых состояний (выделены чёрным цветом) на интервале времени $[0, t]$, $t = 1,7 \cdot 10^{-10}$ с.

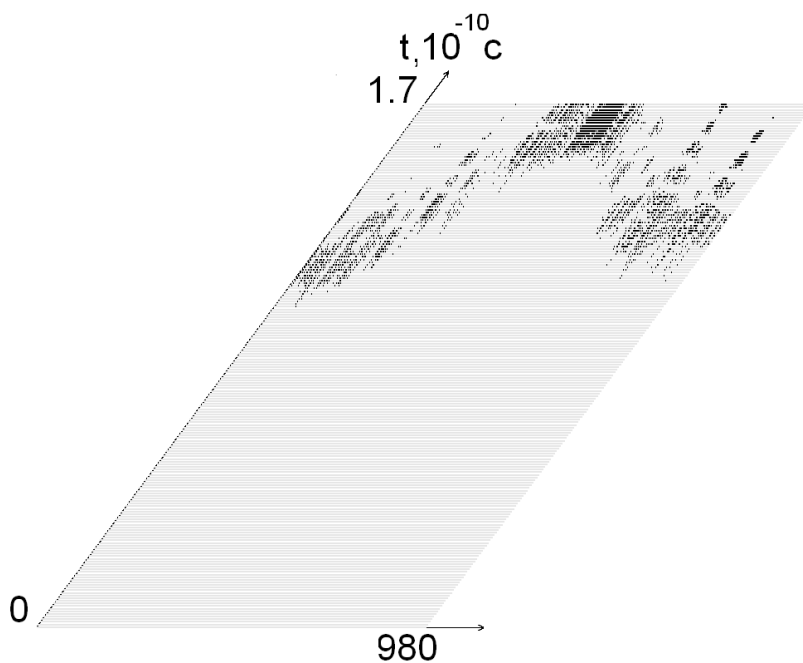


Рисунок 2.10 – Зоны возникновения открытых состояний (выделены чёрным цветом) на промежутке времени $[0, t_3]$.

Из рисунка 2.10 видно, что отдельные участки цепочки маятников могут «открываться», затем «закрываются» и через некоторое время вновь «открываться». «Кинкоподобных» перемещений открытых состояний вдоль цепочек не наблюдается.

Таким образом, в проведенной работе на основе математической модели, использующей аналогию между молекулой дизоксирибонуклеиновой кислоты и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников, исследована динамика молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты, обусловленная вращательным движением азотистых оснований вокруг пентозо-фосфатного двунитевого остова. Изучено влияние на характер решения таких факторов, как неоднородность цепочки азотистых оснований, свойства связи в комплементарных парах и образование открытых состояний. Установлено, что такие упрощения модели, как усреднение характеристик цепочки азотистых оснований или упрощение вида связи в их комплементарных парах существенно влияют на вид решения, снижая достоверность получаемых результатов. Поэтому разработанный подход к решению задачи вращательной динамики молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты в большей степени соответствует ее истинной биомеханике. Особое внимание уделено возникновению и динамике открытых состояний, и влиянию учёта открытых состояний на решение. Показано, что в рамках рассмотренной математической модели возможно появление открытых состояний и восстановление их закрытой структуры. Учет колебаний обеих нитей дизоксирибонуклеиновой кислоты позволяет описать сложный характер динамики открытых состояний, которая для рассмотренных в работе внешних воздействий не может быть сведена только к решениям типа «кинк» [124].

Полученные результаты представлены в Drobotenko M.I., Dzhimak S.S., Svidlov A.A., Basov A.A., Lyasota O.M., Baryshev M.G. A Mathematical Model for Basepair Opening in a DNA Double Helix // *Biophysics*. 2018. Vol. 63. № 2. P. 177–182.

2.2 Исследование закономерностей, возникающих при моделировании влияния вязкости внешней среды на диссипацию энергии колебательных движений азотистых оснований молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты

Колебания вязкости в ядре клетки имеют широкие пределы. Когда молекула дизоксирибонуклеиновой кислоты переходит из области высоких значений вязкости в область низких значений, могут возникать открытые состояния, пузырьки денатурации и расплетение нитей дизоксирибонуклеиновой кислоты. Стабилизация молекулы обеспечивается при помощи рассеивания энергии – диссипации за счет взаимодействия с окружающей средой. Отдельные участки молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты, находящейся в скрученном состоянии, могут испытывать суперспирализационное напряжение, которое в том числе, обусловлено сложными энтропийными эффектами, вызванными взаимодействием с растворителем. В данной работе на основе численного решения механической модели гена интерферона альфа 17 и фрагмента гена дрозофилы проведен анализ влияния вязкости внешней среды на динамику молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты и ее стабильность. Показано, что увеличение вязкости приводит к быстрой стабилизации угловых колебаний азотистых оснований, а уменьшение вязкости изменяет динамику дизоксирибонуклеиновой кислоты: увеличивается скорость изменения угловых отклонений азотистых оснований и угловые деформации нитей дизоксирибонуклеиновой кислоты увеличиваются в каждый момент времени. Эти процессы приводят к нестабильности дизоксирибонуклеиновой кислоты, которая со временем увеличивается. Таким образом, в работе рассматривается влияние вязкости внешней среды на диссипацию энергии колебательных движений азотистых оснований молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты. Изучение на основе описанной модели молекулярной динамики физиологических процессов при различных показателях реологического

поведения нуклеоплазмы позволит получить более глубокое понимание процессов неравновесной физики активного вещества в живом организме.

Вода является универсальным растворителем и средой, в которой происходит большинство биохимических и биофизических реакций в организме. В зависимости от химического, биохимического и даже изотопного состава среды может изменяться скорость и характер происходящих в ней биологических процессов [125-128]

Так, реорганизация молекул воды вносит значительный вклад в изменения энтальпии и энтропии дизооксирибонуклеиновой кислоты и протеинов [129-131].

От параметров растворителя зависит свободная энергия взаимодействия пар азотистых оснований молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты [132-135], а также локализация энергии в ней [136]. Кроме того, отмечена зависимость свободных энергий стэкинга азотистых оснований от водного окружения [137].

Было обнаружено, что смешивающиеся с водой эфиры этиленгликоля изменяют структуру, динамику и реакционную способность дизооксирибонуклеиновой кислоты с помощью механизмов, возможно, связанных с биологически значимым гидрофобным катализом. Спектроскопические данные и эксперименты с использованием оптического пинцета показывают, что при этом энергии складывания оснований снижаются, а водородные связи пар оснований усиливаются [138].

Таким образом, очевидно, что рассматривать биополимеры необходимо с учетом энтропии и их взаимодействия с водным окружением [139-141].

Изучение поведения нуклеиновых кислот под действием внешней силы при различных показателях энтропии в биологических молекулах является актуальной задачей [142, 143]. Необходимо отметить, что почти все взаимодействия нуклеопротеидов и манипуляции с дизооксирибонуклеиновой кислоты связаны с ее механическими деформациями. Вариации механических свойств дизооксирибонуклеиновой кислоты играют фундаментальную роль в

регуляции разнообразных процессов, вовлеченных в организацию хроматина в масштабе всего генома [144], а механика дизоксирибонуклеиновой кислоты является важным компонентом ее функциональных особенностей [144, 145]. На сегодняшний день механические модели являются мощным исследовательским методом [123, 146], не требующим наличия суперкомпьютера для проведения расчетов.

В нашей работе методом математического моделирования исследуется влияние вязкости внешней среды на внутреннюю динамику и стабильность молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты.

Для моделирования динамики молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты будем использовать математическую модель, описанную в предыдущем параграфе.

В уравнениях (2.1)-(2.6) первое слагаемое справа от знака равенства описывает силовое воздействие на i -й маятник со стороны упругой нити, второе слагаемое – со стороны парного маятника, третье слагаемое – внешнее силовое воздействие. Величина внешнего воздействия принимается равной $F_j^i(t) = -\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t) + M(t)$, где слагаемое $-\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t)$ моделирует эффекты диссипации, обусловленные взаимодействием с окружающей молекулу дизоксирибонуклеиновой кислоты жидкостью, слагаемое $M(t)$ задает внешнее воздействие.

Заметим, что предложенная модель не предусматривает возникновения открытых состояний за счет разрыва водородных связей.

Влияние вязкости внешней среды на динамику дизоксирибонуклеиновой кислоты будем исследовать на примере гена интерферона альфа 17 ($n = 980$) и фрагмента гена дрозофилы ($n = 5000$) [147]. Значения коэффициентов уравнений (2.1)-(2.6) приведены в таблице 2.1 (данные взяты из работы [117]). $M(t) = 10^{-22}$ Н·м, при таком значении $M(t)$ динамика угловых отклонений молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты практически не отличается от случая периодических внешних

воздействий вида $\cos(\omega t) \cdot 10^{-22}$ Н·м при $\omega \leq 10^9$ с⁻¹ [148]. Значения коэффициентов β_j^i в правой части уравнений (2.1)-(2.6), характеризующих вязкость внешней среды, будем брать равными соответствующим значениям β из таблицы 2.1, умноженным на параметр λ . Таким образом, изменению параметра λ будет соответствовать изменение вязкости внешней среды. Параметр λ взят от 0,1 до 4, поскольку вязкость окружающей среды может меняться в широких пределах [149].

Исследование динамики дизоксирибонуклеиновой кислоты проведено на основе численного решения задачи (2.1)-(2.8), результаты расчетов представлены в графическом виде.

Зависимость решения задачи (2.1)-(2.8) от вязкости будем определять с помощью угловых отклонений и средних угловых отклонений первой цепочки молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты:

$$\varphi(t) = n^{-1} \sum_{i=1}^n \varphi_1^i(t) \quad (2.12)$$

На рисунке 2.11 приведены графики угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале $[0; 2 \cdot 10^{-9}$ с] при $\lambda = 1,0$.

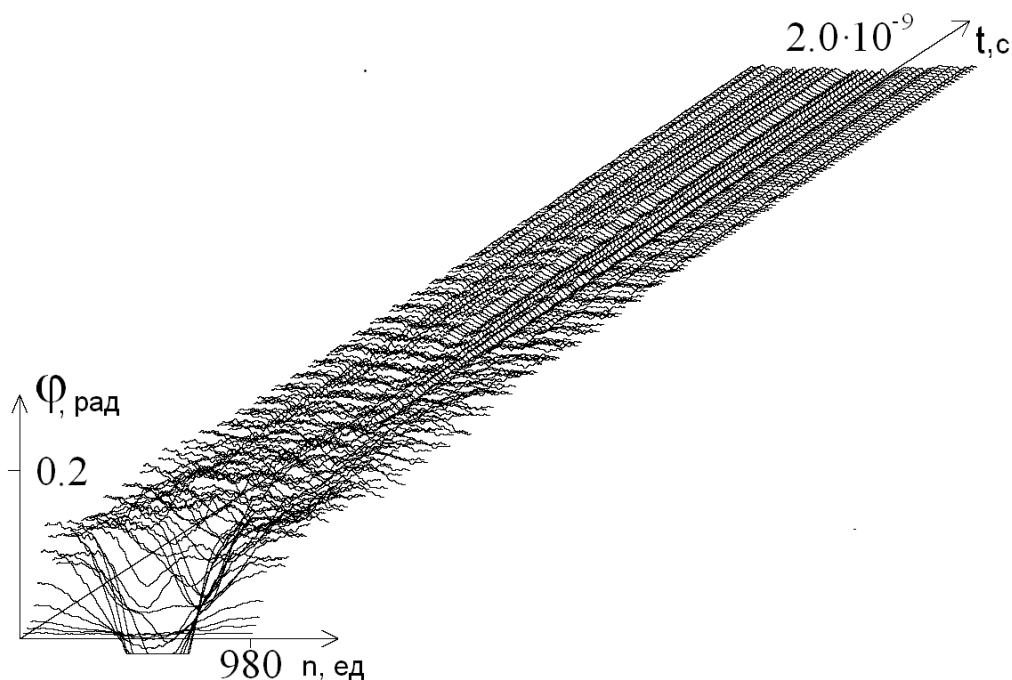


Рисунок 2.11 – Зависимости амплитуды угловых отклонений первой цепочки гена интерферона от времени на интервале $[0; 2 \cdot 10^{-9}$ с] при $\lambda = 1,0$.

Из рисунка 2.11 видно, что после выведения системы из равновесия происходит постепенная стабилизация амплитуды угловых колебаний.

На рисунке 2.12 приведены графики средних угловых отклонений 1-й цепочки гена интерферона на интервале $[0; 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$ для различных значений параметра λ .

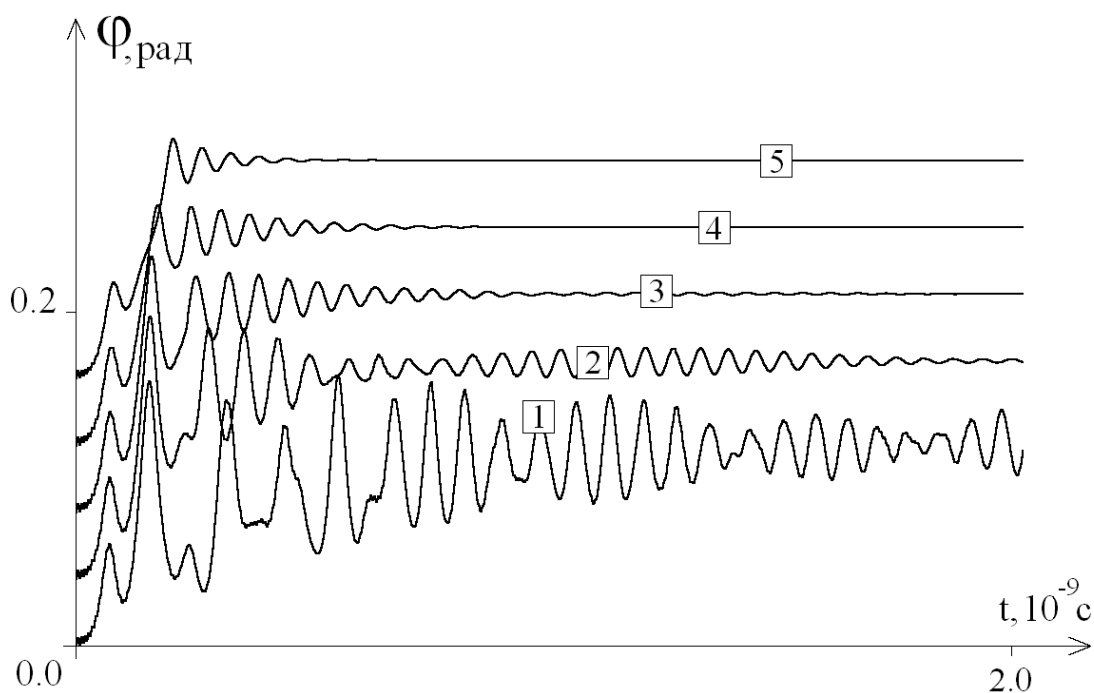


Рисунок 2.12 – Зависимости величины средних угловых отклонений первой цепочки гена интерферона от времени на интервале $[0; 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$: 1 - при $\lambda = 0,1$; 2 - при $\lambda = 0,5$; 3 - при $\lambda = 1,0$; 4 - при $\lambda = 2,0$; 5 - при $\lambda = 4,0$.

Из рисунка 2.12 видно, что уменьшение вязкости внешней среды приводит к увеличению амплитуды средних угловых отклонений азотистых оснований, что может привести к возникновению открытых состояний и расплетению молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты.

На рисунках 2.13 и 2.14 изображены графики угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале $[1,9 \cdot 10^{-9} \text{ с}; 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$ при $\lambda = 1,0$ и $\lambda = 0,1$ соответственно. Видно, что при $\lambda = 0,1$ графики угловых отклонений цепочки дидоксирибонуклеиновой кислоты изменяются во

времени значительно больше, чем при $\lambda = 1,0$, что объясняет увеличение амплитуды средних угловых отклонений. Кроме того, в каждый момент времени при $\lambda = 0,1$ первая цепочка дидоксирибонуклеиновой кислоты испытывает значительно большие угловые деформации, чем при $\lambda = 1,0$, что ведет к уменьшению стабильности молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты.

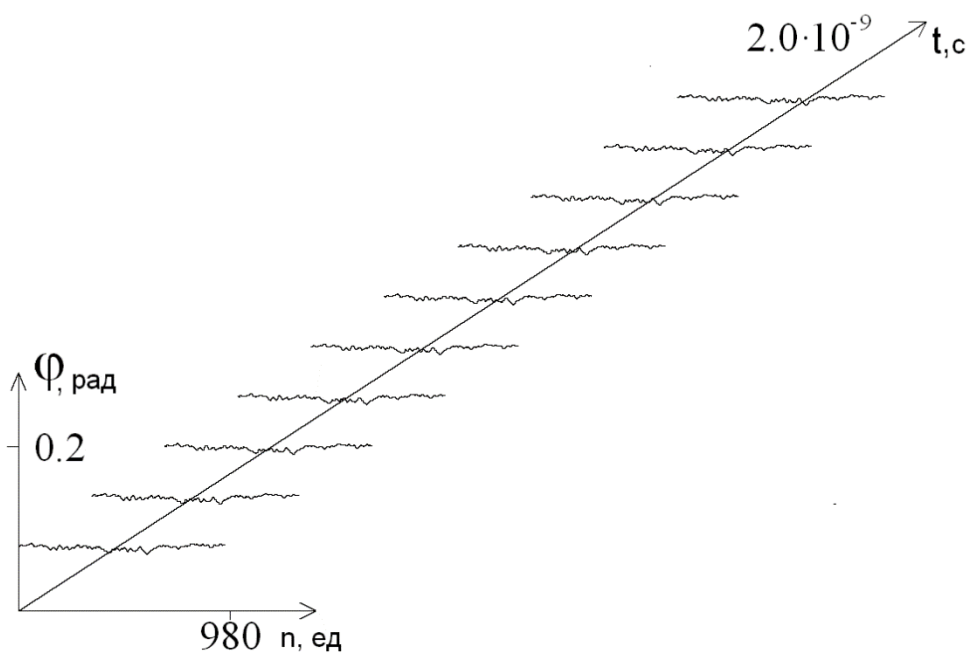


Рисунок 2.13 – Зависимость угловых отклонений первой цепочки гена интерферона от времени на интервале $[1,9 \cdot 10^{-9} \text{ с}; 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$ при $\lambda = 1,0$.

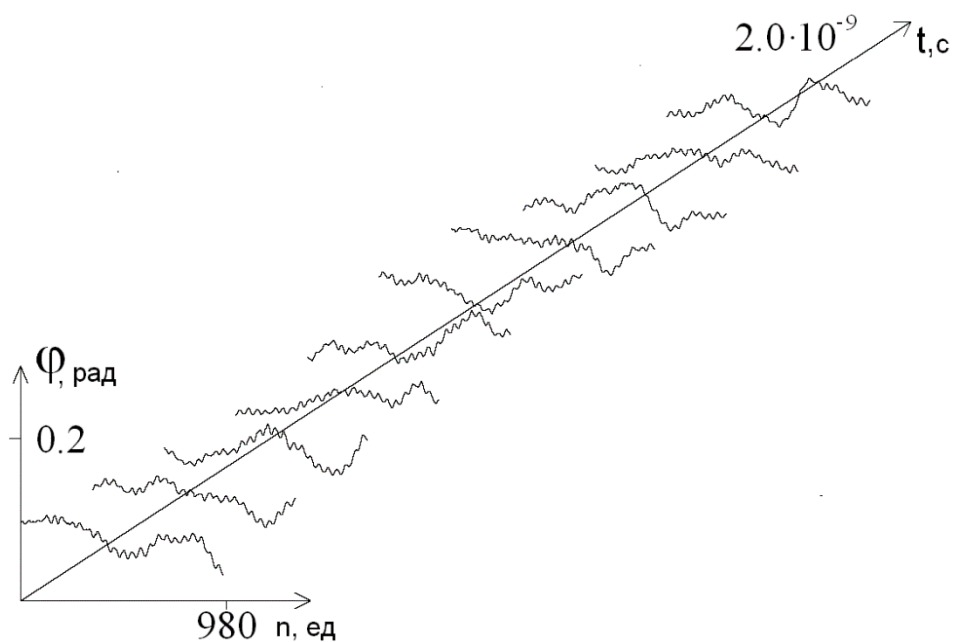


Рисунок 2.14 – Зависимость угловых отклонений первой цепочки гена интерферона от времени на интервале $[1,9 \cdot 10^{-9} \text{ с}, 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$ при $\lambda = 0,1$.

Для $\lambda = 0,1$ был увеличен временной интервал исследования до $[0; 6 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$, результаты приведены рисунке 2.15 (представлены графики средних угловых отклонений первой цепочки гена интерферона), на рисунках 2.16 и 2.17 изображены графики угловых отклонений первой цепочки гена интерферона на интервале $[5,9 \cdot 10^{-9} \text{ с}; 6 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$ при $\lambda = 1$ и $\lambda = 0,1$ соответственно.

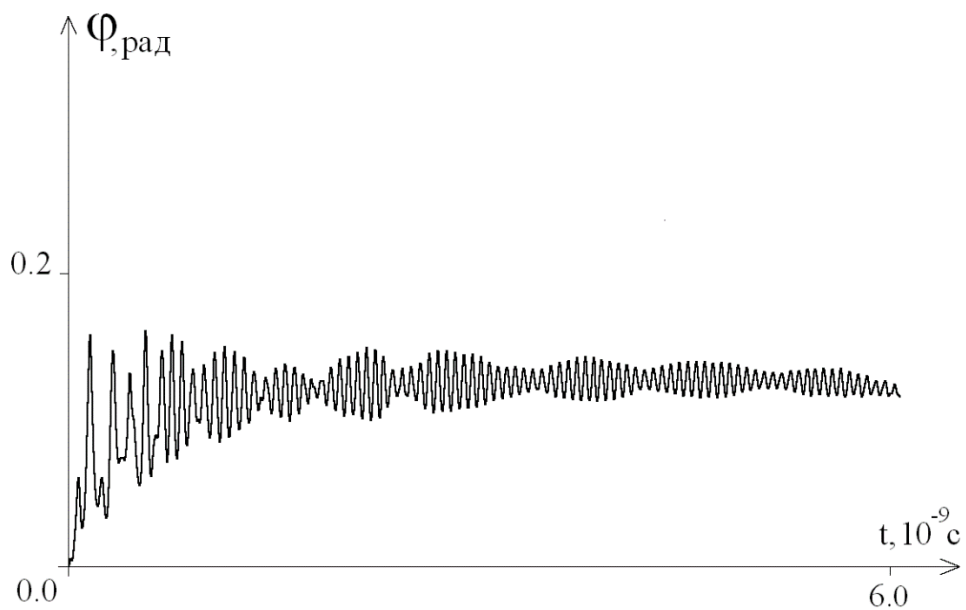


Рисунок 2.15 – Зависимость средних угловых отклонений первой цепочки гена интерферона от времени на интервале $[0; 6 \cdot 10^{-9}$ с] при $\lambda = 0,1$.

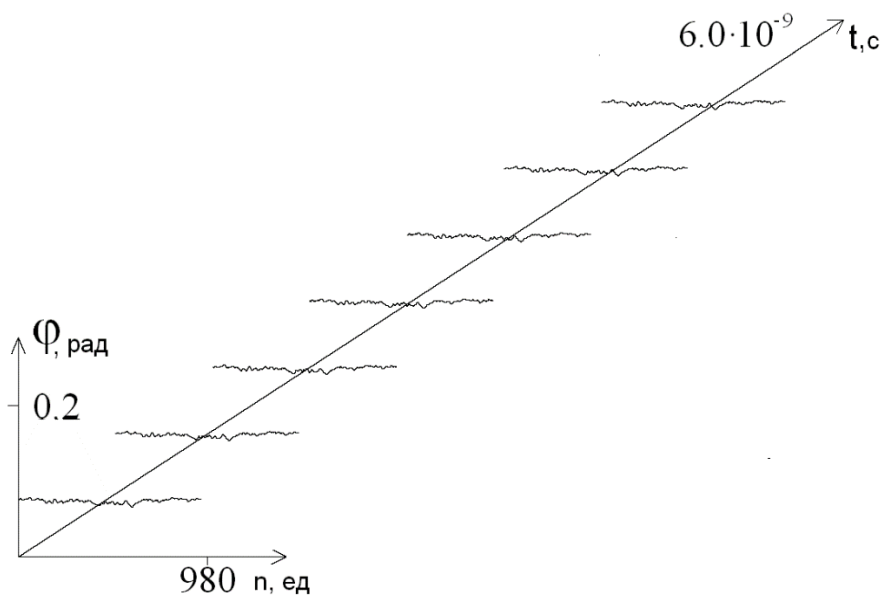


Рисунок 2.16 – Зависимость угловых отклонений первой цепочки гена интерферона от времени на интервале $[5,9 \cdot 10^{-9}$ с; $6 \cdot 10^{-9}$ с] при $\lambda = 1,0$.

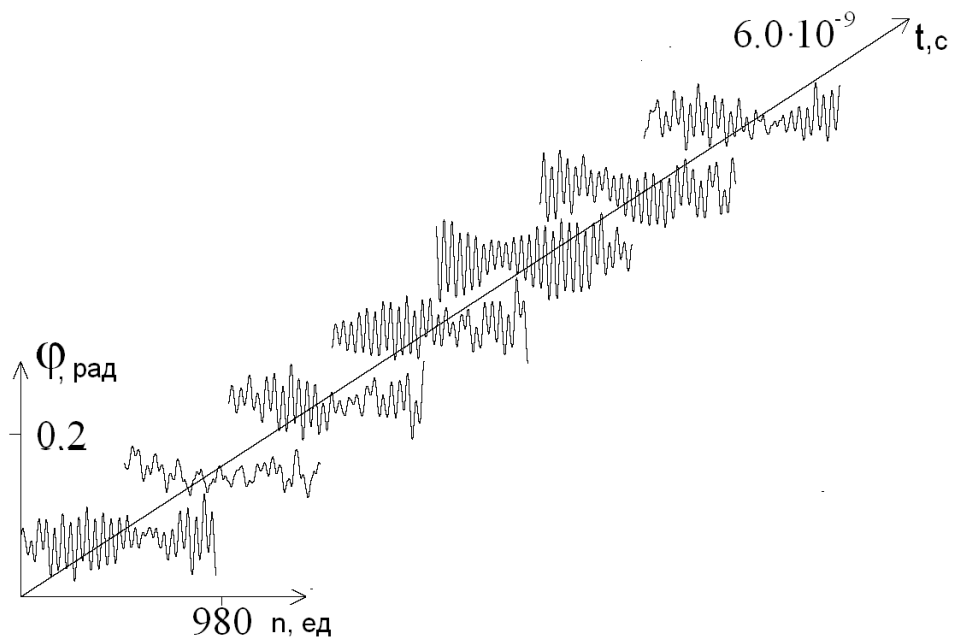


Рисунок 2.17 – Зависимость угловых отклонений первой цепочки гена интерферона от времени на интервале $[5,9 \cdot 10^{-9} \text{ с}; 6 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$ при $\lambda = 0,1$.

Из приведенных рисунков видно, что при малой вязкости растворителя ($\lambda = 0,1$) на достаточно длинном временном интервале не наблюдается затухание амплитуды угловых отклонений азотистых оснований (рассеивание энергии колебаний), т.е. происходит нарушение стабильности молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты.

На рисунке 2.18 приведены графики средних угловых отклонений первой цепочки фрагмента (5000 оснований) гена дрозофилы на интервале $[0; 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$ для различных значений параметра λ .

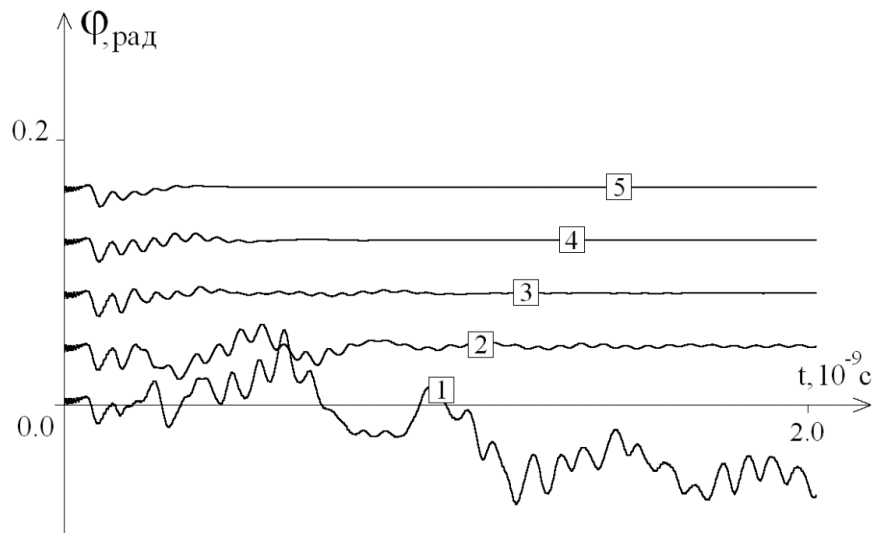


Рисунок 2.18 – Зависимость средних угловых отклонений первой цепочки фрагмента гена дрозофилы от времени на интервале $[0; 2 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$: 1 - при $\lambda = 0,1$; 2 - при $\lambda = 0,5$; 3 - при $\lambda = 1,0$; 4 - при $\lambda = 2,0$; 5 - при $\lambda = 4,0$.

На рисунке 2.19 приведены графики средних угловых отклонений первой цепочки фрагмента гена дрозофилы на интервале $[0; 6 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$ при $\lambda = 0,1$.

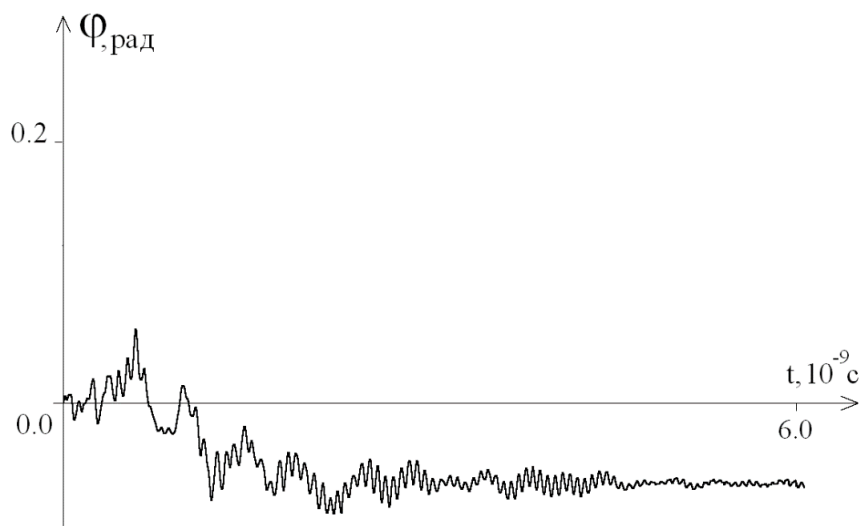


Рисунок 2.19 – Зависимость средних угловых отклонений первой цепочки фрагмента гена дрозофилы от времени на интервале $[0; 6 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$ при $\lambda = 0,1$.

Из рисунка 2.19 видно, что влияние вязкости внешней среды на динамику угловых колебаний молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты имеет тот же характер, что и для гена интерферона.

Известно, что динамика ряда внутриклеточных процессов, прежде всего транспорта биомолекул и органелл внутри ядра, а также особенности развития некоторых заболеваний, например, болезни Альцгеймера и Паркинсона, старение организма, различные формы рака, сопровождаются нарушениями работы генетического аппарата, в том числе ядрышка, что характеризуется также выраженными изменениями реологического поведения нуклеоплазмы, являющейся одним из ключевых механизмов развития данной патологии [150-152]. С помощью подходов микрореологии в ряде работ показано, что вязкость нуклеоплазмы, которая относится к содержанию внутренней части ядра за пределами ядрышек, и представляет собой растворенный хроматин, составляет от 25 до 1000 Па·с [153, 154], значительно превосходя вязкость ядрышек. Учитывая столь широкие колебания вязкости внутри ядра, исследование ее влияния на возникновение открытых состояний представляет особый интерес, т.к. при переходе молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты из области высоких значений вязкости в область низких ее значений, может приводить к возникновению открытых состояний [155], пузырьков денатурации [156] и расплетению нитей дидоксирибонуклеиновой кислоты. Причем большая вариабельность подобных угловых отклонений характерна для генов с меньшей последовательностью нуклеотидов, что ведет к возрастанию у них риска расплетения молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты, а следовательно, и сбоя считывания генетической информации, например, за счет дестабилизации суперспирализации дидоксирибонуклеиновой кислоты или нарушениях крутящего момента эукариотической РНК полимеразы. Описанные процессы могут реализовываться, например, за счет влияния вязкости окружающей молекулу дидоксирибонуклеиновой кислоты среды на кооперативные эффекты, которые наблюдаются при связывании низкомолекулярных лигандов и регуляторных

белков с дизооксирибонуклеиновой кислоты [157, 158] и аллостерическую регуляцию экспрессии генов [159, 160].

Стабилизация молекулы обеспечивается при помощи рассеивания энергии – диссипации за счет взаимодействия с окружающей средой [161]. Необходимо отметить, что гидратная оболочка молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты неоднородна (как на границе раздела дизооксирибонуклеиновой кислоты-вода, так и в малой бороздке, где флуктуации ширины канавки происходят в том же временном масштабе, что и перестройки водородных связей воды) [162]. Отдельные участки молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты, находящейся в скрученном состоянии, могут испытывать суперспирализационное напряжение [122], которое в том числе, обусловлено сложными энтропийными эффектами, вызванными взаимодействием с растворителем [163]. Однако, на данном этапе развития нашей модели, мы не разделяем фазы водного окружения, а считаем всю воду вокруг молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты одинаковой, создающей общую вязкость. При этом, модель позволяет учитывать влияние вязкости на любые участки молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты.

Таким образом, результаты расчетов указывают на адекватность используемой механической модели и значений коэффициентов. Как было отмечено ранее, механические модели дизооксирибонуклеиновой кислоты являются мощнейшим средством исследования ее свойств [164]. При этом, используемая нами механическая модель учитывает неоднородность последовательности пар нуклеотидов, энергию водородных связей между парами азотистых оснований, взаимодействие с окружающей средой, возникновение открытых состояний, позволяет заменять атом водорода на дейтерий в водородных связях между парами оснований и т.д. Модель позволяет производить расчеты следующих параметров: вероятности возникновения открытых состояний в зависимости от критической энергии водородных связей; вероятность возникновения пузырьков денатурации различной длины по всему гену [165]; определять наиболее вероятные места

возникновения открытых состояний в гене [4]; рассчитывать частоты колебаний гена в зависимости от внешнего воздействия [148] и т.д. Далее рассмотрим указанные эффекты.

Представленные результаты опубликованы в: Svidlov A., Drobotenko M., Basov A., Gerasimenko E., Elkina A., Baryshev M., Nechipurenko Y., Dzhimak S. Influence of environmental parameters on the stability of the DNA molecule // Entropy. 2021. Vol. 23(11). P. 1446. <https://doi.org/10.3390/e23111446>

2.3 Теоретическое исследование влияния внешнего торсионного момента динамику молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты, с учетом известных экспериментальных данных

Открытые состояния (ОС) являются одним из факторов, влияющих на ряд биохимических процессов, играют важную роль в процессах транскрипции и репликации, а также в дизоксирибонуклеиновой кислоты-белковом узнавании при репарации нуклеиновых кислот [4, 145, 156, 165, 166].

Процесс образования и динамики зон ОС двухцепочечной молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты в значительной степени определяются ее механическими показателями, важнейшим из которых является торсионный момент [164, 167, 168].

Отмечено, что торсионный момент дизоксирибонуклеиновой кислоты может играть важную роль в процессе транскрипции [169-171].

В связи с этим значительно возросла значимость исследований отдельных молекул в биологических системах, быстро развиваются экспериментальные исследования по измерению торсионного момента в молекулах дизоксирибонуклеиновой кислоты, значимого для ее динамики [172-174].

Так, в работах [175, 176] с помощью угловой оптической ловушки и магнитного пинцета была измерена величина торсионного момента, приводящего к расплетению двойной спирали дизоксирибонуклеиновой кислоты.

В работе [177] величину торсионного момента, необходимого для плавления дизоксирибонуклеиновой кислоты определяли из разницы между работой по растягиванию одной намотанной молекулы и работой, проделанной при растяжении одной перемотанной молекулы на такое же количество витков.

Обнаружено, что рибонуклеиновая кислота-полимераза способна генерировать торсионный момент, достаточный чтобы изменить структуру дизоксирибонуклеиновой кислоты [178].

Однако, экспериментальное исследование динамики дизоксирибонуклеиновой кислоты и возникновения ОС ограничено пространственным разрешением доступных биофизических инструментов [122, 179].

Более полное описание механики дизоксирибонуклеиновой кислоты можно получить, если объединить данные о ее механических показателях и исследовать ее движения. Такой подход возможен в рамках математического моделирования [123].

В данной работе исследована динамика возникновения ОС под влиянием торсионного момента с различной пространственной и временной локализацией. Описываемые процессы относятся к механическим свойствам дизоксирибонуклеиновой кислоты, что позволяет адекватно учесть различные аспекты функционирования молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты в рамках механической математической модели относительно угловых движений азотистых оснований [5, 148, 180].

Таким образом, модернизированная математическая модель угловых движений включает следующие уравнения Ньютона:

$$I_1^i \frac{d^2 \varphi_1^i(t)}{dt^2} = K_1^i [\varphi_1^{i-1}(t) - 2\varphi_1^i(t) + \varphi_1^{i+1}(t)] - \delta^i (k_{12}^i R_1^i (R_1^i + R_2^i) \sin \varphi_1^i + k_{12}^i R_1^i R_2^i \sin(\varphi_1^i - \varphi_2^i)) + F_1^i(t), i = \overline{2, n-1}, \quad (2.13)$$

$$I_1^1 \frac{d^2 \varphi_1^1(t)}{dt^2} = K_1^1 [\varphi_1^2(t) - \varphi_1^1(t)] - \delta^i (k_{12}^1 R_1^1 (R_1^1 + R_2^1) \sin \varphi_1^1 + k_{12}^1 R_1^1 R_2^1 \sin(\varphi_1^1 - \varphi_2^1)) + F_1^1(t), \quad (2.14)$$

$$I_1^n \frac{d^2 \varphi_1^n(t)}{dt^2} = K_1^n [\varphi_1^{n-1}(t) - \varphi_1^n(t)] - \delta^i (k_{12}^n R_1^n (R_1^n + R_2^n) \sin \varphi_1^n + k_{12}^n R_1^n R_2^n \sin(\varphi_1^n - \varphi_2^n)) + F_1^n(t), \quad (2.15)$$

$$I_2^i \frac{d^2 \varphi_2^i(t)}{dt^2} = K_2^i [\varphi_2^{i-1}(t) - 2\varphi_2^i(t) + \varphi_2^{i+1}(t)] + \delta^i (k_{12}^i R_2^i (R_1^i + R_2^i) \sin \varphi_2^i - k_{12}^i R_1^i R_2^i \sin(\varphi_2^i - \varphi_1^i)) + F_2^i(t), \quad i = \overline{2, n-1}, \quad (2.16)$$

$$I_2^1 \frac{d^2 \varphi_2^1(t)}{dt^2} = K_2^1 [\varphi_2^2(t) - \varphi_2^1(t)] + \delta^i (k_{12}^1 R_2^1 (R_1^1 + R_2^1) \sin \varphi_2^1 - k_{12}^1 R_1^1 R_2^1 \sin(\varphi_2^1 - \varphi_1^1)) + F_2^1(t), \quad (2.17)$$

$$I_2^n \frac{d^2 \varphi_2^n(t)}{dt^2} = K_2^n [\varphi_2^{n-1}(t) - \varphi_2^n(t)] + \delta^i (k_{12}^n R_2^n (R_1^n + R_2^n) \sin \varphi_2^n - k_{12}^n R_1^n R_2^n \sin(\varphi_2^n - \varphi_1^n)) + F_2^n(t). \quad (2.18)$$

где

$\varphi_j^i(t)$ – угловое отклонение i -го маятника j -й цепочки, отсчитываемое против часовой стрелки, в момент времени t ;

I_j^i – момент инерции i -го маятника j -й цепочки;

R_j^i – расстояние от центра масс i -го маятника j -й цепочки до нити;

K_j^i – константа, характеризующая крутящий момент i -го участка j -й нити;

k_{12}^i – константа, характеризующая упругие свойства связи i -й пары маятников;

$F_j^i(t)$ – внешнее силовое воздействие на i -й маятник j -й цепочки в момент времени t ,

n – количество пар маятников в рассматриваемой системе.

В уравнениях (2.13)-(2.18) первое слагаемое справа от знака равенства описывает силовое воздействие на i -й маятник со стороны упругой нити, второе слагаемое – со стороны парного маятника, третье слагаемое – внешнее силовое воздействие. Величина внешнего воздействия принимается равной $F_j^i(t) = -\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t) + M^i(t)$, где слагаемое $-\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t)$ моделирует эффекты диссипации, обусловленные взаимодействием с окружающей молекулу дизооксирибонуклеиновой кислоты жидкостью, слагаемое $M^i(t)$ – торсионный момент.

Уравнения (2.13)-(2.18) позволяют моделировать водородную связь в i -й паре ($\delta^i = 1$) и разрыв этой связи ($\delta^i = 0$). Будем считать, что в i -й паре оснований возникает разрыв, если потенциальная энергия связи в этой паре превышает некоторое критическое значение E_H : связь восстанавливается, если ее потенциальная энергия становится меньше E_H и $-\pi < \varphi_1^i < \pi$, $0 < \varphi_2^i < 2\pi$.

К уравнениям (2.13)-(2.18) добавим начальные условия:

$$\varphi_1^i(0) = \varphi_{1,0}^i, \frac{d\varphi_1^i}{dt}(0) = \varphi_{1,1}^i, \quad (2.19)$$

$$\varphi_2^i(0) = \varphi_{2,0}^i, \frac{d\varphi_2^i}{dt}(0) = \varphi_{2,1}^i, i = \overline{1, n}. \quad (2.20)$$

Для определенности будем считать, что в начальных условиях (2.19)-(2.20)

$$\varphi_{1,0}^i = \varphi_{1,1}^i = \varphi_{2,1}^i = 0, \varphi_{2,0}^i = \pi, i = \overline{1, n}. \quad (2.21)$$

Процесс образования и динамики зон ОС в молекуле дидоксирибонуклеиновой кислоты исследовался на основе численного решения задачи (2.13)-(2.20).

Исследования проводили на примере гена, кодирующего интерферон alpha 17. Для этого гена $n = 980$, значения коэффициентов уравнений (2.13)-(2.18) приведены в таблице 2.1, значение энергии, необходимое для разрыва одной водородной связи, равно $E_H = 34,774 \text{ пН} \cdot \text{нм} \approx 5 \text{ ккал/моль}$ (данные взяты из [5]).

Пусть $M^i(t) = M_0 \cdot 1 \text{ пН} \cdot \text{нм}$, $i = \overline{1, n}$, $T_0 = 10^{-10} \text{ с}$. Расчеты на отрезке $[0, 3T_0]$ для M_0 с шагом равным 0,001 показывают, что зоны ОС возникают при $M_0 \geq 13,173$.

На рисунках 2.20 и 2.21 приведены графики угловых отклонений первой цепочки молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты при $M_0 = 13,172$ на отрезках $[0, T_0]$ и $[2T_0, 3T_0]$ соответственно.

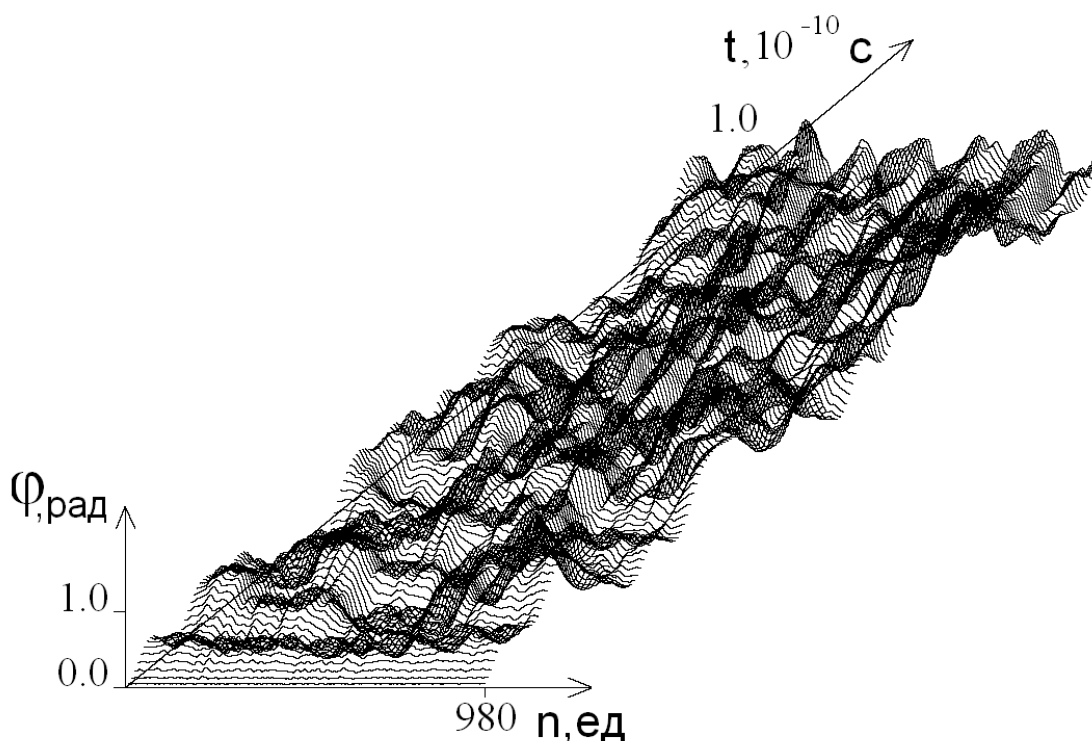


Рисунок 2.20 – Зависимость угловых отклонений 1-й цепочки молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты от времени при $M_0 = 13,172$ на отрезке $[0, T_0]$

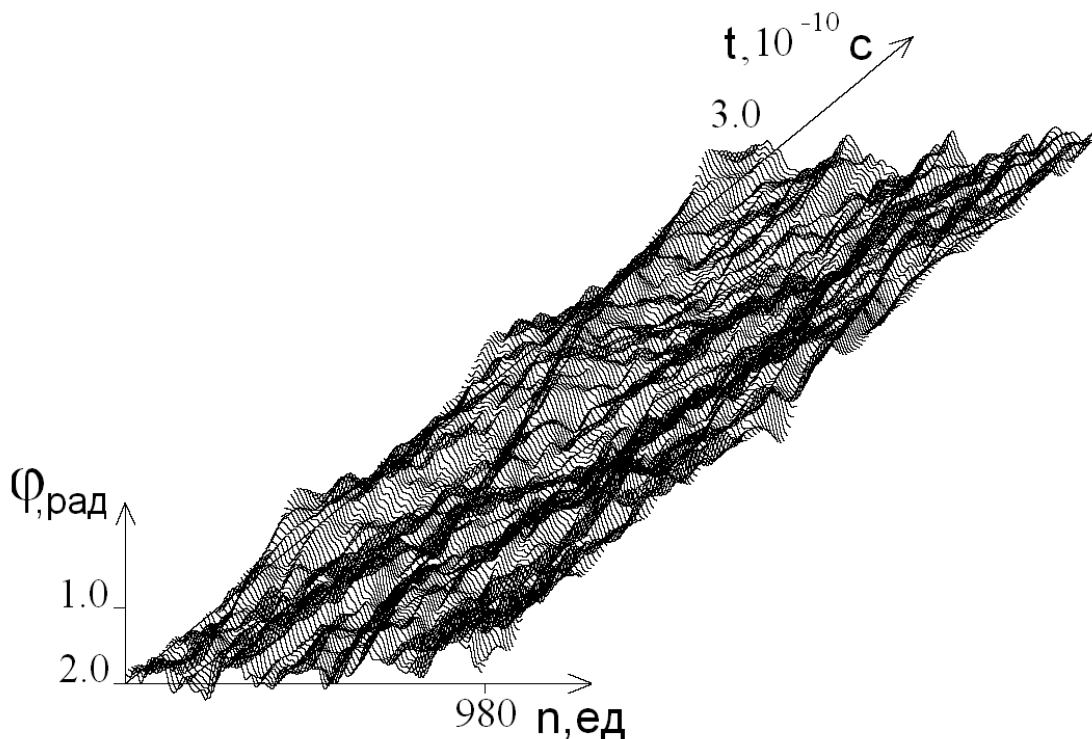


Рисунок 2.21 – Зависимость угловых отклонений 1-й цепочки молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты от времени при $M_0 = 13,172$ на отрезке времени $[2T_0, 3T_0]$

На рисунке 2.22 приведены графики средних угловых отклонений 1-й (тонкая линия) и 2-й (толстая линия) цепочек молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты (при $M_0 = 13,172$), т.е. величин

$$\varphi_j(t) = n^{-1} \sum_{i=1}^n \varphi_j^i(t), j = 1, 2 \quad (2.22)$$

Результаты расчетов для различных значений M_0 из диапазона $13,173 \div 16$ отображены на рисунке 2.23; участки ОС в парах А – Т выделены зеленым цветом, в парах G – C – красным.

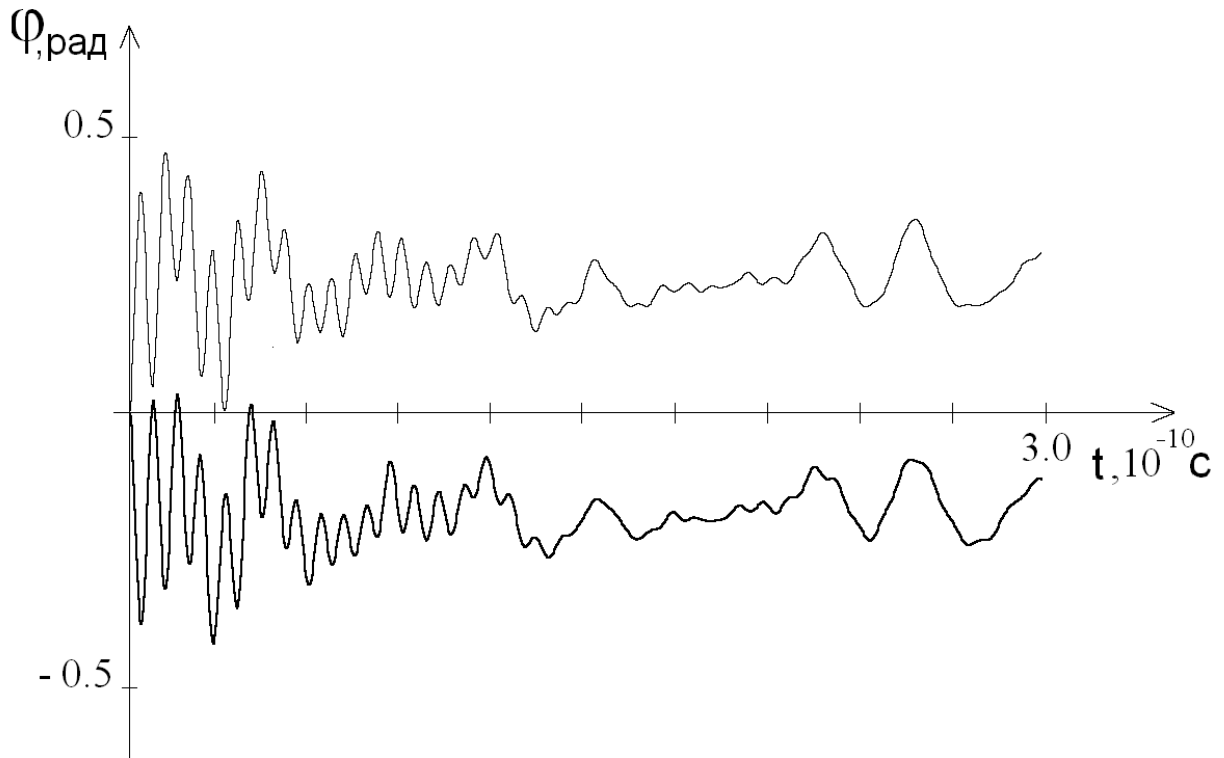


Рисунок 2.22 – Зависимости от времени величины средних угловых отклонений 1-й (тонкая линия) и 2-й (толстая линия) цепочек азотистых оснований дидоксирибонуклеиновой кислоты при $M_0 = 13,172$ на отрезке времени $[0, 3T_0]$

Из рисунков 2.20 и 2.21 видно, что при $t \geq T_0$ амплитуда угловых отклонений цепочек молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты уменьшается, а рис. 2.21 показывает, что при этом уменьшается и разность средних угловых отклонений $\varphi_1(t) - \varphi_2(t)$; этим объясняется, что при таких $t > T_0$ не образуются новые зоны ОС, приводящие к расплетению молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты. Поэтому дальнейшие расчеты проводили на отрезке $[0, T_0]$.

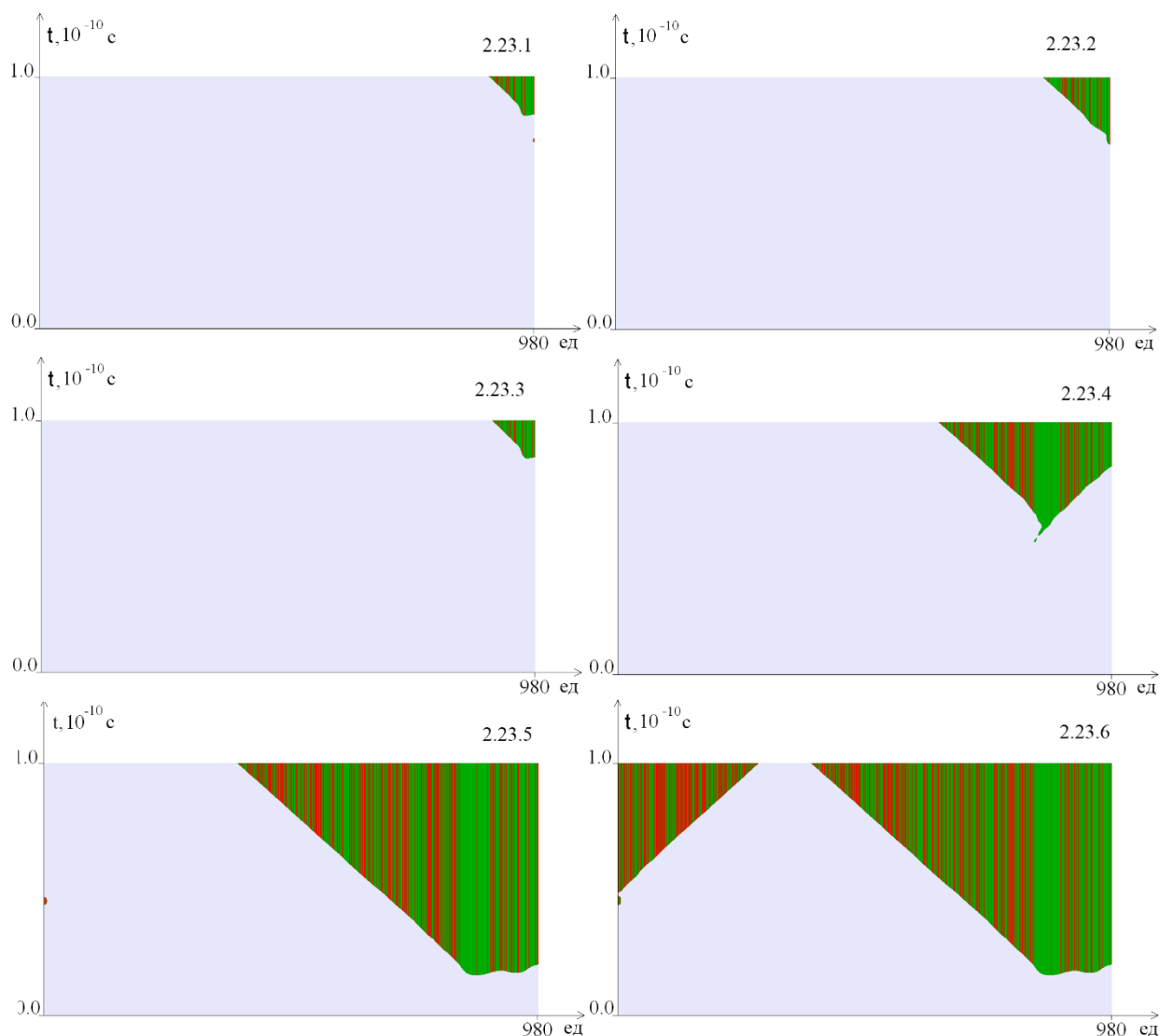


Рисунок 2.23 – Участки ОС при воздействии на молекулу дизоксирибонуклеиновой кислоты с различными значениями торсионного момента M_0 : 2.23.1 – при $M_0 = 13,173$, 2.23.2 – при $M_0 = 13,185$, 2.23.3 – при $M_0 = 13,210$, 2.23.4 – при $M_0 = 13,673$, 2.23.5 – при $M_0 = 15,794$, 2.23.6 – при $M_0 = 15,795$. Зеленым цветом обозначены ОС в парах А-Т, красным – в парах G-C.

Из рисунка 2.23 видно, что с увеличением значения торсионного момента M_0 , происходит увеличение зоны ОС. Из рисунков 2.23.4-2.23.6 видно, что при увеличении значения M_0 , зарождение ОС начинается в зоне, насыщенной парами А-Т. При значительном увеличении торсионного момента

($M_0 \geq 15,795$) зоны ОС начинают образовываться вблизи левого края молекулы (Рис. 2.23.6).

Для графического представления динамики этих процессов был построен график вероятности (в процентах) возникновения ОС для M_0 , лежащих в диапазоне $130 \div 160$ (Рис. 2.24).

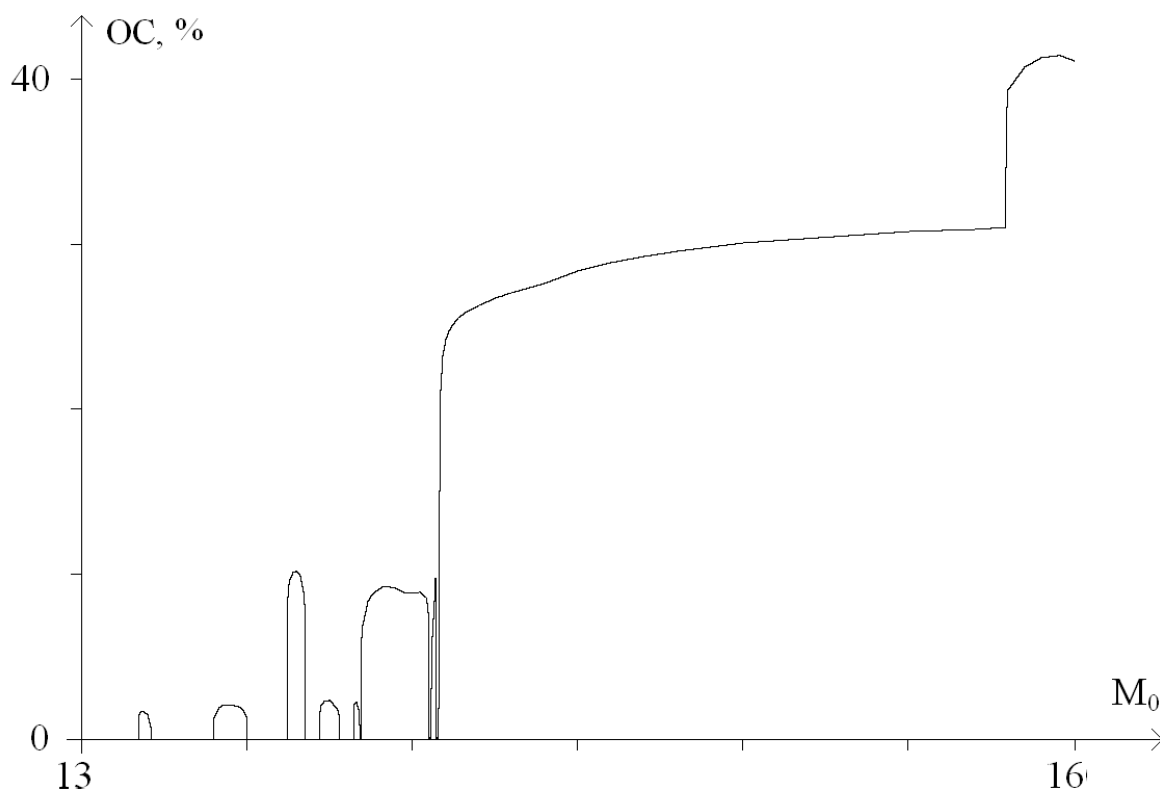


Рисунок 2.24 – Зависимость вероятности (в процентах) возникновения ОС от величины постоянного торсионного момента

Из рисунка 2.24 видно, что с увеличением торсионного момента в диапазоне от 13 до 14,1 наблюдается нелинейная зависимость вероятности возникновения ОС. А при $M_0 > 14,1$ наблюдается резкий рост вероятности возникновения ОС до 27 %. Далее при $14,1 < M_0 < 15,6$ наблюдается плавное возрастание вероятности возникновения ОС с 27 % до 32 % и резкий рост при $M_0 > 15,6$, что соответствует рисункам 2.23.5 и 2.23.6.

Известно, что в реальных условиях действие торсионного момента, создаваемого РНК происходит не на весь ген, а на его промоторную часть.

Поэтому ниже приведены расчеты для локализованного торсионного момента, действующего на разные участки гена интерферона альфа.

Пусть $M^i(t) = M_0^i \cdot 1pN \cdot nm$ $i = \overline{1, n}$, $t \in [0, T_0]$, причем $M_0^i(t) = M_0$ при $1 \leq i_1 \leq i \leq i_2 \leq n$ и $M_0^i = 0$ для остальных значений i . Такое торсионное воздействие будем называть пространственно локализованным на отрезке $[i_1, i_2]$

На рисунках 2.25-2.32 изображены результаты расчетов, полученные для значений торсионного момента, локализованного на отрезках длиной 100 пар оснований: $[1,100]$, $[101,200]$, $[781,880]$ и $[881,980]$.

На рисунке 2.25 изображены участки ОС под действием торсионного момента, локализованного на отрезке $[1,100]$. Видно, что при увеличении значения M_0 , увеличиваются зоны ОС. Отметим, что зона с 1 по 100 пары азотистых оснований гена интерферона альфа содержит большое количество G-C пар.

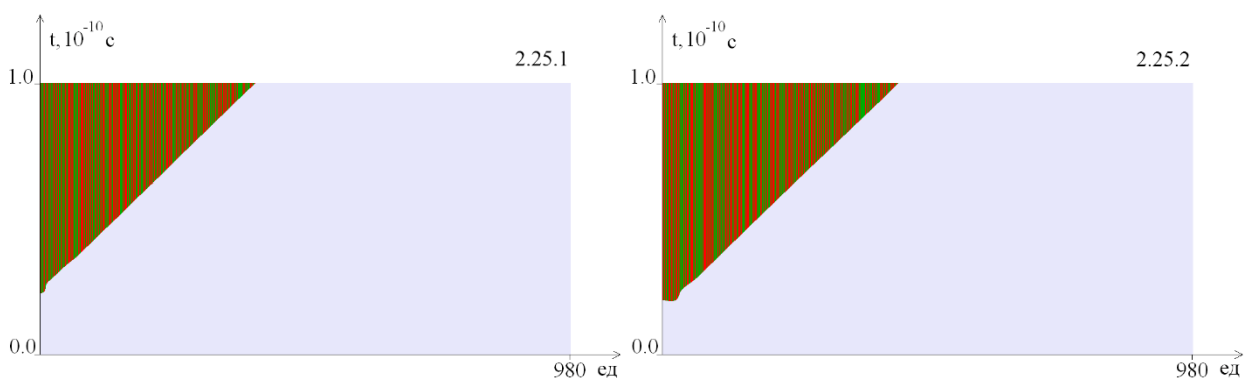


Рисунок 2.25 – Участки ОС при воздействии на 1-100 пары азотистых оснований молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты с различными значениями локального торсионного момента M_0 : 2.25.1 – при $M_0 = 16,8$; 2.25.2 – при $M_0 = 16,9$; Зеленым цветом обозначены ОС в парах А-Т, красным – в парах G-C

На рисунке 2.26 изображены участки ОС под действием торсионного момента, локализованного на отрезке $[101, 200]$.

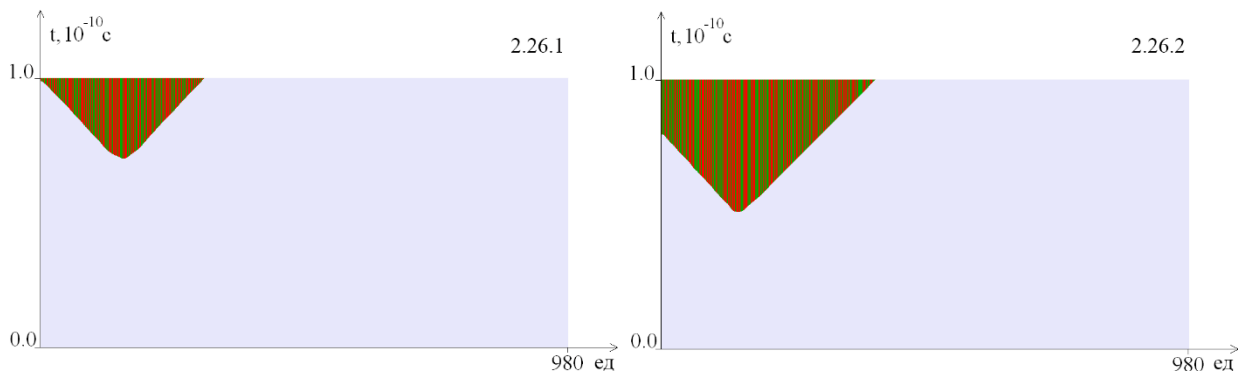


Рисунок 2.26 – Участки ОС под действием локального торсионного момента (M_0 : 2.26.1 – при $M_0 = 22,2$, 2.26.2 – при $M_0 = 22,3$) на основания 101-200. Зеленым цветом обозначены ОС в парах А-Т, красным – в парах G-С.

На рисунке 2.27 приведены графики вероятности возникновения ОС под действием торсионного момента, локализованного на отрезках [1, 100] и [101, 200].

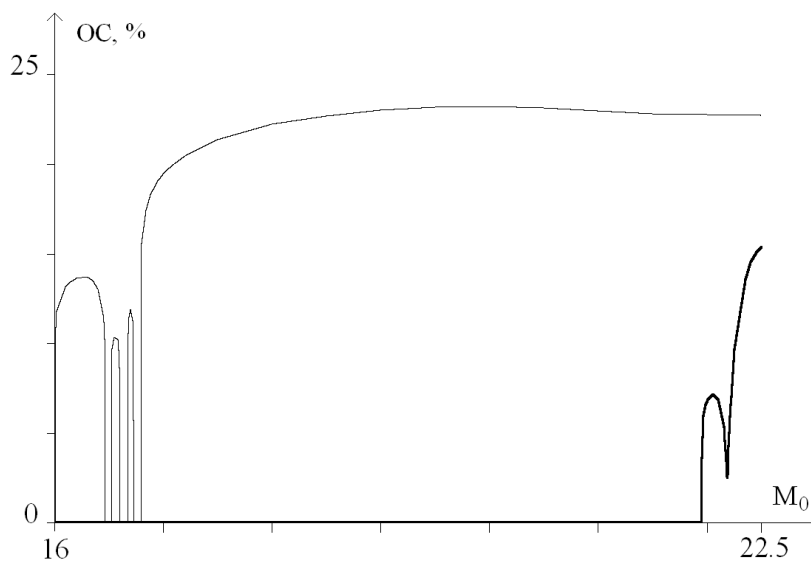


Рисунок 2.27 – Зависимости вероятности (в процентах) возникновения ОС от величины торсионного момента, локализованного на отрезке [1,100] (тонкая линия) и на отрезке [101,200] (толстая линия).

Из рисунка 2.26 видно, что при увеличении значения M_0 , также увеличиваются зоны ОС. Отметим, что для возникновения зон ОС требуется

большее значение торсионного момента M_0 , чем при его локализации на отрезке $[1, 100]$. Это можно объяснить тем, что для возникновения ОС при локализации торсионного воздействия на конце молекулы требуется меньшее количество энергии.

На рисунке 2.28 представлены графики угловых отклонений 1-й цепочки молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты под действием торсионного момента, локализованного на отрезке $[781, 880]$ при $M_0 = 15,045$, при котором еще не происходит возникновения ОС.

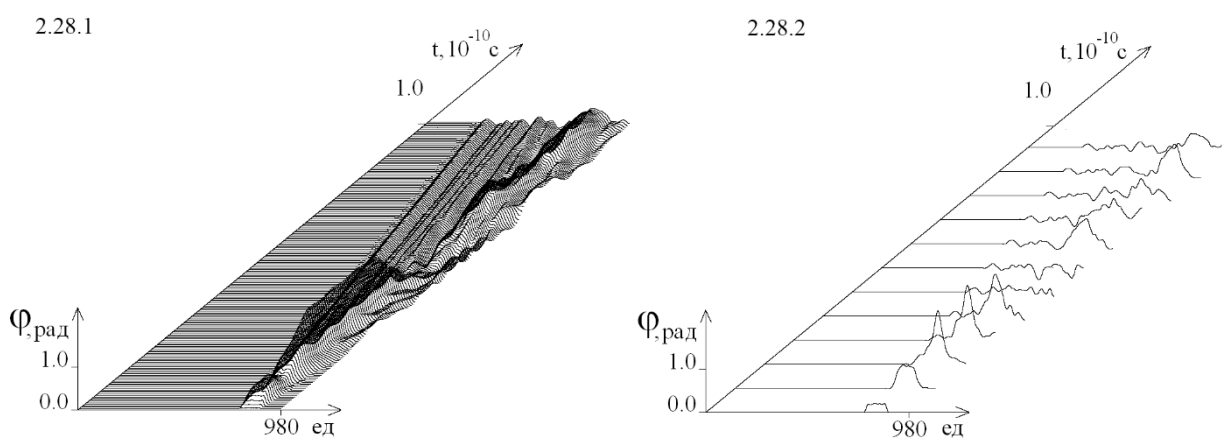


Рисунок 2.28 – Зависимости от времени величины угловых отклонений 1-й цепочки молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты под действием торсионного момента, локализованного на отрезке $[781, 880]$ при $M_0 = 15.045$ на отрезке времени $[0, T_0]$. На 2.28.1 изображено 200 графиков, а на 2.28.2 – 12 графиков.

На рисунке 2.29 изображены участки ОС под действием торсионного момента, локализованного на отрезке $[781, 880]$. Видно, что возникновение ОС при локализации торсионного момента на участке, богатом А-Т парами начинается при меньших значениях торсионного момента, чем при локализации на отрезках $[1, 100]$ и $[101, 200]$. На рисунке 2.30 представлены графики угловых отклонений 1-й цепочки молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты под действием торсионного момента, локализованного на отрезке $[881, 980]$ при $M_0 = 14,032$, при котором еще не происходит возникновения ОС.

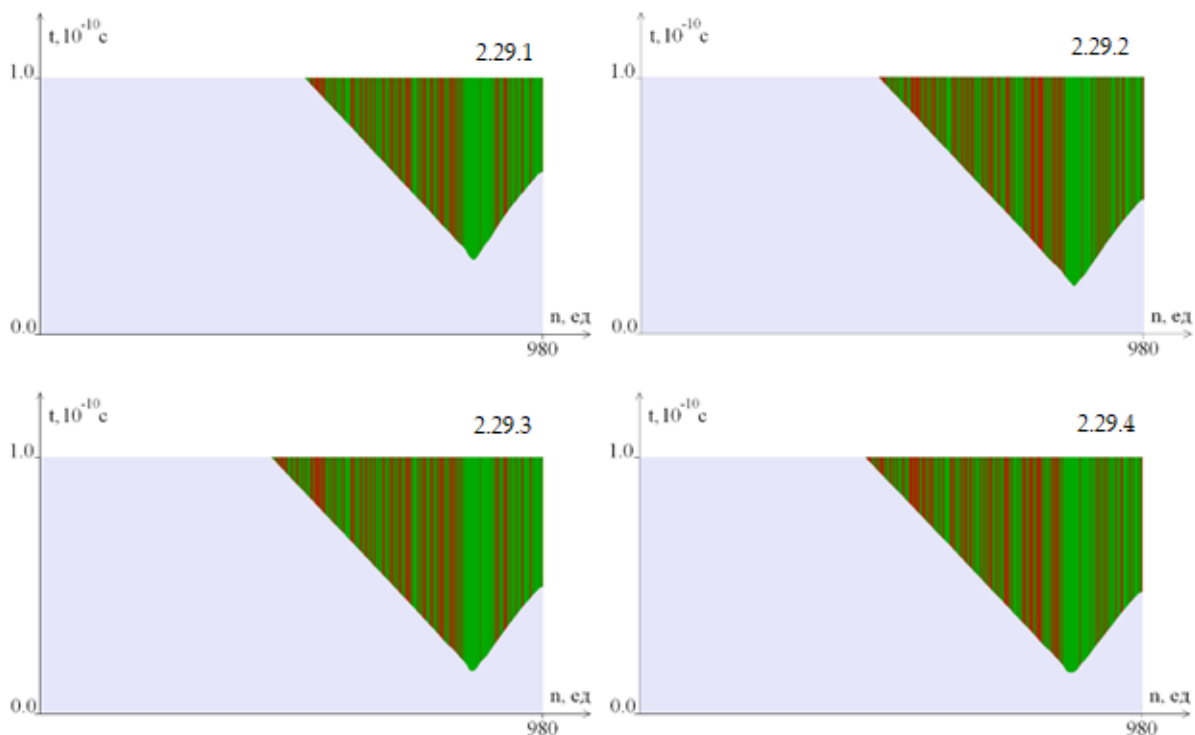


Рисунок 2.29 – Участки ОС, возникающие под действием торсионного момента, локализованного на отрезке [781, 880] с различными значениями (M_0 : 2.29.1 – при $M_0 = 15,046$, 2.29.2 – при $M_0 = 15,2$, 2.29.3 – при $M_0 = 15,5$, 2.29.4 – при $M_0 = 16$). Зеленым цветом обозначены ОС в парах А-Т, красным – в парах G-C.

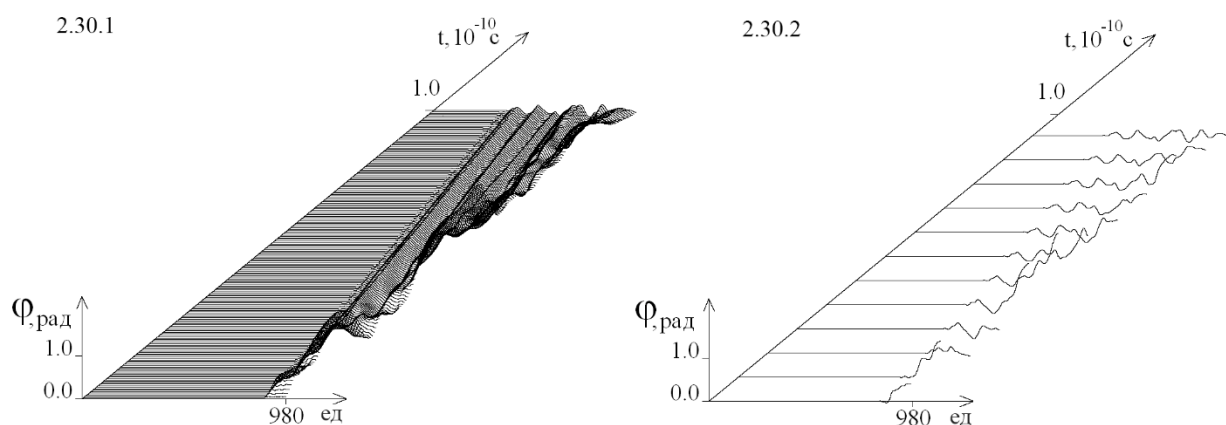


Рисунок 2.30 – Зависимости от времени величины угловых отклонений 1-й цепочки молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты под действием торсионного момента, локализованного на отрезке [881, 980] при $M_0 = 14,032$ на отрезке времени $[0, T_0]$. На рисунке слева изображено 200 графиков, а на рисунке справа – 12 графиков.

На рисунке 2.31 изображены участки ОС под действием торсионного момента, локализованного на отрезке [881, 980]. Видно, что возникновение ОС в данном случае происходит при еще меньших значениях торсионного момента, чем при локализации на отрезке [781, 880], что можно объяснить концевым эффектом.

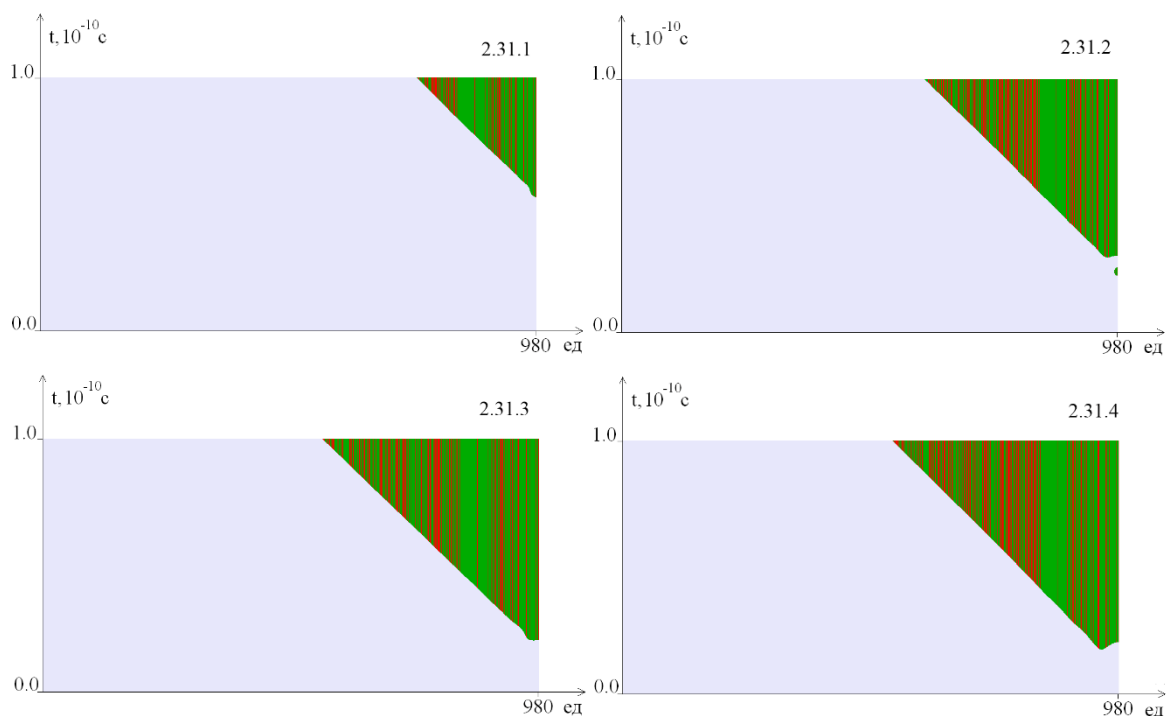


Рисунок 2.31 – Участки ОС, возникающие под действием торсионного момента, локализованного на отрезке [881, 980] для различных значений M_0 : 2.31.1 – при $M_0 = 14,033$, 2.31.2 – при $M_0 = 14,63$, 2.31.3 – при $M_0 = 15$, 2.31.4 – при $M_0 = 16$. Зеленым цветом обозначены ОС в парах А-Т, красным – в парах G-С.

На рисунке 2.32 приведены графики вероятности возникновения ОС под действием торсионного момента, локализованного на отрезках [781, 880] и [881, 980].

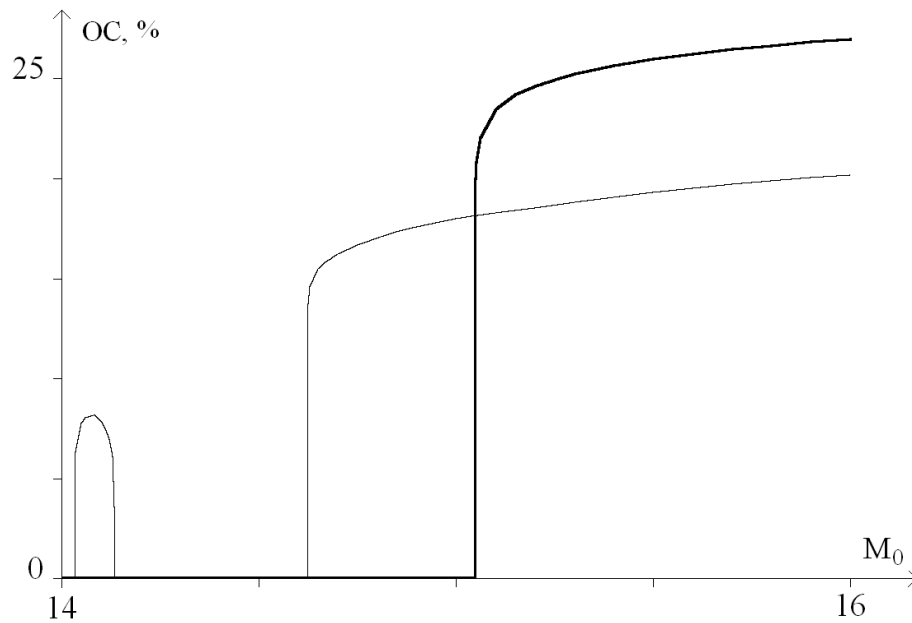


Рисунок 2.32 – Зависимости вероятности (в процентах) возникновения ОС от величины торсионного момента, локализованного на отрезке [781,880] (тонкая линия) и на отрезке [881,980] (толстая линия).

На рисунках 2.33-2.35 изображены результаты расчетов, полученные для значений торсионного момента, локализованного на отрезках длиной 50 пар оснований: [781, 830] и [831, 880]. Графики угловых отклонений показаны при наибольшем значении M_0 , не приводящем к возникновению ОС.

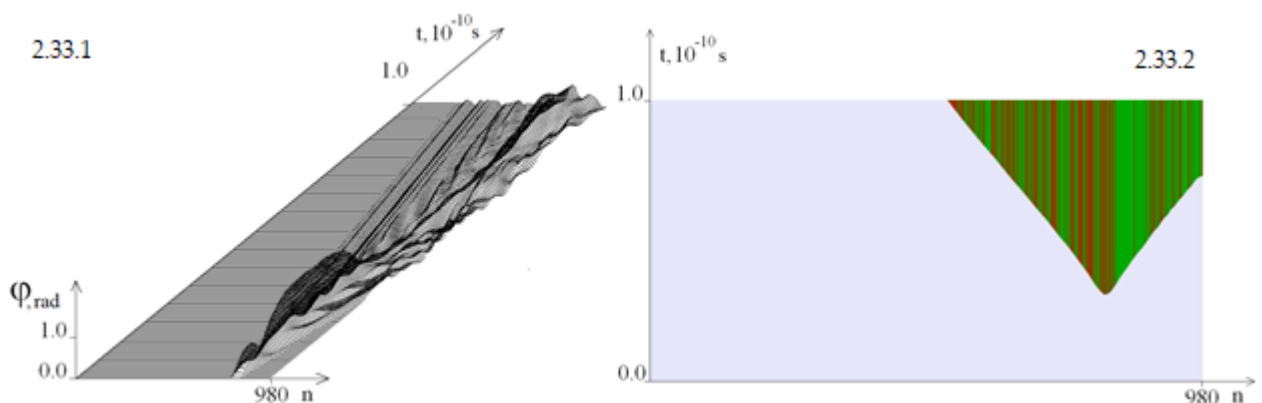


Рисунок 2.33 – Влияние торсионного момента, локализованного на отрезке [781, 830]. 2.33.1 – Зависимость от времени угловых отклонений 1-й цепочки молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты на отрезке времени $[0, T_0]$ при

$M_0 = 21,12$. 2.33.2 – Участки ОС при $M_0 = 21,121$, зеленым цветом обозначены ОС в парах А-Т, красным – в парах G-С.

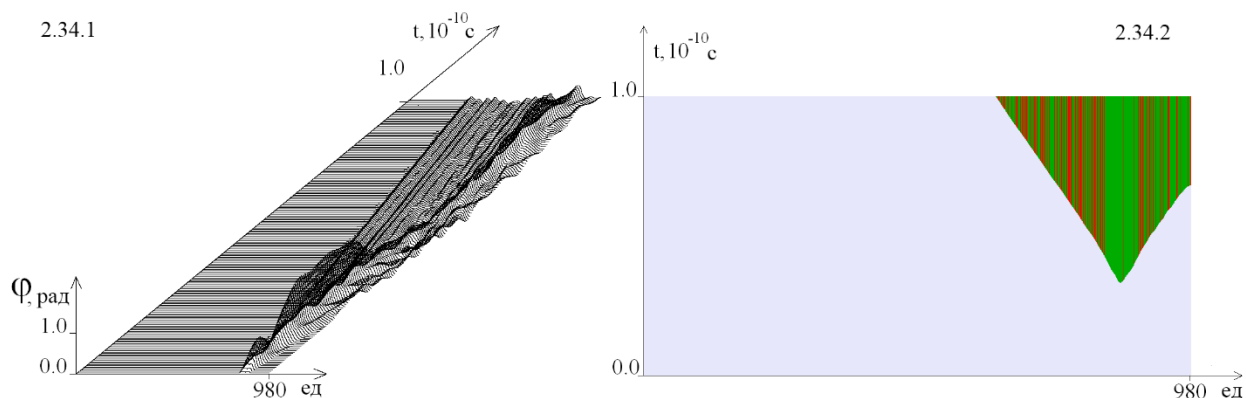


Рисунок 2.34 – Влияние торсионного момента, локализованного на отрезке [831, 880]. 2.34.1 – Зависимость от времени угловых отклонений 1-й цепочки молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты на отрезке времени $[0, T_0]$ при $M_0 = 18,232$. 2.34.2. – Участки ОС при $M_0 = 18,233$, зеленым цветом обозначены ОС в парах А-Т, красным – в парах G-С.

На рисунке 2.35 приведены графики вероятности возникновения ОС под действием торсионного момента, локализованного на отрезках [781, 830] и [831, 880]. Различия графиков объясняется тем, что участок [831, 880] содержит большее количество А-Т пар. Кроме того, сокращение отрезков локализации торсионного момента со 100 пар до 50 привело к увеличению значений M_0 , необходимых для возникновения зон ОС.

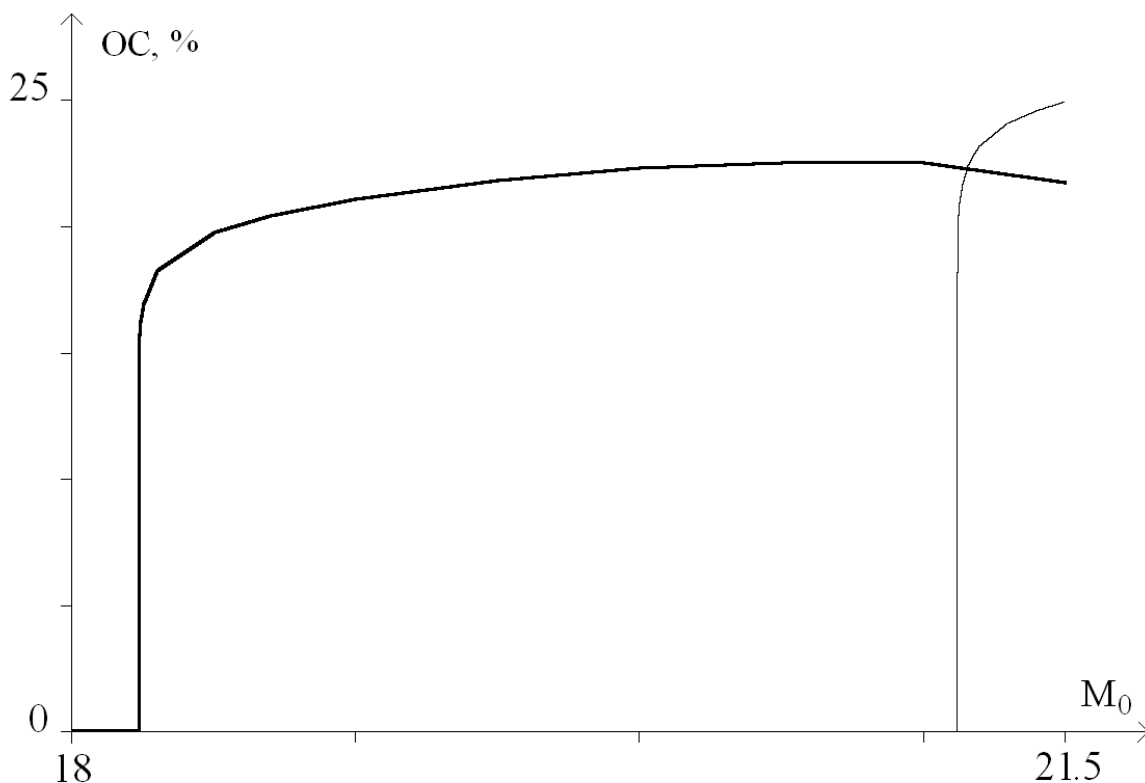


Рисунок 2.35 – Зависимости вероятности (в процентах) возникновения ОС от величины торсионного момента, локализованного на отрезке [781, 830] (тонкая линия) и на отрезке [831, 880] (толстая линия).

Пусть $M^i(t) = M_0^i(t) \cdot 1pN \cdot nm$, $i = \overline{1, n}$, $t \in [0, T_0]$, причем $M_0^i(t) = M_0$ при $1 \leq i_1 \leq i \leq i_2 \leq n$, $0 < t_1 \leq t \leq t_2 \leq T_0$ и $M_0^i(t) = 0$ для остальных значений i и t . Такое торсионное воздействие будем называть локализованным на пространственном отрезке $[i_1, i_2]$ и временном отрезке $[t_1, t_2]$.

На рисунке 2.36 изображены участки ОС, возникающие под действием торсионного момента, локализованного на пространственном отрезке [781, 880] и различной временной локализации. Видно, что при прекращении торсионного воздействия, зоны ОС закрываются, а увеличение промежутка временной локализации приводит к увеличению зон ОС.

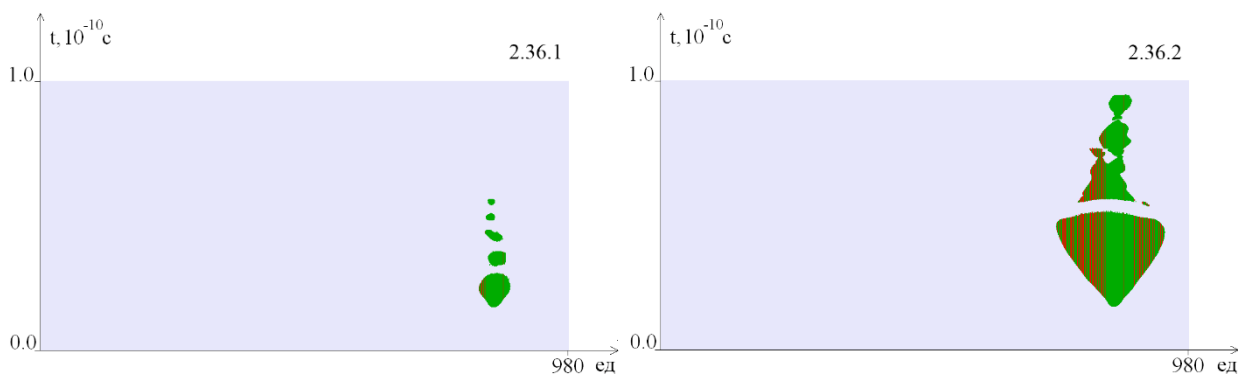


Рисунок 2.36 – Участки ОС, возникающие под действием торсионного момента, локализованного на отрезке [781,880] при $M_0 = 16$. 2.36.1 - на временном промежутке $[0, 0,2T_0]$ и 2.36.2 - на временном промежутке $[0, 0,25T_0]$, зеленым цветом обозначены ОС в парах А-Т, красным – в парах G-С.

В работе [178] было показано, что величина ТМ для РНКп *Escherichia coli* составляет 11 ± 4 пН·нм. Результаты моделирования показали, что значения торсионного момента, необходимого для возникновения зон ОС зависит от локализации и в некоторых случаях близко к полученным в работе [178] значениям.

Из полученных результатов следует, что вероятность образования зон ОС зависит от содержания пар А - Т на участке локализации торсионного момента, от размера этого участка и от величины промежутка временной локализации. Следует отметить, что пространственная локализация торсионного момента вблизи концов молекулы приводит к увеличению вероятности возникновения зон ОС (концевой эффект), а также зоны ОС могут закрываться при прекращении торсионного воздействия.

Кроме того, было замечено, что торсионное воздействие приводит к возникновению вращательных движений азотистых оснований. Это влияние нелинейно и увеличение амплитуды торсионного воздействия не приводит к автоматическому увеличению амплитуды вращательных движений и потенциальной энергии водородных связей и, как следствие, к увеличению зон

ОС. Этим объясняется немонотонность графиков вероятности возникновения ОС (рисунки 2.24; 2.27; 2.32; 2.35).

Полученные данные опубликованы в Dzhimak, S.; Svidlov, A.; Elkina, A.; Gerasimenko, E.; Baryshev, M.; Drobotenko, M. Genesis of Open States Zones in a DNA Molecule Depends on the Localization and Value of the Torque. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 4428. <https://doi.org/10.3390/ijms23084428>.

2.4 Теоретическое исследование влияния ВЧ и СВЧ воздействия на природу изменений собственной частоты колебаний молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты

Чувствительность дизооксирибонуклеиновой кислоты к воздействию электромагнитного излучения в разных диапазонах отличается в зависимости от различных факторов. Целью исследования являлось изучение молекулярной динамики дизооксирибонуклеиновой кислоты под влиянием внешних периодических воздействий с различной частотой. В данной работе в рамках механической модели молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты без упрощений исследовано влияние различной частоты внешнего периодического воздействия на динамику молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты.

Показано, что под влиянием внешней периодической силы молекула дизооксирибонуклеиновой кислоты может совершать колебательные движения с характерной для этой молекулы специфической частотой, которая отличается от частоты внешнего воздействия ω . Установлено, что частота колебаний молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты зависит от последовательности нуклеотидов.

С помощью разработанной математической модели, описывающей вращательное движение азотистых оснований вокруг сахара-фосфатной цепочки, можно рассчитывать частоту и амплитуду колебаний отдельного участка дизооксирибонуклеиновой кислоты. Подобные расчеты могут найти применение в области молекулярных нанотехнологий.

Молекула дизоксирибонуклеиновой кислоты является сложной структурой, в которой хранится генетическая информация. При этом, сохранность генетического кода должна (последовательность нуклеотидов) должна сохраняться при различных пространственных конфигурациях молекулы.

Известно, что чувствительность дизоксирибонуклеиновой кислоты к воздействию электромагнитного излучения в разных диапазонах отличается в зависимости от интенсивности транскрипции формирующих её генов и фазы клеточного цикла, особенно в S-фазе, когда происходит репликация дизоксирибонуклеиновой кислоты [108-110]. Например, влияние СВЧ-спектра на дизоксирибонуклеиновой кислоты бактерий в период S-фазы с частотой, резонансной собственной частоте крутильных колебаний дизоксирибонуклеиновой кислоты [111], приводит к прекращению репликации и гибели клетки, тогда как при воздействии в субтерагерцовом и терагерцовом диапазонах для каждого из азотистых оснований выявлена линия поглощения, соответствующая резонансу их водородных связей [112, 113, 115, 116, 181]. В свою очередь низкочастотному и среднечастотному радиодиапазону могут соответствовать и колебания цепей дизоксирибонуклеиновой кислоты (одна нить относительно другой), а при исследовании данных ИК-спектроскопии молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты показано, что линии поглощения связаны в основном с колебаниями в ней отдельных межатомных связей [118-120]. В то же время, поглощение электромагнитных волн пуриновыми и пиримидиновыми циклами в УФ-спектре (до 400 нм) обусловлено квантовыми переходами между электронными уровнями, что в целом может изменять активность генов и регулировать скорость деления клеток [121].

Учитывая столь широкий диапазон всевозможных факторов, влияющих на молекулярную динамику дизоксирибонуклеиновой кислоты и вызывающих различные по частоте периодические воздействия на неё, исследование подобных эффектов на примере гена, кодирующего интерферон alpha 17,

представляется актуальным для понимания принципов изменения собственных колебаний дизооксирибонуклеиновой кислоты с различной последовательностью нуклеотидов при изменяющейся частоте внешнего воздействия.

Необходимо отметить, что экспериментальное исследование динамики дизооксирибонуклеиновой кислоты ограничено пространственным разрешением доступных биофизических инструментов [122]. По этой причине, основным методом исследования является математическое моделирование [123]. Несмотря на большое количество упрощений, методы математического моделирования позволяют с большой точностью учесть различные аспекты поведения и функционирования молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты.

Механические модели играют важную роль для теоретического исследования внутренней подвижности молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты. В этом случае основания дизооксирибонуклеиновой кислоты представляют в виде маятников, а взаимодействия между основаниями описывают с помощью замены водородных связей на упругие связи. Такой подход был предложен в работе [6], последующие исследования позволили развить механическую модель описания динамики дизооксирибонуклеиновой кислоты с учетом разнообразных форм внешнего воздействия, различными эффектами диссипации и неоднородностью самой макромолекулы [124].

В работе [117] представлены результаты исследования вынужденных угловых колебаний азотистых оснований под влиянием внешней периодической силы. Для молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты с усредненными характеристиками в цепочках азотистых оснований в рамках континуального приближения получены решения, из которых следует, что частота угловых отклонений равна частоте внешнего периодического воздействия.

В опубликованном ранее исследовании [182] было показано, что такие упрощения математической модели дизооксирибонуклеиновой кислоты, как

усреднение ее характеристик, в значительной степени влияют на вид решения, в том числе, на частоту угловых отклонений.

В работе в рамках механической модели без упрощений [4, 179] исследовано влияние различной частоты внешнего периодического воздействия на динамику молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты.

Для моделирования динамики молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты будем использовать математическую модель, описанную в параграфе 2.1

Влияние частоты внешнего периодического воздействия ω на динамику дизооксирибонуклеиновой кислоты исследуем на примере гена, кодирующего интерферон альфа 17. Для этого гена $n = 980$, последовательность оснований 1-й цепочки и значения коэффициентов уравнений (2.1)-(2.6) (см. таблицу 2.1) взяты из работы [117], амплитуда внешнего периодического воздействия $F_0 = 0,5 \cdot 10^{-22}$ Дж. В этой же работе производится замена уравнений (2.1)-(2.6) их континуальными аналогами, что позволяет после усреднения коэффициентов получившихся уравнений и упрощения характера связи между основаниями получить угловые отклонения в следующем виде:

$$\bar{\varphi}_i(t) = A_i \cos(\omega t + \varphi_{0i}), \quad i = 1, 2, \quad (2.23)$$

где A_i и φ_{0i} – некоторые константы. Таким образом, в работе [117] частота колебания угловых отклонений цепочек оснований $\bar{\varphi}_1, \bar{\varphi}_2$ получилась равной частоте внешнего воздействия ω .

В настоящей работе исследование влияния частоты внешнего периодического воздействия ω на динамику дизооксирибонуклеиновой кислоты проведем без упрощающих предположений на основе численного решения задачи (2.1)-(2.8), полученного методом Рунге-Кутты 4-го порядка. Результаты расчетов представлены в графическом виде.

На рисунке 2.37 приведен график угловых отклонений первой цепочки молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты при $\omega = 10^{11} \text{ с}^{-1}$.

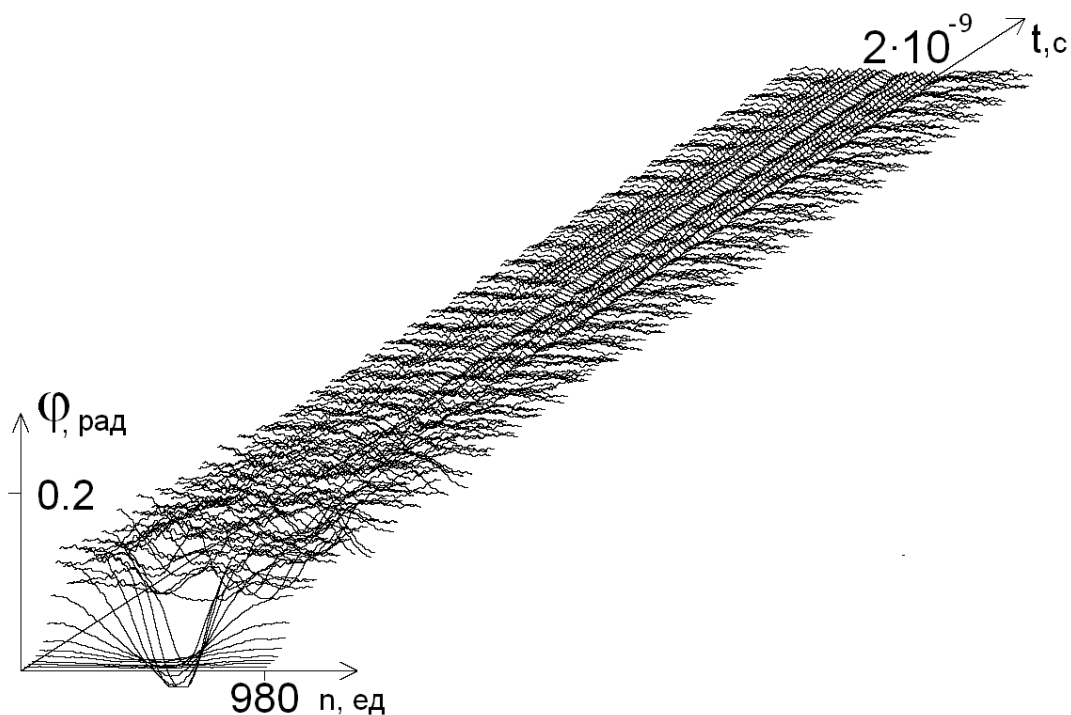


Рисунок 2.37 – Зависимость от времени величины угловых отклонений 1-й цепочки гена, кодирующего интерферон альфа 17, при $\omega = 10^{11} \text{ с}^{-1}$.

Зависимость решения задачи (2.1)-(2.8) (или – динамики молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты) от частоты внешнего воздействия ω будем определять с помощью средних угловых отклонений 1-й цепочки молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты:

$$\varphi(t) = n^{-1} \sum_{i=1}^n \varphi_1^i(t) \quad (2.24)$$

На рисунке 2.38 приведены графики средних угловых отклонений 1-й цепочки для различных значений частоты ω ; видно, что эти графики не описываются равенствами (2.23).

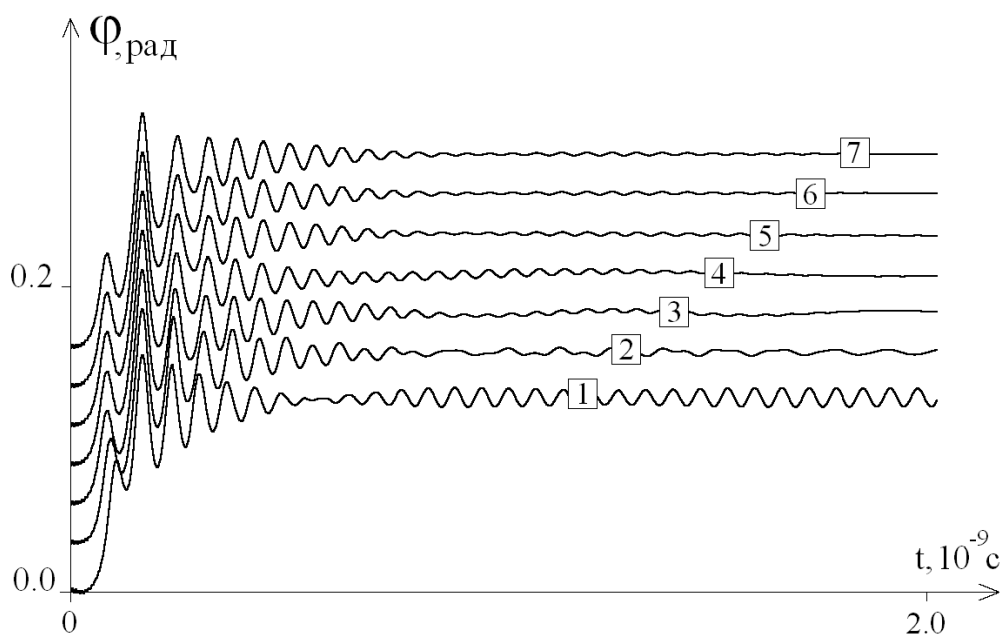


Рисунок 2.39 – Зависимости (со сдвигом по вертикали) от времени величины средних угловых отклонений 1-й цепочки исходной дизооксирибонуклеиновой кислоты для различных значений частоты внешнего периодического воздействия: 1 - $\omega = 10^{11} \text{ с}^{-1}$, 2 - $\omega = 5 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1}$, 3 - $\omega = 10^{10} \text{ с}^{-1}$, 4 - $\omega = 5 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$, 5 - $\omega = 10^9 \text{ с}^{-1}$, 6 - $\omega = 10^8 \text{ с}^{-1}$, 7 - $\omega = 0$.

При $0 < t \leq 0,5 \cdot 10^{-9} \text{ с}$ все графики сходны между собой, при $t \geq 0,5 \cdot 10^{-9} \text{ с}$ графики содержат периодические составляющие различной частоты. При $\omega \geq 1 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1}$ (графики 3-6) амплитуды периодических составляющих убывают при росте t , а частоты зависят от времени t и мало зависят от ω . Заметим также, что эти частоты близки к частоте периодической составляющей графика 7 средних угловых отклонений при постоянном силовом воздействии ($\omega = 0$).

Отметим, что частота периодической составляющей колебаний молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты непостоянна и меняется во времени. Количественный анализ зависимости этой частоты от времени в данной работе не рассматривается.

Проведем качественный анализ зависимости частоты колебаний периодической составляющей от состава молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты. Для этого изменим исходную молекулу дизооксирибонуклеиновой

кислоты, заменив 40 оснований в середине 1-й цепочки молекулы на основания А (аденин). На рисунке 2.40 приведен график угловых отклонений такой молекулы при $\omega = 10^{11} \text{ с}^{-1}$, на рисунке 2.41 приведены графики средних угловых отклонений 1-й цепочки при различных значениях ω , свойства которых аналогичны случаю исходной молекулы.

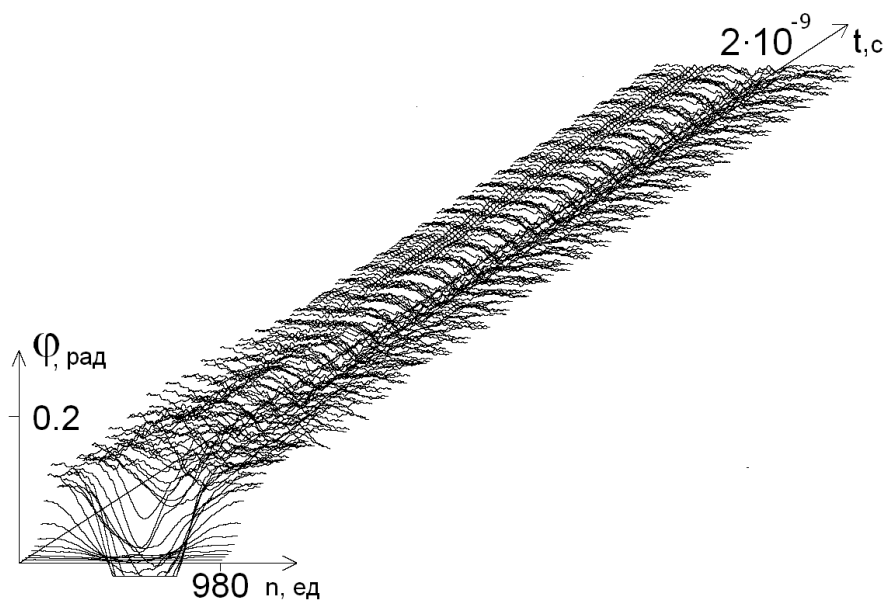


Рисунок 2.40 – Зависимость от времени угловых отклонений 1-й цепочки дидоксирибонуклеиновой кислоты с заменой 40А при $\omega = 10^{11} \text{ с}^{-1}$.

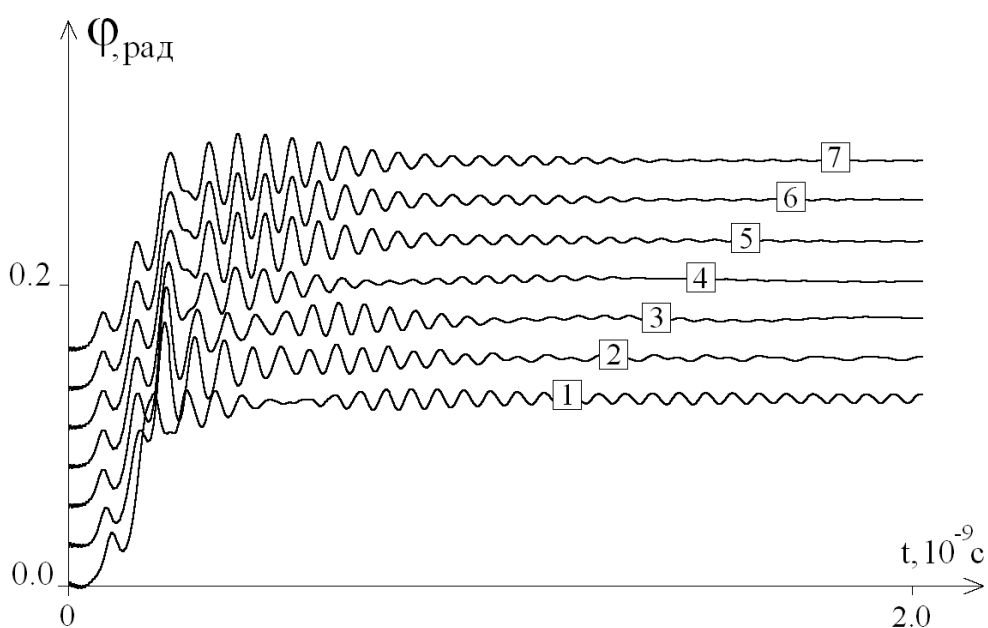


Рисунок 2.41 – Зависимости (со сдвигом по вертикали) от времени величины средних угловых отклонений 1-й цепочки дидоксирибонуклеиновой кислоты

с заменой 40А для различных значений частоты внешнего периодического воздействия: 1 - $\omega = 10^{11} \text{ с}^{-1}$, 2 - $\omega = 5 \cdot 10^{10} \text{ с}^{-1}$, 3 - $\omega = 10^{10} \text{ с}^{-1}$, 4 - $\omega = 5 \cdot 10^9 \text{ с}^{-1}$, 5 - $\omega = 10^9 \text{ с}^{-1}$, 6 - $\omega = 10^8 \text{ с}^{-1}$, 7 - $\omega = 0$.

На рисунке 2.42 приведены фрагменты графиков средних угловых отклонений 1-й цепочки при $\omega = 10^8 \text{ с}^{-1}$ для молекул, у которых 40 оснований в середине исходной молекулы заменены основаниями А, Т, G и С, на рисунке 2.43 – для молекул, у которых 40 и 100 оснований в середине исходной молекулы заменены основаниями А. Из этих рисунков видно, что изменение нуклеотидного состава молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты влияет на частотную характеристику их периодических составляющих.

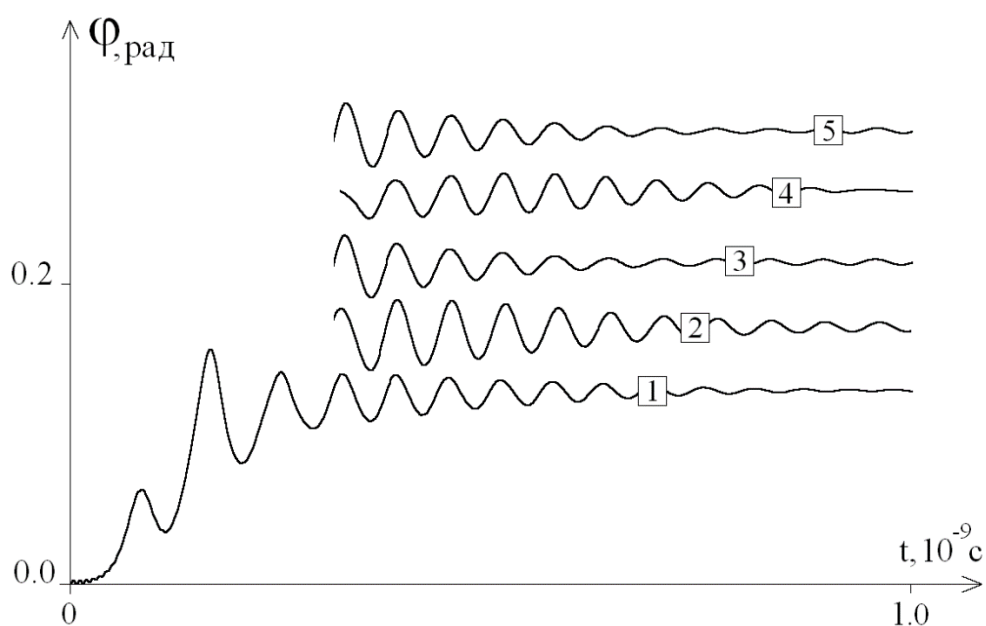


Рисунок 2.42 – Зависимости от времени величины средних угловых отклонений 1-й цепочки дидоксирибонуклеиновой кислоты при $\omega = 10^8 \text{ с}^{-1}$ исходной дидоксирибонуклеиновой кислоты (1) и фрагменты графиков для дидоксирибонуклеиновой кислоты с заменой: 2 - 40А, 3 - 40Т, 4 - 40G, 5 - 40С.

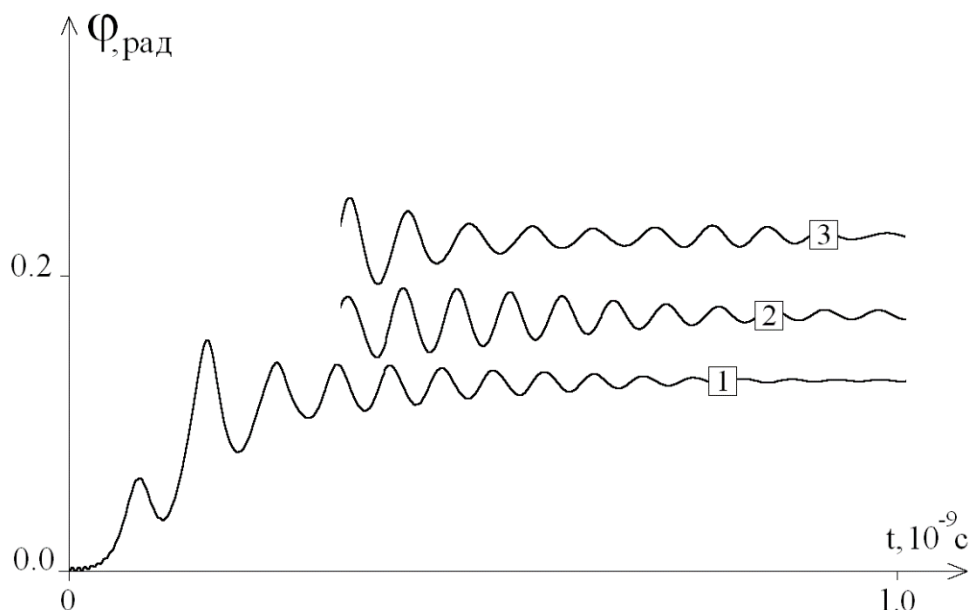


Рисунок 2.43 – Зависимости от времени величины средних угловых отклонений 1-й цепочки дидоксирибонуклеиновой кислоты при $\omega = 10^8 \text{ с}^{-1}$ исходной дидоксирибонуклеиновой кислоты (1) и фрагменты графиков для дидоксирибонуклеиновой кислоты с заменой: 2 - 40А, 3 - 100А.

Так, на основании результатов исследования можно сделать вывод, что разработанная математическая модель полностью подтверждает существование феномена, в результате которого после выведения системы из положения равновесия наблюдаются периодические колебания средних угловых отклонений цепочки дидоксирибонуклеиновой кислоты. Частота этих угловых отклонений зависит от ω (рис. 2.39). Таким образом, моделирование молекулярной динамики указывает на закономерность, описывающую частоту специфических колебаний молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты при периодическом внешнем воздействии. Изучение особенностей этих специфических колебаний дидоксирибонуклеиновой кислоты путем моделирования при её различном молекулярном составе (разных нуклеотидных последовательностях), выявило наличие различных между собой по паттерну (рис. 2.41), а также отличных от исходных колебаний по амплитуде средних угловых отклонений дидоксирибонуклеиновой кислоты,

что было обусловлено заменой в середине её молекулы (с 470-го по 510-й нуклеотид) сорока азотистых оснований на аденин. Данное явление молекулярной динамики демонстрирует зависимость специфических колебаний дизооксирибонуклеиновой кислоты в первую очередь от последовательности нуклеотидов, но не от частоты периодического внешнего воздействия ω .

Полученные результаты указывают на ряд особенностей влияния периодических внешних силовых воздействий на молекулярную динамику дизооксирибонуклеиновой кислоты, в том числе с учетом изменения чувствительности этой молекулы в случае формирования некоторых специфических последовательностей разной длины из гомологичных азотистых оснований (А, Т, С, G).

Прежде всего данные представленные в работе демонстрируют зависимость частоты и амплитуды специфических колебаний молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты как от специфичной последовательности нуклеотидов (на примере гомологичных участков каждого типа азотистых оснований, рис. 2.42), так и от различной длины гомологичных последовательностей (рис. 2.43). При этом на рисунке 2.42 показано, что величина средних угловых отклонений 1-й цепочки возрастают в молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты, имеющей замену в них азотистых оснований в середине (с 470-го по 510-й нуклеотид) для участков длиной 40 нуклеотидов в следующем ряду: $40C > 40G > 40T > 40A$. Кроме того, все они превышают величину средних угловых отклонений исходной молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты, имеющей гетерогенную последовательность азотистых оснований. В целом, эти данные свидетельствуют как о меньшей (на 24 % и более) чувствительности гетерогенных последовательностей молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты к внешним периодическим силовым воздействиям, так и большей уязвимости участков, имеющих азотистые основания с тремя водородными связями (цитозин и гуанин) по сравнению с последовательностями

сформированными из аденина и тимина, средних угловых отклонений которых были в 1,2 – 1,9 раза ниже, чем у молекул с заменой 40 подряд азотистых оснований исключительно на цитозин и гуанин, содержащие по 3 водородные связи.

Анализ данных угловых отклонений дизооксирибонуклеиновой кислоты при одном и том же по интенсивности периодическом внешнем воздействии при $\omega = 1 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}$, полученных при замене 100 азотистых оснований на аденин в середине молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты (с 440-го по 540-й нуклеотид) показал, что происходит увеличение амплитуды средних угловых отклонений 1-й цепочки дизооксирибонуклеиновой кислоты в 1,3 раза по сравнению с заменой 40 азотистых оснований на аденин в той же молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты (рис. 2.43). Выявленная особенность свидетельствует, что формирование в структуре дизооксирибонуклеиновой кислоты более длинных последовательностей из гомологичных азотистых оснований ведет к возрастанию её средних угловых отклонений при внешних периодических воздействиях с частотой $\omega = 1 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}$.

Такое нарастание амплитуды угловых отклонений может увеличивать скорость формирования открытых состояний и пузырей в дизооксирибонуклеиновой кислоты, так и являться одной из причин увеличения уязвимости комплементарных азотистых оснований в результате ослабления их водородных связей в области возникновения пузырей и открытых состояний при влиянии дополнительных неблагоприятных внешних факторов (прооксиданты, химические мутагены, излучение и т.п.). Все перечисленное может быть обусловлено тем, что между нитями двойной дизооксирибонуклеиновой кислоты спирали могут возникать силы отталкивания, наблюдаемые, например, в поле внешних электромагнитных волн. Более того, при определенных резонансных частотах силы отталкивания, действующие на нити двойной спирали приводят к повреждению и разрыву нитей молекулы, или же в случае их продольного распространения (воздействия внешних сил по оси спирали дизооксирибонуклеиновой кислоты)

может происходить растягивание и раскручивание двойной спирали [121, 183], что делает азотистые основания гораздо более уязвимыми для повреждения их при воздействии различных мутагенных факторов. Также принимая во внимание тот факт, что собственная частота крутильных колебаний гена зависит от длины формирующей его спирали дизооксирибонуклеиновой кислоты и, следовательно, данная величина является специфичной для разных типов клеток и их генов, то вычисление показателей собственной частоты колебаний дизооксирибонуклеиновой кислоты, например, в онкогенах или генах микроорганизмов, с последующим воздействием соответствующего по интенсивности внешнего электромагнитного поля, может приводить к подавлению экспрессии генов бактерий и онкопротеинов, т.е. к уменьшению размножения биопатогенов и снижению роста опухолевых клеток [184-186]. Кроме того, определение равновесия двойной спирали под влиянием внешних воздействий представляет интерес и для вычисления оптимальных параметров структуры искусственных магнетиков и бианизотропных метаматериалов [187, 188]. В связи с чем созданная математическая модель представляет интерес для разных областей науки (медицины, биохимии, нанотехнологий и др. [5, 189-192]).

Таким образом, в настоящем исследовании было показано, что под влиянием внешней периодической силы молекула дизооксирибонуклеиновой кислоты может совершать колебательные движения с характерной для этой молекулы специфической частотой, которая отличается от частоты внешнего воздействия ω . Также установлено, что амплитуда средних угловых отклонений в гене, кодирующем интерферон альфа 17, как минимум меньше на 24 %, чем аналогичные показатели, наблюдаемые при замене 40 азотистых оснований на гомологичные в середине (с 470-го по 510-й нуклеотид) участка и убывающие в следующем ряду: $40C > 40G > 40T > 40A$. В дополнение при моделировании периодических внешних воздействий с частотой $\omega \leq 1 \cdot 10^8 \text{ c}^{-1}$ продемонстрировано, что для последовательностей нуклеотидов, имеющих 40

азотистых оснований с тремя водородными связями амплитуда средних угловых отклонений в 1,2 – 1,9 раза больше, чем в участках, сформированных из аденина или тимина. В исследовании показано, что при замене 100 азотистых оснований на аденин в середине гена, кодирующего интерферон alpha 17 (с 440-го по 540-й нуклеотид), происходит увеличение амплитуды средних угловых отклонений в 1,3 раза по сравнению с заменой 40 азотистых оснований на аденин в середине этого же гена.

Кроме того, учитывая последовательность нуклеотидов и длину гена, с помощью разработанной математической модели, описывающей вращательное движение азотистых оснований вокруг сахара-фосфатной цепочки, можно рассчитывать частоту и амплитуду собственных колебаний отдельного участка дезоксирибонуклеиновой кислоты для определения его резонансной частоты. Подобные расчеты могут найти применение в области молекулярных нанотехнологий [193-205]. Например, для расчета резонансной частоты молекулы при модификации первоначальной последовательности нуклеотидов, а также для определения в биологических объектах резонансных частот чужеродных генов (онкогенов, генов патогенных микроорганизмов и др.) с целью применения в дальнейшем для подавления резонансного электромагнитного излучения, ингибирующего в чужеродных клетках транскрипцию и репликацию [190].

Полученные результаты опубликованы в Svidlov A., Drobotenko M., Basov A., Gerasimenko E., Malyshko V., Elkina A., Baryshev M., Dzhimak S. DNA dynamics under periodic force effects // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol.22. №15. P. 7873. [https:// doi.org/10.3390/ijms22157873](https://doi.org/10.3390/ijms22157873);

2.5 Выводы к главе 2

Создана новая физико-математическая модель органической молекулы, состоящей из двух цепочек упорядоченных ансамблей взаимодействующих маятников. Изучено влияние на характер решения таких факторов, как неоднородность цепочки азотистых оснований, свойства связи в

комплементарных парах и образование открытых состояний при следующих параметрах внешнего воздействия: $F_0 = 0,526 \cdot 10^{-22}$ Дж, $\omega = 0,4 \cdot 10^{12}$ с⁻¹. Установлено, что такие упрощения модели, как усреднение характеристик цепочки азотистых оснований или упрощение вида связи в их комплементарных парах существенно влияют на вид решения, снижая достоверность получаемых результатов минимум в 2 раза. Поэтому разработанный подход к решению задачи вращательной динамики молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты в большей степени соответствует ее истинной биомеханике. Особое внимание уделено возникновению и динамике открытых состояний, и влиянию учёта открытых состояний на решение. Показано, что в рамках рассмотренной математической модели возможно появление открытых состояний и восстановление их закрытой структуры. Учет колебаний обеих нитей дизоксирибонуклеиновой кислоты позволяет описать сложный характер динамики открытых состояний, которая для рассмотренных в работе внешних воздействий не может быть сведена только к решениям типа «кинк».

Результаты моделирования показали, что значения торсионного момента, необходимого для возникновения зон ОС зависят от локализации и в некоторых случаях близки к экспериментально измеренным (11 ± 4 пН·нм) в работе [178] значениям.

Из полученных результатов следует, что вероятность образования зон ОС зависит от содержания пар А - Т на участке локализации торсионного момента, от размера этого участка и от величины промежутка временной локализации. Следует отметить, что пространственная локализация торсионного момента вблизи концов молекулы приводит к увеличению вероятности возникновения зон ОС (концевой эффект), а также зоны ОС могут закрываться при прекращении торсионного воздействия.

Было замечено, что влияние торсионного воздействия на вращательные движения азотистых оснований нелинейно и увеличение амплитуды торсионного воздействия не приводит к автоматическому увеличению

амплитуды вращательных движений и потенциальной энергии водородных связей и, как следствие, к увеличению зон ОС. Этим объясняется немонотонность графиков вероятности возникновения ОС.

Установлена следующая зависимость частоты угловых колебаний азотистых оснований от частоты внешнего воздействия ω и времени: при $0 < t \leq 0,5 \cdot 10^{-9}$ с все графики сходны между собой, при $t \geq 0,5 \cdot 10^{-9}$ с графики содержат периодические составляющие различной частоты. При $\omega \geq 1 \cdot 10^{10}$ с⁻¹ амплитуды периодических составляющих убывают при росте t , а частоты зависят от времени t и мало зависят от ω . Заметим также, что эти частоты близки к частоте периодической составляющей графика средних угловых отклонений при постоянном силовом воздействии ($\omega = 0$).

Анализ данных угловых отклонений дизооксирибонуклеиновой кислоты при одном и том же по интенсивности периодическом внешнем воздействии при $\omega = 1 \cdot 10^8$ с⁻¹, полученных при замене 100 азотистых оснований на аденин в середине молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты (с 440-го по 540-й нуклеотид) показал, что происходит увеличение амплитуды средних угловых отклонений 1-й цепочки дизооксирибонуклеиновой кислоты в 1,3 раза по сравнению с заменой 40 азотистых оснований на аденин в той же молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты. Выявленная особенность свидетельствует, что формирование в структуре дизооксирибонуклеиновой кислоты более длинных последовательностей из гомологичных азотистых оснований ведет к возрастанию её средних угловых отклонений при внешних периодических воздействиях с частотой $\omega = 1 \cdot 10^8$ с⁻¹.

Установлено, что частота колебаний азотистых оснований зависит от последовательности нуклеотидов. Кроме того, показано, что учитывая последовательность нуклеотидов и длину гена, с помощью разработанной математической модели, описывающей вращательное движение азотистых оснований вокруг сахара-фосфатной цепочки, можно рассчитывать частоту и амплитуду собственных колебаний отдельного участка дизооксирибонуклеиновой кислоты для определения его резонансной частоты.

Подобные расчеты могут найти применение в области молекулярных нанотехнологий.

3 Физико-математическое моделирование и исследование закономерностей влияния процессов модификации изотопного D/H состава среды на энергию разрыва водородных связей в двухцепочечной молекуле

3.1 Моделирование возникновения разрывов водородных связей в органической молекуле в зависимости от концентрации дейтерия в окружающей жидкой среде

В данном параграфе исследовано влияние концентрации дейтерия в окружающей жидкой среде на возникновение открытых состояний между азотистыми основаниями двухцепочечной молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты. Показано, что характер указанного влияния зависит от величины энергии разрыва водородных связей.

Известно, что энергия дейтериевой связи на ~ 134 кал/моль превышает энергию протиевой, поэтому дейтерий образует на 5% более прочную водородную связь [206]. Попадание атома дейтерия вместо протия в водородную связь носителя биологической информации – двойную спираль молекул дизооксирибонуклеиновой кислоты – способно вызвать очень заметный временной сбой в передаче этой информации, вероятнее всего, за счёт задержки раскрытия какой-либо водородной связи. Атомы дейтерия попадают в водородные связи двойных спиралей молекул дизооксирибонуклеиновой кислоты вследствие очень быстрого протий-дейтериевого изотопного обмена с молекулами окружающей воды, что обусловлено умеренной прочностью связей, о которых идёт речь [207]. При природном содержании дейтерия в воде, равном 156 ppm, равновесная вероятность попадания дейтерия в каждую из возможных водородных связей невелика и составляет примерно $2 \cdot 10^{-4}$ [57]. Помимо флуктуационных изгибов оси спирали и поворотами соседних пар азотистых оснований в молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты происходит открытие и закрытие отдельных пар азотистых оснований [164]. Этот процесс приводит к

изменениям конформации и играет важную роль в реакциях дизоксирибонуклеиновой кислоты с химическими агентами. Замена атома протия на дейтерий влияет на процесс раскрытия пар оснований за счет увеличения энергии, необходимой для разрыва связи. На сегодняшний день реализация эксперимента, который бы позволил оценить влияние атома дейтерия на процессы раскрытия пар оснований затруднена. Теоретическое исследование этих процессов возможно с помощью методов математического моделирования, при этом одним из ключевых условий адекватности математической модели дизоксирибонуклеиновой кислоты является учет открытых состояний.

Существующие математические модели дизоксирибонуклеиновой кислоты рассмотрены в ряде обзоров [123, 164, 208]. Одним из широко известных теоретических подходов является PBD-модель (Peyrard-Bishop-Dauxois), которая изначально создавалась для описания процессов денатурации дизоксирибонуклеиновой кислоты [198], но со временем была дополнена рядом уточнений и позволила, в том числе, имитировать динамику дыхания дизоксирибонуклеиновой кислоты [209]. Для описания эффектов, вызванных введением атомов дейтерия в водородные связи между парами оснований, была выбрана модернизированная модель Л.В. Якушевич [117, 170, 182, 210], которая за счет введения дополнительного слагаемого позволяет учитывать эффекты диссипации, обусловленные вязкостью окружающей молекулу дизоксирибонуклеиновой кислоты среды. Кроме того, в модели за счет введения константы крутящего момента заданного участка сахаро-фосфатной нити косвенно учтены взаимодействия между соседними парами оснований. Еще одним аргументом в пользу выбора механической модели Л.В. Якушевич для описания роли атомов дейтерия в процессах открытия-закрытия пар оснований явился тот факт, что, хотя радиально-торсионные модели способны учитывать искажения структуры дизоксирибонуклеиновой кислоты, вызванные внешним торсионным напряжением, однако, большинство физико-химических экспериментов

проводят на релаксированных дизооксирибонуклеиновой кислоты, в которых эти искажения отсутствуют. Можно считать, что поведение таких молекул описывается радиальными и радиально-торсионными моделями одинаково хорошо [164].

В представленной работе в рамках механической модели Л.В. Якушевич проведены оценочные эксперименты по влиянию изотопного $^2H/^1H$ обмена на процессы раскрытия пар оснований.

Для моделирования процессов образования открытых состояний и пузырей в двойной спирали дизооксирибонуклеиновой кислоты будем использовать математическую модель, описывающую вращательное движение азотистых оснований вокруг сахаро-фосфатной цепочки молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты [170]. При построении такой модели используется аналогия между молекулой дизооксирибонуклеиновой кислоты и механической системой, состоящей из двух цепочек взаимосвязанных маятников: азотистые основания соответствуют вращающимся маятникам, сахарофосфатные цепочки молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты – упругой нити, к которой прикреплены эти маятники, а водородной связи пары комплементарных азотистых оснований эквивалентна упругая связь соответствующих маятников. Поведение такой механической системы, состоящей из n пар маятников, описывается задачей Коши для системы $2n$ обыкновенных дифференциальных уравнений [182, 213].

Эта математическая модель включает уравнения Ньютона:

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

$$i = \overline{2, n-1},$$

$$I_1^1 \frac{d^2 \varphi_1^1(t)}{dt^2} = K_1^1 [\varphi_1^2(t) - \varphi_1^1(t)] -$$

$$-\delta^i(k_{12}^1 R_1^1 (R_1^1 + R_2^1) \sin \varphi_1^1 + k_{12}^1 R_1^1 R_2^1 \sin(\varphi_1^1 - \varphi_2^1)) + F_1^1(t), \quad (3.2)$$

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

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

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

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

Здесь $\varphi_j^i(t)$ – угловое отклонение i -го маятника j -й цепочки, отсчитываемое против часовой стрелки, в момент времени t , I_j^i – момент инерции i -го маятника j -й цепочки, R_j^i – расстояние от центра масс i -го маятника j -й цепочки до нити, K_j^i – константа, характеризующая крутящий момент i -го участка j -й нити, k_{12}^i – константа, характеризующая упругие свойства связи i -й пары маятников, $F_j^i(t)$ – внешнее воздействие на i -й маятник j -й цепочки в момент времени t , n – количество пар маятников в рассматриваемой системе.

Величина внешнего воздействия принимается равной $F_j^i(t) = -\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t) + F_0 \cos \omega t$, где слагаемое $-\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t)$ моделирует эффекты

диссипации, обусловленные взаимодействием с окружающей молекулу дизоксирибонуклеиновой кислоты водой, слагаемое $F_0 \cos \omega t$ – внешнее периодическое воздействие.

В уравнениях (3.1)-(3.6) первое слагаемое справа от знака равенство описывает силовое воздействие на i -й маятник со стороны нити, второе слагаемое – воздействие со стороны парного маятника, третье слагаемое – 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 ($\delta^i = 1, k_{12}^i = k_{12}^{D,i}$) и разрыв этой связи ($\delta^i = 0$). Будем считать, что разрыв в парах оснований возникает, если потенциальная энергия связи в этих парах превышает некоторое критическое значение $E_{кр}^H$ для водородной связи и $E_{кр}^D$ для дейтериевой. Если потенциальная энергия в паре с разорванной связью меньше критического значения, связь восстанавливается.

К уравнениям (3.1)-(3.6) добавим начальные условия:

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

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

Для определённости будем считать, что при $t = 0$ система находится в равновесии, то есть в начальных условиях (3.7) и (3.8).

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

В данной работе все исследования проводились на основе численного решения задачи (3.1)–(3.8).

Влияние концентрации дейтерия на возникновение ОС оценивали с помощью величины вероятности их возникновения:

$$P = p_0P_0 + p_1P_1 + p_2P_2 + \dots + p_NP_N, \quad (3.10)$$

где

p_k – вероятность того, что в рассматриваемой молекуле ровно k водородных связей заменены на дейтериевые; P_k – вероятность возникновения ОС в молекуле, у которой ровно k водородных связей заменены на дейтериевые, N – количество водородных связей в молекуле.

Вероятность образования дейтериевой связи p^D в молекуле зависит от концентрации дейтерия в жидкости, окружающей эту молекулу. Примем, что вероятность p^D численно равна этой концентрации [211], таким образом, при концентрации дейтерия, например, 156 ppm вероятность p^D принимает значение, то есть $p^D = 156 \cdot 10^{-6}$.

Считая, что образование новой дейтериевой связи в молекуле дизоксирибонуклеиновой кислоты не зависит от наличия и расположения других дейтериевых связей в этой молекуле, получим:

$$p_0 = (1 - p^D)^n = 1 - (p_1 + p_2 + \dots + p_n), \quad (3.11)$$

$$p_1 = np^D(1 - p^D)^{n-1}, \quad (3.12)$$

$$p_2 = n(n-1)(p^D)^2(1 - p^D)^{n-2}/2, \quad (3.13)$$

$$p_3 = n(n^2 - 3n + 2)(p^D)^3(1 - p^D)^{n-3}/6. \quad (3.14)$$

Вероятности P_k найдем на основе численного решения задачи (3.1)-(3.8) для молекулы, у которой ровно в k парах оснований водородная связь заменена на дейтериевую. Для этого построим на отрезке $[0, T]$ множество точек $t_j = j\tau$, $j = \overline{1, m}$, m , где $\tau = T/m$. Вычислим при $t = t_j$ отношение q_j количества пар оснований с разорванной связью к общему количеству пар оснований n и

среднее арифметическое по точкам t_j значение этих отношений $Q = m^{-1}(\sum_{j=1}^m q_j)$

Считая, что вероятности возникновения в молекуле различных комбинаций k дейтериевых связей одинаковы, получим, что вероятность P_k возникновения ОС на промежутке времени $[0, T]$ в молекуле, у которой ровно k пар оснований связаны дейтериевой связью, равна Q_k - среднему арифметическому значению величин Q по всем возможным комбинациям k дейтериевых связей.

Исследуем влияние изотопного D/H обмена на возникновение ОС на примере гена, кодирующего интерферон alpha 17. Для этого гена $n = 980$, значения коэффициентов уравнений (3.1)-(3.6) приведены в таблице 2.1, внешняя сила $F_j^i(t) = -\beta_j^i \frac{d\varphi_j^i}{dt}(t) + F_0 \cos \omega t$ (первое слагаемое описывает эффекты диссипации, второе - внешнее периодическое воздействие), $F_0 = 0,526 \cdot 10^{-22}$ Дж, $\omega = 0,4 \cdot 10^{12} \text{ с}^{-1}$.

Будем считать, что $E_{\text{кр}}^D = k^D \cdot E_{\text{кр}}^H$, $k_{12}^{D,i} = k^D \cdot k_{12}^{H,i}$, $k^D = 1.05$. Значение коэффициента k^D выбиралось с учетом того, что дейтериевая связь на 5% прочнее водородной.

При $p^D = 1,56 \cdot 10^{-4}$ значения $p_0 \approx 0,85822$, $p_1 \approx 0,13122$, $p_2 \approx 0,01002$, $p_3 \approx 0,00051$.

Вычисление величин P_k при $k \geq 2$ требует значительных вычислительных ресурсов из-за большого количества комбинаций дейтериевых связей.

Численный эксперимент для случая, когда дейтериевая связь может образовываться только у первых 4-х оснований, показывает, что величины Q_1 , Q_2 и Q_3 различаются на 1-5 %. Предположим, что и отличие величин P_2 , P_3 от P_1 лежит в пределах 5 % (при вычислении P_1 так и получалось: результаты, полученные по нескольким первым основаниям, хорошо приближали итоговое значение). Это предположение позволяет оценить влияние D/H

обмена на возникновение ОС, ограничившись вычислением P_0 и P_1 . Действительно, обозначим $P' = p_0 P_0 + (p_1 + p_2 + p_3) P_1$, тогда

$$P - P' = p_2 P_2 + p_3 P_3 + p_4 P_4 + \dots + p_n P_n - (p_2 + p_3) P_1 \leq p_2 (P_2 - P_1) + p_3 (P_3 - P_1) + p_4 + \dots + p_n = p_2 (P_2 - P_1) + p_3 (P_3 - P_1) + 1 - (p_0 + p_1 + p_2 + p_3), \quad (3.15)$$

Откуда

$$-a \leq P - P' \leq a + \delta', \quad (3.16)$$

где $a = 0,05 P_1 (p_2 + p_3)$, $\delta' = 1 - (p_0 + p_1 + p_2 + p_3) \approx 0,000020$.

В таблице 3.1 приведены значения P_0 , P_1 , P' и P'/P_0 , вычисленные при $T = 3,0 \cdot 10^{-10}$ с, $\tau = 0,0001 \cdot 10^{-10}$ с для различных значений $E_{кр}^H$, при этом для всех 4-х случаев согласно формулы (3.15) выполняются неравенства

$$-0,000006 < P - P' < 0,00003 \quad (3.17)$$

и

$$P'/P_0 - 0,00055 < P/P_0 < P'/P_0 + 0,003 \quad (3.18)$$

Таблица 3.1 – Результаты решения модельной задачи для $n = 980$

$E_{кр}^H \cdot 10^{-22}$ Н · м	P_0	P_1	P'	P'/P_0
0,320	0,01073	0,01105	0,01077	1,0042
0,330	0,00900	0,00930	0,00903	1,0047
0,340	0,00694	0,00725	0,00698	1,0063
0,350	0,00702	0,00592	0,00686	0,9777

Из таблицы видно, что в силу неравенств (3.17) и (3.18) при определении характера влияния Д/Н обмена на возникновение ОС в данном случае можно ограничиться анализом величины P'/P_0 .

Анализ этой величины по данным таблицы 3.2 показывает, что учет изотопного D/H обмена может приводить как к увеличению (при $P'/P_0 > 1 + 0.00055$), так и уменьшению (при $P'/P_0 < 1 - 0.003$) вероятности возникновения ОС при различных значениях $E_{кр}^H$.

Таблица 3.2 – Результаты решения модельной задачи для $n = 10$

$E_{кр}^H \cdot 10^{-22} \text{ Н} \cdot \text{м}$	P_0	P_1	P''	P''/P_0
0,324	0,80925	0,55006	0,80885	0,9995
0,325	0,01624	0,29546	0,01667	1,0268
0,326	0,70485	0,43345	0,70443	0,9994
0,327	0,12589	0,49044	0,12646	1,0045
0,328	0,61194	0,19067	0,61129	0,9989
0,329	0,69854	0,06222	0,69755	0,9986
0,330	0,00125	0,07786	0,00137	1,0954
0,331	0,00124	0,00130	0,00124	1,00008
...
0,334	0,00121	0,00123	0,00121	1,00002
...
0,358	0,0073	0,000235	0,00073	0,9989
0,359	0,00000	0,000233	$4 \cdot 10^{-7}$...
...
0,369	0,00000	0,000047	$1 \cdot 10^{-7}$...
0,370	0,00000	0,00000	0,00000	...

В случае $n = 10$ при оценке влияния D/H обмена на возникновение ОС ограничимся вычислением величины $P'' = p_0 P_0 + p_1 P_1$, $p_0 \approx 0,998441$, $p_1 \approx 0,001558$. Тогда

$$\begin{aligned}
 P - P'' &= p_2 P_2 + \dots + p_n P_n \leq p_2 + \dots + p_n = 1 - (p_0 + p_1) = \delta'' \approx \\
 &\approx 0,0000011,
 \end{aligned}
 \tag{3.19}$$

откуда следуют неравенства

$$0 < P - P'' < \delta'' \quad (3.20)$$

и

$$P''/P_0 < P/P_0 < P''/P_0 + \delta''/P_0 \quad (3.21)$$

В таблице 3.2 приведены результаты расчетов для молекулы, состоящей из первых 10 пар оснований гена, кодирующего интерферон alpha 17. Расчеты проводились при $T = 10^{-9}$ с, $\tau = 0,0001 \cdot 10^{-10}$ с для значений $E_{кр}^H$ в диапазоне от $0,324 \cdot 10^{-22}$ н·м до $0,334 \cdot 10^{-22}$ н·м с шагом 0,001.

Вычисления показывают, что при этом выполняются неравенства $\delta''/P_0 < 0,000002$, поэтому неравенства (3.20) и (3.21) в этом случае принимают вид

$$P''/P_0 < P/P_0 < P''/P_0 + 0,000002 \quad (3.22)$$

Из неравенств (3.22) следует, что для приведенных в таблице 3.2 значений $E_{кр}^H$ условие $P''/P_0 > 1$ означает увеличение вероятности возникновения ОС при учете изотопного D/H обмена, а $P''/P_0 < 1$ - уменьшение.

Рисунки 3.1 и 3.2 иллюстрируют динамику ОС молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты. Все связи в молекуле водородные, $E_{кр}^H = 0,330 \cdot 10^{-22}$ н·м, интервал времени $(0,3 \cdot 10^{-10}$ с] и $[1,5 \cdot 10^{-10}$ с, $2,2 \cdot 10^{-10}$ с) соответственно, участки возникновения открытых состояний выделены чёрным цветом. Видно, что отдельные участки цепочки маятников могут "открываться", затем "закрываются" и через некоторое время вновь "открываться".

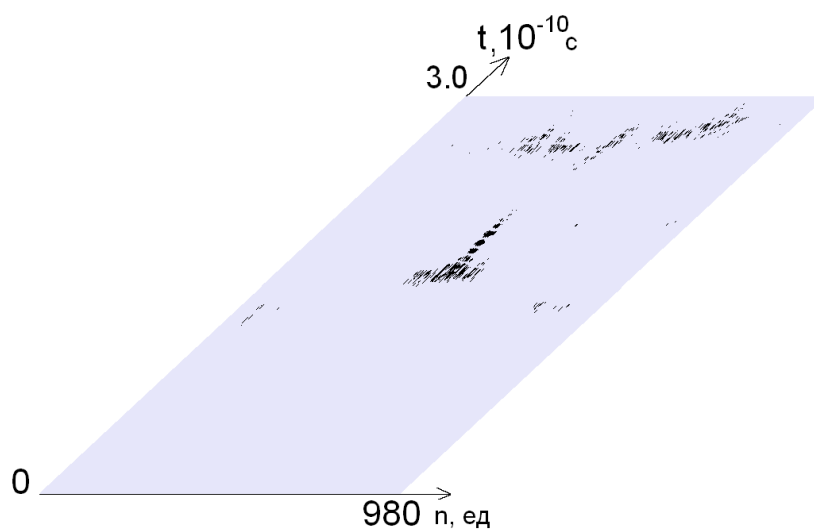


Рисунок 3.1 – Зоны возникновения открытых состояний (выделены чёрным цветом) на промежутке времени $[0, 3,0 \cdot 10^{-10} \text{ с}]$.

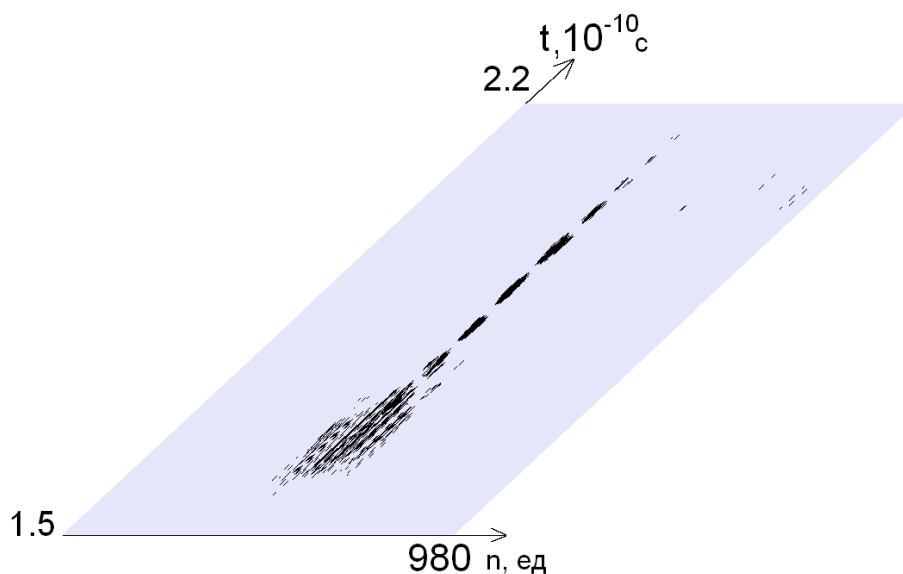


Рисунок 3.2 – Зоны возникновения открытых состояний (выделены чёрным цветом) на промежутке времени $[1,5 \cdot 10^{-10} \text{ с}, 2,2 \cdot 10^{-10} \text{ с}]$.

Модельные расчеты для значений энергии разрыва водородной связи больших $0,330 \cdot 10^{-22} \text{ Н} \cdot \text{м}$ показали, что ее увеличение приводит к уменьшению вероятностей возникновения ОС. Кроме того, при значении энергии разрыва водородной связи $0,358 \cdot 10^{-22} \text{ Н} \cdot \text{м}$ еще наблюдается

ненулевая вероятность возникновения ОС при отсутствии дейтерия в молекуле, а при значении энергии разрыва водородной связи $0,359 \cdot 10^{-22}$ Н · м и более эта вероятность равна нулю. В то же время при наличии хотя бы одного атома дейтерия в молекуле ненулевая вероятность возникновения ОС наблюдается даже при значении энергии разрыва водородной связи $0,369 \cdot 10^{-22}$ Н · м, и лишь при значении $0,358 \cdot 10^{-22}$ Н · м и более эта вероятность становится равной нулю (таблица 3.2). Таким образом, присутствие дейтерия в последовательности нуклеотидов может приводить - в зависимости от значения энергии разрыва водородной связи - как к увеличению, так и уменьшению вероятности возникновения открытых состояний. Кроме того, участие атомов дейтерия в образовании водородных связей двойных спиралей молекул дизоксирибонуклеиновой кислоты может приводить к изменению времени передачи генетической информации, чем можно объяснить влияние даже небольших изменений концентрации дейтерия в среде на метаболические процессы у живых систем.

Далее рассмотрим влияние концентрации дейтерия в окружающей молекулу дизоксирибонуклеиновой кислоты среде на вероятность возникновения открытых состояний.

Для этого рассмотрим молекулу, состоящую из первых 10 пар оснований гена, кодирующего интерферон alpha 17 (при $n=10$, количество водородных связей $N = 24$, расчёты при $T = 1,0 \cdot 10^{-9}$ с, $\tau = 0,0001 \cdot 10^{-10}$ с для $E_{кр}^H = E_1 = 0,335 \cdot 10^{-22}$ Н · м дают $P_0 = 0,0012080$, $P_1 = 0,0012173$, для $E_{кр}^H = E_2 = 0,345 \cdot 10^{-22}$ Н · м – $P_0 = 0,0010920$, $P_1 = 0,0009675$). Обозначим $P' = p_0 P_0 + p_1 P_1$. В таблице 3.1 приведены значения P'/P_0 для различных значений концентрации p^D .

Оценим величину P-P':

$$P - P' = p_2 P_2 + \dots + p_N P_N \leq p_2 + \dots + p_n = 1 - (p_0 + p_1) = \delta, \quad (3.23)$$

откуда следуют неравенства:

$$0 < P - P' < \delta, \quad (3.24)$$

и

$$\frac{P'}{P_0} < \frac{P}{P_0} < \frac{P'}{P_0} + 0,0000005. \quad (3.25)$$

В нашем случае $\delta/P_0 < 0,0000005$, поэтому неравенства (3.24) и (3.25) принимают вид:

$$\frac{P'}{P_0} < \frac{P}{P_0} < \frac{P'}{P_0} + 0,0000005. \quad (3.26)$$

Из неравенств (3.26) следует, что для данных из таблицы 3.3 условие $P'/P_0 > 1$ означает увеличение вероятности возникновения ОС по сравнению с $p^D = 0$, а $P'/P_0 < 1$ – уменьшение. Таким образом, при $E_{кр}^H = E_1$ присутствие дейтерия приводит к увеличению вероятности возникновения ОС, при $E_{кр}^H = E_2$ – к уменьшению, причём, зависимость величины P'/P_0 от концентрации дейтерия имеет практически линейный характер.

Таблица 3.3 – Значения P'/P_0 при $n = 10$

p^D, ppm	$E_{кр}^H = E_1$	$E_{кр}^H = E_2$
156	1,000029	0,999574
120	1,000022	0,999672
100	1,000018	0,999727
80	1,000015	0,999781
60	1,000011	0,999836
40	1,000007	0,999891

При больших значениях n зависимость P от p^D , вообще говоря, нелинейная. Это объясняется тем, что значение слагаемых $p_k P_k, k \geq 2$ в

выражении (3.22) велико при больших значениях n , при этом величины $p_k P_k$ зависят от p^D нелинейно: так, например,

$$p_2 = N(N - 1)(p^D)^2(1 - p^D)^{N-2}/2, \quad (3.27)$$

$$p_3 = N(N^2 - 3N + 2)(p^D)^3(1 - p^D)^{N-3}/6. \quad (3.28)$$

Более того, даже зависимость P'/P_0 от p^D в этом случае может быть нелинейной, как показывают результаты расчётов для молекулы гена, кодирующего интерферон alpha 17, приведённые в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Значения P'/P_0 при $n = 980$

p^D, ppm	$E_{\text{кр}}^H = E_1$	$E_{\text{кр}}^H = E_2$
156	1,008842	1,012899
120	1,007329	1,010580
100	1,006323	1,009095
80	1,005218	1,007487
60	1,004024	1,005766
40	1,002753	1,003941

Таким образом, показано, что вероятность возникновения открытых состояний между азотистыми основаниями в двухцепочечной дидоксирибонуклеиновой кислоты зависит от концентрации дейтерия в жидкой среде, окружающей молекулу, и от величины энергии разрыва водородных связей ($E_{\text{кр}}$). При энергии разрыва водородных связей равной $0,335 \cdot 10^{-22}$ Н·м наблюдается практически линейное уменьшение вероятности появления открытых состояний между азотистыми основаниями в двухцепочечной дидоксирибонуклеиновой кислоты (для первых 10 пар оснований гена, кодирующего интерферон alpha 17) в диапазоне концентраций дейтерия от 156 до 40 ppm в жидкой среде, окружающей молекулу. При этом вероятность разрыва водородных связей между азотистыми основаниями в

случае внедрения даже одного атома дейтерия в молекулу дизоксирибонуклеиновой кислоты достоверно превышает вероятность аналогичного разрыва в той же молекуле, содержащей только атомы протия ($P'/P_0 > 1$), что свидетельствует об уменьшении стабильности молекулярной структуры дизоксирибонуклеиновой кислоты. Если же энергия разрыва водородных связей равна $0,345 \cdot 10^{-22}$ Н·м, то в диапазоне концентраций дейтерия от 156 до 40 ppm в жидкой среде, окружающей молекулу дизоксирибонуклеиновой кислоты, наблюдается практически линейное возрастание вероятности возникновения открытых состояний между ее азотистыми основаниями, однако в целом вероятность разрыва водородных связей между азотистыми основаниями в случае внедрения атома дейтерия в молекулу дизоксирибонуклеиновой кислоты достоверно не превышает вероятность аналогичного разрыва в той же молекуле, содержащей только атомы протия ($P'/P_0 < 1$).

Представленные результаты опубликованы в: Джимаков С.С., Дроботенко М.И., Басов А.А., Свидлов А.А., Федулова Л.В., Лясота О.М., Барышев М.Г. Математическое моделирование возникновения открытых состояний в молекуле ДНК в зависимости от концентрации дейтерия в окружающей жидкой среде при разных значениях энергии разрыва водородной связи // Доклады Академии наук. 2018. Том 483. № 5. С. 564–566.; Джимаков С.С., Дроботенко М.И., Басов А.А., Свидлов А.А., Барышев М.Г. Математическое моделирование учета открытых состояний в зависимости от $^2\text{H}/^1\text{H}$ соотношения в двухцепочечной молекуле ДНК // Математическая биология и биоинформатика. 2019. Т. 14. № 2. С. 612–624.

3.2 Теоретическое исследование влияния единичных замен протия на дейтерий в водородных связях органической молекулы на изменение ее механических параметров

В параграфе представлены данные математического моделирования возникновения открытых состояний между азотистыми основаниями в гене *D*.

melanogaster при замещении атома протия на дейтерий. Установлено, что в физиологическом диапазоне концентраций дейтерия замены протия на дейтерий увеличивают вероятность разрыва связи между комплементарными азотистыми основаниями на 0,22-0,60%, что отражает его способность замедлять скорость считывания генетической информации в процессах транскрипции, тогда как в условиях, ослабляющих силу межспиральных водородных связей в молекуле дизоксирибонуклеиновой кислоты, замена атома протия на дейтерий увеличивает частоту возникновения открытых состояний, увеличивая вероятность модификации азотистых оснований при воздействии повреждающих факторов внешней среды.

Возникновение открытых состояний в молекуле дизоксирибонуклеиновой кислоты является облигатным условием, обеспечивающим ее функциональную активность, в том числе облегчающим специфические межмолекулярные дизоксирибонуклеиновой кислоты-белковые взаимодействия в процессе транскрипции, фолдинга и репликации. Учитывая, что значительная часть дизоксирибонуклеиновой кислоты в эукариотической клетке находится в конденсированном состоянии и связана с гистонами, исследование ее молекулярной динамики *in vivo* существенно затруднено, поэтому целесообразным представляется изучение открытых состояний в молекуле дизоксирибонуклеиновой кислоты с помощью математического моделирования [212, 213]. Последнее удобно для аналитического исследования, так как позволяет изучать дизоксирибонуклеиновой кислоты в значительно более длительные временные периоды по сравнению с ее молекулярной динамикой *in vivo*.

При этом, необходимо учитывать, что возникновение открытого состояния прежде всего инициируется разрывом водородных связей в комплементарных азотистых основаниях, способных наряду или во взаимодействии с другими, образующими нековалентными факторами, стабилизирующими ее пространственную структуру (стэкинг, перенос заряда π -сопряженной системой, пространственная суперспирализация) приводить к

формированию участков денатурации в молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты [164]. При этом необходимо учитывать, что участки открывания дизооксирибонуклеиновой кислоты, обусловленные разрывом водородных связей могут существенно отличаться по длине, особенно для определенных последовательностей азотистых оснований, поэтому, именно математическое моделирование помогает не только наиболее эффективно оценивать риск возникновения открытых состояний для различных генов и разных генотипов, но и одновременно производить поиск стабильных последовательностей пар азотистых оснований и участков, в большей мере подверженных процессу денатурации [214, 215].

Кроме того, особую актуальность исследования молекулярной динамики дизооксирибонуклеиновой кислоты можно обосновать также тем, что именно возникающие участки с различными по длине открытыми состояниями в первую очередь могут инициировать, например, переходы типа спираль-клубок с частичным сбросом суперспирализованного напряжения (или иные этапы фолдинга), а также изотопный обмен (в том числе D/H-ротацию) или окислительную модификацию азотистых оснований, что в целом играет ключевую роль при активном функционировании дизооксирибонуклеиновой кислоты, а также ее репарации после воздействия неблагоприятных факторов, или же в свою очередь являться пусковым механизмом в процессах онко- и мутагенеза [207, 216]. Помимо вышеперечисленного математические расчеты кинетических показателей открытых состояний в зависимости от величины энергии внешних воздействий представляются достаточно важным еще и потому, что открытые состояния могут значительно отличаться термодинамическими свойствами в зависимости от первичной структуры участка молекулы дизооксирибонуклеиновой кислоты, вида самого открытого состояния, а также особенностей взаимодействия различных открытых состояний между собой, что изменяет их энергетические показатели в широком интервале [217]. Следует понимать, что в таких условиях внедрение в молекулу

дизоксирибонуклеиновой кислоты даже одного дейтрона способно приводить к изменению термодинамических характеристик не только в месте непосредственного внедрения *in situ*, но и на отдаленных участках, что достаточно сложно оценить традиционными методами молекулярной биологии [57, 73, 86, 218]. Кроме того, в исследованиях последних лет показано, что снижение концентрации дейтерия ниже природного уровня также оказывает существенное влияние на метаболические процессы [91, 219, 220] и это важно учитывать при моделировании биологических процессов в условиях непрерывного D/H обмена.

При проведении расчетов была использована математическая модель, описанная в п. 3.1 [117, 182].

Влияние D/H обмена на возникновение открытых состояний (ОС) характеризуется величиной вероятности возникновения ОС:

$$P = p_0P_0 + p_1P_1 + p_2P_2 + \dots + p_NP_N, \quad (3.29)$$

где p_l – вероятность того, что в рассматриваемой молекуле ровно l водородных связей заменены на дейтериевые; P_l – вероятность возникновения ОС в молекуле, у которой ровно l водородных связей заменены на дейтериевые, N – количество водородных связей в молекуле.

Вычислим вначале p_l . Вероятность образования дейтериевой связи p^D в молекуле дизоксирибонуклеиновой кислоты зависит от концентрации дейтерия в жидкости, окружающей эту молекулу. Некоторые авторы [211] считают, что вероятность p^D численно равна этой концентрации, то есть $p^D = 1,56 \cdot 10^{-4}$ при концентрации дейтерия равной 156 ppm.

Считая, что образование новой дейтериевой связи в молекуле дизоксирибонуклеиновой кислоты не зависит от наличия и расположения других дейтериевых связей в этой молекуле, получим:

$$p_0 = (1 - p^D)^N, \quad (3.30)$$

$$p_1 = Np^D(1 - p^D)^{N-1} \quad (3.31)$$

Вероятности P_l найдем на основе численного решения задачи (3.1)-(3.8) для молекулы, у которой ровно l водородных связей заменены на дейтериевые. Для этого построим на отрезке $[0, T]$ множество точек $t_j = j\tau, j = \overline{1, m}$, где $\tau = T/m$. При $t = t_j$ отношение q_j количества открытых пар оснований к общему количеству пар оснований n и среднее арифметическое по точкам t_j значение этих отношений $Q = m^{-1}(\sum_{j=1}^m q_j)$.

Считая, что вероятности возникновения в молекуле различных комбинаций l дейтериевых связей одинаковы, получили, что вероятность P_l возникновения ОС на промежутке времени $[0, T]$ в молекуле, у которой ровно l водородных связей заменены на дейтериевые, равна Q_l – среднему арифметическому значению величин Q по всем возможным комбинациям l дейтериевых связей.

Будем считать, что замена протия, образующего водородную связь в парах оснований, на дейтерий изменяет ее величину в k^D раз. Таким образом, значение величины, характеризующей упругие свойства водородной связи в паре А-Т, будет принимать значения k_{12} , если обе связи образованы протием, $k_{12}(k^D+1)/2$ и $k_{12}k^D$, если одна или две связи образованы дейтерием. Соответственно, в паре С-Г эта величина будет принимать значения k_{12} , если все три связи образованы протием, $k_{12}(k^D+2)/3$, $k_{12}(2k^D+1)/3$ и $k_{12}k^D$, если одна, две или три связи образованы дейтерием.

Пусть $E_{кр}^H$ – критическое значение потенциальной энергии, превышение которого приводит к разрыву в паре оснований со всеми протиевыми связями; тогда критическое значение для пары, в которой хотя бы одна протиевая связь заменена дейтериевой, будем принимать равным $E_{кр}^D = k^D \cdot E_{кр}^H$.

Изменением массы (а значит, и момента инерции) азотистых оснований, к которым приводит замена протия, образующего водородную связь в парах

оснований, на дейтерий, будем пренебрегать. Значение коэффициента $k^D = 1,05$ выбиралось с учетом того, что дейтериевая связь на 5 % прочнее водородной [51, 211, 221].

Для дизоксирибонуклеиновой кислоты дрозофилы $n = 5000$ [147], количество водородных связей $N = 12256$, по две в паре А-Т, по три в паре С-Г, значения коэффициентов уравнений, описывающих поведение рассматриваемой механической системы, взяты из работы [117], внешнее периодическое воздействие описывается $F_0 \cos \omega t$, где $F_0 = 0,526 \cdot 10^{-22}$ Дж, $\omega = 0,4 \cdot 10^{-12}$ с⁻¹ (данные также взяты из [117]).

При $p^D = 1,56 \cdot 10^{-4}$ значения $p_0 \approx 0,147772$, $p_1 \approx 0,282575$, $p_2 + p_3 + \dots + p_N \approx 0,569653$. Большое количество комбинаций дейтериевых связей при $l \geq 2$ требует значительных вычислительных ресурсов для вычисления величин P_l . Поэтому, несмотря на то, что вероятность $p_2 + p_3 + \dots + p_N$ образования в молекуле дизоксирибонуклеиновой кислоты дрозофилы более одной дейтериевой связи $\approx 0,569653$, мы ограничимся рассмотрением влияния на возникновение ОС единичных замен протия на дейтерий.

На рисунках 3.3 и 3.4 изображены графики зависимости от $E_{кр}^H$ величин P_0 и P_0/P_1 . Из рисунке 3.3 видно, что вероятность P_0 возникновения ОС в молекуле дизоксирибонуклеиновой кислоты, у которой все связи протиевые, нелинейно зависит от значений энергии разрыва $E_{кр}^H$. Рис. 3.4 показывает, что влияние единичных замен протия на дейтерий на изменение вероятности возникновения ОС в молекуле дизоксирибонуклеиновой кислоты имеет сложный характер.

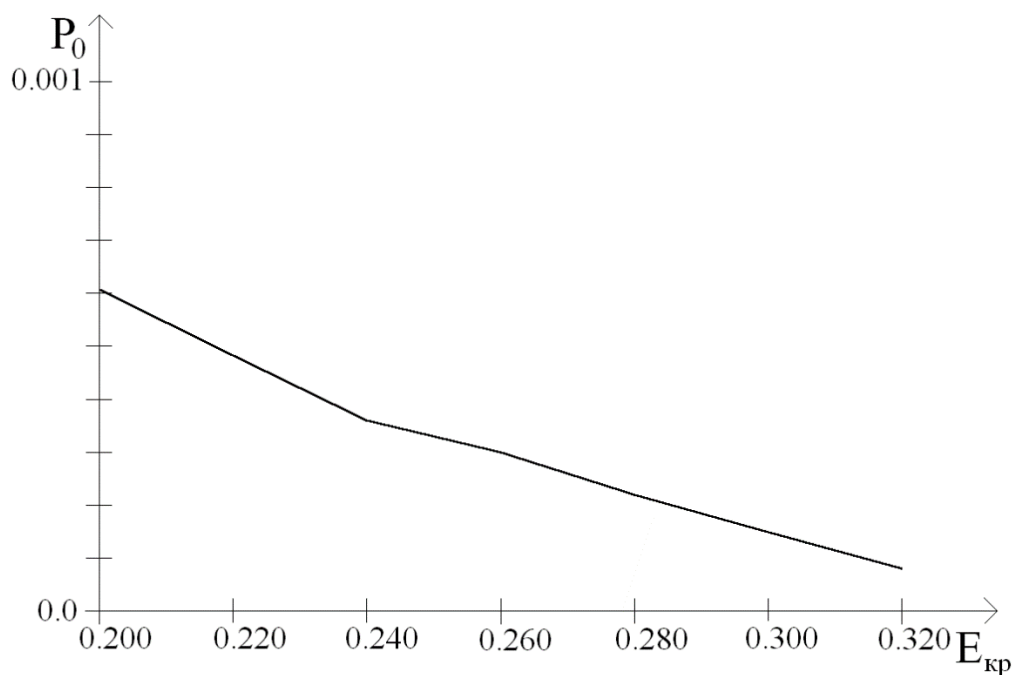


Рисунок 3.3 – Зависимость вероятности возникновения открытых состояний в молекуле, в которой отсутствуют дейтериевые связи (P_0) от критического значения энергии разрыва, превышение которой приводит к разрыву в паре оснований с протиевой связью ($E_{кр}^H$).

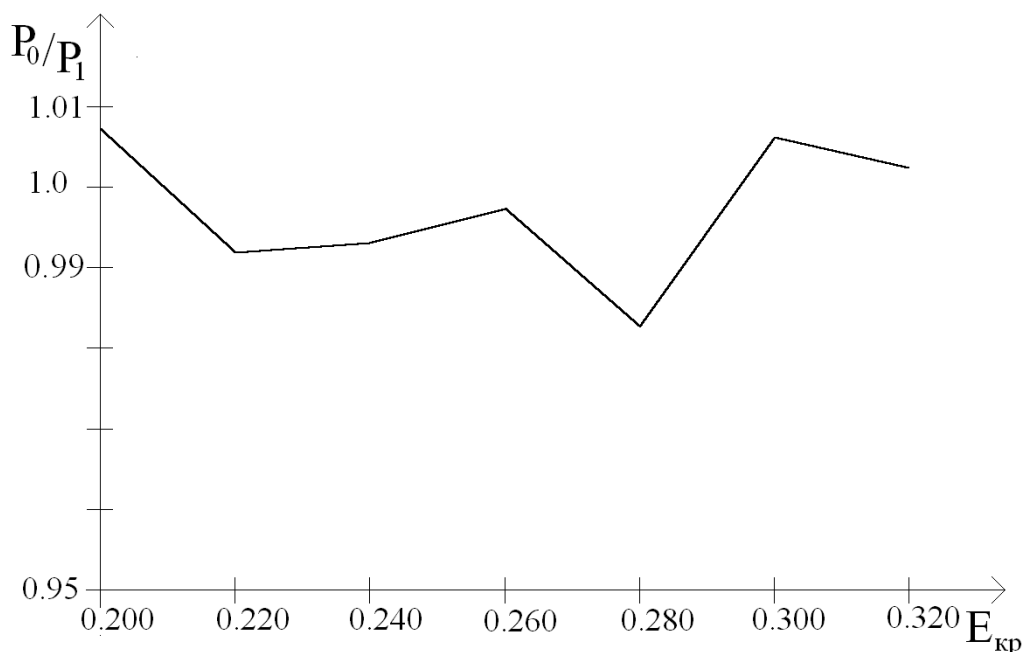


Рисунок 3.4 – Зависимость отношения вероятности возникновения открытых состояний в молекуле, в которой отсутствуют дейтериевые связи к вероятности возникновения открытых состояний в молекуле, в которой присутствует одна дейтериевая связь (P_0/P_1) от критического значения

энергии разрыва, превышение которой приводит к разрыву в паре оснований с протиевой связью ($E_{кр}^H$).

В таблице 3.5 приведены значения P_0 , P_1 , P_0/P_1 , вычисленные при $T = 1,0 \cdot 10^{-10}$ с, $\tau = 0,001 \cdot 10^{-10}$ с для различных значений $E_{кр}^H$. Видно, что вероятности P_0 и P_1 монотонно убывают с ростом энергии разрыва $E_{кр}^H$. Изменение величины P_0/P_1 показывает, что даже единичные замены протия на дейтерий влияют на вероятность возникновения ОС, как уменьшая, так и увеличивая её для различных значений $E_{кр}^H$.

Таблица 3.5 – Значения P_0 , P_1 и P_0/P_1 , вычисленные при $T = 1,0 \cdot 10^{-10}$ с, $\tau = 0,001 \cdot 10^{-10}$ с для различных значений $E_{кр}^H$

$E_{кр}^H \cdot 10^{-22}$ Н·м	P_0	P_1	P_0/P_1
0,200	0,0606	0,0601	1,008
0,220	0,0482	0,0485	0,993
0,240	0,0358	0,0361	0,992
0,260	0,0297	0,0298	0,996
0,280	0,0217	0,0221	0,982
0,300	0,0147	0,0146	1,007
0,320	0,0077	0,0077	1,000

Из таблицы 6 видно, что вероятность P_0 возникновения ОС в молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты, у которой все связи протиевые, нелинейно зависит от значений энергии разрыва $E_{кр}^H$. При этом наличие атома дейтерия увеличивает вероятность разрыва связи между комплементарными азотистыми основаниями на 0,22-0,60 %, что подтверждает влияние единичных замен протия на дейтерий на изменение вероятности возникновения ОС в молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты.

Таким образом, математическое моделирование возникновения открытых состояний в молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты позволяет

прогнозировать резистентность генома к воздействию повреждающих факторов различной интенсивности, в том числе влияние сверхнизких концентраций дейтерия на генетический аппарат.

При возникновении условий, ослабляющих силу межспиральных водородных связей в молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты, наличие атома дейтерия увеличивает частоту возникновения открытых состояний, повышая, таким образом, риск мутаций за счет большей доступности азотистых оснований к повреждающим воздействиям неблагоприятных внешних факторов. Последнее подтверждает возможность возрастания частоты спонтанных мутаций, опосредованных влиянием атомов дейтерия на молекулярную динамику двухцепочечной дизооксирибонуклеиновой кислоты, что может играть существенную роль в процессе эволюции живых организмов. Полученные результаты также показывают неравноценность отдельных термодинамических/кинетических эффектов, связанных с заменой дейтерия на протий в молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты, что указывает на способность реакций D/H обмена регулировать скорость жизненно важных процессов биологически активных систем (например, считывание генетической информации). Таким образом, не исключается вероятность наличия у живых организмов особых механизмов различного уровня организации, осуществляющих долговременную адаптацию к выраженным колебаниям D/H соотношения в окружающей среде.

При этом стоит отметить, что на основании полученных решений задачи Коши (системы n нелинейных дифференциальных уравнений) можно сделать вывод о том, что даже при замене в молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты всего одного атома протия на дейтерий и одинаковой средней скорости репликации дизооксирибонуклеиновой кислоты могут возникать отдельные периодические замедления и эквивалентные им в таком случае по суммарной выраженности ускорения, хотя в целом и нивелирующие друг друга, но способные за счет изменения внутритактового паттерна считывания генетической информации приводить к общему накоплению ошибок

воспроизведения генетической информации, сопровождающихся на определенном этапе переходом количественных изменений (число сбоев репликации) в качественные дефекты (мутации), приводящие к стойким, в том числе наследуемым, нарушениям генома у живых существ.

Полученные данные опубликованы в Basov A., Drobotenko M., Svidlov A., Gerasimenko E., Malyshko V., Elkina A., Baryshev M., Dzhimak S. Inequality in the frequency of the open states occurrence depends on single 2H/1H replacement in DNA // *Molecules*. 2020. Volume 25, Issue 16, P. 3753.; Dzhimak S.S., Svidlov A.A., Basov A.A., Baryshev M.G., Drobotenko M.I. The effect of single deuterium substitutions for protium in a DNA molecule on the occurrence of open states // *Biophysics*. 2018. Vol. 63. №4. P. 497–500.

3.3 Исследование закономерностей влияния концентрации дейтерия на возникновение областей с разорванными водородными связями в органической молекуле

Несмотря на достаточную прочность структуры двойной спирали дизоксирибонуклеиновой кислоты, в ней может происходить расплетение сахарофосфатных цепочек. В молекулярной и клеточной биологии гибридизация и дегибридизация дизоксирибонуклеиновой 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. Например, РНК-полимеразы «читают» одноцепочечную дизоксирибонуклеиновую кислоту, и

для инициации транскрипции требуется образование так называемого транскрипционного пузыря в начальном участке транскрипции [210].

Известно, что изменение содержания дейтерия в живых системах оказывает влияние на метаболические процессы в них [126, 222]. Это касается как повышенных [73], так и пониженных концентраций дейтерия относительно природного уровня [71, 223-227].

С учетом вышесказанного, попадание атома дейтерия в водородные связи между парами азотистых оснований дизоксирибонуклеиновой кислоты может оказывать влияние на термодинамические характеристики как в месте его локализации, так и на отдаленных участках [4]. Провести 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 дизоксирибонуклеиновой кислоты, могут оказывать влияние на вероятности возникновения открытых состояний [228]. Кроме того, в [179] показано, что вероятность возникновения ОС зависит как от концентрации дейтерия в окружающей молекулу жидкой среде, так и от критической энергии разрыва водородных связей. Поскольку возникновение пузырьков денатурации в молекуле дизоксирибонуклеиновой кислоты имеет ключевое значение для считывания генетической информации, необходимо проведение исследований влияния атомов дейтерия в водородных связях между парами азотистых оснований на этот процесс.

Для моделирования процессов образования открытых состояний и пузырей в двойной спирали дизоксирибонуклеиновой кислоты будем использовать математическую модель, описывающую описанную в пункте 3.1.

Исследование влияния $^2\text{H}/^1\text{H}$ обмена на образование и динамику ОС будем проводить на примере гена, кодирующего интерферон alpha 17. Для этого гена $n = 980$, значения коэффициентов уравнений (3.1)-(3.6) приведены в таблице 2.1 (данные взяты из [117]), $F_0 = 0,526 \times 10^{-22}$ Дж, $\omega = 0,4 \times 10^{12}$ с $^{-1}$.

Будем считать, что $E_{\text{кр}}^{\text{D}} = k^{\text{D}} \cdot E_{\text{кр}}^{\text{H}}$, $k_{12}^{\text{D},i} = k^{\text{D}} \cdot k_{12}^{\text{H},i}$, если одна из водородных связей в i -й паре оснований заменена на дейтериевую, $k^{\text{D}} = 1,05$. Значение коэффициента k^{D} выберем с учетом того, что дейтериевая связь на 5% прочнее водородной. Порядок критической энергии $E_{\text{кр}}^{\text{H}}$ согласован с экспериментальными данными из работы.

Вероятность p_l возникновения пузырей ОС длины l в молекуле дизооксирибонуклеиновой кислоты вычислим на основе численного решения задачи (3.1)-(3.8). Для этого на временном отрезке $[0, T]$ построим множество точек $t_j = j\tau$, $j = \overline{1, m}$, где $\tau = T/m$. Вычислим при $t = t_j$ отношение q_j^l количества пар оснований с разорванной связью, содержащихся в пузырях длины l , к общему количеству пар оснований n ; тогда вероятность p_l равна среднему арифметическому по точкам t_j значению этих отношений (3.32):

$$p_l = (\sum_{j=1}^m q_j^l) / m. \quad (3.32)$$

Для исследования влияния $^2\text{H}/^1\text{H}$ обмена на возникновение зон открытых состояний выбирались несколько точек локализации дейтерия, приводящие к наибольшим отличиям вероятности возникновения открытых состояний по сравнению с молекулой дизооксирибонуклеиновой кислоты, не содержащей атомов дейтерия.

Задача (3.1)-(3.8) решалась методом Рунге–Кутты 4-го порядка при $T = 2,0 \times 10^{-10}\text{с}$, $\tau = 0,00000625 \cdot 10^{-10}\text{с}$. На рисунке 3.5 изображены участки открытых состояний (выделены черным цветом) при $E_{\text{кр}}^{\text{H}} = 270 \times 10^{-25}\text{Н}\cdot\text{м}$. На рисунке 3.5 в качестве примера приведена картина возникновения и исчезновения открытых состояний в гене, кодирующем интерферон альфа 17 при $E_{\text{кр}}^{\text{H}} = 270 \times 10^{-25}\text{Н}\cdot\text{м}$ при отсутствии атомов дейтерия. Участки открытых состояний выделены черным цветом.

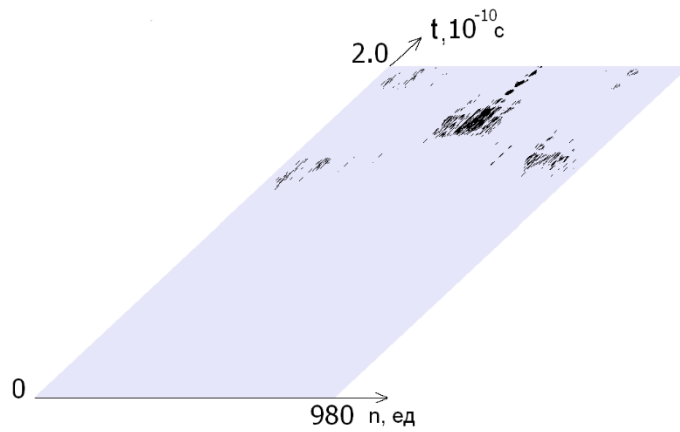


Рисунок 3.5 – Динамика зон открытых состояний в гене, кодирующем интерферон альфа 17 при $E_{\text{кр}}^{\text{H}} = 270 \times 10^{-25} \text{H}\cdot\text{м}$.

На рисунках 3.6–3.8 для различных значений критической энергии $E_{\text{кр}}^{\text{H}}$ приведены графики зависимости от l вероятности P_l возникновения пузырей длиной не меньше l . Жирной линией изображены графики для молекулы, содержащей только водородные связи, тонкими линиями – для молекул с единичной заменой водородной связи на дейтериевую. Цифрой 1 выделены графики, соответствующие локализации атома дейтерия в 20-й паре оснований, цифрой 2 – в 353-й, цифрой 3 – в 376-й паре оснований молекулы дидоксирибонуклеиновой кислоты.

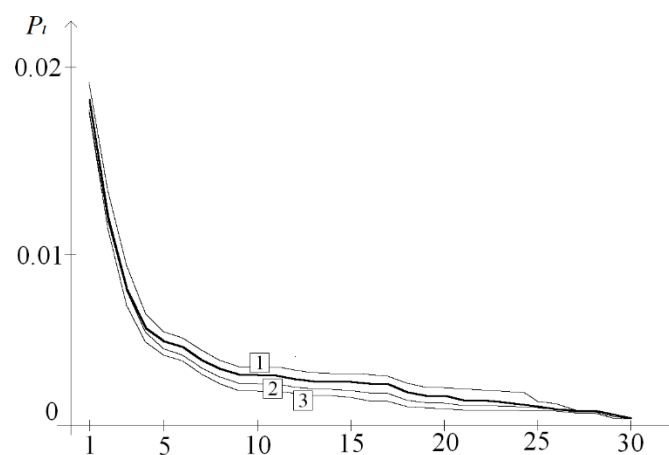


Рисунок 3.6 – Зависимости от l вероятности P_l возникновения пузырей длиной не меньше l для $E_{\text{кр}}^{\text{H}} = 270 \times 10^{-25} \text{H}\cdot\text{м}$.

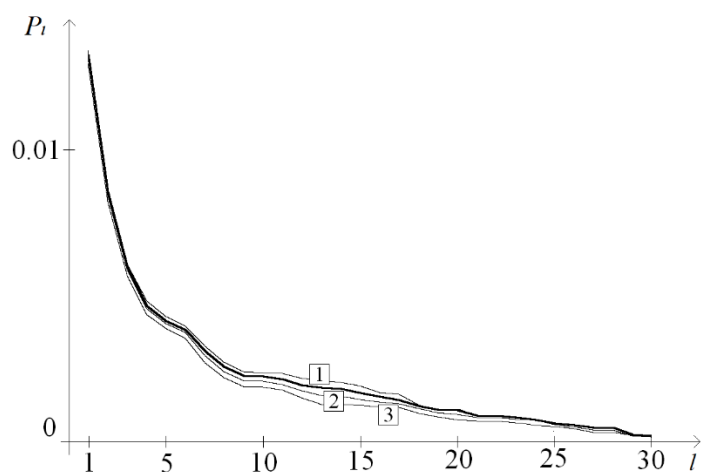


Рисунок 3.7 – Зависимости от l вероятности P_l возникновения пузырей длиной не меньше l для $E_{кр}^H = 280 \times 10^{-25} \text{Н}\cdot\text{м}$.

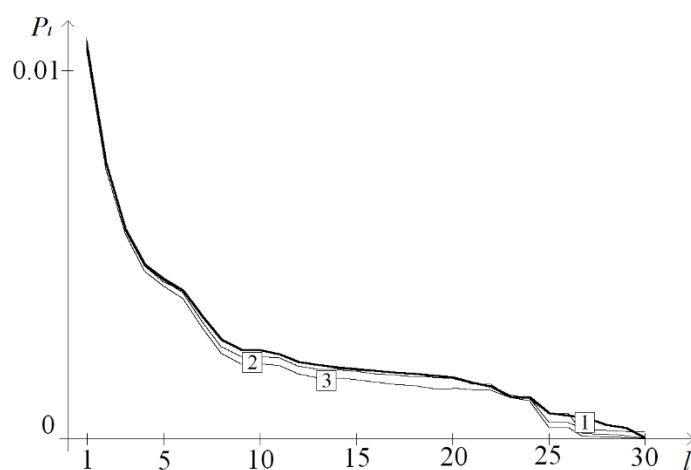


Рисунок 3.8 – Зависимости от l вероятности P_l возникновения пузырей длиной не меньше l для $E_{кр}^H = 290 \times 10^{-25} \text{Н}\cdot\text{м}$.

В таблице 3.6 для различных $E_{кр}^H$ приведены значения P_0 – вероятностей образования открытых состояний при отсутствии дейтериевых связей в молекуле дидоксирибонуклеиновой кислоты и P_i – вероятностей образования открытых состояний при локализации атома дейтерия в i -й паре оснований.

Таблица 3.6 – Значения вероятностей образования открытых состояний при различных $E_{кр}^H$

$E_{кр} \cdot 10^{-25} \text{ Н}\cdot\text{м}$	P_0	P_{020}	P_{353}	P_{376}
270	0,0173477	0,0178338	0,0168469	0,0170676
280	0,0132254	0,0132540	0,0131500	0,0130869

290	0,0106987	0,0108056	0,0107960	0,0106176
-----	-----------	-----------	-----------	-----------

В таблице 3.7 для различных энергий разрыва водородной связи между парами азотистых оснований приведены вероятности образования пузырей различной длины при наличии и отсутствии атома дейтерия в водородных связях. Через P_0 обозначена вероятность возникновения пузыря заданной длины в отсутствие атомов дейтерия, через P_i – вероятность образования пузыря заданной длины при локализации атома дейтерия в i -й паре оснований.

Таблица 3.7 – Вероятности образования пузырей при различной локализации атома дейтерия для разных энергий разрыва водородной связи

$E_{кр} \cdot 10^{-25}$ Н·м	Длина пузыря	P_0	i	P_i	P_0/P_i
270	21	0,0002338	20	0,0001488	1,571
	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
	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
	17	0,0000426	353	0,0000267	1,595
	27	0,0000702	376	0,0002460	0,284

Влияние $^2\text{H}/^1\text{H}$ обмена на вероятность образования зон открытых состояний характеризуется величиной P_0/P_i . В таблицах 3.6 и 3.7 видно, например, что при $E_{кр} = 270 \times 10^{-25}$ Н·м величина $P_0/P_{376} = 1,016$ для вероятности возникновения открытых состояний и $P_0/P_{376} = 0,644$ для вероятности возникновения пузырей длины 16, т.е. локализация атома дейтерия в 376-й паре оснований приводит к уменьшению вероятности возникновения открытых состояний и к увеличению вероятности возникновения пузырей длины 16. При том же значении $E_{кр}$ локализация атома

дейтерия в 20-й паре оснований приводит к увеличению вероятности возникновения открытых состояний ($P_0/P_{20} = 0,973$) и к уменьшению вероятности возникновения пузырей длины 21 ($P_0/P_{20} = 1,571$).

Таким образом, $^2\text{H}/^1\text{H}$ обмен в парах азотистых оснований по-разному влияет на образование зон открытых состояний, причем это влияние на образование пузырей определенной длины более значительное, чем на образование открытых состояний в целом.

Проведенный анализ полученных результатов позволяет сделать еще несколько важных выводов, в том числе о селективной чувствительности и специфичной молекулярной динамике дизоксирибонуклеиновой кислоты при единичной $^2\text{H}/^1\text{H}$ замене в разных участках ее молекулы в условиях определенного по интенсивности внешнего воздействия, например образование открытых состояний было более выражено при $E_{\text{кр}} = 270 \times 10^{-25}$ Н·м, тогда как образование пузырей длиной от 17 до 27 нуклеотидов более часто наблюдалось при $E_{\text{кр}} = 290 \times 10^{-25}$ Н·м.

Последнее также указывает на способность единичной замены протия на дейтерий в определенных (критических) участках дизоксирибонуклеиновой кислоты вызывать за счет изменения скорости разрывов водородных связей между отдельными парами азотистых оснований ускорение или замедление считывания генетической информации. Кроме того, $^2\text{H}/^1\text{H}$ замены, в зависимости от внешних условий могут снижать или повышать скорость транскрипции путем модификации пространственной напряженности двуспиральной молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты при уменьшении или увеличении (последнее в данном случае 1,26 раза чаще) частоты раскрытия денатурационных пузырей. Все это может приводить к существенному изменению сродства промоторных областей молекулы дизоксирибонуклеиновой кислоты (прежде всего термодинамических показателей в точках связывания) к конкретным ферментам. Например, на стадии инициации при взаимодействии промотора с дизоксирибонуклеиновой кислоты-зависимой РНК-полимеразой и другими белковыми

транскрипционными факторами, а также при изменении скорости взаимодействия дидоксирибонуклеиновой кислоты и ферментов системы её репарации, что может, к примеру, при замедлении их взаимодействия, повышать вероятность возникновения мутаций в организме.

Таким образом, математическое моделирование возникновения открытых состояний в молекуле дидоксирибонуклеиновой кислоты позволяет прогнозировать резистентность генома к воздействию повреждающих факторов различной интенсивности, в том числе влияние сверхнизких концентраций дейтерия на генетический аппарат.

Проведенные методами математического моделирования оценочные эксперименты по влиянию изотопного $^2H/{}^1H$ обмена на процессы раскрытия пар оснований показывают, что присутствие дейтерия в последовательности нуклеотидов может приводить - в зависимости от значений энергии разрыва водородной связи - как к увеличению, так и к уменьшению вероятности возникновения открытых состояний. В естественных условиях атом дейтерия более вероятно способен замедлять скорость считывания генетической информации в процессах транскрипции, сужая при персистентном воздействии в течение клеточного цикла низкоинтенсивного неблагоприятного фактора диапазон регуляторных механизмов и приводя к снижению адаптационного потенциала у клетки. Например, при уменьшении силы межспирального взаимодействия за счет водородных связей в молекуле дидоксирибонуклеиновой кислоты, наличие атома дейтерия увеличивает частоту появления открытых состояний, увеличивая тем самым, риск пострепликативной модификации в связи с большей доступностью азотистых оснований к повреждающим воздействиям факторов, инициирующих повреждения дидоксирибонуклеиновой кислоты.

Все вышесказанное указывает на вероятность увеличения нестабильности молекулы нуклеиновой кислоты, непосредственно связанного с влиянием атомов дейтерия на колебательные процессы в двунитевой молекуле дидоксирибонуклеиновой кислоты, что по-видимому, играло

определенную роль в ходе эволюции живых существ. Кроме того, выявленные на основании проведенных расчетов особенности измерения энергии водородной связи, демонстрируют наличие неоднородности отдельных термодинамических процессов, сопровождающих обмен в молекуле дидоксирибонуклеиновой кислоты дейтерия на протий, показывая их способность регулировать интенсивность протекания процессов на молекулярном уровне в биологически активных системах, в том числе, наблюдающихся при считывании генетической информации. При этом, зоны с открытыми состояниями являются эффективным рассеивателем внутренней энергии. Однако, более прочная дейтериевая связь может задерживать образование открытого состояния и привести к накоплению внутренней энергии с последующим возрастанием вероятности образования открытых состояний. Более того, нельзя исключить и другие механизмы реализации изотопных эффектов при их включении в макромолекулы, например, связанные с изотопным резонансом [38] в живых системах. Поэтому даже при замене в молекуле дидоксирибонуклеиновой кислоты всего одного атома протия на дейтерий и одинаковой средней скорости репликации дидоксирибонуклеиновой кислоты могут возникать отдельные периодические замедления и эквивалентные им в таком случае по суммарной выраженности ускорения, хотя в целом и нивелирующие друг друга, но способные за счет изменения внутритактового паттерна считывания генетической информации приводить к общему накоплению ошибок ее воспроизведения, сопровождающихся на определенном этапе переходом количественных изменений (число сбоев репликации) в качественные дефекты структуры дидоксирибонуклеиновой кислоты.

Таким образом, участие атомов дейтерия в образовании водородных связей двойных спиралей молекул дидоксирибонуклеиновой кислоты может приводить к изменению времени передачи генетической информации, чем можно объяснить влияние даже небольших изменений концентрации дейтерия в среде на метаболические процессы у живых систем.

Описанные результаты опубликованы в Svidlov A.A., Drobotenko M.I., Basov A.A., Elkina A.A., Gerasimenko E.O., Malyshko V.V., Baryshev M.G., Dzhimak S.S. Influence of the $2\text{H}/1\text{H}$ isotope composition of the water environment on the probability of denaturation bubble formation in a DNA molecule // Physics of Wave Phenomena. 2021. Vol. 29. №2. P. 180–185.

Выводы к главе 3

Установлено, что вероятность возникновения открытых состояний между азотистыми основаниями в двухцепочечной дизоксирибонуклеиновой кислоты зависит от концентрации дейтерия в жидкой среде, окружающей молекулу, и от величины энергии разрыва водородных связей ($E_{\text{кр}}$). При энергии разрыва водородных связей равной $0,335 \cdot 10^{-22}$ Н·м наблюдается практически линейное уменьшение вероятности появления открытых состояний между азотистыми основаниями в двухцепочечной дизоксирибонуклеиновой кислоты (для первых 10 пар оснований гена, кодирующего интерферон alpha 17) в диапазоне концентраций дейтерия от 156 до 40 ppm в жидкой среде, окружающей молекулу. При этом вероятность разрыва водородных связей между азотистыми основаниями в случае внедрения даже одного атома дейтерия в молекулу дизоксирибонуклеиновой кислоты достоверно превышает вероятность аналогичного разрыва в той же молекуле, содержащей только атомы протия ($P'/P_0 > 1$), что свидетельствует об уменьшении стабильности молекулярной структуры дизоксирибонуклеиновой кислоты. Если же энергия разрыва водородных связей равна $0,345 \cdot 10^{-22}$ Н·м, то в диапазоне концентраций дейтерия от 156 до 40 ppm в жидкой среде, окружающей молекулу дизоксирибонуклеиновой кислоты, наблюдается практически линейное возрастание вероятности возникновения открытых состояний между ее азотистыми основаниями, однако в целом вероятность разрыва водородных связей между азотистыми основаниями в случае внедрения атома дейтерия в молекулу дизоксирибонуклеиновой кислоты достоверно не превышает вероятность

аналогичного разрыва в той же молекуле, содержащей только атомы протия ($P'/P_0 < 1$).

Установлено, что за счет попадания атома дейтерия в водородные связи между парами азотистых оснований изменяется величина критической энергии разрыва водородных связей по всей длине гена. Для гена, кодирующего интерферон alpha 17, уже при значении критической энергии разрыва связей равной $0,358 \cdot 10^{-22}$ Н·м еще наблюдается ненулевая вероятность возникновения ОС при отсутствии дейтерия в молекуле, а при значении энергии разрыва водородной связи $0,359 \cdot 10^{-22}$ Н·м и более эта вероятность равна нулю. В то же время при наличии хотя бы одного атома дейтерия в молекуле ненулевая вероятность возникновения ОС наблюдается даже при значении энергии разрыва водородной связи $0,369 \cdot 10^{-22}$ Н·м, и лишь при значении $0,370 \cdot 10^{-22}$ Н·м и более эта вероятность становится равной нулю.

Вероятность P_0 возникновения ОС в молекуле дидоксирибонуклеиновой кислоты, у которой все связи протиевые, нелинейно зависит от значений энергии разрыва $E_{кр}^H$. При этом наличие атома дейтерия увеличивает вероятность разрыва связи между комплементарными азотистыми основаниями на 0,22-0,60 %, что подтверждает влияние единичных замен протия на дейтерий на изменение вероятности возникновения ОС в молекуле дидоксирибонуклеиновой кислоты.

Установлена селективная чувствительность молекулярной динамики дидоксирибонуклеиновой кислоты на единичные $^2\text{H}/^1\text{H}$ замены в разных участках ее молекулы в условиях определенного по интенсивности внешнего воздействия, например образование открытых состояний было более выражено при $E_{кр} = 270 \times 10^{-25}$ Н·м, тогда как образование пузырей длиной от 17 до 27 нуклеотидов более часто наблюдалось при $E_{кр} = 290 \times 10^{-25}$ Н·м. Последнее также указывает на способность единичной замены протия на дейтерий в определенных (критических) участках дидоксирибонуклеиновой кислоты вызывать за счет изменения скорости разрывов водородных связей

между отдельными парами азотистых оснований ускорение или замедление считывания информации.

4 Физико-математические основы новой теории, объясняющей процессы изменения энергии химической связи между парами атомов стабильных изотопов

4.1 Исследование закономерностей неравновесного распределения стабильных изотопов в гетерогенных системах и изменение физических свойств конденсированных веществ

В результате анализа опубликованных ранее экспериментальных данных было установлено, что образование «изотопного шока» свойственно для тех случаев, когда велика вероятность образования связей с нескомпенсированным нейтроном (нечетное количество нейтронов) или в присутствии в системе химического элемента, чаще всего металла, который тоже имеет нескомпенсированный нейтрон или нейтроны.

Например, для пар изотопов справедливы равенства: $^{15}\text{N}-^1\text{H} = 8n - 8p$ и $^{14}\text{N}-^1\text{H} = 7n - 8p$, в данном случае нескомпенсированный нейтрон отсутствует, следовательно, «изотопный шок» не наблюдается, в то время как в парах изотопов $^{13}\text{C}-\text{D} = 8n - 7p$ и $^{15}\text{N}-^2\text{H} = 9n - 8p$ присутствует нескомпенсированный нейтрон и как следствие, наблюдается явление «изотопного шока».

Рассматривая вероятность образования вышеописанной закономерности, называемой далее нейтронный эффект, установлено, что возможный механизм его реализации обусловлен способностью нескомпенсированного нейтрона изменять спин ядра в атомах и как следствие, оказывать влияние на реакционную способность химической связи изотопов, имеющих суммарную нескомпенсированность по нейтронам.

Одним из объяснений механизма возникновения нейтронного эффекта является нарушение баланса по массе в системе с равновесным зарядом. В атоме равновесие по массе обеспечивается не только за счет взаимодействия нейтронов и протонов, но и нейтронов попарно между собой, например: а.м. $[p^+ + n^0] \approx 1:1$ (равновесная масса), а.м. $[n_i^0 + n_{i+1}^0] = 1:1$ (равновесная масса).

Важно отметить, что в триаде электрон, протон, нейтрон отмечается равновесие по массе и по заряду. По сравнению с массовыми эффектами, более сильное взаимодействие электрона и протона объясняет отсутствие дисбаланса по массе в ядрах атомов с большим количеством протонов, чем нейтронов.

При этом, присутствие нескомпенсированного по массе нейтрона способно привести к появлению зависящего от массы дисбаланса в системе с равновесным зарядом, что присуще для части тяжелых изотопов или связей, образованных ими, например, $[p^+ + e^- + n_i^0] \cdot n_{i+1}^0 = 0$ (равновесная масса), но $\neq 1:1$ (неравновесная масса).

Воздействие нескомпенсированного по массе нейтрона n_{i+1}^0 происходит не на все ядро одновременно, а стохастически по времени на каждую триаду электрон-протон-нейтрон, что, в свою очередь, ведет к проявлению эффекта масс, который пропорционален минимум $\frac{1}{2}$ равновесного протон-нейтронного взаимодействия, которое ведет к модифицированию силы взаимодействия заряженных частиц, то есть протон-электрон. Данное утверждение находит обоснование в том, что именно водородные связи очень чувствительны к распределению электронной плотности по всей молекуле, поэтому усиление или ослабление протон-электронного взаимодействия в различных частях может привести к возникновению туннельного эффекта [229-231].

В системе с тремя нейтронами вышеописанный эффект осуществляется за счет отсутствия возможности парных нейтронов компенсировать масс-флуктуации нескомпенсированного нейтрона во всем объеме атома, в то время, как в изотопах с большим количеством нейтронов, относительно протонов на 5 и более вероятно появление частичного равновесия масс за счет некоторого распределения в пространстве этих нейтронов, что снижает вероятность нейтронного эффекта.

Еще одним возможным механизмом, способным ускорить скорость ферментативной реакции является способность нескомпенсированного по массе нейтрона провоцировать квантовое туннелирование за счет вовлечения

одной из вышеописанных атомных триад в этот процесс с дальнейшим образованием энергии необходимой для появления новой химической связи, что способствует ускорению образования субстратов, необходимых для роста клеточных культур и организма в целом. Возникновение вышеописанного эффекта связано с появлением «изотопного шока» в присутствии тяжелых нерадиоактивных изотопов микро- и макроэлементов в живых системах. Кроме того, наблюдается экспоненциальное усиление этих явлений при сочетании различных изотопов биогенных элементов в биообъекте.

Данные эффекты имеет место, поскольку известны примеры коллективного протонного туннелирования в ряде систем. В присутствии электрон-ядерного магнитного взаимодействия в избирательных по электронному спину реакциях, появляется селективность по ядерному спину. Важно отметить, что в биологических объектах в составе органических молекул осуществление нейтронного эффекта происходит в составе групп атомов, связанных нековалентными и ковалентными взаимодействиями, а не на изолированных изотопах. В связи с чем, расчет нейтронного эффекта должен происходить как минимум, на атомную пару, которая имеет перекрывание электронных облаков, поэтому не будет наблюдаться линейного возрастания нейтронного эффекта при линейном утяжелении изотопов, которую образуют химическую связь. Так, например, для связи $^{13}\text{C}-\text{H}$ нейтронный эффект равен нулю и отсутствует вероятность возникновения изотопного резонанса, в то время как для связи $^{13}\text{C}-^2\text{H}$ нейтронный эффект равен 1 и высока вероятность возникновения изотопного резонанса [232]. Аналогично, для связи $^{18}\text{O}-\text{H}$ нейтронный эффект равен 1, в данном случае также высока вероятность изотопного резонанса, в то время как для связи $^{18}\text{O}-^2\text{H}$ нейтронный эффект равен 2 и вероятность образования изотопного резонанса мала.

Данными примерами можно объяснить неоднозначные экспериментальные данные некоторых авторов, полученные при обогащении биологических объектов тяжелыми изотопами и их смесями [233]. Данному явлению можно

найти подтверждение на практике: обогащение раковых клеток ^{13}C и ^2H , когда ожидаемо появление изотопной резонансной пары – ^{13}C - ^2H , где нейтронный эффект равен 1. Фракционирование $^1\text{H}/^2\text{H}$ и $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ с увеличением количества тяжелых атомов сопровождается возникновением дополнительного метаболического и энергетического преимущества онкоцитов перед обычными клетками с естественным изотопным составом (^{12}C - H – нейтронный эффект отсутствует).

Увеличение частоты колебаний и энергии связи ядра при уменьшении межъядерного расстояния способно возникать с разной интенсивностью и скоростью в связях, образованных изотопами с парными нейтронами и изотопов с нескомпенсированным нейтроном, при этом, со временем можно увидеть увеличение в разнице между начальной энергией и энергией перед туннелированием [234]. 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 вышеописанное объясняет наличие нейтронного эффекта, как одного из возможных механизмов осуществления туннельного эффекта при ферментативном катализе.

Основываясь на вышеописанном, можно сделать вывод о том, что фракционирование изотопов в биосистемах лишь предпосылка для появления изотопного резонанса, который наблюдается в случае, когда реализуется нейтронный эффект, который связан с особенностями инкорпорирования тяжелых изотопов в биомолекулы и взаимодействием с другими тяжелыми и легкими изотопами. В связи с чем, при избыточном обогащении среды исключительно тяжелыми изотопами нейтронный эффект и как следствие изотопный резонанс могут отсутствовать (например, ^{12}C - ^{18}O , ^{13}C - ^{17}O , ^{14}N - ^{18}O , ^{15}N - ^{17}O).

При низких концентрациях дейтерия в окружающей среде для реализации необходимого изотопного обмена и функционирования организму

требуется значительно большее накопление ^{13}C и ^{15}N чем ^{18}O и ^{34}S [66, 75-80]. Более явный изотопный резонансный эффект ^{17}O и ^{18}O по сравнению с ^{13}C и ^{15}N объясняется большим участием атомов кислорода в деятельности функционально активных групп $^{-17/18}\text{O}-^1\text{H}$ по сравнению с атомами углерода и азота. В связи с чем, изменение естественной среды путем ее обогащения ^{18}O приведет к увеличению скорости транскрипции или росту каталитической активности, что ведет к увеличению числа метаболически активных клеток или качественному усилению их резистентности к отрицательным интрацеллюлярным воздействиям, в то время как обогащение естественной среды с помощью ^{13}C и ^{15}N происходит с меньшим изотопным резонансом в связи с замедлением неспецифического распада молекулярных структур при изотопном утяжелении отдельных химических групп, например, конденсированные полиненасыщенные и полициклические структуры, гетероциклы, нековалентные взаимодействия в макромолекулярных комплексах.

Исходя из вышеописанного, изотопный шок более вероятен в метаболически активных тканях и клетках. Например, в период деления или роста клеток, в случае, когда белый шум по амплитуде энергетических колебаний составляет примерно 50 % от энергетического потенциала клетки, активизируя таким образом появление стохастического резонанса, поэтому один и тот же изотоп дает резонанс в различные фазы клеточного цикла, но с различной степенью выраженности и в разных концентрациях или наоборот, активизировать клеточные эффекты при слабом (менее 40 %) и сильном (более 60 %) воздействии, эти же можно объяснить и способность некоторых соединений изотопов при определенном клеточном цикле вызывать супер резонанс, описанный Р.А. Зубаревым [229].

В качестве описания одного из возможных механизмов воздействия изотопного состава ферментов на функциональную активность биообъектов, была выдвинута гипотеза о том, что подавляющее либо стимулирующее влияние фермента связано с изменением химической связи при вариации

изотопного состава и изменению энергии, соответствующей валентной связи. Изменение энергии химической связи можно объяснить с помощью нескольких факторов, описанных ниже.

Рассмотрим два атома, расположенные на равновесном расстоянии a и связанные ковалентной связью. Локализованное состояние электрона в атомах имеет волновые функции с экспоненциальной асимптотикой в виде затухающей экспоненты. В месте локализации электронов, потенциал, созданный атомными остовами, расположенными на концах связи, можно представить в виде суперпозиции кулоновских потенциалов атомных остовов, т.е., сферически симметричных заполненных внутренних электронных оболочек и ядер, и экспоненциально спадающих потенциалов, обусловленных асимптотиками волновых функций внешних электронов.

$$V(r) = \frac{Ue^2}{r} + e^2 \frac{\exp(-\kappa r)}{r} \quad (4.1)$$

где κ – величина, обратная радиусу атома.

В вышеприведенной формуле в месте расположения валентных электронов можно пренебречь вторым слагаемым и говорить о том, что первый атом создает в месте расположения валентных электронов потенциал $V_1(r) = \frac{U_1 e^2}{r}$, а второй атом создает в месте расположения валентных электронов потенциал $V_2(r) = \frac{U_2 e^2}{|a-r|}$, как следствие, потенциал в месте расположения валентных электронов можно выбрать в виде:

$$U(r) = \frac{U_1 e^2}{r} + \frac{U_2 e^2}{a-r}, \quad 0 \leq r \leq a \quad (4.2)$$

где, с целью упрощения, модуль разности векторов $|a-r|$ заменен на $a-r$ т.е., трехмерная химическая связь заменена на одномерную. Будем считать, что подобная замена допустима, так как потенциал (4.2) является эмпирическим. В вышеописанных формулах U_1 , U_2 – безразмерные

константы, имеющие смысл зарядов атомных остовов в единицах, заряда электрона e . r , $a-r$ – расстояния от валентного электрона до 1-го и 2-го атомных остовов. Для расчета межатомных взаимодействий чаще всего используют потенциал Леннарда-Джонса, который сильно усложняет расчеты, в связи с чем, был выбран потенциал (4.2).

Валентные электроны располагаются таким образом, что их потенциальная энергия взаимодействия с атомными остовами минимальна. Расстояние, на котором находится этот минимум энергии находится из формулы:

$$\frac{dU}{dr} = 0 . \quad (4.3)$$

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

Подставляя (4.3) в (4.2), получаем:

$$\frac{U_1 e^2}{r^2} = \frac{U_2 e^2}{(a-r)^2} . \quad (4.4)$$

Решаем это уравнение относительно искомого равновесного расстояния r_0 , на первом этапе получаем:

$$\begin{aligned} (a-r) &= \frac{r\sqrt{U_2}}{\sqrt{U_1}}, \\ \sqrt{U_1} &= \frac{r\sqrt{U_1}}{a} + \frac{r\sqrt{U_2}}{a} \end{aligned} \quad (4.5)$$

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

$$r_0 = a \frac{\sqrt{U_1}}{\sqrt{U_1} + \sqrt{U_2}} . \quad (4.6)$$

Аналогично выражению 4.6, расстояние на котором находится валентный электрон от атома номер 2, равно:

$$a - r_0 = \frac{\sqrt{U_2}}{\sqrt{U_1} + \sqrt{U_2}} \quad (4.7)$$

При этом, энергия валентного электрона в равновесном положении равна:

$$U(r) = e^2 \left(\frac{U_1}{r} + \frac{U_2}{a-r} \right) \quad (4.8)$$

$$U'(r) = \frac{U_2 e^2}{(a-r)^2} = \frac{U_1 e^2}{r^2} \quad (4.9)$$

$$(a - r)\sqrt{U_1} = r\sqrt{U_2} \quad (4.10)$$

$$\frac{r}{a} = \frac{\sqrt{U_1}}{\sqrt{U_1} + \sqrt{U_2}} \quad (4.11)$$

$$a - r = a \frac{\sqrt{U_2}}{\sqrt{U_1} + \sqrt{U_2}} \quad (4.12)$$

$$\begin{aligned} U_{min} &= \frac{U_1 e^2}{a\sqrt{U_1}} (\sqrt{U_1} + \sqrt{U_2}) + \frac{U_2 e^2}{a\sqrt{U_2}} (\sqrt{U_1} + \sqrt{U_2}) = \frac{\sqrt{U_1} e^2}{a} (\sqrt{U_1} + \sqrt{U_2}) + \\ &+ \frac{\sqrt{U_2} e^2}{a} (\sqrt{U_1} + \sqrt{U_2}) = \frac{e^2}{a} (\sqrt{U_1} + \sqrt{U_2})^2 \end{aligned} \quad (4.13)$$

При вычислении энергии взаимодействия электрона с атомными остовами мы можем оценить химическую активность соединения, определяемую равновесным положением электрона, кроме того, важно отметить, что химическая активность валентной связи определяется не только взаимным расположением атомов один и два, но и взаимодействием атомных остовов с парой валентных электронов. Таким образом, чем ниже энергия, тем

менее активна химическая связь и тем больше внешняя энергия необходима для активации ковалентной химической связи.

Полученные результаты опубликованы в Джимак С.С., Копытов Г.Ф., Елкина А.А., Тумаев Е.Н., Моисеев А.В., Малышко В.В., Исаев В.А. Влияние на энергию ковалентной связи изотопного состава формирующих ее ядер // Известия вузов. Физика. 2020. Т. 63, № 11. С. 81–89. DOI: 10.17223/00213411/63/11/81; Elkina A.A., Tumaev E.N., Basov A.A., Moiseev A.V., Malyshko V.V., Barisheva E.V., Churkina A.V., Dzhimak S.S. The mechanisms of the interaction of stable isotopes with biological objects in the presence of an uncompensated neutron in chemical bonds // Biophysics, 2020, Vol. 65, № 5, pp. 883–888 и Basov A., Fedulova L., Vasilevskaya E., Dzhimak S. Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes // Molecules. 2019. Vol. 24 (22). P.4101. doi:10.3390/molecules24224101.

4.2 Исследование механизмов, обеспечивающих изменение энергии химической связи между парами атомов стабильных изотопов, содержащих азот

На энергию химической связи и расстояние между атомами воздействует несколько факторов:

1. Так как кулоновское взаимодействие валентных электронов незначительно зависит от изотопного состава химических элементов, поправки, связанные с энергией кулоновского взаимодействия валентных электронов в данной работе, не рассматриваются;

2. Аналогично, взаимодействие магнитных моментов валентных электронов также слабо зависит от изотопного состава соединения, поэтому в данном исследовании не рассматривается;

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. Так же, в данной работе учитывается взаимодействие магнитных моментов ядер атомов, приводящее к изменению расстояния между ними;

5. Тепловые колебания способны вызвать изменение расстояния между атомами. Допустим, что колебания происходят вблизи положения равновесия по гармоническому закону с частотой ω , определяемой параметрами потенциальной ямы, в которой находятся атомы, т.е. в конечном счете параметрами межатомных взаимодействий, как следствие, амплитуда тепловых колебаний атомов будет зависеть только от их массы и температуры.

Далее, рассмотрим третий фактор – взаимодействие магнитных моментов валентных электронов с магнитными моментами ядер атомов. Энергия взаимодействия с магнитным моментом ядра первого атома равна:

$$\frac{\eta_1 \eta_2}{r^3} = U(r) + \frac{3(\eta_1 r)(\eta_2 r)}{r^5}, \quad (4.14)$$

где

$$\eta_1 r = \eta_1 r \cos \theta_1, \quad \eta_2 r = \eta_2 r \cos \theta_2, \quad 0 \leq \theta_1, \theta_2 \leq \pi$$

При тепловых колебаниях углы θ_1 , θ_2 между радиус-вектором r , соединяющим атомы 1 и 2 и магнитные моменты $\bar{\eta}_1$ и $\bar{\eta}_2$ меняются случайным образом с нулевым средним значением. Так как усреднение выражения (4.14) по тепловым колебаниям атомов приводит к обращению в ноль второго слагаемого. Усредненное значение $\bar{U}_1(r) = \frac{\eta_1 \eta_2}{r^3}$ можно записать в виде

$\bar{U}_1(r) = \frac{\sigma_1 e^2 a^2}{r^3}$, где σ_1 – эмпирическая величина, которая для диполь-дипольного взаимодействия играет ту же роль, что и заряд U_1 атомного остова первого атома. Так же, взаимодействие магнитного момента валентного электрона со вторым атомом, приводит к дополнительному вкладу в его энергию, которая равна $\bar{U}_2(r) = \frac{e^2 \sigma_2 a^2}{(a-r)^3}$, где, σ_2 – величина, аналогичная σ_1 для второго атома. Множитель a^2 в обоих выражениях введен из соображений размерности. Вышеописанные взаимодействия приводят к появлению дополнительного вклада в энергию взаимодействия валентного электрона с 1 и 2 атомами:

$$U(r) = \frac{U_1 e^2}{r} + \frac{U_2 e^2}{a-r} + \frac{\sigma_1 e^2 a^2}{r^3} + \frac{\sigma_2 e^2 a^2}{(a-r)^3} \quad (4.15)$$

По сравнению с первыми двумя слагаемыми, два последних малы по нескольким причинам:

1) они описывают взаимодействие магнитного типа, которое нерелятивистски мало по сравнению с взаимодействием электрического типа, т.е., первым и вторым слагаемым;

2) 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 $1/r$.

Данные факторы дают возможность разделить потенциальную энергию взаимодействия (4.15) на 2 слагаемых: доминирующую часть: $U_0(r) = \frac{U_1 e^2}{r} + \frac{U_2 e^2}{a-r}$ и малую поправку: $\Delta U(r) = \frac{e^2 \sigma_1 a^2}{r^3} + \frac{e^2 \sigma_2 a^2}{(a-r)^3}$.

Откуда:

$$\Delta U(r) = U_0(r_0) - U(r) \quad (4.16)$$

Дополнительное слагаемое $\Delta U(r)$ 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 (4.15), получаем:

$$\frac{U_1 e^2}{r^2} + \frac{e^2 \sigma_1 a^2}{r^4} \times 3 = \frac{U_2 e^2}{(a-r)^2} + \frac{e^2 \sigma_2 a^2}{(a-r)^4} \times 3 \quad (4.17)$$

Так как ранее было доказано, что энергия взаимодействия магнитных диполей электрона с атомными остовами меньше их кулоновского взаимодействия, можно сделать вывод о том, что учет взаимодействия магнитных моментов приведет к небольшому смещению положения электрона. Следовательно, искать решение уравнения (4.17) следует в виде:

$$r = r_0 + \Delta r, \quad \Delta r \ll r_0 \quad (4.18)$$

где Δr - малая поправка к r_0 возникающая в виду смещения электрона из положения равновесия, как следствие его взаимодействия с магнитными моментами ядер. Подставляя $r = r_0 + \Delta r$ в (4.17) получим:

$$\frac{U_1}{(r_0 + \Delta r)^2} - \frac{U_2}{(a - r_0 - \Delta r)^2} = \frac{3\sigma_2 a^2}{(a - r_0 - \Delta r)^4} + \frac{3\sigma_1 a^2}{(r_0 + \Delta r)^4} \quad (4.19)$$

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

Первое (4.20):

$$\frac{1}{(r_0 + \Delta r)^2} = \frac{1}{r_0^2 \times (1 + \frac{\Delta r}{r_0})^2} \approx \frac{1}{r_0^2} \times \left(1 - \frac{2\Delta r}{r_0}\right) = \frac{1}{r_0^2} - \frac{2\Delta r}{r_0^3} \quad (4.20)$$

Второе (4.21):

$$\begin{aligned}\frac{1}{(a - r_0 - \Delta r)^2} &= \frac{1}{(a - r_0)^2 \times \left(1 - \frac{\Delta r}{a - r_0}\right)^2} \approx \\ &\approx \frac{1}{(a - r_0)^2} \times \left[1 + \frac{2\Delta r}{a - r_0}\right] = \frac{1}{(a - r_0)^2} + \frac{2\Delta r}{(a - r_0)^3}\end{aligned}\quad (4.21)$$

Третье (4.22):

$$\frac{1}{(r_0 + \Delta r)^4} + \frac{1}{r_0^3 \times \left(1 + \frac{\Delta r}{r_0}\right)^4} \approx \frac{1}{r_0^3} \times \left(1 - \frac{4\Delta r}{r_0}\right) = \frac{1}{r_0^4} - \frac{4\Delta r}{r_0^5}\quad (4.22)$$

Четвертое (4.23):

$$\begin{aligned}\frac{1}{(a - r_0 - \Delta r)^4} &= \frac{1}{(a - r_0)^4 \times \left(1 - \frac{\Delta r}{a - r_0}\right)^4} = \\ &= \frac{1}{(a - r_0)^4} \times \left[1 + \frac{4\Delta r}{a - r_0}\right] = \frac{1}{(a - r_0)^4} + \frac{4\Delta r}{(a - r_0)^5}\end{aligned}\quad (4.23)$$

Вышеописанных разложениях по малому параметру использовались формулы приближенных вычислений для 1 и 3 части уравнения:

$$\frac{U_1 e^2}{(r_0 + \Delta r)^2} \approx \frac{U_1 e^2}{r_0^2} \left(1 - \frac{2\Delta r}{r_0}\right)\quad (4.24)$$

$$\frac{3\sigma_1 e^2}{(r_0 + \Delta r)^4} \approx \frac{\sigma_1 e^2}{r_0^4} \left(1 - \frac{4\Delta r}{r_0}\right)\quad (4.25)$$

и аналогичные формулы для 2 и 4 частей.

Получим:

$$\frac{dU}{dr} = \frac{\dot{U}_1}{r_0^2} - \frac{2\Delta r \dot{U}_1}{r_0^3} - \frac{\dot{U}_2}{(a-r_0)^2} + \frac{2\Delta r \dot{U}_2}{(a-r_0)^3} + \frac{3\sigma_1 a^2}{r_0^4} = \frac{12\sigma_1 a^2}{r^5} \times \Delta r + \frac{3\sigma_2 a^2}{(a-r_0)^4} - \frac{12\sigma_2 a^2}{(a-r_0)^5} \times \Delta r \quad (4.26)$$

В результате определения равновесного расстояния была получена формула (4.6), позволяющая упростить последнее выражение (4.26):

$$-\frac{2\dot{U}_1 \Delta r}{r_0^3} + \frac{2\dot{U}_2 \Delta r}{(a-r_0)^3} + \frac{3\sigma_1 a^2}{r_0^4} - \frac{12\sigma_1 a^2 \Delta r}{r_0^5} - \frac{3\sigma_2 a^2}{(a-r_0)^4} + = -\frac{12\sigma_2 a^2}{(a-r_0)^5} \times \Delta r \quad (4.27)$$

Отсюда (4.27) получаем:

$$\frac{3\sigma_2 a^2}{(a-r_0)^4} - \frac{3\sigma_1 a^2}{r_0^4} = -\frac{2\dot{U}_1}{r_0^3} \times \Delta r + \frac{2\dot{U}_2}{(a-r)^3} \times \Delta r - \frac{12\sigma_1 a^2}{r_0^5} \times \Delta r + \frac{12\sigma_2 a^2}{(a-r_0)^5} \times \Delta r \quad (4.28)$$

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

$$\Delta r = \frac{\frac{3\sigma_2 a^2}{(a-r_0)^4} - \frac{3\sigma_1 a^2}{r_0^4}}{\frac{2\dot{U}_2}{(a-r)^3} - \frac{2\dot{U}_1}{r_0^3} - \frac{12\sigma_1 a^2}{r_0^5} + \frac{12\sigma_2 a^2}{(a-r_0)^5}} \quad (4.29)$$

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

$$\Delta E = U(r_0 + \Delta r) - U_0(r_0) \quad (4.30)$$

Так как отношение $\Delta r/r_0$ мало и поправка к потенциалу ΔU тоже мала, то при расчете поправки к энергии можно заменить $\Delta U(r_0 + \Delta r)$ на $U(r_0)$.

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

$$\Delta E = U(r_0 + \Delta r) - U_0(r_0) = U(r_0) + \frac{dU(r_0)}{dr} \Delta r - U_0(r_0) = \frac{U_1 e^2}{r_0} + \frac{U_2 e^2}{a - r_0} + \frac{\sigma_1 e^2 a^2}{r_0^3} + \frac{\sigma_2 e^2 a^2}{(a - r_0)^3} + \frac{dU_0 \Delta r}{dr_0} + \frac{d\Delta U}{dr_0} \Delta r - U_0(r_0) = \Delta U(r_0) + \frac{d\Delta U(r_0)}{dr} \Delta r \quad (4.31)$$

В уравнении (4.31) первое слагаемое описывает смещение потенциальной энергии валентного электрона по вертикали (увеличение энергии), второе - по горизонтали в следствие смещения.

Рассмотрим фактор № 4 – взаимодействие магнитных моментов ядер атомов, которое приводит к активизации химической связи в виду уменьшения расстояния между атомами, в следствие взаимодействия магнитных моментов их ядер, что дает увеличению суммарного потенциала взаимодействующих ядер в точке равновесного положения электрона.

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

$$U_{12} = U_0 \left[\left(\frac{a_0}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{a_0}{r} \right)^6 \right] \quad (4.32)$$

где U_{12} – потенциальная энергия взаимодействия атомов первого и второго атомов, 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:

$$\frac{dU_{12}}{dr} = 0$$

$$U_0 \left[12 \left(\frac{a_0}{r} \right)^{13} - 12 \left(\frac{a_0}{r} \right)^7 \right] = 0 \quad (4.33)$$

Установлено, что параметр a_0 имеет смысл равновесного расстояния между атомами.

Минимальная потенциальная энергии взаимодействия равна $U_{12min} = -U_0$, что позволяет трактовать величину U_0 как энергию связи атомов один и два. Учитывая, что при замене атомов их изотопами с ненулевыми значениями магнитных моментов ядер возникает дополнительная энергия взаимодействия, равная:

$$\Delta U_{12}(r) = \frac{ba_0^3}{r^3} \quad (4.34)$$

откуда:

$$U_{12}(r) = U_0 \left[\left(\frac{a_0}{r} \right)^{12} - 2 \left(\frac{a_0}{r} \right)^6 \right] + \frac{ba_0^3}{r^3} \quad (4.35)$$

где a_0 – первоначальное расстояние, b – параметр, имеющий размерность энергии, характеризующий величину диполь-дипольного взаимодействия ядер.

Будем считать, что магнитные моменты атомов один и два, в связи с тепловым движением, свободно вращаются вокруг оси, соединяющей атомы один и два и образуют с этой осью углы θ_1 и θ_2 , меняющиеся в интервале от 0 до 2π , поэтому среднее значение косинусов этих углов равны 0. Новое расстояние между атомами один и два вычисляется, как и ранее, через минимум потенциальной энергии:

$$\frac{dU}{dr} = -12 \frac{U_0}{a_0} \left[\left(\frac{a_0}{r} \right)^{13} - \left(\frac{a_0}{r} \right)^7 \right] - 3 \frac{ba_0^3}{r^4} = 0 \quad (4.36)$$

Преобразуем полученное выражение:

$$-4 \frac{U_0}{a_0} \left[\left(\frac{a_0}{r} \right)^{13} - \left(\frac{a_0}{r} \right)^7 \right] - 3 \frac{b a_0^3}{r^4} = 0 \quad (4.37)$$

Представим решение последнего уравнения в виде:

$r = a_0 + \Delta r$, где $\Delta r \ll a_0$, преобразуем два первых слагаемых в (4.37):

$$\left(\frac{a_0}{r} \right)^{13} - \left(\frac{a_0}{r} \right)^7 = \left(\frac{a_0}{a_0 + \Delta r} \right)^{13} - \left(\frac{a_0}{a_0 + \Delta r} \right)^7 \approx \left(1 - 13 \frac{\Delta r}{a_0} \right) - 1 + 7 \frac{\Delta r}{a_0} = -6 \frac{\Delta r}{a_0} \quad (4.38)$$

Для оставшегося слагаемого выражение получаем аналогично.

Выражение для нового расстояния между атомами один и два можно записать в виде:

$$-4 \frac{U_0}{a_0} \left(-6 \frac{\Delta r}{a_0} \right) - \frac{b}{a_0} \left(1 - 4 \frac{\Delta r}{a_0} \right) = 0 \quad (4.39)$$

Или

$$24 \frac{U_0}{a_0^2} \Delta r + 4 \frac{b}{a_0^2} \Delta r = \frac{b}{a_0} \quad (4.40)$$

Отметим, так как взаимодействие магнитных моментов атомов один и два 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 Δr :

$$\Delta r = \frac{b}{a_0} \times \frac{1}{24 \frac{U_0}{a_0^2} + 4 \frac{b}{a_0^2}} \quad (4.41)$$

$$\Delta r = a_0 \frac{b}{24U_0 + 4b} \approx a_0 \frac{b}{24U_0} \quad (4.42)$$

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

$$\Delta E = U(a_0 + \Delta r) - U_0(a_0) = U_0(a_0 + \Delta r) + \Delta U(a_0 + \Delta r) - U_0(a_0) \quad (4.43)$$

Последнюю формулу запишем в виде:

$$\Delta E = U_0(a_0) + \Delta r \left(\frac{dU_0}{dr} \right)_{a_0} + \Delta U(a_0) + \Delta r \left(\frac{d\Delta U}{dr} \right)_{a_0} - U_0(a_0) = \Delta U(a_0) \quad (4.44)$$

При выводе уравнения (4.44) второе слагаемое обращается в 0, так как a_0 – равновесное расстояние между атомами, предпоследнее слагаемое имеет порядок Δr^2 и мало по сравнению с остальными слагаемыми.

Тогда,

$$\Delta E = -\frac{ba_0^3}{a_0^3} = -b, \quad b < 0, \quad \Delta r < 0 \quad (4.45)$$

Для расчёта изменения энергии валентного электрона используем следующее выражение:

$$\Delta E_e = \frac{U_1 e^2}{r} + \frac{U_2 e^2}{a-r} \quad (4.46)$$

В последней формуле r определяет положение валентного электрона, хотя ранее оно определяло расстояние между атомами, a – новое равновесное расстояние между атомами. Чтобы избежать путаницы, обозначим ранее рассчитанное изменение расстояния между атомами через Δa . Т.е.: $a = a_0 - \Delta a$

Тогда изменение потенциальной энергии электрона равно:

$$\Delta E_e = \frac{U_1 e^2}{r} + \frac{U_2 e^2}{a-r} - \frac{U_1 e^2}{r} - \frac{U_2 e^2}{a_0-r} = \frac{U_2 e^2}{a-r} - \frac{U_2 e^2}{a_0-r} \quad (4.47)$$

Преобразуем первое слагаемое в этой формуле:

$$\frac{U_1 e^2}{a_0 - \Delta a - r} = \frac{U_2 e^2}{a_0 - r} \frac{1}{1 - \frac{\Delta a}{a_0 - r}} \approx \frac{U_2 e^2}{a_0 - r} \left(1 + \frac{\Delta a}{a_0 - r} \right) = \frac{U_2 e^2}{a_0 - r} + \frac{U_2 e^2 \Delta a}{(a_0 - r)^2} \quad (4.48)$$

Применим рассчитанное ранее найденное равновесное расстояние r , получим окончательную формулу для расчета изменения энергии электрона вследствие изменения расстояния между атомами один и два:

$$\Delta E = \frac{U_2 \Delta r}{(a_0 - r)^2} \quad (4.49)$$

где Δr – смещение положения электрона вследствие изменения расстояния между атомами:

$$\Delta r = \Delta a \frac{\sqrt{U_1}}{\sqrt{U_1} + \sqrt{U_2}} \quad (4.50)$$

Далее рассмотрим фактор 5 (тепловые колебания способны вызвать изменение расстояния между атомами).

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

$$\frac{m\omega^2 A^2}{2} = \frac{3kT}{2} \quad (4.51)$$

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

Из уравнения (4.51) находим, что средняя амплитуда колебаний равна:

$$A = \frac{1}{\omega} \sqrt{\frac{3kT}{m}} \quad (4.52)$$

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

$$\Delta A = \frac{\Delta m}{2m\omega} \sqrt{\frac{3kT}{m}} \quad (4.53)$$

где m – масса легкого изотопа.

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

Ранее было получено уравнение (4.50) для равновесного положения электрона, находящегося между атомами, где Δr – смещение положения электрона вследствие изменения расстояния между атомами:

$$\Delta r = \Delta A \frac{\sqrt{U_1}}{\sqrt{U_1} + \sqrt{U_2}} \quad (4.54)$$

где ΔA приводится формулой (4.53).

Увеличение энергии в связи с изменением расстояния было рассчитано ранее в формуле (4.49).

Из приведенных расчетов следует, 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.

Несмотря на то, что наблюдение за ростом бактерий ограничено диапазоном температур их жизнедеятельности, указанный эффект возможно объяснить следующими экспериментальными данными: при исследовании влияния температуры на повышение скорости роста в условиях резонанса, *E. coli* выращивали в 0,35% ^{13}C при температуре от 15°C до 41°C . Максимальные скорости роста биомассы были выше, чем в изотопно-нормальных средах, при этом наибольшее увеличение наблюдалось в диапазоне от 25 до 35°C [229], 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.

Кроме того, косвенным подтверждением нейтронного эффекта могут служить имеющиеся факты селективного накопления изотопов в биологических объектах по сравнению с окружающей средой, которые обусловлены взаимодействием разных нерадиоактивных изотопов между собой, приводящих к формированию резонансных пар. Например, при высоких концентрациях дейтерия в окружающей среде для реализации необходимого изотопного эффекта и выживания организму требуется значительно большее накопление ^{18}O и ^{34}S , чем ^{13}C и ^{15}N , т.е. $\delta^{18}\text{O}_{(\text{organism})} > \delta^{18}\text{O}_{(\text{environment})}$ и $\delta^{34}\text{S}_{(\text{organism})} > \delta^{34}\text{S}_{(\text{environment})}$, тогда как $\delta^{13}\text{C}_{(\text{organism})} \approx \delta^{13}\text{C}_{(\text{environment})}$ и аналогично для $\delta^{15}\text{N}_{(\text{organism})} \approx \delta^{15}\text{N}_{(\text{environment})}$ [235]. Соответственно ожидаются более выраженные отрицательные корреляции между $\delta^{13}\text{C}$ и δD , $\delta^{15}\text{N}$ и δD , при этом между $\delta^{18}\text{O}$ и δD , а также $\delta^{34}\text{S}$ и δD будут наблюдаться слабые положительные корреляции или их отсутствие [236].

Различие в резонансных эффектах, показанное Р. Зубаревым [229], характеризующееся в 3 раза большим эффектом у ^{13}C по сравнению с ^{15}N , можно объяснить (при условии одинаково выраженного нейтронного эффекта) гораздо более высокой способностью организма усваивать ^{13}C из обогащенной ^{13}C -диеты (43.2-60.8 % из 80% обогащенной ^{13}C -диеты [237], а также в работе [238]), по сравнению с его способностью усваивать ^{15}N из обогащенной ^{15}N -диеты (на 250 ‰ из 95% обогащенной ^{15}N -диеты [233, 239]). При этом совместное обогащение среды ^{13}C и ^{15}N наоборот снижает скорость роста живых организмов (например, сапротрофный зигомический гриб *Absidia cylindrospora* [240] или *Poecilia reticulata* [230]), что объясняется отсутствием в данной системе некомпенсированного нейтрона вследствие того, что каждый из данных изотопов имеет по 1 нейтрону, которые совместно формируют пару нейтронов, не позволяющих реализовываться нейтронному эффекту. Тогда как в работе [241] показано, что *Brachionus plicatilis*, получающий резонансную диету ^{15}N , имеет более высокие показатели жизнедеятельности и большую способность к размножению по сравнению со всеми другими видами воздействия и контрольной группой.

Другим примером является фракционирование изотопов различных металлов при их взаимодействии с отдельными изотопами неметаллов. При этом нейтронный эффект будет реализовываться как при наличии устойчивых $\text{Me}-\text{O}$ связей, в том числе координационных, так и в случае отсутствия стойких ковалентных связей $\text{Me}-\text{O}$, например, в структурах типа $\text{Me}^+\dots\text{O}^-$ реакции, базирующиеся на реализации нейтронного эффекта, будут протекать за счет преимущественного участия иона металла [80, 242] и его собственного некомпенсированного нейтрона (или реже нечетного числа нескольких нейтронов). Например, в связи с тем, что нейтронный эффект в соединениях CuCO_3 реализуется через связи $^{63/65}\text{Cu}-^{17/18}\text{O}$, ожидается накопление в данной соли как ^{17}O [243], так и ^{18}O изотопов: $[\delta^{17}\text{O}_{(\text{organism})} / \delta^{17}\text{O}_{(\text{environment})}] \geq [\delta^{18}\text{O}_{(\text{organism})} / \delta^{18}\text{O}_{(\text{environment})}]$, в отличие от $^{40}\text{CaCO}_3$, в котором будет накапливаться преимущественно ^{17}O : $[\delta^{17}\text{O}_{(\text{organism})} / \delta^{17}\text{O}_{(\text{environment})}] \gg \gg$

$[\delta^{18}\text{O}_{(\text{organism})} / \delta^{18}\text{O}_{(\text{environment})}]$, тогда как в $^{43}\text{CaCO}_3$ различия изотопных соотношений ^{17}O и ^{18}O будут существенно менее выражены из-за фракционирования обоих атомов: $[\delta^{17}\text{O}_{(\text{organism})} / \delta^{17}\text{O}_{(\text{environment})}] \geq [\delta^{18}\text{O}_{(\text{organism})} / \delta^{18}\text{O}_{(\text{environment})}]$.

В заключении необходимо отметить, что интенсивность проявления изотопных эффектов может изменяться в зависимости от их концентрации: при низких концентрациях потенциально резонансных изотопов (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O и другие) преимущественно реализуются их термодинамические и кинетические эффекты (что характеризуется относительно невысокими различиями в скоростях фракционирования), тогда как при высоких концентрациях этих же изотопов вероятность образования резонансных пар с дальнейшим возникновением валентного нейтронного эффекта, позволяющего дополнительно реализовывать туннелирование, что приводит к появлению аномальных (или парадоксальных) изотопных эффектов в одних и тех же биологических реакциях.

Кроме того, важно подчеркнуть, что в гетерогенных системах реализация явления, называемого «изотопный шок», будет реализовываться также и путем формирования изотопного градиента, стимулирующего работу системы неспецифической защиты, приводящей к накоплению биологически активных протективных факторов в организме. Все это вкупе с описанными выше термодинамическими и кинетическими эффектами, а также туннелированием нейтронов является той движущей силой, которая приводит к наблюдаемому в природе выраженному разнообразию изотопного состава в гетерогенных системах, зависящему не только от изотопного состава среды, но и функциональной активности самого организма, также особенностей взаимодействия различных изотопов между собой при фракционировании их на разных морфофункциональных уровнях в самом объекте.

Представленные результаты опубликованы в: Джимаков С.С., Копытов Г.Ф., Елкина А.А., Тумаев Е.Н., Моисеев А.В., Малышко В.В., Исаев В.А. Влияние на энергию ковалентной связи изотопного состава формирующих ее

ядер // Известия вузов. Физика. 2020. Т. 63, № 11. С. 81–89. DOI: 10.17223/00213411/63/11/81 и Елкина А.А., Яковенко Н.А., Барышев М.Г., Малышко В.В., Лясота О.М., Джимаков С.С. О механизмах, обуславливающих влияние модификации изотопного состава сред на физические параметры гетерогенных систем // Экологический вестник научных центров Черноморского экономического сотрудничества. – 2020. – Т. 17. №4. С. 33–42. DOI: 10.31429/vestnik-17-4-33-42.

Выводы к главе 4

Созданы основы новой теории, объясняющей физический механизм фракционирования изотопов, который связан с преобладанием среди нуклонов определенного количества нейтронов и объясняющего неравновесное накопление определенных форм стабильных изотопов биогенных элементов в гетерогенных системах. Причинами обнаруженного нейтронного эффекта могут являться: взаимодействие магнитных моментов атомных ядер и валентных электронов, приводящее к изменению расстояния между ними, в том числе влияние измененного расстояния между атомами на энергию ковалентной связи между парами атомов.

Из приведенных расчетов следует, 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.

Необходимо отметить, что интенсивность проявления изотопных эффектов может изменяться в зависимости от их концентрации: при низких концентрациях потенциально резонансных изотопов (^{13}C , ^{15}N , ^{18}O и другие) преимущественно реализуются их термодинамические и кинетические эффекты (что характеризуется относительно невысокими различиями в скоростях фракционирования), тогда как при высоких концентрациях этих же изотопов вероятность образования резонансных пар с дальнейшим возникновением валентного нейтронного эффекта, позволяющего

дополнительно реализовывать туннелирование, что приводит к появлению аномальных (или парадоксальных) изотопных эффектов в одних и тех же биологических реакциях.

Глава 5 Практическое применение методов модификации изотопного состава жидких сред

Для проведения экспериментов по влиянию модификации изотопного состава среды на гетерогенные системы необходимо было решить несколько задач: разработать способ контроля концентрации изотопов ^2H , ^{17}O и ^{13}C в жидких средах; разработать установку для модификации изотопного состава неорганических жидкостей; и собственно, провести эксперименты.

5.1 Способ и методика для определения концентрации ^2H , ^{17}O и ^{13}C в жидких средах на импульсном ЯМР-спектрометре

Основными причинами, обуславливающими флуктуации изотопного состава веществ являются как радиоактивные превращения, так и результаты различных физико-химических и биологических процессов, основную роль в которых играют кинетический и термодинамический изотопные эффекты. Причём фракционирование изотопов в природе сильнее выражено у тех элементов, которые принимают более активное участие в круговороте веществ неорганического и органического мира (кислород, водород, углерод, азот, сера). Информация об изотопном распределении элементов в природных и синтетических материалах может использоваться для определения географической локации человека и животных происхождения пищевой продукции, напитков, для определения фальсифицированных товаров, а также для решения таких специфических задач, как идентификация происхождения наркотических веществ в следственном эксперименте [223].

Для определения изотопного состава используются различные инструментальные методы: масс-спектрометрия, ИК-спектрометрия, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) с методологическим подходом SNIF-NMR.

Сложность решения проблемы определения изотопного состава веществ заключается в трудоёмкости, длительности и дорогостоящей реализации методов детерминирования содержания ядерных изотопов в химических

веществах. Наиболее проблематичным при выполнении методик определения изотопов методами количественного ЯМР является выбор оптимальных специфических зондов с подходящими магнитно-релаксационными характеристиками. При определении концентрации дейтерия наибольшие трудности связаны с длительностью съемки спектра ЯМР.

Несмотря на то, что одним из наиболее совершенных методов определения соотношения нерадиоактивных изотопов в веществе является масс-спектрометрия, ее применение тоже несколько ограничено, так как данный метод не позволяет провести количественное измерение в воде соотношения $^{16}\text{O}/^{17}\text{O}$ из-за наложения молекулярного иона H^{16}O^- на пик ^{17}O , что обусловлено одинаковой массы этих частиц.

Исходя из этих примеров, очевидно, что не существует универсальных методов для определения концентрации указанных выше изотопов в веществе, поэтому представляется актуальной разработка альтернативных методов диагностики изотопного состава веществ.

Целью работы являлась разработка нового метода количественного определения ^2H и ^{17}O с помощью ЯМР спектроскопии и применением лантаноидного сдвигающего реагента (ЛСР), добавляемого в зонд в качестве внешнего ЯМР стандарта, относительно которого проводится измерение.

Данный подход позволит значительно упростить и ускорить выполнение эксперимента по изотопному составу веществ. Для решения поставленной цели необходимо было подобрать наиболее подходящий по релаксационным и сдвигающим характеристикам ЛСР, его концентрацию для приготовления эталонного образца, провести экспериментальную оценку химического сдвига для ядер ^2H и ^{17}O с построением калибровочных графиков.

В работе использовался прибор ЯМР фурье-спектрометр 400 МГц FT-NMR SYSTEM модели JNM-ECA 400, с датчиком 40TH5AT/FG2, со следующими характеристиками: индукция постоянного магнитного поля равная 9,389766 Тл; диапазон частот от 10 до 400 МГц, с шагом 0,01 Гц; резонансная частота ядер ^{17}O : 54,22 МГц; резонансная частота ядер ^2D : 61,371

МГц (настраивается прибором); чувствительность для ^1H : ≥ 220 (для 0,1 % раствора этилбензола в дейтерохлороформе); чувствительность для ^{13}C : ≥ 170 (для 10 % раствора этилбензола в дейтерохлороформе); дрейф постоянного магнитного поля: менее 4 Гц/час; ширина ^1H ЯМР сигнала на полувысоте: не более 0,45 Гц (для 0,1 % раствора этилбензола в дейтерохлороформе).

Для исследуемого образца использовалась откалиброванная основная ЯМР-ампула диаметром $4,97 \pm 0,013$ мм и длиной 178 мм. В неё помещалось исследуемое на изотопный состав вещество. Также имелась откалиброванная внутренняя ЯМР-ампула (коаксиальный внешний стандарт) с длиной концевой капилляра 32 мм и его ёмкостью 40 мкл, которая являлась вставкой в основную ЯМР ампулу и содержала в себе вещество - эталон с такой же как у определяемого вещества молекулярной структурой, но известным изотопным составом (Рис. 5.1).

Внутренняя ЯМР-ампула содержала раствор трифторметансульфоната европия(III) в воде с известной концентрацией дейтерия и ^{17}O . В результате съёмки ЯМР спектров на ядрах ^2H или ^{17}O сигнал вещества внутренней ампулы был смещён относительно сигнала определяемого вещества из основной ампулы, что позволяло произвести интегрирование отдельных сигналов спектра друг относительно друга.

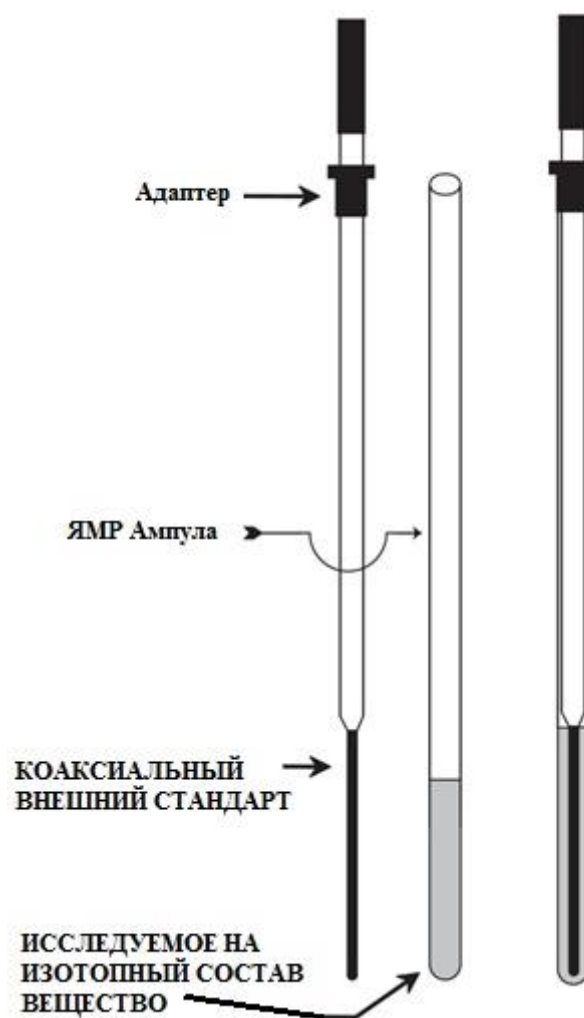


Рисунок 5.1 – Схематичное изображение ЯМР ампулы (в центре) с исследуемым на изотопный состав веществом; коаксиальный внешний стандарт (слева) с раствором $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Eu}$ в воде с известной концентрацией ^2H и ^{17}O ; система из вставленного стандарта в ампулу (справа)

Использовались ряд калибровочных образцов чистой воды (содержание примесей не более 0,01 % по массе.) с известным содержанием изотопа кислорода ^{17}O и дейтерия в соответствии с международным стандартом введённым МАГАТЭ VSMOW и SLAP.

Для метода определения концентрации ^{17}O в внутреннюю ЯМР-ампулу помещался образец воды с содержанием ЛСР $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Eu}$ равным $(0,120 \pm 0,005)$ моль/л, при этом содержание изотопа кислорода ^{17}O воды в данном растворе должно соответствовать исследуемому диапазону

концентраций изотопа кислорода ^{17}O измеряемого объекта. А для метода определения отношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ в внутреннюю ЯМР-ампулу помещался образец воды с содержанием $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Eu}$ равным $(0,045 \pm 0,005)$ моль/л, при этом содержание дейтерия воды в данном растворе должно соответствовать исследуемому диапазону концентраций дейтерия измеряемого объекта. Содержание других примесей не должно было превышать 0,01 % по массе.

Для приготовления растворов использовалась дозаторная микропипетка на 1 мл с шагом в 0,010 мл со сменными наконечниками и лабораторные аналитические весы с пределом допускаемой погрешности однократного взвешивания $\pm 0,0005$ г.

Предварительно проверку ампул на отсутствие в них фоновых сигналов ЯМР выполняют на спектрометре ЯМР при максимальном усилении спектрометра с выбранными режимами измерений. При этом, ампула не должна иметь собственных сигналов ЯМР. В противном случае ампулу бракуют и не используют при проведении измерений. Ампулы промывают в дистиллированной воде, высушивают и хранят в условиях, исключающих попадание на них влаги и пыли до использования их в работе. Подготовка спектрометра ЯМР к работе выполняют в соответствии с руководством по эксплуатации прибора. После каждого погружения в резонатор образца, первым делом производится настройка однородности постоянного магнитного поля прибора с помощью шиммирующих катушек.

Очень важно, чтобы все эксперименты в рамках серии образцов, включая калибровочные проводились в одинаковых условиях проведения ЯМР измерений и с одинаковыми настройками прибора.

Для измерений на ядрах ^{17}O нами были подобраны оптимальные параметры: усиление 90; смещение (-10) м.д.; развёртка 80 м.д.; время наблюдения спада свободной индукции 60 мс; число сканирований 10000; релаксационная задержка $10 \cdot T_1(\text{H}_2^{17}\text{O}) \geq 0,1$ сек; температура внутри резонатора 25 °С.

Для измерений на ядрах ^2H нами подобраны оптимальные значения: усиление 60; смещение 5 м.д.; развёртка 10 м.д.; время наблюдения спада свободной индукции 6 сек; число сканирований 256; релаксационная задержка $10 \cdot T_1(^2\text{D}_2\text{O}) \geq 7$ сек; температура внутри резонатора 25 °С.

В обоих случаях важным требованием является то, что съёмка спектра должна проводиться без вращения образца в спектрометре, иначе, как нами было экспериментально выяснено, могут возникать дополнительные погрешности в определении изотопных соотношений из-за прецессионных движений при вращении ампулы в резонаторе спектрометра.

При выполнении измерений в лаборатории были соблюдены следующие условия окружающей среды:

- температура воздуха $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$;
- атмосферное давление (760 ± 20) мм. рт. ст.;
- влажность воздуха не более 60 % при температуре 20°C ;
- переменные магнитные поля 0,3 мкТл или менее;
- акустический шум 75 дБ или менее.

Для нахождения оптимальной концентрации трифторметансульфоната европия (III) в эталонном образце, содержащем воду, нами была изучена концентрационная зависимость соли европия на индуцированный парамагнитный сдвиг ядер дейтерия, входящих в состав молекул воды.

При этом, готовилась серия водных растворов, содержащих 0,100 моль/л, 0,050 моль/л, 0,020 моль/л, 0,010 моль/л, 0,005 моль/л, 0,001 моль/л сдвигающего реагента – трифторметансульфоната европия(III).

Результаты полученных спектров дейтерия приготовленных растворов, представленные на рисунке 5.2, показывают заметное смещение сигнала ЯМР в зависимости от концентрации ионов Eu^{3+} в полутяжёлой воде. Это обусловлено наличием сильного псевдоконтактного (диполь-дипольного) взаимодействия ионов Eu^{3+} с атомами дейтерия. В ЯМР спектрах на ядрах дейтерия (Рис. 5.2) наблюдается два разнесённых по шкале химических сдвигов ЯМР сигналов – от дейтерия воды с растворённым в ней

лантаноидный сдвигающий реагент (ЛСР, Eu^{3+}), которая находится во внутренней вставке в ампулу и от дейтерия исследуемой воды, находящейся в самой ампуле.

Варьируя процентное содержание дейтерия воды, от природного составляющего около 0,015 % до содержащегося в тяжёлой воде 98 % дейтерия, нами было, показано, что парамагнитный сдвиг одинаков для всего диапазона концентраций дейтерия и зависит только от концентрации ионов Eu^{3+} .

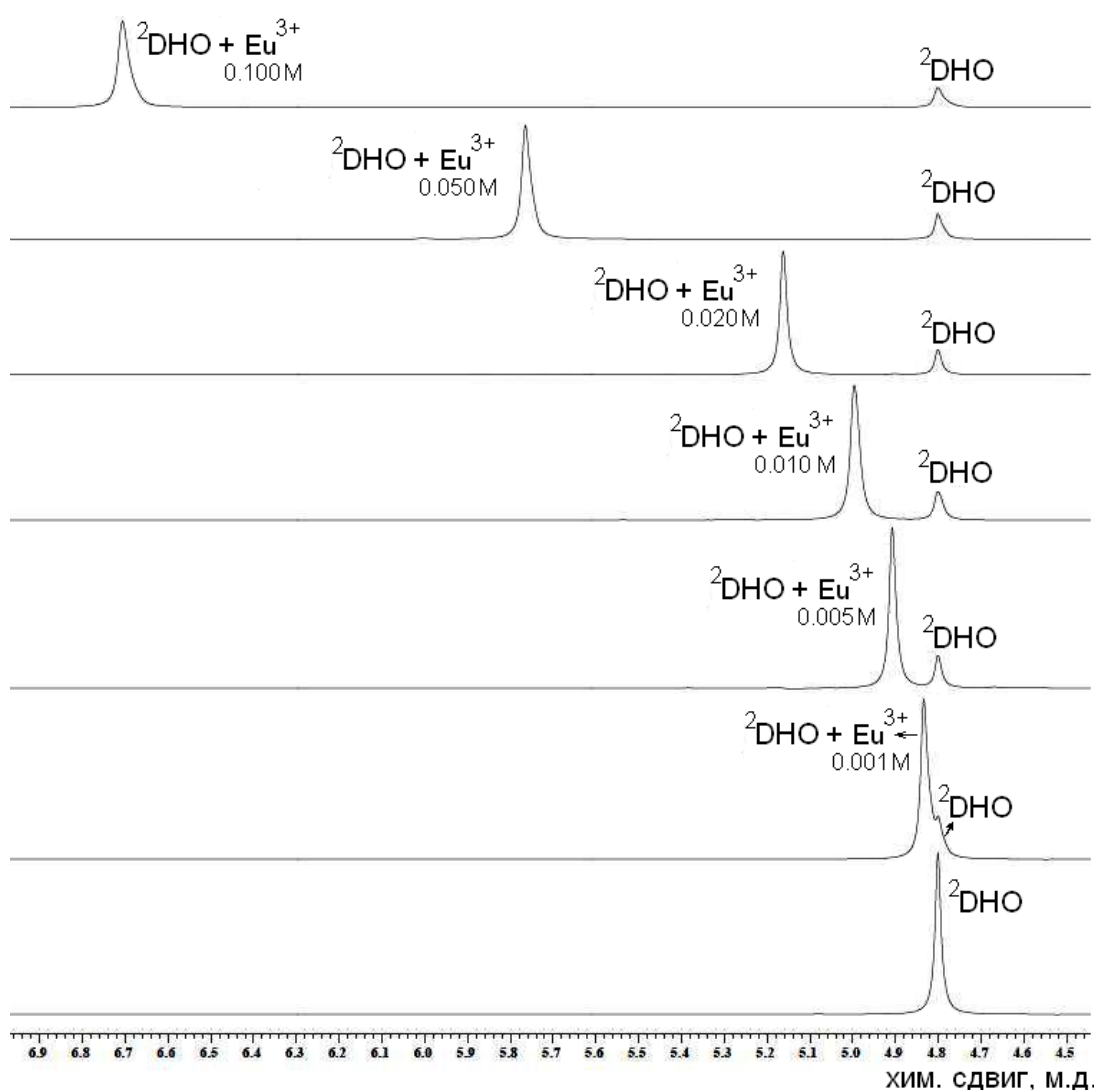


Рисунок 5.2 – ^2H ЯМР спектры растворов, содержащих 0,100 моль/л, 0,050 моль/л, 0,020 моль/л, 0,010 моль/л, 0,005 моль/л, 0,001 моль/л сдвигающего реагента трифторметансульфоната европия(III) в полутяжёлой воде

На рисунке 5.3 представлена зависимость парамагнитного химического сдвига ядер дейтерия полутяжёлой воды от концентрации ионов Eu^{3+} в растворе. Рис. 5.3 показывает линейный характер зависимости на всём диапазоне концентраций парамагнитного иона европия(III).

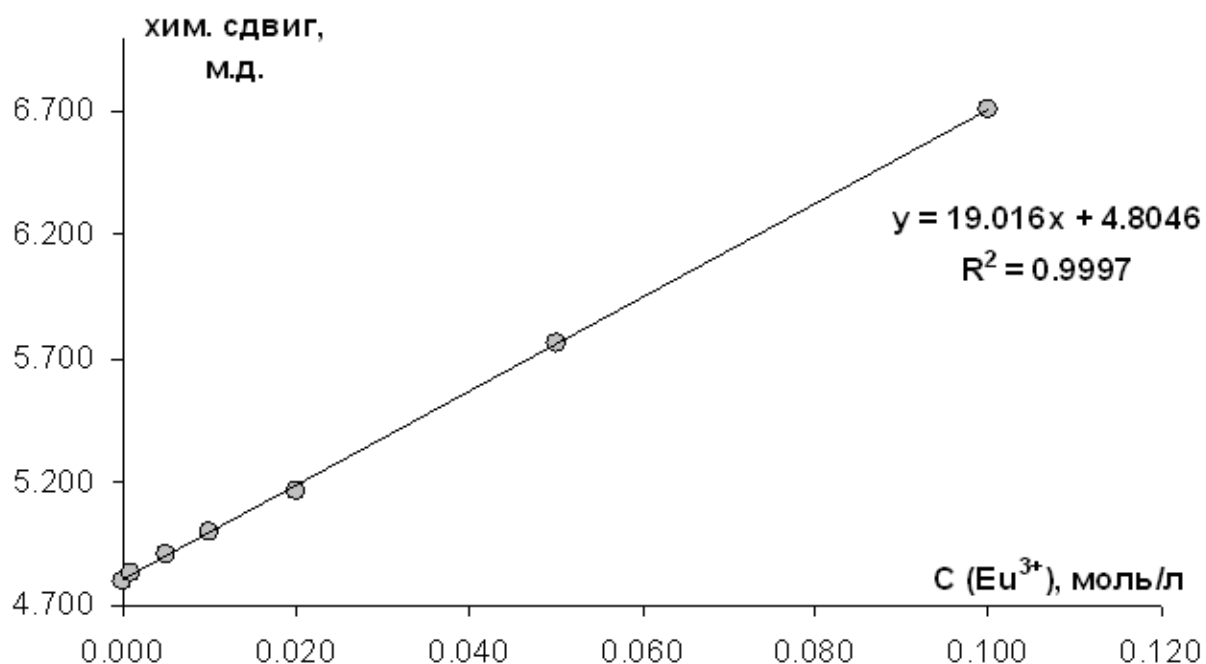


Рисунок 5.3 – Зависимость парамагнитного химического сдвига ядер дейтерия полутяжёлой воды от концентрации ионов Eu^{3+} в растворе

Таким образом, по интерполяции калибровочной линии тренда рисунка 5.3 можно определить оптимальную концентрацию трифлата европия(III) для эталонного образца.

При проведении изотопного определения $^2\text{H}/^1\text{H}$ в исследуемом образце необходимо было, чтобы содержание дейтерия воды в эталонном образце воды соответствовало исследуемому диапазону концентраций ^2H измеряемого объекта. Причём, концентрация и характер других растворённых веществ в исследуемом образце были заранее точно известны.

Нами для последующих количественных экспериментов по определению изотопного соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ в воде, водных растворах и в биологических жидкостях была взята оптимальная, по нашему усмотрению,

величина концентрации Eu^{3+} в эталонном образце воды, которая составляла $0,045 \pm 0,005$ моль/л.

На рисунке 5.4 изображён ^2H ЯМР спектр, полученный при определении изотопного соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ в пробе воды, взятой из Артезианской скважины Краснодарского края. При определении соотношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ Артезианской воды, взятой со скважин в 9 различных отдалённых друг от друга местах Краснодарского края, было показано, что значения $^2\text{H}/^1\text{H}$ во всех образцах практически одинаковые и составляли интервал (149 ± 2) ppm.

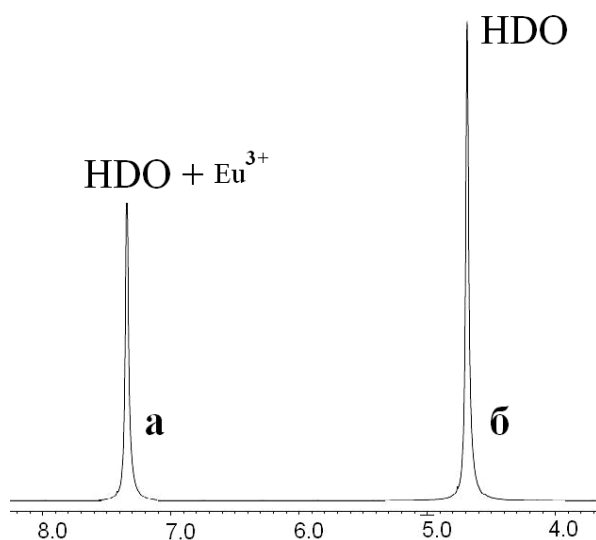


Рисунок 5.4 – ^2H ЯМР спектр. Сигнал дейтерия в исследуемом образце воды (б), относительно эталона со сдвигающим реагентом (а)

Результаты количественных анализов изотопного отношения $^2\text{H}/^1\text{H}$ различных объектов исследования, выполненные по разработанной нам в рамках данной работы методике, представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Изотопное соотношение $^2\text{H}/^1\text{H}$ в объектах исследования

Объект исследования	Изотопное соотношение $^2\text{H}/^1\text{H}$, ppm
Минеральная вода “Ессентуки 4”	153 ± 2
Минеральная вода “Ессентуки 17”	154 ± 2
Минеральная вода “Горячий ключ, скважина 934”	154 ± 2

Лёгкая вода “Лангвей”	44 ± 1
Минеральная вода “Aqua minerale”	149 ± 2
Плазма крови лабораторной мыши, подвергнутой длительному воздействию (постоянное питьё) лёгкой воды с $^2\text{H}/^1\text{H} = 44$ ppm.	102 ± 2
Ледниковая вода с п. Домбай, Карачаево-Черкессия	135 ± 2
“Лёгкая” вода, полученная из установки [8] КубГУ	41 ± 1
Вода из ручья, вытекающего из урановой штольни №5 около п. Даховская, Белореченского р-на, Краснодарского края	160 ± 3
Бидистиллированная вода полученная из установки по дистилляции НОЦ “ДССН” ЦКП КубГУ	155 ± 2
Вода с обеднённым содержанием дейтерия, полученная из лаборатории “ПРИМА” ун-та РУДН $^2\text{H}/^1\text{H} = 51$ ppm (по данным метода IRMS)	51 ± 1
Вода с обеднённым содержанием дейтерия, полученная из лаборатории “ПРИМА” ун-та РУДН $^2\text{H}/^1\text{H} = 10$ ppm (по данным метода IRMS)	9 ± 1
Вода с обеднённым содержанием дейтерия, полученная из лаборатории “ПРИМА” ун-та РУДН $^2\text{H}/^1\text{H} = 3$ ppm (по данным метода IRMS)	5 ± 1

Методологический подход данной работы с применением в качестве стандартного образца откалиброванного раствора трифторметансульфоната европия(III) в дейтерированной воде с точно известной концентрацией дейтерия нашёл применение в работах исследователей Кубанского государственного университета. Например, в изучении антирадикальной активности воды с модифицированным изотопным составом с помощью ЯМР [244], а также в исследовании влияния воды с пониженным содержанием дейтерия на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы у

лабораторных животных [245]. Авторами данных работ был сделан ряд важных научных наблюдений о биохимических процессах при воздействии на образцы изотопномодифицированной воды. Было установлено, что употребление воды с пониженным содержанием $^1\text{H}^2\text{HO}$ относительно природного, приводит к уменьшению концентрации дейтерия в плазме крови, эритроцитах и гомогенате сердца лабораторных крыс. Изучены транспортные особенности дейтерия в организмах лабораторных животных.

Нами была изучена концентрационная зависимость ионов Eu^{3+} на индуцированный парамагнитный сдвиг ядер кислорода ^{17}O , входящих в состав молекул воды.

Для нахождения оптимальной концентрации трифторметансульфоната европия (III) в эталонном образце, содержащем воду готовилась серия водных растворов, содержащих 0,200 моль/л, 0,150 моль/л, 0,100 моль/л, 0,070 моль/л, 0,050 моль/л, 0,025 моль/л сдвигающего реагента – трифторметансульфоната европия(III). Исходя из калибровочной зависимости, представленной на рисунке 5.5, нами была выбрана оптимальная концентрация ионов Eu^{3+} составляющая 0,120 моль/л.

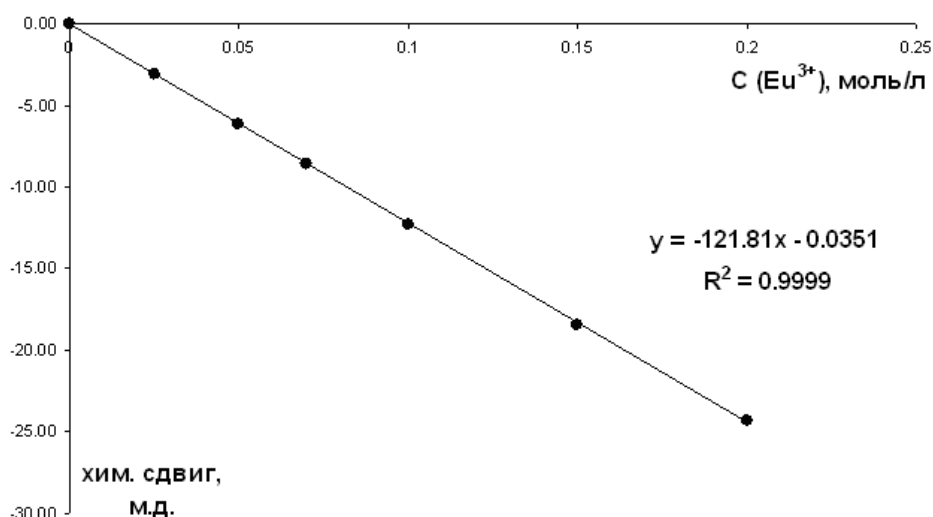


Рисунок 5.5 – Зависимость парамагнитного химического сдвига ядер ^{17}O воды от концентрации ионов Eu^{3+} в растворе

ЯМР спектр системы, состоящей из ампулы, которая содержит исследуемое вещество и вставленной в неё внутренней ампулы, содержащей эталонный образец воды с ЛСР, где $C(\text{Eu}^{3+}) = 0,120$ моль/л показан на рисунке 5.6.

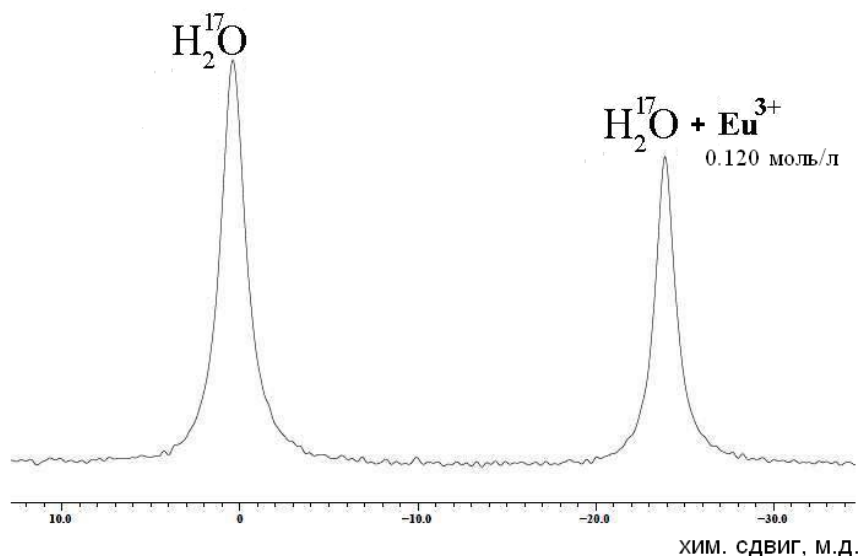


Рисунок 5.6 – ^{17}O ЯМР спектр. Сигнал ^{17}O в исследуемом образце воды (слева) и сигнал эталона со сдвигающим реагентом (справа)

Из рисунка 5.6 можно заметить значительное смещение сигнала ЯМР ^{17}O воды, содержащей Eu^{3+} в сильное поле, что характеризуется изменением общей магнитной восприимчивости раствора, а также, предположительно, наличием контактного взаимодействия ионов Eu^{3+} с ^{17}O .

При количественном определении изотопов методом ЯМР важной проблемой является правильный выбор эталона – вещества, имеющего ЯМР сигнал относительно которого будет производиться определение интегральной интенсивности определяемого пика в спектре.

Так как время спин-решёточной релаксации (T_1) определяет релаксационную задержку при накоплении ЯМР спектра в отсутствие насыщения, то в качестве эталона необходимо использовать вещество, имеющее оптимальное значение T_1 для необходимого ядра.

Соответственно, чем ниже значение T_1 , тем короче время проведения количественного ЯМР анализа. В то же время, при очень коротких временах

спин-спиновой релаксации (T_2) ядер наблюдается значительное уширение линии спектра ЯМР, что снижает точность при интегрировании пиков.

В данной работе, выбор в качестве ЛСР именно соединения европия (III) из всех лантаноидов обусловлен тем, что при достаточном сдвигающем эффекте Eu^{3+} , влияние на времена спин-решёточной и спин-спиновой ядерной релаксации невелики, относительно других соединений редкоземельных элементов. Это объясняется тем, что для Eu^{3+} основное электронное состояние диамагнитно и описывается термом 7F_0 , а парамагнетизм возникает лишь за счёт возбуждённого состояния 7F_1 . Вследствие этого, времена спин-решёточной и спин-спиновой электронной релаксации T_{1e} и T_{2e} крайне короткие и составляют порядок $10^{-12} - 10^{-13}$ секунд. А например, уширяющие линии ЯМР ионы гадолиния Gd^{3+} и Eu^{2+} имеют порядок величин электронной релаксации $10^{-8} - 10^{-9}$ секунд, являясь хорошим ЯМР релаксантами, так как имеют основное состояние ${}^8S_{7/2}$. У такого терма величина полного углового момента определяется только спином, так как орбитальный момент L равен нулю, следовательно такое состояние не взаимодействует с электрическим полем, то есть эффект Штарка не проявляется, следовательно время релаксации электронного спина Gd^{3+} и Eu^{2+} будет намного больше, чем у Eu^{3+} .

Нами была проведена серия ЯМР экспериментов по определению времён спин-решёточной и спин-спиновой ядерной релаксации для ядер дейтерия и ${}^{17}\text{O}$ в присутствии Eu^{3+} широкого диапазона концентраций (от 0,001 до 0,200 моль/л Eu^{3+}) методами “инверсия-восстановление” (для T_1) и СРМГ (для T_2).

Полученные результаты подтвердили теоретическое обоснование выбора европия (III) в качестве ЛСР для целей данной работы, поскольку изменения времён ядерной релаксации от повышения концентрации Eu^{3+} были незначительные.

Для ядер ${}^2\text{H}$ без присутствия Eu^{3+} время T_1 составляло $(0,43 \pm 0,02)$ с, а в присутствии 0,100 моль/л Eu^{3+} изменялось до $(0,35 \pm 0,02)$ с. Соответственно,

T_2 без присутствия Eu^{3+} составляло $(0,35 \pm 0,05)$ с, а в присутствии $0,100$ моль/л Eu^{3+} изменялось до $(0,20 \pm 0,05)$ с.

Аналогично, для ядер ^{17}O без присутствия Eu^{3+} время T_1 составляло $(0,007 \pm 0,001)$ с, а в присутствии $0,200$ моль/л Eu^{3+} изменялось до $(0,005 \pm 0,001)$ с. При этом, ядро ^{17}O , имея высокую величину электрического квадрупольного момента, релаксирует по квадрупольному механизму, следовательно, $T_1 = T_2$, что и наблюдалось нами в эксперименте. Соответственно, T_2 без присутствия Eu^{3+} составляло $(0,007 \pm 0,001)$ с, а в присутствии $0,200$ моль/л Eu^{3+} изменялось до $(0,005 \pm 0,001)$ с.

Представленные данные подтверждают обоснованность выбора в качестве ЛСР именно соли европия (III). При этом, анион выбирался по принципу соответствия растворимости соли Eu^{3+} в эталоне. В данном случае, трифторметансульфонат европия (III) (Sigma Aldrich) был безводным и водорастворимым.

Следует вывод, что методологический подход данной работы добавления ЛСР к эталону, которым является вещество с таким же молекулярным строением, как и исследуемое является более перспективным и универсальным, по сравнению с выбранными эталонами аналогичных ЯМР анализов изотопного состава веществ, как например, в работах.

Для определения содержания количества дейтерия или кислорода-17 в составе исследуемого образца воды, водного раствора или биологической жидкости на первом этапе измеряется количество посторонних примесей, либо водный раствор подвергается очистке и ректификации.

Подбирается эталонный образец чистой бидистиллированной воды так, чтобы содержание изотопа кислорода ^{17}O или дейтерия в эталоне соответствовало исследуемому диапазону концентраций ^{17}O или дейтерия измеряемого объекта (содержание других примесей не более $0,01$ % по массе.).

В эталонный образец добавляется ЛСР $((\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Eu})$ так, чтобы его концентрация была равна $0,120 \pm 0,005$ моль/л в случае определения ^{17}O или $0,045 \pm 0,005$ моль/л в случае определения дейтерия.

Далее, приготовленный эталонный образец воды с ЛСР помещают во внутреннюю ЯМР ампулу - вставку и герметично закрывают, либо запаивают. Внутренняя ЯМР ампула с таким эталонным раствором называется внешний стандарт для ЯМР.

Затем, проводится калибровочная процедура на ЯМР внешнего стандарта. Для этого, внешний стандарт вставляют в основную ЯМР ампулу, в которую предварительно с помощью дозаторной пипетки помещают 600 мкл калибровочного образца воды с заранее точно известным содержанием ^{17}O или ^2H . После этого проводят измерение на ЯМР спектрометре в соответствии с условиями измерений для каждого калибровочного образца. Далее, обрабатывают полученные ЯМР спектры. Измеряют в полученных спектрах с помощью встроенного программного обеспечения "Delta" интегральную интенсивность (ИИ) внешнего его стандарта и относительно него ИИ каждого калибровочного образца. Строят калибровочную кривую зависимости ИИ от содержания ^{17}O или ^2H , относительно внешнего стандарта. Математическим методом наименьших квадратов проводят линию тренда в линейных координатах $y=k*x+b$, где y – ИИ; x - содержание изотопа; k , b – коэффициенты линейной аппроксимации, затем, проводят экстраполяцию и узнают точное содержание изотопов ^{17}O или ^2H в искомом внешнем стандарте ЯМР.

Условия воспроизводимости результатов эксперимента были достигнуты путём вариации различных факторов, такими как оператор, оборудование, интервал времени между измерениями, параметры съёмки ЯМР спектров, что допускается по ГОСТ Р ИСО 5725-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений».

В работе для различных групп экспериментов по определению в образцах содержания дейтерия и изотопа кислорода-17 была проведена оценка статистических и систематических погрешностей. В таблице 5.1 приведены некоторые примеры измерений содержания дейтерия в различных образцах воды. При этом, рассчитанные относительные погрешности составляют от 1 %

до 2,5 %. Нужно отметить, что точность определения увеличивается с ростом концентрации определяемого изотопа, так как повышается чувствительность детектирования ЯМР сигнала.

Сравнение результатов измерений образцов данной работы проводилось с результатами изотопных анализов этих же образцов методом IRMS – масс-спектрометрии изотопных соотношений на аппарате Thermo Finnigan «Delta V Advantage Plus» в лаборатории “Центра прецизионных инструментальных методов анализа «ПРИМА»” при Московском государственном университете РУДН, что позволило оценить систематическую погрешность выполненных измерений методики данной работы.

Для ЯМР спектрометра (модель JNM-ECA 400MHz), использованного в данной работе, возможно было проводить изотопные количественные измерения для ^2H и ^{17}O только с использованием ЯМР ампул с диаметром 5мм. Это связано с конструкционными особенностями датчика (модель 40TH5AT/FG2) данного спектрометра ЯМР. Но в настоящее время во многих аналитических центрах и радиоспектроскопических лабораториях университетов широко используются более современные ЯМР спектрометры, которые имеют более высокую чувствительность, чем у модели JNM-ECA 400MHz и, при этом, их датчики рассчитаны на использование не только 5-ти миллиметровых ЯМР ампул, но и ампул с диаметром 10 мм. А так как чувствительность определения методом ЯМР напрямую зависит от количества определяемого образца, то из этого следует, что применение методики данной работы на таких ЯМР спектрометрах может в разы увеличить точность и ускорить время изотопного анализа. Этот факт обуславливает дальнейшую перспективность применения методологического подхода данной работы на современных ЯМР спектрометрах и открывает новые возможности количественного анализа сверхнизких концентраций изотопов ^{19}F , ^{31}P , ^{15}N , ^{14}N , ^{33}S , ^{35}Cl , ^{37}Cl , ^{10}B , ^{11}B , ^{13}C и др.

В результате работы была достигнута основная цель – разработаны методы измерений содержания изотопов кислорода ^{17}O и дейтерия в воде с

помощью количественного ядерного магнитного резонанса на фурье-спектрометре ЯМР (модель JNM-ECA 400MHz).

Решена задача выбора эталонного вещества – в качестве эталона выбирается вещество с таким же молекулярным строением, как и исследуемое, при этом к эталону добавляется лантанойдный сдвигающий реагент: трифторметансульфонат европия(III).

По результатам проделанной работы сделаны следующие выводы:

1) Из всех парамагнитных ионов металлов, наиболее подходящим по релаксационным и частотно-сдвигающим ЯМР характеристикам для целей данной работы является трёхзарядный катион европия (Eu^{3+}).

2) Наиболее подходящим химическим соединением, содержащим Eu^{3+} для использования его в качестве “сдвигающего” реагента для водных растворов с целью изучения изотопного состава является соединение трифторметансульфоната европия $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Eu}$.

3) По результатам исследования зависимостей химического сдвига ядер ^{17}O и ^2H от концентрации трифторметансульфоната европия удалось определить удельные величины парамагнитного химического сдвига, что позволило рассчитать необходимую концентрацию ионов Eu^{3+} для внешних стандартов систем – эталонов по определению изотопного состава веществ. Величины концентраций Eu^{3+} в воде составляют для определения изотопа ^{17}O – $0,120 \pm 0,005$ моль/л и для определения дейтерия ^2H – $0,045 \pm 0,005$ моль/л.

Полученные результаты могут быть востребованы производителями продукции, государственными структурами, осуществляющими контроль качества и подлинности продукции, органами сертификации и стандартизации и применяться в научных исследованиях, для контроля качества воды, анализа происхождения воды в соответствии с изотопным составом местности, в области сельского хозяйства, в химии, в медицине, в ядерной энергетике [223].

По результатам разработки способа определения количественного содержания дейтерия в воде и водных растворах был получен патент РФ на изобретение [246].

Изучение соотношения стабильных изотопов в гетерогенных системах является важным подходом при выполнении исследований в разных областях естественных наук, в том числе физиологии [247], экологии [101], судебно-медицинской экспертизе [248] и нутрициологии [249], где важным направлением является определение географического места происхождения и переработки различных пищевых продуктов. Современные ЯМР-спектрометры позволяют выполнять измерения абсолютного и относительного содержания изотопов некоторых химических элементов с полуцелым спином ($s = 1/2, 3/2, \dots$), входящих в состав природных и синтетических веществ. Полученная таким способом информация по изотопному составу образца позволяет дать ответы на многие вопросы, начиная от определения возраста пород для геологии и заканчивая определением фальсификатов многих продуктов и установлением места происхождения товаров и сырья [250], в том числе предоставляет возможность оценки условий их образования [251], основанных на особенностях фракционирования изотопов в естественных и искусственных физико-химических процессах.

Одним из распространенных способов для определения концентрации изотопов углерода ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) и водорода ($^2\text{H}/^1\text{H}$) является масс-спектрометрия [252], являющаяся менее доступной и экспрессной по сравнению с ЯМР-спектроскопией [244], которая позволяет быстро и достаточно точно определять соотношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ и $^2\text{H}/^1\text{H}$ [245]. Последнее представляется актуальным в связи со всевозрастающей необходимостью идентификации различных вин, коньячных и других спиртных напитков [253, 254]. ЯМР высокого разрешения позволяет также наблюдать отдельно каждую группу атомов в молекуле в качественном и количественном аспектах.

В настоящей работе представлен новый подход к решению проблемы измерения изотопного соотношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ методом ЯМР высокого разрешения на ядрах ^1H для установления оригинальности происхождения этанола в спирто-водосодержащих жидкостях, прежде всего выявление

различий между образцами синтетического и природного (свекловичного, зернового пшеничного и кукурузного) этанолов. Широко используемый методологический подход SNIF-NMR для установления изотопного состава веществ [255] сталкивается с различными экспериментальными трудностями. Например, точное определение соотношения ядер $^2\text{H}/^1\text{H}$ в структурных группировках исследуемого образца по спектрам ЯМР требует использования серии стандартов с различным содержанием дейтерия и большого числа накоплений спектров для достижения оптимального соотношения сигнал/шум. Точное определение соотношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в субстрате из спектров ЯМР требует использования сложных схем спиновой развязки и также большого числа сканирований при накоплении спектра.

Однако, известен экспериментальный факт того, что в спектрах ЯМР ^1H присутствуют боковые сателлиты, которые проявляются от спин-спинового взаимодействия ядер ^1H и ^{13}C . Поэтому представляет интерес изучение возможности использования этих сигналов для экспрессной оценки соотношений $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в различных структурных группировках простых веществ в сырье биологического происхождения.

Разработан новый метод определения изотопного соотношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в водных спиртосодержащих системах с помощью ЯМР-спектроскопии на ядрах ^1H для выявления различий в происхождении природных и синтетических этанолов, присутствующих в разнообразных спиртных напитках. Предложенный подход позволит значительно упростить и ускорить выполнение эксперимента по изучению изотопного ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) состава и идентификации спиртов.

В работе использовался спектрометр ЯМР (FT NMR SYSTEM модели JNM-ECA 400), с датчиком 40TH5AT/FG2. Изучение этанолсодержащих водных растворов методом ^1H ЯМР проводилось с резонансной частотой 400 МГц. Параметры съёмки: 6,7 с (время измерения), 20 с (задержка релаксации), 5,6 мкс (x-импульс), 0,15 Гц (разрешающая способность), количество

сканирований для отдельного измерения составляло от 8 до 64 раз. Температура съёмки – 25°C, при этом точность стабилизации была 0,2°C.

При изучении растворов с разной концентрацией этанола в качестве растворителя использовалась $^2\text{H}_2\text{O}$ для настройки однородности постоянного магнитного поля ЯМР спектрометра. Обработка полученных спектров ^1H ЯМР заключалась в точной коррекции фазы, выделения базисной линии с помощью полиномиального приближения и последующего численного определения соотношения интегральных интенсивностей сигналов ^1H ЯМР метильных и метиленовых протонов этанола и их боковых сателлитов. Измерения каждого образца проводили трехкратно для уменьшения погрешностей эксперимента.

Изменение изотопного состава выражали в промилле (‰; часть на тысячу) с использованием стандартного дельта-обозначения (δ) по формуле (5.1):

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{пробы}}}{R_{\text{станд.}}} - 1 \right) \cdot 1000(\text{‰}), \quad (5.1)$$

где

R – соотношение изотопов $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$;

$R_{\text{пробы}}$ и $R_{\text{станд.}}$ – соотношение $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в исследуемой пробе и официальном стандарте «Pee Dee Belemnite» (PDB), равном 0,0112372, при котором $\delta^{13}\text{C}$ составляет 0,0‰ [256].

Далее рассчитывали соотношение интегральных интенсивностей ^1H ЯМР сигналов метиленовых и метильных протонов относительно боковых сателлитов каждого сигнала у изучаемого образца этанола. Известно, что в ^1H ЯМР спектре, помимо основных мультиплетных сигналов (триплета метильных и квартета метиленовых протонов), можно наблюдать боковые сателлиты. Они проявляются при спин-спиновом взаимодействии ядер ^1H и ^{13}C и имеют спектральную структуру дублетов, характеризующихся соответствующими константами спин-спинового взаимодействия $^1J(^1\text{H}-^{13}\text{C})$

для метильной и метиленовой групп. Интегральные интенсивности этих дублетов зависят от количества ядер ^{13}C непосредственно химически связанных с наблюдаемыми в спектре ^1H ядрами. Таким образом, соотношение интегральных интенсивностей сигналов ^1H боковых сателлитов к интегральной интенсивности основного сигнала является показателем соотношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. В дальнейшем, с использованием выражения (5.1) определяли концентрацию ^{13}C в исследуемом образце.

Спирто-водосодержащие образцы были получены из натуральных компонентов (пшеницы, кукурузы, свеклы) в лаборатории «Научно-методических работ и контрольно-аналитических исследований» ФГБНУ "ВНИИМП им. В.М. Горбатова". Для сравнения исследовали 95%-ный синтетический этанол.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием свободного программного обеспечения статистического анализа (R Development Core Team, 2008), достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Первоначально были изучены водные растворы образца коммерческого синтетического этилового спирта, получаемого гидратацией этилена, в воде с различной концентрацией спирта. Спектр ^1H ЯМР водного раствора синтетического этилового спирта с концентрацией этанола 95 об.% приведен на рисунке 5.7. После полиномиального сглаживания проводили интегрирование площадей мультиплетов метильных и метиленовых протонов ^1H ЯМР водного раствора синтетического этилового спирта и их соответствующих боковых сателлитов. При расчете установлено, что для метильных протонов усредненная по двум значениям боковых мультиплетов величина $\delta^{13}\text{C}$ составила -30 ± 3 ‰, тогда как для метиленовых протонов синтетического этанола величина $\delta^{13}\text{C}$ составила -33 ± 2 ‰. Заметим, что по данным работ [253, 257] величина $\delta^{13}\text{C}$ для коммерческих образцов синтетического этанола составляет диапазон от $-33,8$ до $-32,6$ ‰. Следует отметить, что в образцах этанола синтетического происхождения с различной концентраций воды возможно с помощью метода ^1H ЯМР спектроскопии на

основании анализа площадей сигналов боковых сателлитов определение значения величины $\delta^{13}\text{C}$ с вполне удовлетворительной точностью на уровне $32 \pm 4 \text{ ‰}$.

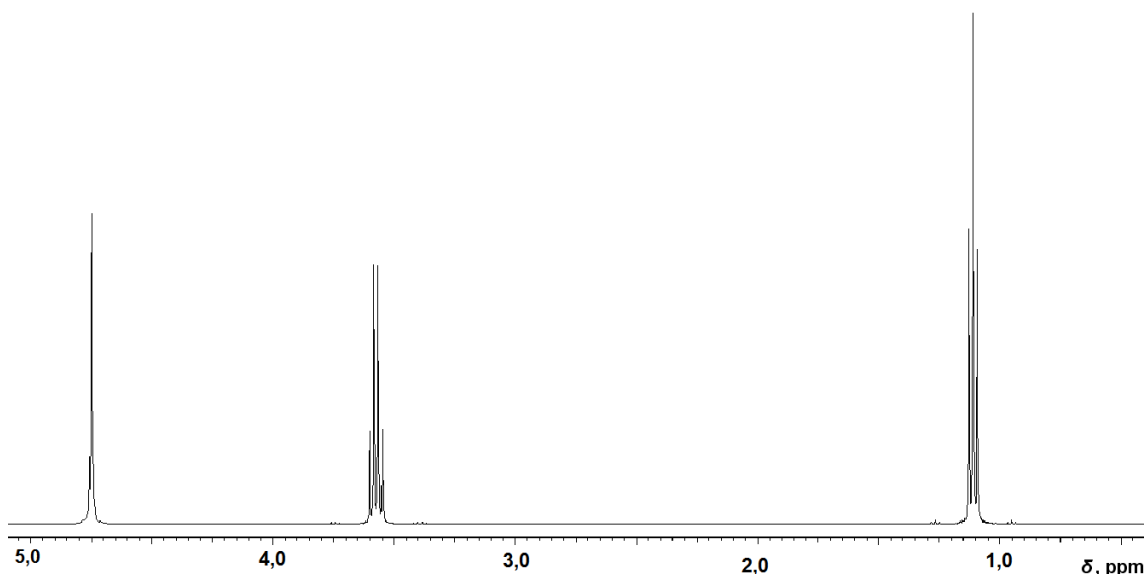


Рисунок 5.7 – Спектр ^1H ЯМР водного раствора синтетического этилового спирта с концентрацией этанола 95 об.%

Для приведенного ^1H ЯМР спектра триплетный сигнал метильных протонов этанола находится в области 1,0-1,3 м.д. (относительно $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$), тогда как квартетный сигнал метиленовых протонов располагается в области 3,3-3,8 м.д. В области 4,7-4,8 м.д. располагается сигнал протонов $^1\text{H}^2\text{HO}$.

Результаты интегрирования после полиномиального сглаживания основных и боковых сателлитных сигналов в мультиплетах метильных и метиленовых протонов ^1H ЯМР водного раствора синтетического этилового спирта с концентрацией этанола 95 об.% отображены на рисунке 5.8.

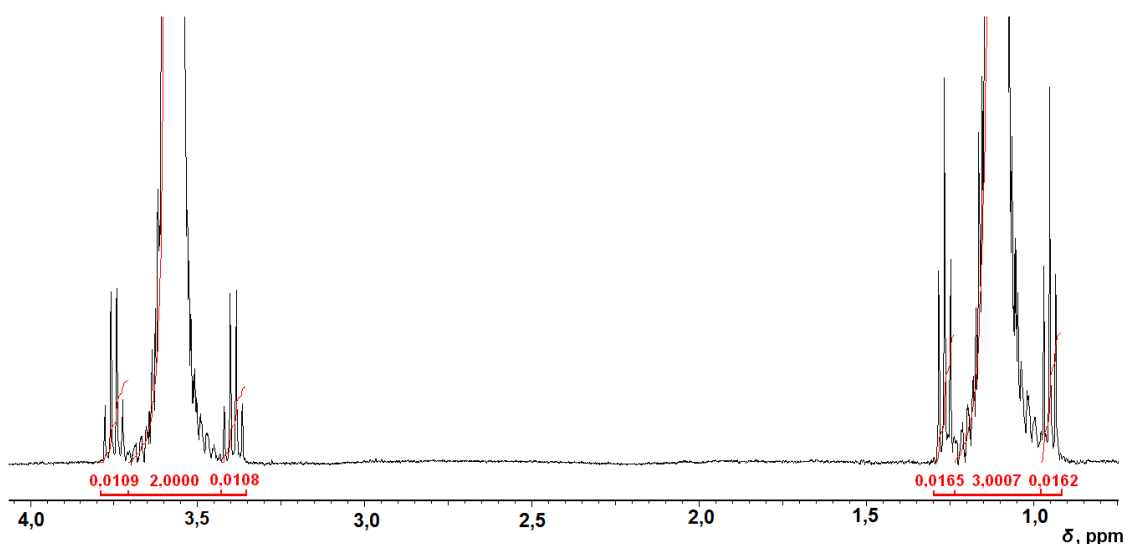


Рисунок 5.8 – Результаты интегрирования основных и сателлитных сигналов в спектре ^1H ЯМР водного раствора синтетического этилового спирта с концентрацией этанола 95 об.%

Рассчитанные средние значения $\delta^{13}\text{C}$ двух типов этанольных алифатических протонов для спиртовых растворов различного природного происхождения в сравнении со средними данными для синтетического этанола приведены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Рассчитанные значения величины $\delta^{13}\text{C}$ в различных этанолсодержащих образцах

Образец этанола	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$, CH_3 - группа	$\delta^{13}\text{C}(\text{‰})$, $-\text{CH}_2$ - группа
Синтетический (в концентрации от 25 до 95 об.%)	-29 ± 4	-34 ± 4
Пшеничный (в концентрации от 40 до 94,5 об.%)	-23 ± 3 *	-26 ± 4 *
Кукурузный (в концентрации от 40 до 95 об.%)	-11 ± 4 *	-13 ± 3 *
Свекловичный (в концентрации от 40 до 95,1 об.%)	-25 ± 4 *	-28 ± 4 *

Примечание: * - $p < 0,05$ в сравнении с аналогичными показателями для этанола синтетического происхождения.

Анализ представленных в таблице 5.2 данных позволяет сделать вывод, что дефицит изотопа ^{13}C для метиленовых группировок во всех исследованных образцах этанолов более выражен по сравнению с метильными протонами. Это наблюдение хорошо согласуется с данными работы [257] в которой для образца коммерческого синтетического этанола определенное прецизионным методом ^{13}C -SNIF-NMR величина $\delta^{13}\text{C}$ составляет $-26,0 \pm 0,3$ ‰ для метильных протонов и $-32,7 \pm 0,3$ ‰ для метиленовых протонов.

Необходимо указать, что рассчитанное соотношение интегральных интенсивностей ^1H ЯМР сигналов метиленовых и метильных протонов этанола из пшеницы, кукурузы, свеклы составило 1,000:1,501; 1,000:1,503; 1,000:1,502 соответственно, что хорошо согласуется и с теоретически рассчитанным соотношением.

Представленные в таблице 5.2 результаты не противоречили данным из литературных источников, в которых концентрация $\delta^{13}\text{C}$ определяли другими методами. Например, в работе [258] величина $\delta^{13}\text{C}$ для образцов этанола, полученного биохимическим брожением пшеничного солода, составляла диапазон от $-28,5$ до $-26,0$ ‰; в работе [253] величина $\delta^{13}\text{C}$ для образцов этанола, полученного биохимическим брожением кукурузного зерна, составляла диапазон от $-13,2$ до $-10,1$ ‰; в работах [253, 257] величина $\delta^{13}\text{C}$ для образцов этанола, полученного биохимическим брожением свекловичного сахара, составляла диапазон от $-29,1$ до $-26,5$ ‰.

Таким образом, результаты проведенного изучения спиртовых растворов этанола различного происхождения подтвердили, что имеется прямая взаимосвязь между интенсивностями сигналов ^1H ЯМР метильных и метиленовых протонов этанола и их боковыми сателлитами, и этот подход может применяться для экспрессной оценки изотопного соотношения $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$

в водных спиртосодержащих системах (процесс регистрации спектров ^1H ЯМР и их обработки занимает около 10 минут).

Можно говорить о том, что анализ интегральных интенсивностей основных и боковых сателлитных сигналов метильных и метиленовых протонов этанола, полученных методом ЯМР на ядрах ^1H , позволяет различать этанол синтетического и природного происхождения. Проведенные эксперименты показали, что с помощью разработанного метода возможно установить различия между образцами зернового пшеничного и свекловичного этанолов со спиртом, полученного из кукурузы, в то же время различия между свекловичным и пшеничным этанолом не были выявлены [259].

Представленные результаты опубликованы Барышев М.Г., Кашаев Д.В., Джимаков С.С., Ломакина Л.В., Соколов М.Е., Шлапаков М.С. Способ определения количественного содержания дейтерия в воде и водных растворах, заявка № 2014105789 от 17.02.14, патент РФ № 2558433, Опубликовано: 10.08.2015 Бюл. № 22; Джимаков С.С., Басов А.А., Копытов Г.Ф., Кашаев Д.В., Соколов М.Е., Арцыбашева О.М., Шарапов К.С., Барышев М.Г. Применение ЯМР-спектроскопии для определения низких концентраций нерадиоактивных изотопов в жидких средах // Известия высших учебных заведений. Физика. 2015. Том 58. №7. С. 47-52; Джимаков С.С., Басов А.А., Бузько В.Ю., Копытов Г.Ф., Кашаев Д.В., Шашков Д.И., Шлапаков М.С., Барышев М.Г. Определение изотопного соотношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в спиртах различного происхождения с помощью ЯМР-спектроскопии ядер ^1H // Известия вузов Физика. 2016. Том. 59. №10. С. 167-171 и Джимаков С.С., Басов А.А., Шашков Д.И., Арцыбашева О.М., Кашаев Д.В., Барышев М.Г. Определение концентраций природного уровня ^2H в жидких средах с помощью ЯМР спектроскопии // Ученые записки физфака МГУ. 2017. №6, С. 1760901.

5.2 Исследование и разработка электрохимического способа снижения концентрации дейтерия в жидких средах, создание экспериментальной установки

При создании электрохимической установки для получения воды с пониженным содержанием тяжелых изотопов водорода одной из основных

целей являлось повышение эффективности способа, то есть увеличение степени разделения изотопов водорода за одну стадию, а также удешевление способа за счет использования в электролизере наиболее дешевых электродных материалов.

Результатом решения этих задач стал проект установки по получению обедненной дейтерием воды, которая включает электролизер, адсорбер-осушитель электролизных газов, преобразователь электролизных газов в воду, выполненный в виде реактора-конденсатора и емкость-сборник обедненной дейтерием воды. При этом электролизер выполнен в виде максимально эффективной фильтрпрессной конструкции с биполярными электродами без разделения электродных пространств, что позволяет снизить внутреннее сопротивление электролизера и повысить эффективность процесса электролиза [64, 260, 261]. В качестве электродного материала использовали никелевые пластины (коэффициент разделения никеля составляет 2,9). Реактор выполнен в виде прямоточного водяного холодильника из нержавеющей стали. Таким образом, реакторная часть установки состоит из горелки, в которую поступает газ из электролизера через систему гидрозатворов. Пламя горелки направлено в холодильник, изготовленный из нержавеющей стали.

Охлаждение происходит за счет циркуляции холодной воды через холодильник. Проведенные испытания показали, что при прямоточном реакторе не все пары успевают конденсироваться в холодильнике. Поэтому было принято решение сделать гидрозатвор, через который бы не проходили пары воды из холодильника. После запуска установки по получению воды с пониженным содержанием дейтерия, происходит постепенное наполнение гидрозатвора холодильника легкой водой. После заполнения гидрозатвора, установка выходит на рабочий режим. Производительность по выходной воде с пониженным содержанием дейтерия (50 ppm или -679 %) составляет 3 л/ч, максимальная потребляемая мощность: 25 кВт.

Установка «ЛВ-2/1» включает в себя контур охлаждения, контур электролиза, реакторную часть и блок электропитания с панелью управления и приборами контроля. Контур охлаждения включает в себя теплообменник, радиатор с вентилятором и циркуляционный насос. Контур электролиза включает в себя электролизер, пеноотделитель и гидрозатвор. Общий вид установки «ЛВ-2/1» изображен на рисунке 5.9.

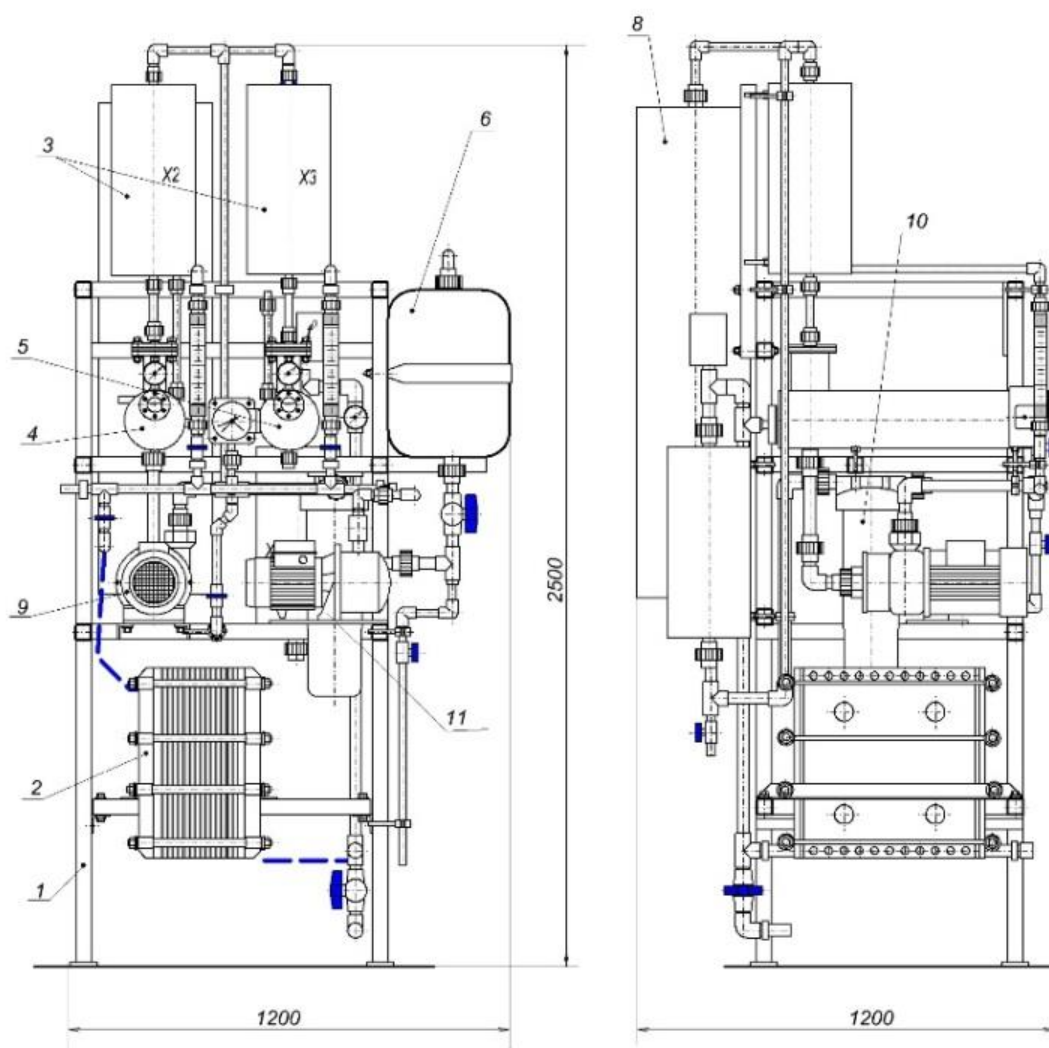


Рисунок 5.9 – Общий вид установки большой производительности «ЛВ-2/1».

1 - стойка; 2 - электролизер; 3 - теплообменники; 4 - пеноотделитель; 5 - гидрозатвор; 6 – технологическая емкость; 8 –реактор; 9 – насос контура электролиза; 10 – фильтр; 11 – насос контура охлаждения.

Принципиальная технологическая схема одномодульной установки «ЛВ-2/1» показана на рисунке 5.10.

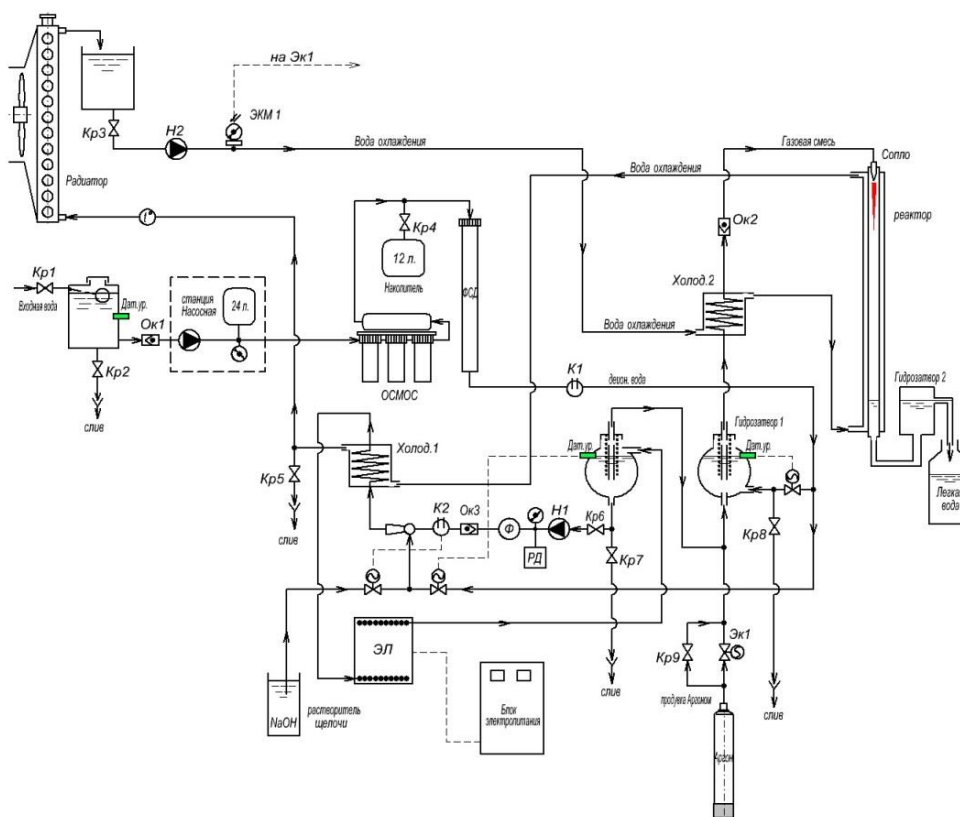


Рисунок 5.10 – Принципиальная технологическая схема установки «ЛВ-2/1».

КР – краны, Е 1 – емкость для жидкости контура охлаждения, Е 2 – емкость для электролита, Е 3 – емкость для деионизованной воды, Ф – фильтр, Тп – теплообменник, ПО – пеноотделитель, ГЗ – гидрозатвор, Н1 – циркуляционный насос, Н2 – насос контура электролиза, ЭЛ – электролизер, Р – реактор.

Работа установки «ЛВ-2» происходит следующим образом:

Перед запуском установки из технологических емкостей деионизованная вода заливается в контур охлаждения и гидрозатвор, а электролит в контур электролиза. Затем последовательно включаются система охлаждения, циркуляционный насос контура электролиза, подается электропитание на реактор. После загорания индикатора готовности реактора подается электропитание на электролизер. При неготовности или отключении

реактора электропитание не может быть подано на электролизер. Электролизер разлагает воду на составляющие газы, которые проходят гидрозатвор и попадают в реактор, где в результате реакции синтеза превращаются в воду с пониженным содержанием дейтерия.

Установка имеет блок питания с панелью управления. Для управления технологическим процессом получения воды с пониженным содержанием дейтерия панель управления имеет переключатели:

«ПУСК/СТОП» – переключатель включает или отключает общий электромагнитный пускатель блока питания.

«ПОЛЮС» – переключатель полюсов на электролизере. Изменение полюсов допускается только при выключенном электролизере.

«ОХЛАЖДЕНИЕ» – переключатель включает или отключает циркуляционный насос контура охлаждения, вентилятор радиатора.

«НАСОС» – переключатель включает или отключает циркуляционный насос контура электролиза.

«РЕАКТОР» – переключатель включает или отключает реактор синтеза воды.

«ЭЛЕКТРОЛИЗЕР» – переключатель включает или отключает электролизер.

Включение электролизера возможно только при готовности реактора.

«ТОК» – ручка плавного изменения силы тока на электролизере.

Для контроля токовых режимов панель управления снабжена амперметром. Для контроля за технологическим процессом получения воды с пониженным содержанием дейтерия панель управления имеет также световую индикацию рабочих режимов:

«ПУСК/СТОП» – индикатор желтого цвета, сигнализирует о том, что на блок питания подано напряжение. Загорается и гаснет вместе с включением и выключением блока питания в сети.

«ВКЛ» – индикаторы зеленого цвета, сигнализируют о том, что подано напряжение на циркуляционный насос контура охлаждения, вентилятор охлаждения радиатора, циркуляционный насос контура электролиза.

«НАГРЕВ» – индикатор *реактора* желтого цвета, сигнализирует о том, что подано напряжение на каталитический реактор и он находится в состоянии разогрева.

«ГОТОВ» – индикатор реактора зеленого цвета, сигнализирует о том, что каталитический реактор разогрет и находится в состоянии автоматического поддержания температуры.

«СЕТЬ» – индикатор инвертора зеленого цвета, сигнализирует о том, что подано напряжение на электролизер.

«ПЕРЕГРУЗКА» – индикатор инвертора красного цвета, сигнализируют о том, что инвертор вышел за пределы допустимых режимов.

«ВЫКЛ» – индикаторы красного цвета, сигнализирует о том, что отключено напряжение на циркуляционных насосах, вентиляторе охлаждения радиатора, электролизере.

В случае несанкционированного отключения электропитания работа всей установки автоматически прекращается. После устранения неисправностей установка включается вручную оператором. Техническое обслуживание установки сводится к периодическому контролю за уровнями технологических жидкостей и периодической смене рабочих растворов. Периодичность смены растворов 168 часов. Принципиальная электрическая схема приведена на рисунке 5.11.

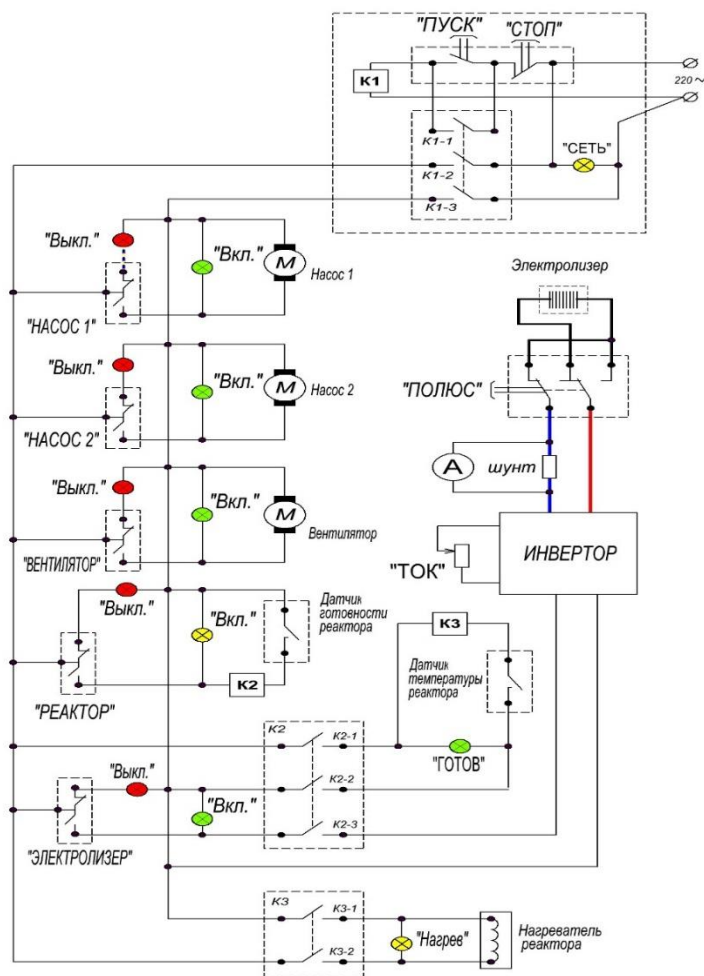


Рисунок 5.11 – Принципиальная электрическая схема установки «ЛВ-2/1»

Электрическая часть установки «ЛВ-2/1» включает в себя блок питания электролизера, реактор синтеза воды из электролизных газов, циркуляционные насосы контуров охлаждения и электролиза, вентилятор радиатора охлаждения. Блок питания электролизера расположен на раме установки в металлическом корпусе с вентиляционными отверстиями. Блок питания представляет собой выпрямительный агрегат, собранный на основе сварочного инвертора. На передней панели корпуса расположены амперметр, световые индикаторы и переключатели рабочих режимов. Вход линии питания 220 В, кабеля автоматики и выходы силовых кабелей питания электролизеров расположены в задней части корпуса. В задней части корпуса также расположен вентилятор охлаждения и вывод заземления, обозначенный знаком «*заземление*». Внутри корпуса расположены инвертор, двухканальный

измеритель-регулятор 2ТРМ1, электромагнитный пускатель, реле температуры реактора, шунт электролизера, амперметр, переключатель полюсов. Сетевой кабель 220 В подключен к электромагнитному пускателью.

Электромагнитный пускатель подает напряжение на остальные переключатели. Циркуляционный насос контура охлаждения и вентилятор радиатора включаются одним выключателем. Циркуляционный насос контура электролиза имеет свой выключатель. Реактор имеет датчик температуры, подключенный к измерителю-регулятору. Измеритель-регулятор имеет два канала. Один канал в зависимости от температуры включает и выключает реле элемента нагрева реактора, другой канал в зависимости от температуры реактора включает и выключает цепь питания инвертора. По достижении реактором заданной температуры измеритель-регулятор замыкает цепь питания инвертора. После этого включив инвертор можно подать напряжение на электролизер. При падении температуры реактора ниже заданной величины электропитание электролизера прерывается. При дальнейшем повышении температуры рабочей части реактора реле температуры отключает элемент нагрева реактора. Силовые кабели инвертора подключены к переключателю полюсов, затем подключены к электролизеру. Между инвертором и переключателем полюсов последовательно подключен шунт, с которого снимает показания амперметр. Регулируется ток электролиза ручкой «ТОК», расположенной на передней панели управления.

Основными параметрами, определяющими качество синтезированной легкой воды являются содержание в ней дейтерия в ppm и примесей органического и неорганического происхождения.

Нами были изучены следующие зависимости:

1. Концентрации дейтерия в получаемой воде первой ступени электролитического разделения изотопов от величины перенапряжения на ячейке;
2. Концентрации органических примесей;

3. Изменения концентрации неорганических примесей в зависимости от применяемых методов очистки реакционной газовой смеси

По пункту 2.1 было обнаружено, что в условиях промышленного электролиза на установке с биполярными электродами с коэффициентом разделения электродного материала по дейтерию $D = \frac{C_D}{C_H} = 3$ следующим образом зависит от перенапряжения и плотности тока в биполярном электролизере:

Как видно из таблицы 5.3 экспериментальные данные вполне удовлетворительно соответствуют расчетным (точность определения дейтерия ± 1 ppm). Из таблицы можно сделать вывод об уменьшении коэффициента разделения при увеличении плотности тока и перенапряжения на ячейке, однако сильное снижение перенапряжения приводит к уменьшению рабочей плотности тока и снижению производительности установки. Эквивалентный пересчет по закону Фарадея производительности установки по легкой воде на общее содержание дейтерия 26 ppm приводит к оптимальной плотности тока 10 А/дм² при напряжении на ячейке 2,60 В при которой производительность составляет 1,5 л*час/м².

Таблица 5.3 – Зависимость коэффициента разделения дейтерий – протий от перенапряжения на ячейке

Плотность тока, А/дм ²	Температура °С	Напряжение на ячейке, В	Перенапряжение на ячейке, В	Коэффициент разделения D	Расчетная концентрация дейтерия в получаемой легкой воде, ppm	Определенная экспериментально концентрация дейтерия в получаемой легкой воде, ppm
2	30	2,3	0,05	5,7	27,19	26
		2,35	0,10	5,1	30,39	32
		2,40	0,15	4,6	33,70	35
5		2,45	0,20	4,4	35,23	39
		2,5	0,25	4,1	37,8	42

		2,55	0,30	3,95	39,24	46
10		2,6	0,35	3,65	42,47	49
		2,65	0,40	3,35	46,26	54
		2,7	0,45	3,15	49,20	58
		2,75	0,50	3,05	50,82	60
15		2,8	0,55	2,85	54,39	65
		2,85	0,60	2,70	57,41	70

По второму пункту показано, что содержание примесей органического происхождения, определенное хроматографическим методом ничтожно мало от 10^{-6} до 10^{-8} М подтверждается литературными данными о низком содержании органики после пламенного реактора синтеза.

Известно, что неорганические примеси могут присутствовать в конечном продукте и привносятся туда в случае недостаточной очистки входящих газов как от неорганических, так и от органических соединений. Был изучен анионно-катионный состав воды с использованием барботёра поглотителя и без. Результаты представлены в таблице 5.4.

Таблица 5.4 – Анионно-катионный состав воды

Температура электролизных газов °С	Температура пламени в реакторе °С	Наличие барботера	Общая электропроводность синтезированной воды 1/Ом*см	Основные катионы примеси	Основные анионы примеси
30	3000	+	$1 \cdot 10^{-6}$	Na^+	OH^-
		-	$1 \cdot 10^{-3}$	Na^+	OH^-

При помощи определения концентрации основных катионов и анионов в обоих случаях показано что это катион натрия и гидроксоанион. Что довольно логично при использовании для электролиза раствора гидроксида

натрия. Однако использование простейшего поглотителя барботажного типа как видно из таблицы уменьшает общую электропроводность воды до уровня дистиллята, соприкасающегося с воздухом, т.е. в нашем случае на три порядка.

Таким образом, анализ факторов, влияющих на качество продукции показал, что органо-минеральный состав воды соответствует по составу воде бидистиллированной, а изучение параметров электролиза позволило для данного типа электролизера определить оптимальную плотность тока и напряжение на ячейке

Разработана и создана электрохимическая экспериментальная установка для производства обедненной дейтерием воды с концентрацией 50 ppm (-679‰). Концентрации дейтерия в получаемой воде первой ступени электролитического разделения изотопов зависят от величины перенапряжения на ячейке. Показано, что содержание примесей органического происхождения, определенное хроматографическим методом ничтожно мало. Определено наличие неорганических примесей и способ очистки от них получаемой легкой воды.

Полученные результаты опубликованы в Фролов В.Ю., Барышев М.Г., Джимаков С.С., Ломакина Л.В. Способ получения обедненной дейтерием воды. Заявка: 2013149198/05, 05.11.2013, патент РФ № 2548442, опубликовано: 20.04.2015 и Барышев М.Г., Болотин С.Н., Фролов В.Ю., Джимаков С.С., Пикула А.А., Долгов М.А., Шашков Д.И., Петриев И.С. Способы получения воды с пониженным содержанием дейтерия // Экологический вестник научных центров ЧЭС. 2013. №1. С. 13-17.

5.3 Разработка методов воздействия изотопного состава среды на показатели гетерогенных систем.

Для изучения механизмов влияния более низких по отношению к природному $\delta^2\text{H}$ на клеточном уровне было исследовано влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на жизнеспособность лимфоцитов (*in vitro*), которые изолировали из крови лабораторных животных, далее

инкубировали в физиологическом растворе (раствор-2), приготовленном на воде с природным содержанием дейтерия ($-36,98 \pm 9,44$ ‰, контроль А) или на воде с пониженным содержанием дейтерия ($-743,20 \pm 12,84$ ‰, опыт А). После лизирования клеток и соответствующей обработки растворов регистрировали спектры флюоресценции, при анализе которых установлено, что при инкубации в течение 16 часов в растворе-1, количество однонитевых разрывов дидоксирибонуклеиновой кислоты существенно не изменилось (Рис. 5.12). Увеличение времени инкубирования до 24 час статистически значимо не влияло на полученные значения, достоверно не зависело от $\delta^2\text{H}$ в среде инкубирования, а количество однонитевых разрывов дидоксирибонуклеиновой кислоты составляло $2,5 \pm 0,2$ %.

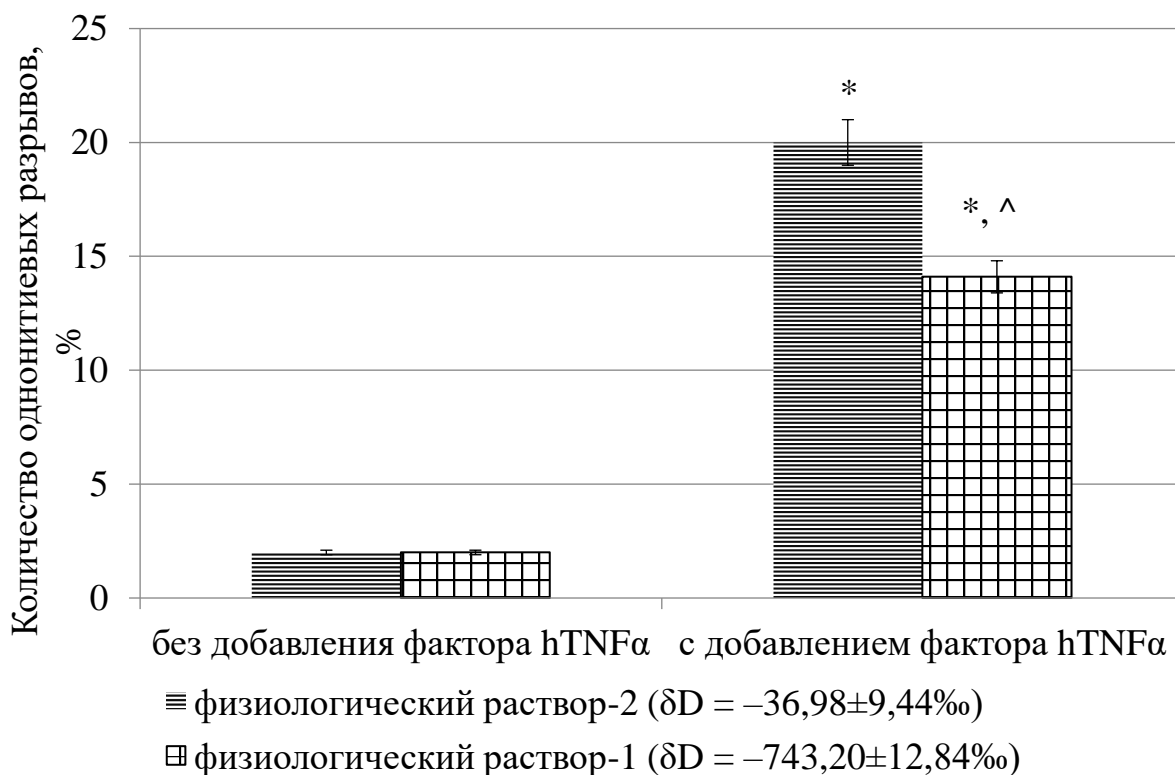


Рисунок 5.12 – Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на количество однонитевых разрывов дидоксирибонуклеиновой кислоты лимфоцитов в отсутствие и при добавлении в инкубационную среду hTNF α (концентрация 10 нг/мл)

Полученные данные свидетельствовали, о том, что

дизоксирибонуклеиновой кислоты лимфоцитов здоровых животных имеет незначительное количество повреждений в физиологических условиях. Поэтому для оценки возможного влияния обедненной дейтерием воды на процессы апоптоза у лимфоцитов и работу дизоксирибонуклеиновой кислоты-репарирующих систем были проведены эксперименты с использованием рекомбинантного человеческого фактора некроза опухолей ($hTNF_{\alpha}$). Известно, что $hTNF_{\alpha}$ является провоспалительным цитокином, который инициирует апоптоз в лимфоцитах [262]. Поэтому в инкубационной среде создавали концентрацию $hTNF_{\alpha}$, равную 10 нг/мл, которая гарантированно инициировала апоптоз. Лимфоциты, выделенные из плазмы крови лабораторных животных, инкубировали в растворе-1 при температуре 24 °C в присутствии $hTNF_{\alpha}$ (опыт В) и сравнивали с данными, полученными в опыте А. В качестве дополнительного контроля исследовали лимфоциты, которые инкубировали в растворе-2, также в присутствии $hTNF_{\alpha}$ (контроль В). После выполнения инкубации проводили измерения количества однонитевых разрывов дизоксирибонуклеиновой кислоты (Рис. 5.12), результаты статистической обработки соответствующих спектров флуоресценции растворов лизатов лимфоцитов представлены в виде графика (Рис. 5.13).

При использовании для инкубации лимфоцитов раствора-2, действие $hTNF_{\alpha}$ приводило к прогрессивному накоплению однонитевых разрывов дизоксирибонуклеиновой кислоты. После инкубации лимфоцитов в течение 3-х часов количество однонитевых разрывов дизоксирибонуклеиновой кислоты составляло $21,3 \pm 3,1$ %, и в ходе дальнейшей инкубации достоверно не изменялось. При инкубации лимфоцитов в растворе-1 количество однонитевых разрывов дизоксирибонуклеиновой кислоты в лимфоцитах увеличивалось в течение 2-х часов, а затем наблюдали их достоверное уменьшение.

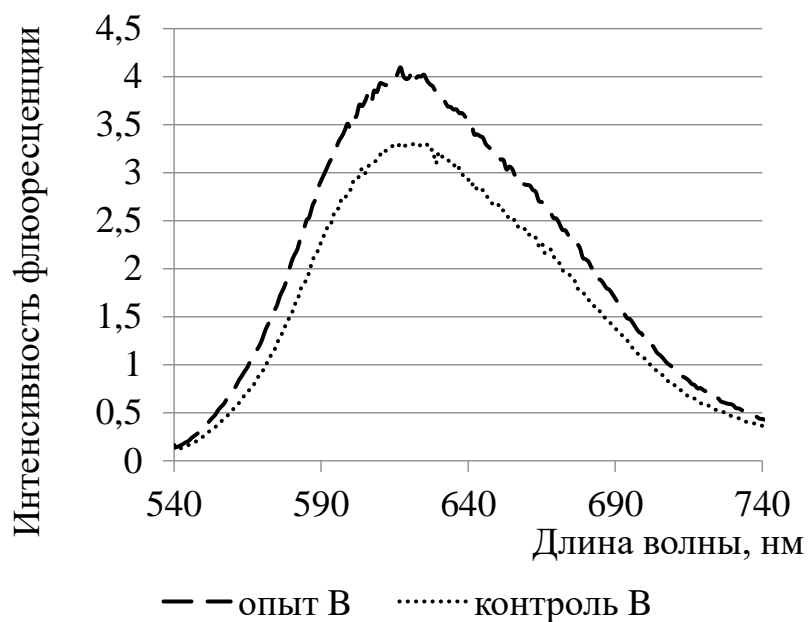


Рисунок 5.13 – Интенсивность флуоресценции раствора бромистого этидия с лизатами лимфоцитов при инкубировании в растворах с различным содержанием ^2H с добавлением hTNF_α

Такое поведение клеток вводе с пониженным содержанием дейтерия, возможно, связано с тем, что наряду с возникновением однонитевых разрывов дизоксирибонуклеиновой кислоты в клетках активируются системы ее репарации, частично ликвидирующие эти разрывы. Появлению однонитевых разрывов дизоксирибонуклеиновой кислоты предшествует ее фрагментация, которая наблюдается при вхождении клеток в стадию апоптоза. Использование обедненной дейтерием воды, по-видимому, делает обратимым этот процесс. Однонитевые разрывы дизоксирибонуклеиновой кислоты наблюдаются в незначительном количестве у лимфоцитов в физиологических условиях, но их количество существенно возрастает при патологических процессах. Пониженные $\delta^2\text{H}$ в среде могут повышать адаптационные возможности и способствовать увеличению функциональной активности клетки, связанной с усилением потока ионов водорода и последующей активацией системы дизоксирибонуклеиновой кислоты-репарации, что сопровождается большими затратами энергии. Последнее может

компенсироваться за счет более эффективной работы в условиях пониженной $\delta^2\text{H}$ в среде трансмембранного градиента протонов, необходимого для деятельности АТФ-синтазы и других ключевых ферментов энергетического цикла [263]. В целом, стоит указать, что среда с пониженной $\delta^2\text{H}$ создает благоприятные условия для клеток, о чем свидетельствует большая сохранность лимфоцитов в опыте В. Влияние пониженной $\delta^2\text{H}$ на механизмы репарации в лимфоцитах указывает на ее способность повышать эффективность работы дизоксирибонуклеиновой кислоты-репарирующих систем, проявляющуюся уменьшением количества одонитевых разрывов дизоксирибонуклеиновой кислоты (на 29,5 %) при добавлении в среду инициатора апоптоза (hTNF_α), и отсутствие подобного эффекта в естественных условиях.

Изучение механизмов влияния изотопного состава воды на работу биологических систем показало их сложность и разнообразие. Высказаны предположения о воздействии дейтерия на системы водородных связей, обеспечивающие структуру и функции макромолекул. Отмечено, что водородные связи с участием дейтерия несколько прочнее обычных. При инкубации клетки в воде с измененным относительно первоначального соотношением D/H, изменяется не только соотношение дейтериевой и протиевой воды внутри биологической системы как растворителя, но также осуществляется изотопный обмен в гидроксильных, сульфгидрильных, карбоксильных и аминоклупах молекул всех органических соединений [73, 264-266].

В связи с растущим количеством исследований биологических эффектов воды с модифицированным изотопным составом интерес представляет изучение влияния такой водной среды на бактерии, в частности на родококков. Спектр физиолого-биохимических особенностей данных представителей актинобактерий обусловил их применение в качестве биологического агента в биотехнологии трансформации гидрофобных соединений, и прежде всего, в экологической биотехнологии. В настоящее время родококки являются

основой, или, по меньшей мере, важным компонентом практически любого нефтеокисляющего биопрепарата или микробиологической технологии биоочистки углеводородзагрязненных почв и грунтов.

Данная группа микроорганизмов эволюционно адаптирована к утилизации и трансформации широкого круга соединений углеводородной природы. Природными соединениями, утилизируемыми актинобактериями, в том числе, представителями рода *Rhodococcus*, являются углеводороды нефти, поступающие в биосферу естественным или техногенным путем, а также различные другие природные биологически устойчивые соединения, в том числе гидрофобные. Основным местообитанием актинобактерий являются почвы, гуминовые и другие органические соединения которых служат практически неисчерпаемым депо углерода, доступного для поддержания жизнедеятельности данной группы бактерий. Для осуществления характерной для родококков экологической К-стратегии у них имеется соответствующий катаболический ферментный аппарат, а также система энергоэффективного транспорта углеводородных молекул в клетку, представленная продукцией биоПАВ, развитой клеточной стенкой, гидрофобизованной миколовыми кислотами и другими соединениями [267-269]. Спектр физиолого-биохимических особенностей актинобактерий обусловил их применение в качестве биологического агента в биотехнологии трансформации гидрофобных соединений, и прежде всего, в экологической биотехнологии. В настоящее время родококки являются основой, или, по меньшей мере, важным компонентом практически любого нефтеокисляющего биопрепарата или микробиологической технологии биоочистки углеводородзагрязненных почв и грунтов [270, 271].

Родококки способны к утилизации как сахарозы, так и гексадекана в составе жидкой питательной среды. Известно, что при потреблении данных субстратов используются принципиально разные катаболические механизмы, включающие экспрессию соответствующих генов, работу ферментов и структурных компонентов клетки. В случае утилизации актинобактериями

гексадекана большое значение отдается формированию и работе специфических атрибутов катаболизма углеводов – развитой гидрофобной клеточной стенки, обеспечивающей сольюбилизацию гидрофобного субстрата, синтезу биогенных ПАВ, связанных с клеточной стенкой и/или поступающих в окружающую среду и, наконец, катаболическим ферментам. Таким образом, при последовательной замене сахарозы на гексадекан в среде культивирования, бактериальной культуре требуются определенные структурно-физиологические и биохимические перестройки. В этой связи, для выявления зависимости ответа растущей бактериальной культуры от соотношения D/H воды жидкой питательной среды был поставлен эксперимент, совмещающий многоэтапную адаптацию культуры к условиям пониженного содержания дейтерия и замену субстрата, рассматриваемую как стрессовый фактор.

Воду с пониженным содержанием дейтерия производили на установке ЛВ-1 [272] в Бизнес-инкубаторе Кубанского государственного университета.

Определение концентрации дейтерия в полученной воде были проведены на импульсном ЯМР спектрометре JEOL JNM-ECA 400MHz в центре коллективного пользования "Диагностика структуры и свойств наноматериалов" КубГУ по модифицированной методике ФР.1.31.1999.00073 «Методика выполнения измерений содержания дейтерия в воде, водно-органических и органических растворах методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса» [273].

В работе использовали штамм бактерий *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д, депонированный во Всероссийской коллекции микроорганизмов, используемый в научно-исследовательской и практической деятельности [274].

Для культивирования штамма использовали жидкую минеральную среду следующего состава: (г/л): KNO_3 – 4; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ – 1,4; KH_2PO_4 – 0,6; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,8; стандартный раствор микроэлементов (10 элементов) – 1 мл/л среды. В качестве единственного источника углерода и энергии

использовали гексадекан ($C_{16}H_{34}$) или сахарозу в количестве 10 г/л среды. Растворы компонентов среды стерилизовали автоклавированием отдельно при разных режимах, после чего стерильно смешивали в необходимой пропорции. Культивирование вели в 250 мл колбах на орбитальном шейкере при 110 оборотах в минуту (RPM) и 24 °С.

Определение концентрации (АСВ – абсолютно сухого веса) биомассы выполняли гравиметрическим методом по усовершенствованной методике Brown [275]. Осаждение клеток осуществляли центрифугированием на центрифуге РС-6МЦ при 3000 g и 10 °С. При использовании гексадекана в качестве источника углерода и энергии, согласно правилам определения концентрации биомассы при культивировании на углеводородах [276], осажденные клетки дополнительно промывали гексаном (осч) для удаления остатков углеводородного субстрата, адсорбировавшегося на поверхности микроорганизмов и посуды.

Оптическую плотность культур, растущих на сахарозе, измеряли в 3 мм кювете при $\lambda=670$ нм. Оптическая плотность использована для учета динамики роста концентрации биомассы по стандартной методике [277].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Достоверным считали различие при $p<0,05$.

Была приготовлена серия жидких минеральных сред, различающихся соотношением D/H в воде, использованной для растворения солей. Для этого, стерильно смешивали аликвоты сред, приготовленных на основе исходной дистиллированной воды ($\delta D= -37$ ‰) и воды с пониженным содержанием дейтерия ($\delta D= -711$ ‰). Соотношение легкая вода/обычная вода варьировали от 0 до 100 % с шагом 25 %. Таким образом, в эксперименте использовали пять образцов воды для приготовления сред с δD равным -711 ‰; -544 ‰; -371 ‰; -204 ‰; -37 ‰ до стерилизации растворов автоклавированием.

Схема эксперимента приведена на рисунке 5.14. Клетки *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д были дважды стерильно отмыты от остатков

среды культивирования (питательного агара) минеральной средой без источника углерода, приготовленной на воде с $\delta D = -37\text{‰}$. Клетки были использованы для инокуляции серии сред первого этапа эксперимента, где в качестве питательного субстрата использовали сахарозу. Клетки, выросшие на сахарозе, при специфическом соотношении D/H в среде, были использованы для инокуляции серии сред второго этапа эксперимента, где в качестве субстрата был использован гексадекан, а водная фаза имела заданные соотношения D/H, равные таковым на предыдущем этапе.

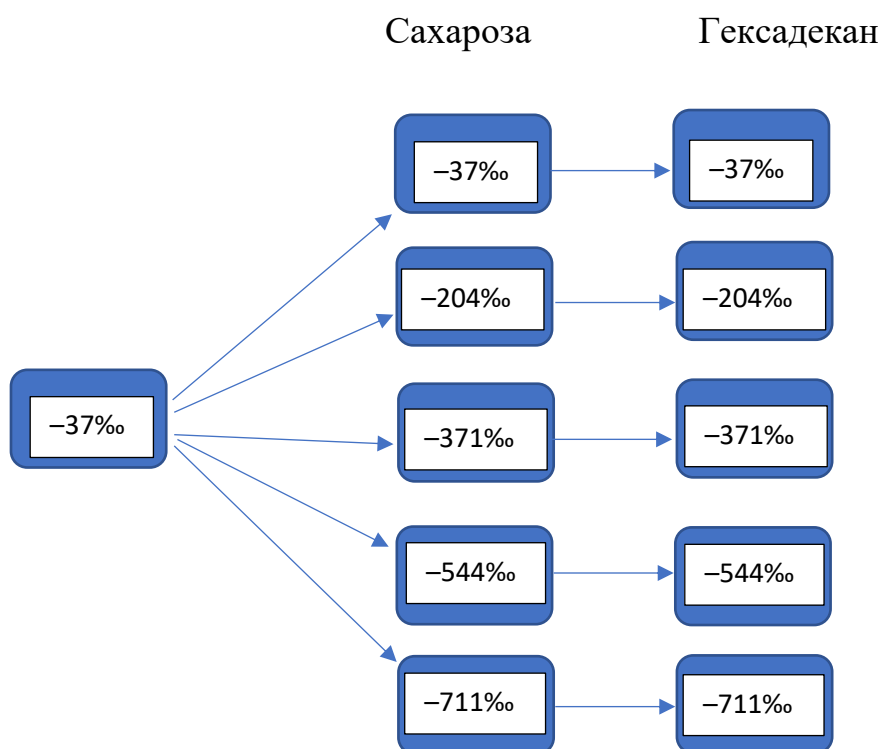


Рисунок 5.14 – Схема пересевов родококка на среды с различными соотношениями D/H и питательными субстратами.

На первом этапе эксперимента клетки *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д культивировали на серии жидких минеральных сред с сахарозой при разных соотношениях D/H. Результаты гравиметрического определения концентрации абсолютно сухой клеточной биомассы на разных сроках культивирования показаны на рисунке 5.15.

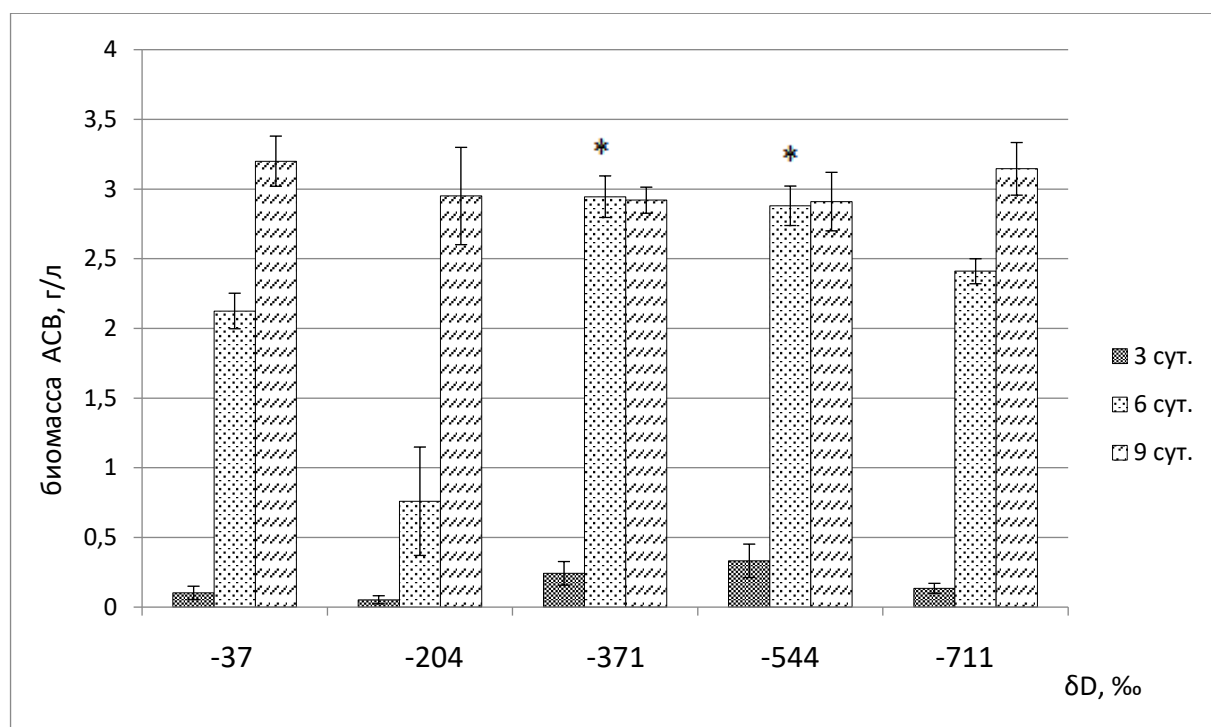


Рисунок 5.15 – Продукция биомассы *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д на сахарозе в зависимости от соотношения D/H в воде жидкой минеральной среды. * – $p < 0,05$ в сравнении с показателями на контрольной среде -37 ‰.

На третьи сутки роста, при малых абсолютных значениях измеряемого параметра наблюдали слабо выраженное положительное влияние пониженного до $\delta D = -544$ ‰ – $\delta D = -371$ ‰. На шестые сутки, на средах с пониженными менее $\delta D = -371$ ‰ соотношениями D/H также была зафиксирована более высокая концентрация биомассы по сравнению с контрольной средой ($\delta D = -37$ ‰). Это согласуется с экспериментальными данными других авторов [278], отметивших проявление положительного влияния пониженного содержания дейтерия на фазе логарифмического роста, в данных экспериментальных условиях имевшего место на третьи сутки. Однако, на девятые сутки, статистически достоверные различия между всеми вариантами опыта на сахарозе не были обнаружены. Достижение значения концентрации биомассы около 3 г/л (АСВ) является максимальным для штамма *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д при глубинном периодическом культивировании на аналогичной минеральной среде. Одной

из причин лимитации роста является исчерпание более 80 % углеродного субстрата, что было показано ранее при культивировании исследуемого штамма на биотехнологическом комплексе ОКА-01-100Т [274]. Сходные значения концентрации биомассы были отмечены другими авторами при глубинном культивировании родококков на углеводах в течение девяти и более суток [267].

На втором этапе эксперимента, серия сред с соотношениями D/H, равными таковым на первом этапе, отличающаяся заменой сахарозы на гексадекан, была инокулирована равными микроколичествами клеток родококков из соответствующих проб предыдущего опыта. Результаты гравиметрического определения концентрации абсолютно сухой клеточной биомассы показаны на рисунке 5.16.

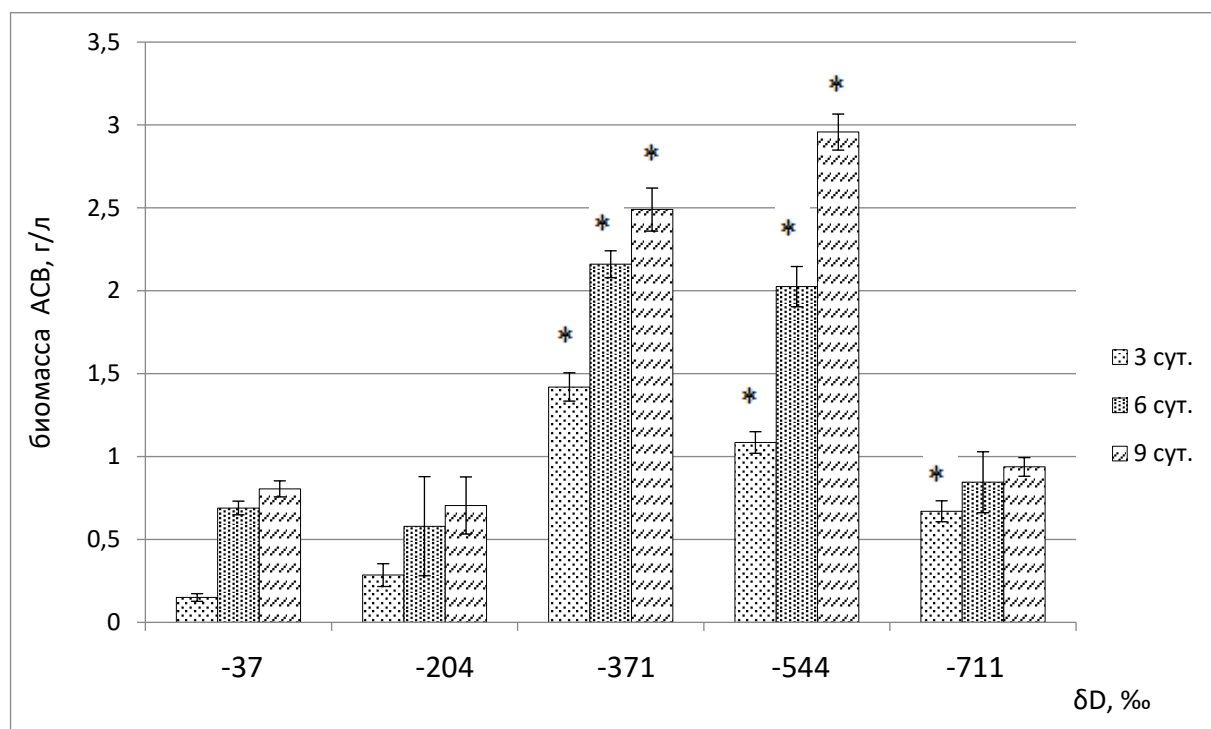


Рисунок 5.16 – Продукция биомассы *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д на гексадекане в зависимости от соотношения D/H в воде жидкой минеральной среды. * – $p < 0,05$ в сравнении с показателями на контрольной среде $\delta D = -37$ ‰.

В случае переключения культуры *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д с сахарозы на гидрофобный субстрат, имел место значительный эффект влияния соотношения D/H на продукцию биомассы. Разница в концентрации биомассы сохранялась весь период эксперимента. Максимальные отличия были зафиксированы для минеральных сред на основе $\delta D = -544 \text{ ‰}$ и $\delta D = -371 \text{ ‰}$ воды. Характерно, что на девятые сутки культивирования на гексадекане, выход биомассы около 3 г/л (АСВ), характерный для такого же периода роста на сахарозе всех вариантов опыта, обеспечила только среда с содержанием дейтерия $\delta D = -544 \text{ ‰}$.

Таким образом, исследуемая культура родококка, поддерживаемая на жидких средах с постоянными пониженными соотношениями D/H в воде, при смене гидрофильного источника углерода и энергии (сахарозы) на гидрофобный (н-гексадекан) демонстрирует значительный эффект стимуляции роста. Поскольку синтез большинства ферментов и структурных компонентов клетки, участвующих в катаболизме алканов, имеет конститутивный характер, основные изменения, обуславливающие повышенную ростовую активность культуры *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д на средах с пониженным соотношением D/H, не связаны с индукцией синтеза каких-либо специфических структурных компонентов клетки или ферментов.

Одним из свойств популяций коринеформных бактерий, к которым относятся родококки, является их гетерогенность, выражающаяся в существовании нескольких вариантов клеток, отличающихся по культуральным, морфологическим и физиолого-биохимическим признакам (явление диссоциации). Для родококков наиболее распространены R-, S- и M-варианты, или морфотипы, названные в зависимости от морфологии колоний на поверхности плотной питательной среды (rough, smooth, mucoid). Известно, что преобладание в потребляющей углеводороды культуре родококков того или иного диссоцианта влияет на общую скорость роста [279, 280].

Культуральные признаки, такие как размер и форма колоний на плотной

среде, тип их поверхности и края, являются наиболее экспрессными в выявлении диссоциативных вариантов микроорганизмов. На девятые сутки роста жидких культур на средах с заданным соотношением D/H в воде, были сделаны высевы на плотную питательную среду – питательный агар (ПА). Для всех проб эксперимента выдерживался одинаковый слой среды в чашке Петри, а также сходная плотность количества изолированных колоний на единицу площади. Культивирование на ПА вели четверо суток при 30 °С. Влияние соотношения D/H на морфотип колоний *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д на ПА зависело от субстрата, на котором культура развивалась в жидкой среде. При высеве из проб жидкой минеральной среды с сахарозой, гетерогенность не была выражена. Вид колоний указывал на принадлежность к M-морфотипу. При высеве из проб второго этапа эксперимента, где в качестве субстрата использовали гексадекан, при понижении соотношения D/H в среде, до $\delta D = -371$ ‰ и ниже, помимо колоний, характерных для указанного выше M-морфотипа, были обнаружены колонии родококка, характерные для S-морфотипа. Характерно, что наибольшее относительное количество колоний S-морфотипа было отмечено для пробы из среды, приготовленной на воде с $\delta D = -544$ ‰ и обеспечивающей максимальный выход биомассы при росте на гексадекане (Рис. 5.16).

Была проверена возможность воспроизведения эффекта стимуляции роста без использования смены субстрата и пониженных соотношений D/H в среде. Для этого, клетки родококка, выросшие на средах с использованными в экспериментах сочетаниями D/H в среде с сахарозой в качестве субстрата, были использованы для инокуляции аналогичной жидкой минеральной среды с сахарозой. При этом, среда была приготовлена на основе обычной воды ($\delta D = -37$ ‰). Культивирование проводили в условиях, аналогичных предыдущим экспериментам. Концентрацию биомассы определяли нефелометрически.

Результаты показали, что соотношение D/H в среде, использованной для выращивания исходного инокулята, не оказывало значительного влияния на рост *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д, посеянный на аналогичную

среду с характерным для природной воды соотношением D/H (-37 ‰). До восьмых суток включительно, влияние соотношения D/H в воде среды, на которой был выращен инокулят, не влияло на выход биомассы. На 9 и 10 сутки культивирования появился незначительный положительный эффект влияния воды с пониженными концентрациями дейтерия на продукцию биомассы. Положительная разница обнаружена между средами, инокулированными клетками со среды с соотношением D/H (-711 ‰) – (-371 ‰) и контрольной средой ($\delta D = -37$ ‰).

Таким образом, наиболее выраженный и быстрый эффект использования воды с пониженным содержанием дейтерия проявляется при переходе с гидрофильного на гидрофобный субстрат, рассматриваемом в данном случае как создание стрессовых условий. Однако, использование гексадекана и других гидрофобных субстратов ограничено в некоторых конструкциях биореакторов. Прикладной интерес может представлять выращивание инокулята на средах с пониженным содержанием дейтерия, с последующим посевом на среду с сахарозой или другими гидрофильными источниками углерода и энергии.

Совокупность катаболических и анаболических реакций бактериальной клетки опосредуется узким местом – системой накопления и преобразования энергии. Дыхательная цепь, имеющаяся и у родококков, среди прочего, обеспечивает создание трансмембранного градиента протонов, необходимого для деятельности АТФ-синтаз и других ключевых ферментов энергетического цикла. Кроме того, сам трансмембранный градиент является способом кратковременного накопления и/или сохранения энергии, необходимой для жизнедеятельности клетки. Основой дыхательной цепи является совокупность различных цитохромов и ряда других ферментов [281, 282]. Один из ключевых элементов цепи – цитохромы, в общем виде, обеспечивающие взаимодействие протона, атома кислорода и электрона с образованием молекулы воды [283-285]. Для некоторых родококков обнаружено несколько альтернативно действующих терминальных

компонентов дыхательных цепей, обеспечивающих передачу электронов между хинонами и конечным акцептором – кислородом [286]. Структурно-функциональные особенности данных ферментов в настоящее время хорошо изучены, поскольку группа цитохромов дыхательной цепи пропускает значительный трафик протонов живой клетки, в том числе и дейтерия. В исследованиях ряда авторов [287, 288] описано влияние изотопного состава (соотношения D/H) на работу системы перемещения протонов. В предыдущих работах [289] также было отмечено, что скорость обработки протона цитохромоксидазой в среде D₂O была ниже по сравнению со средой протиевой воды. Этот процесс может быть опосредован вовлечением D как в трансмембранный трафик водорода, так и включением в состав протонсвязывающих гидратированных компонентов фермента [290-292].

Необходимо особо отметить, что родококки, как и остальные микроорганизмы, способные к утилизации углеводов, демонстрируют значительное увеличение удельной дыхательной (цитохромоксидазной) активности при переходе с углеводов на углеводороды [267, 293]. Это связано с принципиально разным строением молекул, с иной степенью окисления углеродных атомов данных субстратов, проявляющейся в разных путях катаболизма [294-298].

Следовательно, при выращивании клеток *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д на средах с пониженным содержанием дейтерия, изменяется содержание дейтерия в различных структурных компонентах клетки. При замене субстрата в среде с углевода на углеводород, происходит значительное увеличение активности цитохромоксидаз, а также других ферментов и систем, касающихся переноса протонов. Предварительная адаптация к пониженным концентрациям дейтерия в среде может способствовать увеличению функциональной активности систем клетки, связанных со значительными траффиками ионов водорода, что выражается в значительном ускорении роста на углеводородах. И напротив, при повторном культивировании на углеводном субстрате, в тех же условиях измененного изотопного состава

воды, значительных изменений в росте по сравнению с контролем не наблюдается. Таким образом, пониженные концентрации дейтерия в среде культивирования обеспечивают долговременный антистрессовый эффект, либо качественно изменяют физиологию роста *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д при переходе с углеводного субстрата на углеводородный, что выражается в значительном (в разы) увеличении выхода биомассы.

Далее было исследовано влияние питьевого рациона с пониженным содержанием дейтерия на показатели эстрального цикла у крыс-самок в предстарческом возрасте:

Ранее было высказано предположение о том, что снижение содержания дейтерия в питьевой воде может оказывать геропротекторный эффект на млекопитающих [299]. Правомерность такого предположения усиливается сведениями о возможности негативного действия дейтерия на процессы репарации ДНК [300], а также свидетельствами положительного влияния на продолжительность жизни и уровень здоровья людей воды из озера Байкал (концентрация дейтерия составляет 136 ppm [301, 302]), а также воды, образующейся при таянии высокогорных ледников (133 ppm [303]) или снега, выпадающего в районах Арктической зоны (124.6 ppm [304]), которая, наряду с рядом других особенностей, отличается сниженным содержанием дейтерия [299].

В то же время, при весьма значительном количестве исследований, результаты которых косвенно указывают на геропротекторные свойства воды со сниженным содержанием дейтерия, нам не удалось обнаружить в литературе прямых доказательств возможности восстановления с помощью этого фактора физиологических функций организма млекопитающих, утрачиваемых с возрастом.

В связи с вышеизложенным, было проведено изучение влияния воды со сниженным содержанием дейтерия на половой (эстральный) цикл и двигательную активность белых беспородных крыс-самок предстарческого возраста.

При проведении исследования соблюдали международные правила гуманного обращения с экспериментальными животными [305]. В экспериментах было использовано 37 белых беспородных крыс-самок: 10 животных молодого возраста (группа "Young", возраст 8-10 месяцев, масса тел составила 210 ± 12 г) и 27 крыс предстарческого возраста (20-22 месяца, вес 291 ± 32 г), которые были разделены на группу 1 (n=13) и группу 2 (n=14). В отличие от крыс из группы 2 и группы "Young", животные из группы 1 ежедневно в течение 5 недель употребляли воды со сниженным содержанием дейтерия ($\delta D = -704\text{‰}$) в объеме от 25 до 30 мл в сутки на 1 голову (крысу). По данным ЯМР спектроскопии вода со сниженным содержанием дейтерия содержала примерно в 3 раза меньше дейтерия, чем природная вода региона ($\delta D = -37\text{‰}$), в котором обитали эти крысы.

Воду со сниженным содержанием дейтерия получали на установке, разработанной в Кубанском государственном университете методом электролитического разделения [306]. Минерализацию полученной воды, производили путем добавления солей для достижения физиологически полноценного минерального состава, который был идентичен у воды с содержанием дейтерия -704‰ и -37‰ . Минерализация полученной воды со сниженным содержанием дейтерия в итоге составила 314-382 мг/л, что включало 144-180 мг гидрокарбонатов, менее 1 мг сульфатов, 60-76 мг хлоридов, 6 мг кальция, 3 мг магния, 50-58 мг натрия и 50-58 мг калия.

Кроме того, крысы-самки всех исследованных групп получали стандартный концентрированный комбикорм (ГОСТ Р 50258-92, Российская Федерация) *ad libitum* с одинаковым изотопным составом по дейтерию $\delta D = -86\text{‰}$.

В качестве показателей состояния животных изучали продолжительность фаз эстрального цикла, состояние аутофлоры кожных покровов, а также содержание дейтерия в плазме крови и некоторых висцеральных органах (печени, почке, сердце).

Хорошо известно, что клеточный состав вагинальных мазков крыс-

самок репродуктивного возраста определяется состоянием гормональной функции яичников и имеет характерные особенности, соответствующие фазам полового цикла – prooestrus, oestrus, meta oestrus и dioestrus [307]. Таким образом, по результатам микроскопии вагинальных смывов можно оценить изменения эстрального цикла и, соответственно, выраженность нарушений нейроэндокринной регуляции репродуктивных процессов у стареющих крыс-самок. Изучение клеточного состава водного смыва из влагалища крыс-самок исследованных групп проводили ежедневно на микроскопе «Leica DM LS2» 2 раза в сутки (утром и вечером). По результатам цитологического анализа устанавливали продолжительность и последовательность стадий эстрального цикла, что позволяло оценивать периодичность гормональных изменений в яичниках животных исследованных групп.

Дополнительно оценивали антимикробную резистентность кожи определяющую устойчивость организма к повреждающим факторам различной природы, по стандартному методу. При изучении бактериальных отпечатков с хвоста животных использовали мясо-пептонный агар с добавлением 1,5% спиртового раствора бромтимолблау и 1% раствора маннита. Дифференцировка колоний патогенных и непатогенных бактерий осуществлялась по изменению окраски бромтимолблау, которое происходило вследствие ферментирования (сбраживания) маннита патогенными формами стафилококков. При этом колонии непатогенных бактерий были окрашены в зеленый цвет, а колонии патогенного стафилококка были окрашены в желтый цвет.

По окончании эксперимента животные исследованных групп были эвтаназированы путем декапитации под эфирным наркозом, после чего производился забор крови и висцеральных органов (печени, почки, сердца).

Определение концентрации дейтерия в плазме крови проводили на импульсном ЯМР спектрометре JEOL JNM-ECA 400MHz по методике [244].

Для определения изотопного состава лиофилизированных (в лиофильной сушилке «ЛС-1000», «Проинтех», RU) органов лабораторных

животных использовался масс-спектрометр DELTA^{plus} H/Device (Finnigan, Германия). Твердые образцы заворачивались в металлическую фольгу и помещались в камеру сгорания с помощью автоматического пробоотборника Carlo Erba AS 200-LS. Изменение изотопного состава выражали в промилле (‰) с использованием стандартного дельта-обозначения (δ) и привязывали к δ Vienna standard mean ocean water (VSMOW):

$$\delta D = (R_{\text{пробы}}/R_{\text{станд.}} - 1) \times 1000 (\text{‰}),$$

где R – соотношение изотопов, $R_{\text{пробы}}$ и $R_{\text{станд.}}$ – соотношение D/H в исследуемой пробе и стандарте VSMOW ($D/H = 155,76 \text{ ppm}$). Калибровка измерений в жидкостях выполнялась относительно международных стандартов SMOW ($\delta D = 0\text{‰}$), Standard light antarctic precipitation (SLAP, $\delta D = -428\text{‰}$) и воды, отвечающей внутренним стандартам. Калибровка измерений в твердых образцах выполнялась относительно международного образца (IAEA-CN-7, $\delta D = -100,3\text{‰}$) и различных внутренних проверенных стандартов. Точность измерений составляла $\sim \pm 2\text{‰}$ для твердого вещества [308].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли методами вариационной статистики: рассчитывали средние значения в полученных выборках (M), среднеквадратичное отклонение (σ), достоверным считали различие между группами, определяемое с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни при $p < 0.05$.

В связи с необходимостью углубленного изучения путей системного влияния воды со сниженным содержанием дейтерия на живые организмы представляли интерес измерения содержания дейтерия в плазме крови и тканях экспериментальных животных. В таблице 5.5 представлены данные ЯМР-спектроскопии плазмы крови и масс-спектроскопии висцеральных органов (печени, почки, сердца) стареющих крыс-самок исследованных групп, проведенные через 5 недель после начала эксперимента. Представленные в таблице 1 данные указывают на наличие изотопного D/H градиента между кровью и органами при обычных условиях: $C_{D^{\text{висцеральные органы}}} < C_{D^{\text{плазма крови}}}$.

Потребление животными группы 1 воды со сниженным содержанием дейтерия привело к существенному снижению содержания дейтерия в организме. Наиболее значительные изменения были отмечены в плазме крови крыс группы 1, у которых содержания тяжелого изотопа водорода уменьшилось в 22 раза, по сравнению с животными группы 2 и группы "Young". В органах животных группы 1 также наблюдалось достоверное, хотя и менее выраженное, уменьшение содержания дейтерия по сравнению с показателями у крыс двух других групп (печень – в 1,6 раза, почки – в 1,7 раза, сердце – в 1,6 раза). Отмеченные изменения приводят к формированию в организме животных опытной группы нового изотопного D/H градиента ($C_D^{\text{висцеральные органы}} > C_D^{\text{плазма крови}}$) – противоположного физиологическому D/H градиенту ($C_D^{\text{висцеральные органы}} < C_D^{\text{плазма крови}}$). Поскольку в условиях эксперимента животные потребляли пищу с неизменным изотопным составом, отмеченные изменения обусловлены только потреблением воды со сниженным содержанием дейтерия. Отмеченные изменения свидетельствуют о наличии изотопного D/H градиента между кровью и органами, величина которого, очевидно, обусловлена скоростью реакций обмена изотопов водорода в обычных условиях, а также влиянием потребляемой пищи с неизменным изотопным составом, особенно в органах с высокой метаболической активностью. Формирование противоположного физиологическому градиенту нового изотопного D/H градиента может приводить к усилению активности гуморальных и клеточных защитных систем, приводящих к неспецифическому феномену повышения резистентности организма в результате прекондиционирования, в ходе которой потенцируются защитные механизмы на клеточном уровне.

Таблица 5.5 – Содержание дейтерия (‰) в плазме крови и органах крыс-самок предстарческого возраста

Группы	Почка	Печень	Сердце	Плазма крови
Группа 1 (n=13)	-202±14*	-173±19*	-177±12*	-338±21*

Группа (n=14)	2	-117±12	-109±11	-114±8	-18±13
Группа "Young" (n=10)		-116±9	108±10	-111±9	-15±7

* – отличается от аналогичных показателей в группе 2, $p < 0.05$.

Неселективное замещение протия на тяжелые изотопы водорода в связях "C–H" высокомолекулярных соединений не оказывает существенного влияния на нативные свойства, в частности биологическую активность, последних. Так, например, было показано сохранение физиологической активности инсулина в исследованиях с использованием каталитического изотопного обмена. Тогда как при замене протия на дейтерий в легкодиссоциирующих группах (гидроксильных (–OH), тиоловых (–SH), первичных и вторичных аминогрупп (–NH₂, =NH)) активных и аллостерических центров ферментов, в ходе осуществления биокатализа может изменяться скорость каталитических реакций в результате снижения энергии активации переходных состояний комплекса «фермент-субстрат», что может служить основой развития метаболической адаптации организма и приводить к возникновению антистрессорных реакций на системном уровне. Также в ряде научных исследований было показано, что при замене протия на дейтерий происходит изменение энергии не только ковалентных химических связей, но и наблюдаются различия в межмолекулярных силах взаимодействия (например, за счет изменения энергии водородных связей) между отдельными молекулами изотополога, что становится причиной различий в его физических свойствах и химических превращениях [309].

Кроме того, колебания изотопного состава и, вероятно, формирование противоположного физиологическому градиенту нового изотопного D/H градиента (δD "висцеральные органы" > δD "плазма крови") могут приводить к усилению активности гуморальных и клеточных защитных систем, приводящих к неспецифическому феномену повышения резистентности организма в результате прекодиционирования, в ходе которой потенцируются защитные механизмы на клеточном уровне 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 (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) и соотношения транспортеров энергетических субстратов в мембранах.

При этом, на фоне снижения изотопного соотношения D/H плазмы крови и висцеральных органов у крыс-самок из группы 1 были отмечены изменения внешнего вида, а также наличие сдвигов в количественном составе форменных элементов периферической крови, выявлены отличия продолжительности стадий эстрального цикла (по данным клеточного состава вагинальных смывов), качественного и количественного состава аутофлоры кожных покровов.

В таблице 5.6 представлены данные о продолжительности стадий эстрального цикла у крыс-самок исследованных групп в конце эксперимента, в том числе после приема воды со сниженным содержанием дейтерия в течение 5 недель животными предстарческого возраста группы 1. Как видно из таблицы, эстральный цикл стареющих животных группы 2, получавших обычную воду, весьма заметно отличался от цикла животных молодого возраста и характеризовался значительным укорочением стадий prooestrus и oestrus (соответственно, в 3,2 и 1,7 раз) при существенном удлинении стадий meta oestrus (в 3,4 раза) и dioestrus (в 1,6 раз). Прием воды со сниженным содержанием дейтерия в течение пяти недель привел к весьма заметным изменениям эстрального цикла, свидетельствующим о частичном восстановлении нейроэндокринной регуляции репродуктивной функции у крыс-самок предстарческого возраста из группы 1. Так, к концу эксперимента у этих животных по сравнению с крысами группы 2 значительно сократились

стадии meta oestrus и dioestrus (в 1,5 и 1,8 раза соответственно), а также более чем в 2 раза увеличилась продолжительность стадии prooestrus, характеризующейся, как известно, резкими сдвигами секреции гормонов гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, имеющими триггерное значение для формирования полноценного эстрального цикла [310]. Указанные изменения приблизили продолжительности отдельных стадий цикла, а также их соотношение к соответствующим значениям у крыс молодого возраста (табл. 5.6).

Таблица 5.6 – Влияние приема воды со сниженным содержанием дейтерия на длительность стадий полового цикла у крыс-самок предстарческого возраста

Группы животных		Продолжительность стадии полового цикла (часы)			
		P	O	M	D
Группа "Young" (n=10)		13.1±1.5	25.3±2.3	7.5±1.1	55.7±3.8
Крысы-самки предстарческого возраста	Группа 1 (n=13)	9.1±1.8 ²	13.8±2.7 ¹	16.5±2.4 ^{1,2}	51.2±5.4 ²
	Группа 2 (n=14)	4.1±0.7 ¹	15.0±2.4 ¹	25.5±3.8 ¹	91.1±7.0 ¹

Обозначения: P, O, M, D – стадии полового цикла, соответственно, prooestrus, oestrus и meta oestrus, dioestrus. *Примечание:* ¹ – отличается от значений у животных молодого возраста, $p < 0.05$; ² – отличается от значений у крыс-самок группы 2, $p < 0.05$.

Восстановление нейроэндокринной регуляции под влиянием воды со сниженным содержанием дейтерия, очевидно, обусловило и появление визуально четко различимых признаков омоложения животных группы 1. Так, у самок, принимавших воды со сниженным содержанием дейтерия, было отмечено изменение состояния шерстного покрова: замещение желтой остистой шерсти на белую, мягкую и блестящую, а также заметное повышение двигательной активности этих животных.

Результаты изучения состава аутофлоры кожных покровов у крыс-самок

предстарческого возраста представлены в таблице 5.7. Так, при потреблении воды со сниженным содержанием дейтерия в бактериальных отпечатках кожи хвоста животных группы 1 не наблюдалось "желтых" колоний патогенного стафилококка, в то время как у крыс группы 2 с доминированием такие колонии значительно преобладали над "зелеными" колониями непатогенных форм стафилококка.

Таблица 5.7 – Изменения аутофлоры кожных покровов у крыс-самок предстарческого возраста под влиянием воды со сниженным содержанием дейтерия

Виды колоний микрофлоры	Группа 1	Группа 2
Общее число колоний	57±2 *	44±2
«Желтые» колонии (патогенный стафилококк)	0±0 *	37±5
«Зеленые» колонии (непатогенный стафилококк)	57±2 *	7±1

Примечание: * – $p < 0,01$ в сравнении с показателями в экспериментальной группе 2.

Результаты изучения влияния воды со сниженным содержанием дейтерия на состояние животных свидетельствовали, в частности, об активизации механизмов бактерицидности кожных покровов.

Таким образом, результаты исследования являются прямым экспериментальным свидетельством геропротекторного действия воды со сниженным содержанием дейтерия у млекопитающих, проявившемся в изменении продолжительности отдельных стадий эстрального цикла (dioestrus, prooestrus и meta oestrus) и соотношения длительности стадий полового цикла в целом у белых беспородных крыс-самок предстарческого возраста и приближении этих показателей к аналогичным значениям у животных молодого возраста, а также в выраженных признаках улучшения состояния шерстного покрова, который становится белым, мягким и

блестящим. Все это характеризуется незначительными различиями между показателями у крыс-самок предстарческого возраста, употреблявших воды со сниженным содержанием дейтерия, и аналогичными значениями у животных молодого возраста, в отличие от достоверных различий с подобными данными (длительности и соотношения отдельных стадий полового цикла, изменения клеточного состава вагинальных смывов по нормотипу), характеризующими эстральный цикл у животных предстарческого возраста, употреблявших воду с концентрацией дейтерия -37% . При этом была показана связь геропротекторного влияния воды со сниженным содержанием дейтерия со значительным увеличением бактерицидности кожных покровов, а также в выраженных признаках улучшения состояния шерстного покрова. Отмеченные системные изменения, свидетельствующие о восстановлении нейроэндокринной регуляции, нарушенной у животных предстарческого возраста, очевидно, были обусловлены снижением содержания дейтерия в крови и висцеральных органах (печени, почке, сердце), приводящем к формированию противоположного физиологическому градиенту ($\delta D_{\text{"висцеральные органы"}} < \delta D_{\text{"плазма крови"}}$) нового изотопного D/H градиента ($\delta D_{\text{"висцеральные органы"}} > \delta D_{\text{"плазма крови"}}$). Эффективность воды со сниженным содержанием дейтерия и простота использования данного нутриционного фактора позволяют рассматривать его в качестве перспективного средства холистической гериатрии в пресенильном периоде онтогенеза [311].

Выводы к главе 5

Разработана методика определения концентрации дейтерия с помощью ЯМР спектрометра. Установлено, что наиболее подходящим химическим соединением, содержащим Eu^{3+} для использования его в качестве “сдвигающего” реагента для водных растворов с целью изучения изотопного состава является соединение трифторметансульфоната европия $(\text{CF}_3\text{SO}_3)_3\text{Eu}$. По результатам исследования зависимостей химического сдвига ядер ^{17}O и ^2H от концентрации трифторметансульфоната европия удалось определить

удельные величины парамагнитного химического сдвига, что позволило рассчитать необходимую концентрацию ионов Eu^{3+} для внешних стандартов систем – эталонов по определению изотопного состава веществ. Величины концентраций Eu^{3+} в воде составляют для определения изотопа ^{17}O – $0,120 \pm 0,005$ моль/л и для определения дейтерия ^2H – $0,045 \pm 0,005$ моль/л.

Результаты проведенного изучения спиртовых растворов этанола различного происхождения подтвердили, что имеется прямая взаимосвязь между интенсивностями сигналов ^1H ЯМР метильных и метиленовых протонов этанола и их боковыми сателлитами, и этот подход может применяться для экспрессной оценки изотопного соотношения $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ в водных спиртосодержащих системах (процесс регистрации спектров ^1H ЯМР и их обработки занимает около 10 минут).

Влияние пониженной $\delta^2\text{H}$ на механизмы репарации в лимфоцитах указывает на ее способность повышать эффективность работы дизоксирибонуклеиновой кислоты-репарирующих систем, проявляющуюся уменьшением количества одонитевых разрывов дизоксирибонуклеиновой кислоты (на 29,5 %) при добавлении в среду инициатора апоптоза (hTNF_α), и отсутствие подобного эффекта в естественных условиях.

Показано, что при содержании дейтерия в среде $\delta\text{D} = -371$ и $\delta\text{D} = -544$ ‰, наблюдается увеличение выхода клеточной биомассы *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д на 1,5 мг/л и 2 мг/л по сравнению с контрольным образцом, в котором использовали воду с $\delta\text{D} = -37$ ‰.

Экспериментально установлено наличие геропротекторного действия воды со сниженным содержанием дейтерия у млекопитающих, проявившееся в изменении продолжительности отдельных стадий эстрального цикла (dioestrus, prooestrus и meta oestrus) и соотношения длительности стадий полового цикла в целом у белых беспородных крыс-самок предстарческого возраста и приближении этих показателей к аналогичным значениям у животных молодого возраста, а также в выраженных признаках улучшения

состояния шерстного покрова, который становится белым, мягким и блестящим.

Представленные результаты опубликованы в: Барышев М.Г., Басов А.А., Болотин С.Н., Джимаков С.С., Федосов С.Р., Фролов В.Ю., Кашаев Д.В., Лысак Д.А., Шашков Д.И., Тимаков А.А. Оценка антирадикальной активности воды с модифицированным изотопным составом с помощью ЯМР, ЭПР и масс-спектрологии // Известия РАН. Серия Физическая. Т.76., №12., С. 1507-1510; Samkov A. A., Dzhimak S. S., Barishev M. G., Volchenko N. N., Khudokormov A. A., Samkova S. M., and Karaseva E. V. The effect of water isotopic composition on *Rhodococcus erythropolis* biomass production // Biophysics, 2015, Vol. 60, No. 1, pp. 107–112; Джимаков С.С., Басов А.А., Федулова Л.В., Быков И.М., Ивлев В.А., Мелконян К.И., Тимаков А.А. Определение концентрации дейтерия в биологических жидкостях с помощью ЯМР спектроскопии // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2016. Т. 50. № 3. С. 42-47; Джимаков С.С., Басов А.А., Волченко Н.Н., Самков А.А., Федулова Л.В., Барышев М.Г. Изменение функциональной активности митохондрий, выделенных из клеток печени крыс, прошедших преадаптацию к сверхнизким концентрациям дейтерия // Доклады Академии наук. 2017. Т. 476, № 5. С. 584–587; Dzhimak S.S., Shikhliarova A.I., Zhukova G.V., et al. Some systemic effects of deuterium depleted water on presenile female rats // Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 2018. V. 13. №3. P. e83494. и Basov A., Fedulova L., Baryshev M., Dzhimak S. Deuterium-depleted water influence on the isotope $^2\text{H}/^1\text{H}$ regulation in body and individual adaptation // Nutrients. 2019. 11(8), P. 1903; doi:10.3390/nu11081903.

Основные результаты и выводы

Основные результаты и выводы диссертационной работы заключаются в следующем:

1. Разработана физико-математическая модель молекулярной динамики дезоксирибонуклеиновой кислоты с учетом энергии разрыва водородных связей и возможностью возникновения деформированных водородных связей между парами комплементарных маятников. Данная модель позволяет учитывать неоднородность последовательности пар нуклеотидов, энергию водородных связей между парами азотистых оснований, взаимодействие с окружающей средой, возникновение открытых состояний, позволяет заменять атом водорода на дейтерий в водородных связях между парами оснований.

2. Установлено, что при периодическом внешнем воздействии ($F_0 = 0,526 \cdot 10^{-22}$ Н·м, $\omega = 0,4 \cdot 10^{12}$ с⁻¹) на молекулу дезоксирибонуклеиновой кислоты возможно появление открытых состояний между парами азотистых оснований и восстановление их закрытой структуры. При наличии единичных ²H/¹H замен в водородных связях, в нормальных условиях, энергии разрыва связей $E_{кр}^H$ в диапазоне от $0,2 \cdot 10^{-22}$ Н·м до $0,32 \cdot 10^{-22}$ Н·м вероятность разрыва связи между комплементарными азотистыми основаниями увеличивается на 0,22-0,60%.

3. Впервые обнаружена следующая закономерность – изотопные эффекты в органических системах могут возникать в случаях образования химических связей между стабильными изотопами при суммарном количестве нейтронов больше, чем протонов на нечетное число, т.е. при наличии в системе нечетного числа (от 1 до 7) нескомпенсированных нейтронов.

4. Установлена следующая закономерность – частота и амплитуда собственных колебаний органической молекулы, состоящей из двух цепочек упорядоченных ансамблей взаимодействующих маятников, при внешних периодических воздействиях с частотой в диапазоне от $0,4 \cdot 10^6$ с⁻¹ до $0,4 \cdot 10^{12}$ с⁻¹, зависит от специфичной последовательности маятников.

5. Установлена следующая закономерность – при увеличении параметров модели, характеризующих вязкость среды в 4 раза относительно нормального уровня, происходит стабилизация угловых колебаний ансамблей взаимодействующих маятников в модели дезоксирибонуклеиновой кислоты в диапазоне времени $[0; 0,5 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$, а уменьшение параметров вязкости среды в 10 раз приводит к увеличению скорости угловых отклонений маятников и деформации цепочек молекулы в диапазоне времени $[0; 6 \cdot 10^{-9} \text{ с}]$.

6. Установлено, что возникновение областей с деформированными водородными связями между парами азотистых оснований двухцепочечной молекулы зависит от локализации, времени воздействия и величины внешнего торсионного момента, лежащего в диапазоне от 13 до 21 пН·нм. Результаты моделирования показали, что значения торсионного момента, необходимого для возникновения зон открытых состояний в некоторых случаях близки к экспериментально измеренным ($11 \pm 4 \text{ пН} \cdot \text{нм}$).

7. Установлено, что за счет попадания атома дейтерия в водородные связи между парами азотистых оснований изменяется величина критической энергии разрыва водородных связей по всей длине гена. Для гена, кодирующего интерферон alpha 17, уже при значении критической энергии разрыва связей равной $0,358 \cdot 10^{-22} \text{ Н} \cdot \text{м}$ еще наблюдается ненулевая вероятность возникновения ОС при отсутствии дейтерия в молекуле, а при значении энергии разрыва водородной связи $0,359 \cdot 10^{-22} \text{ Н} \cdot \text{м}$ и более эта вероятность равна нулю. В то же время при наличии хотя бы одного атома дейтерия в молекуле ненулевая вероятность возникновения ОС наблюдается даже при значении энергии разрыва водородной связи $0,369 \cdot 10^{-22} \text{ Н} \cdot \text{м}$, и лишь при значении $0,370 \cdot 10^{-22} \text{ Н} \cdot \text{м}$ и более эта вероятность становится равной нулю.

8. Разработан программный комплекс для расчета влияния $^2\text{H}/^1\text{H}$ соотношения на вероятность возникновения разрывов водородных связей между парами азотистых оснований двухцепочечной молекулы

дезоксирибонуклеиновой кислоты (Свидетельство о государственной регистрации программы ЭВМ №2019667043).

9. Показано, что при содержании дейтерия в среде $\delta D = -371$ и $\delta D = -544$ ‰, наблюдается увеличение выхода клеточной биомассы *Rhodococcus erythropolis* ВКМ Ас-2017Д на 1,5 мг/л и 2 мг/л по сравнению с контрольным образцом, в котором использовали воду с $\delta D = -37$ ‰.

10. Разработана и создана высокоэффективная установка для производства обедненной по дейтерию воды, позволяющая стабильно получать воду с содержанием дейтерия $\delta D = -679$ ‰ (50 ppm).

11. Разработан новый метод количественного определения ^2H в диапазоне концентраций дейтерия от 30 ppm до 98 ‰ с помощью ЯМР спектроскопии и применением лантаноидного сдвигающего реагента, добавляемого в зонд в качестве внешнего ЯМР стандарта, относительно которого проводится измерение. Данный подход позволяет значительно упростить и ускорить выполнение эксперимента по изотопному составу веществ.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность научному консультанту, профессору Барышеву М.Г., благодаря поддержке и консультациям которого была написана данная работа, а также профессору Яковенко Н.А. за бесценные советы по улучшению работы и четкому выражению мыслей, профессору Исаеву В.А. за консультации и поддержку, профессору Тумаеву Е.Н. за помощь в физико-математическом описании нейтронного эффекта, доценту Дроботенко М.И. за помощь в исследовании математической модели молекулы дезоксирибонуклеиновой кислоты, профессору Басову А.А. за неоценимую помощь в обсуждении полученных результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vologodskii A., Frank-Kamenetskii M.D. Theoretical model, its parameters and predictions: Reply to comments on "DNA melting and energetics of the double helix" // *Physics of Life Reviews*. 2018. Vol. 25. P. 42–44.
2. Basu A., Bobrovnikov D.G., Qureshi Z., Kayikcioglu T., Ngo T.T.M., Ranjan A., Eustermann S., Cieza B., Morgan M.T., Hejna M., Rube H.T., Hopfner K.P., Wolberger C., Song J.S., Ha T. Measuring DNA mechanics on the genome scale // *Nature*. 2021. Vol. 589. № 7842. P. 462–467.
3. Shigaev A.S., Ponomarev O.A., Lakhno V.D. Theoretical and experimental investigations of DNA open states // *Mathematical Biology and Bioinformatics*. 2018. Vol.13(S). P. t162–t267.
4. Basov A., Drobotenko M., Svidlov A., Gerasimenko E., Malyshko V., Elkina A., Baryshev M., Dzhimak S. Inequality in the Frequency of the Open States Occurrence Depends on Single $^2\text{H}/^1\text{H}$ Replacement in DNA // *Molecules*. 2020. Vol. 25. № 16. P. 3753.
5. Yakushevich L.V. *Nonlinear Physics of DNA*. NJ, USA: JohnWiley & Sons: Hoboken, 2007. 252 p.
6. Englander S.W., Kallenbach N.R., Heeger A.J., Krumhansl J.A., Litwin S. Nature of the open state in long polynucleotide double helices: possibility of soliton excitations // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1980. Vol. 77. P. 7222.

7. Yomosa Y. Soliton excitations in deoxyribonucleic acid (DNA) double helices // *Physical Review A*. 1983. Vol. 27. P. 2120.

8. Yomosa Y. Solitary excitations in deoxyribonuclei acid (DNA) double helices // *Physical Review A*. 1984. Vol. 30. P. 474.

9. Homma S., Takeno S. A coupled base- rotator model for structure and dynamics of DNA // *Progress of Theoretical Physics*. 1984. Vol. 72. P. 679.

10. Yakushevich L.V. Nonlinear DNA dynamics: a new model // *Physics Letters A*. 1989. Vol. 136. P. 413.

11. Drobotenko M.I., Dzhimak S.S., Svidlov A.A., Basov A.A., Lyasota O.M., Baryshev M.G. A Mathematical Model for Basepair Opening in a DNA Double Helix // *Biophysics*. 2018. Vol. 63. № 2. P. 177–182.

12. Gaeta G. On a model of DNA torsion dynamics // *Physics Letters A*. 1990. Vol. 143. № 4-5. P. 227–232.

13. Gaeta G. Solitons in planar and helicoidal Yakushevich model of DNA dynamics // *Physics Letters A*. 1992. Vol. 168. № 5-6. P. 383–390.

14. Yakushevich L.V., Savin A.V., Manevitch L.I. Nonlinear dynamics of topological solitons in DNA // *Physical Review E*. 2002. Vol. 66. № 1. P. 016614.

15. Peyrard M., Bishop A.R. Statistical mechanics of a nonlinear model for DNA denaturation // *Physical Review Letters*. 1989. Vol. 62. P. 2755.

16. Dauxois T., Peyrard M., Bishop A.R. Dynamics and thermodynamics of a nonlinear model for DNA denaturation // *Physical Review E*. 1993. Vol. 47. P. 684.

17. Wildes A., Theodorakopoulos N., Valle-Orero J., Cuesta-López S., Garden J.L., Peyrard M. Thermal denaturation of DNA studied with neutron scattering // *Physical Review Letters*. 2011. Vol. 106. № 4. P. 048101.
18. Wildes A., Khadeeva L., Trewby W., Valle-Orero J., Studer A., Garden J.L., Peyrard M. Melting of highly oriented fiber DNA subjected to osmotic pressure // *Journal of Physical Chemistry B*. 2015. Vol. 119. № 12. P. 4441–4449.
19. Gaeta G., Reiss C., Peyrard M., Dauxois T. 1994 Simple models of nonlinear DNA dynamics // *La Rivista del Nuovo Cimento*. 1994. Vol. 17. P. 1–48.
20. Weber G. Sharp DNA denaturation due to solvent interaction // *Europhysics Letters*. 2006. Vol. 73. № 5. P. 806–811.
21. Peyrard M., Cuesta-López S., Angelov D. Experimental and theoretical studies of sequence effects on the fluctuation and melting of short DNA molecules // *Journal of Physics Condensed Matter*. 2009. Vol. 21. № 3. P. 034103.
22. Barbi M., Lepri S., Peyrard M., Theodorakopoulos N. Thermal denaturation of a helicoidal DNA model // *Physical Review E*. 2003. Vol. 68. P. 061909.
23. Dauxois T., Peyrard M. Entropy-driven transition in a one-dimensional system // *Physical Review E*. 1995. Vol. 51. P. 4027–4040.
24. Dauxois T. Dynamics of breather modes in a nonlinear «helicoidal» model of DNA // *Physical Review A*. 1991. Vol. 159. P. 390–395.
25. Zdravković S. Helicoidal Peyrard-Bishop model of DNA dynamics // *Journal of Nonlinear Mathematical Physics*. 2011. Vol. 18. № 2. P. 463.

26. Kawahara T. The derivative-expansion method and nonlinear dispersive waves // *Journal of the Physical Society of Japan*. 1973. Vol. 35. P. 1537–1544.
27. Dodd R.K., Eilbeck J.C., Gibbon J.D., Morris H.C. *Solitons and nonlinear wave equations*. London, UK: Academic Press, Inc. 1982.
28. Zdravković S., Satarčić M.V. Single molecule unzipping experiments on DNA and Peyrard- Bishop-Dauxois model // *Physical Review E*. 2006. Vol. 73. P. 021905.
29. Nomidis S.K., Caraglio M., Laleman M., Skoruppa E., Carlon E. Twist-bend coupling, twist waves, and the shape of DNA loops // *Physical Review E*. 2019. Vol. 100. № 2. P. 022402.
30. Nomidis S.K., Skoruppa E., Carlon E., Marko J.F. Twist-bend coupling and the statistical mechanics of the twistable wormlike-chain model of DNA: Perturbation theory and beyond // *Physical Review E*. 2019. Vol. 99. № 3. P. 032414.
31. Nomidis S.K., Hooyberghs J., Maglia G., Carlon E. DNA capture into the ClyA nanopore: Diffusion-limited versus reaction-limited processes // *Journal of Physics Condensed Matter*. 2018. Vol. 30. № 30. P. 304001.
32. Torrellas G., MacÍá E. Twist-radial normal mode analysis in double-stranded DNA chains // *Physics Letters, Section A: General, Atomic and Solid State Physics*. 2012. Vol. 376. № 45. P. 3407–3410.
33. Zeida A., MacHado M.R., Dans P.D., Pantano S. Breathing, bubbling, and bending: DNA flexibility from multimicrosecond simulations // *Physical*

Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics. 2012. Vol. 86. № 2. P. 021903.

34. Mazur A.K., Maaloum M. DNA flexibility on short length scales probed by atomic force microscopy // Physical Review Letters. 2014. Vol. 112. № 6. P. 068104.

35. Zoli M. Twist-stretch profiles of DNA chains // Journal of Physics Condensed Matter. 2017. Vol. 29. № 22. P. 225101.

36. Mazur A.K. Weak nanoscale chaos and anomalous relaxation in DNA // Physical Review E. 2017. Vol. 95. № 6. P. 062417.

37. Pal T., Bhattacharjee S.M. Rigidity of melting DNA // Physical Review E. 2016. Vol. 93. № 5. P. 052102.

38. Noy A., Golestanian R. Length scale dependence of DNA mechanical properties // Physical Review Letters. 2012. Vol. 109. № 22. P. 228101.

39. Mazur A.K. Homologous pairing between long DNA double helices // Physical Review Letters. 2016. Vol. 116. № 15. P. 158101.

40. Mazur A.K. Comment on length scale dependence of DNA mechanical properties // Physical Review Letters. 2013. Vol. 111. № 17. P. 179801.

41. Altan-Bonnet G., Libchaber A., Krichevsky O. Bubble dynamics in double-stranded DNA // Physical Review Letters. 2003. Vol. 90. № 13. P. 138101.

42. Lee O.-C., Jeon J.-H., Sung W. How double-stranded DNA breathing enhances its flexibility and instability on short length scales // Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics. 2010. Vol. 81. № 2. P. 021906.

43. Sanchez D.S., Qu H., Bulla D., Zocchi G. DNA kinks and bubbles: Temperature dependence of the elastic energy of sharply bent 10-nm-size DNA molecules // *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*. 2013. Vol. 87. № 2. P. 022710.
44. Lee O.-C., Sung W. Enhanced bubble formation in looped short double-stranded DNA // *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*. 2012. Vol. 85. № 2. P. 021902.
45. Alexandrov B.S., Wille L.T., Rasmussen K.O., Bishop A.R., Blagoev K.B. Bubble statistics and dynamics in double-stranded DNA // *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*. 2006. Vol. 74. P. 050901.
46. Park S., Lee O.-C., Durang X., Jeon J.-H. A mini-review of the diffusion dynamics of DNA-binding proteins: experiments and models // *Journal of the Korean Physical Society*. 2021. Vol. 78. № 5. P. 408–426.
47. Salerno D., Tempestini A., Mai I., Brogioli D., Ziano R., Cassina V., Mantegazza F. Single-molecule study of the DNA denaturation phase transition in the force-torsion space // *Physical Review Letters*. 2012. Vol. 109. № 11. P. 118303.
48. Qu H., Wang Y., Tseng C.-Y., Zocchi G. Critical Torque for Kink Formation in Double-Stranded DNA // *Physical Review X*. 2011. Vol. 1. № 2. P. 1–11.
49. Sanchez D.S., Qu H., Bulla D., Zocchi G. DNA kinks and bubbles: Temperature dependence of the elastic energy of sharply bent 10-nm-size DNA molecules // *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*. 2013. Vol. 87. № 2. P. 022710.

50. Wang J., Qu H., Zocchi G. Critical bending torque of DNA is a materials parameter independent of local base sequence // *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*. 2013. Vol. 88. Vol. 3. P. 032712.

51. Лобышев В.И., Калиниченко Л.П. Изотопные эффекты D₂O в биологических системах. Москва: Наука, 1978. 215 с.

52. Schmidt H.L., Robins R.J., Werner R.A. Multi-factorial in vivo stable isotope fractionation: causes, correlations, consequences and applications // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. 2015. Vol. 51. № 1. P. 155–199.

53. Galimov E.M. On an erroneous "experience" of isotope fractionation in enzymatic reaction // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2007. Vol. 81. № 5. P. 831–835.

54. Brenna J.T. Natural intramolecular isotope measurements in physiology: elements of the case for an effort toward high-precision position-specific isotope analysis // *Rapid Communicat in Mass Spectrometry*. 2001. Vol 15. P. 1252–1262.

55. Hayes J.M. Isotopic order, biogeochemical processes, and earth history // *Geochim Cosmochim Acta*. 2004. Vol. 68. P. 1691–1700.

56. Walter W.D., Kurle C.M., Hopkins J.B. Applications of stable isotope analysis in mammalian ecology // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. 2014. Vol. 50. № 3. P. 287–290.

57. Kosenkov A.V., Gulyaev M.V., Anisimov N.V., Lobyshev V.I., Pirogov Yu.A. Investigation of the distribution of heavy nuclei in laboratory animals

using multinuclear magnetic resonance imaging // *Physics of Wave Phenomena*. 2015. Vol. 23. № 4. P. 311–315.

58. Pedersen L.G., Bartolotti L., Li L. Deuterium and its role in the machinery of evolution // *Journal of Theoretical Biology*. 2006. Vol. 238. P. 914–918.

59. Podlesak D.W., Torregrossa A.-M., Ehleringer J.R., Dearing M.D., Passey B.H., Cerling T.E. Turnover of oxygen and hydrogen isotopes in the body water, CO₂, hair, and enamel of a small mammal // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2008. Vol. 72. P. 19–35.

60. Podlesak D.W., Bowen G.J., O'Grady S., Cerling T.E., Ehleringer J.R. $\delta^2\text{H}$ and $\delta^{18}\text{O}$ of human body water: a GIS model to distinguish residents from non-residents in the contiguous USA // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. 2012. Vol. 48. № 2. P. 259–279.

61. Kelly S., Heaton K., Hoogewerff J. Tracing the geographical origin of food: the application of multi-element and multi-isotope analysis // *Trends Food Science Technology*. 2005. Vol. 16. P. 555–567.

62. Hobson K.A., Bond A.L. Extending an indicator: Year-round information on seabird trophic ecology from multiple-tissue stable-isotope analyses // *Marine Ecology Progress Series*. 2012. Vol. 461. P. 233–243.

63. Galimov E.M. Life is a product of molecular ordering “machine” // *Geochemistry International*. 2014. Vol. 52. № 13. P. 1190–1196.

64. Ivlev A.A., Knyazev Yu.A., Logachev M.F. Short-period variations in carbon isotope composition of CO₂ of expired air under different physiological conditions in man // *Biofizika*. 1996. Vol. 41. № 2. P. 508–516.

65. Фролов В.Ю., Барышев М.Г., Болотин С.Н., Джимаков С.С. Способ получения биологически активной питьевой воды с пониженным содержанием дейтерия. Патент РФ №2438765 от 25.05.2010. Опубликовано 10.01.2012 № 2010121324/05.

66. Rasooli A., Fatemi F., Akbarzadeh K., Dini S., Bahremand S. Synergistic protective activity of deuterium depleted water (DDW) and *saturejarechingeri* essential oil on hepatic oxidative injuries induced by acetaminophen in rats // *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2019. Vol. 19. № 5. P. 1086–1101.

67. Chesson L.A., Valenzuela L.O., O'Grady S.P., Cerling T.E., Ehleringer J.R. Hydrogen and oxygen stable isotope ratios of milk in the United States // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. Vol. 58. P. 2358–2363.

68. Bowen G.J., Winter D.A., Spero H.J., Zierenberg R.A., Reeder M.D., Cerling T.E., Ehleringer J.R. Stable hydrogen and oxygen isotope ratios of bottled waters of the world // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2005. Vol. 19. № 23. P. 3442–3450.

69. Mladin C., Ciobica A., Lefter R., Popescu A., Bild W. Deuterium depletion induces anxiolytic-like effects in rats // *Archives of Biological Sciences*. 2014. Vol. 66. № 2. P. 947–953.

70. Stefanescu, I., Manolescu, N., Titescu, G., Balint, E., Tamaian, R., Feurdean, V. Assessment of deuterium depletion in plymouth rock chickens' bodies // *Environmental Engineering and Management Journal*. 2010. Vol. 9. № 11. P. 1477–1480.

71. Gyöngyi Z., Budán F., Szabó I., Ember I., Kiss I., Krempels K., Somlyai I., Somlyai G. Deuterium depleted water effects on survival of lung cancer patients and expression of Kras, Bcl2, and Myc genes in mouse lung // *Nutrition and Cancer*. 2013. Vol. 65. № 2. P. 240–246.

72. Dzhimak S.S., Basov A.A., Elkina A.A., et al. Influence of Deuterium-Depleted Water on Hepatorenal Toxicity // *Jundishapur J Nat Pharm Prod*. 2018. Vol. 13. № 2. P. e69557.

73. Storm-Suke A., Wassenaar L.I., Nol E., Norris D.R. The influence of metabolic rate on the contribution of stable-hydrogen and oxygen isotopes in drinking water to quail blood plasma and feathers // *Functional Ecology*. 2012. Vol. 26. P. 1111–1119.

74. Buchachenko A.L. Photooxidation of water by molecular oxygen: isotope exchange // *Theoretical and Experimental Chemistry*. 2011. Vol. 46. № 6. P. 359–362.

75. Buchachenko A.L. Kuznetsov D.A., Breslavskaya N.N., Shchegoleva L.N., Arkhangelsky S.E. Calcium induced ATP synthesis: isotope effect, magnetic parameters and mechanism // *Chemical Physics Letters*. 2011. Vol. 505. P. 130–134.

76. Buchachenko A.L., Kouznetsov D.A., Breslavskaya N.N. Chemistry of enzymatic ATP synthesis: an insight through the isotope window // *Chemical Reviews*. 2012. Vol. 112. № 4. P. 2042–2058.
77. Buchachenko A.L., Kouznetsov D.A. Efficiency of ATP synthase as a molecular machine // *Biophysics*. 2008. Vol. 53. № 3. P. 219–222.
78. Buchachenko A.L., Orlov A.P., Kouznetsov D.A., Breslavskaya N.N. Magnetic control of the DNA synthesis // *Chemical Physics Letters*. 2013. Vol. 586. P. 138–142.
79. Buchachenko, A.L. Magnetic isotope effect in chemistry and biochemistry. New York: Nova Science Publ., 2009. 105 p.
80. Koltover V.K., Labyntseva R.D., Kosterin S.O., Karandashev V.K. Magnetic isotope of magnesium accelerates ATP hydrolysis catalyzed by myosin // *Biophysics*. 2016. Vol. 61. № 2. P. 200–206.
81. Koltover V.K., Avdeeva L.V., Kudryashova E.A., Shevchenko U.G., Royba E.A., Berdinsky V.L. Magnetic-isotope effect of magnesium in the living cell // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2012. Vol. 442. № 1. P. 12–14.
82. Xie X., Zubarev R.A. Effects of Low-Level Deuterium Enrichment on Bacterial Growth // *PLoS ONE*. 2014. Vol. 9. № 7. P. e102071.
83. Никитин Д.И., Оранская М.Н., Лобышев В.И. Специфичность отклика бактерий на вариации изотопного состава воды // *Биофизика*. 2003. Т. 48. № 4. С. 678–682.
84. Stefanescu I., Manolescu N., Titescu G., Comisel V., Tamaian R., Feurdean V. Studies concerning DDW use for deuterium depletion in the organism

of laboratory animals // Environmental Engineering and Management Journal. 2010. Vol. 9. № 11. P. 1473–1476.

85. Buchachenko A.L., Pliss E.M. Hydrogen isotope effects and atom tunneling // Russian Chemical Reviews. 2016. Vol. 85. № 6. P. 557–564.

86. Shchepinov M.S. Reactive oxygen species, isotope effect, essential nutrients, and enhanced longevity // Rejuvenation research. 2007. Vol. 10. № 1. P. 47–59.

87. Li X., Snyder M.P. Yeast longevity promoted by reversing aging-associated decline in heavy isotope content // npj Aging and Mechanisms of Disease. 2016. Vol. 2. P. 16004.

88. Lewis E.R., Johansen E., Holman T.R. Large competitive kinetic isotope effects in human 15-lipoxygenase catalysis measured by a novel HPLC method // Journal of the American Chemical Society. 1999. Vol. 121. № 6. P. 1395–1396.

89. Darad R., Aiyar A.S. Effects of heavy water on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation // Journal of Biosciences. 1982. Vol. 4. № 2. P. 159–166.

90. Kolesova O.E., Pomytkin I.A. Relationship between natural concentration of heavy water isotopologs and rate of H₂O₂ generation by mitochondria // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2006. Vol. 142. № 5. P. 570–572.

91. Джимаков С.С., Басов А.А., Волченко Н.Н., Самков А.А., Федуллова Л.В., Барышев М.Г. Изменение функциональной активности митохондрий,

выделенных из клеток печени крыс, прошедших преадаптацию к сверхнизким концентрациям дейтерия // Доклады Академии наук. 2017. Т. 476. № 5. С. 584–587.

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

93. Lewis C. A., Parker S. J., Fiske B. P., McCloskey D., Gui D. Y., Green C. R., Vokes N. I., Feist A.M., Heiden M. G. V., Metallo C. M. Tracing Compartmentalized NADPH Metabolism in the Cytosol and Mitochondria of Mammalian Cells // *Molecular Cell*. 2014. Vol. 55. P. 253–263.

94. Boros L. G., D’Agostino D. P., Katz H. E., Roth J.P., Meuillet E.J., Somlyai G. Submolecular regulation of cell transformation by deuterium depleting water exchange reactions in the tricarboxylic acid substrate cycle // *Medical Hypotheses*. 2016. Vol. 87. P. 69–74.

95. Sormendi S., Wielockx B. Hypoxia pathway proteins as central mediators of metabolism in the tumor cells and their microenvironment // *Frontiers in Immunology*. 2018. Vol. 9. P. 40.

96. Strekalova T., Evans M., Chernopiatko A., Couch Y., Costa-Nunes J., Cespuglio R., Chesson L., Vignisse Ju., Steinbusch H.W., Anthony D.C., Pomytkin I., Lesch K.P. Deuterium content of water increases depression susceptibility: the potential role of a serotonin-related mechanism // *Behavioural Brain Research*. 2015. Vol. 277. P. 237–244.

97. Avila D.S., Somlyai G., Somlyai I., Aschner M. Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a *C. elegans* model // *Toxicology Letters*. 2012. Vol. 211. P. 319–324.
98. Letuta U.G., Berdinskiy V.L. Magnetosensitivity of bacteria *E. coli*: magnetic isotope and magnetic field effects // *Bioelectromagnetics*. 2017. Vol. 38. № 8. P. 581–591.
99. Cong F., Zhang Y., Sheng H., Ao Z., Zhang S., Wang J. Deuterium-depleted water inhibits human lung carcinoma cell growth by apoptosis // *Experimental Therapeutical Medicine*. 2010. Vol. 1. P. 277–283.
100. Shchepinov M.S. Do "heavy" eaters live longer? // *BioEssays*. 2007. Vol. 29. P. 1247–1256.
101. Джимак С.С., Басов А.А., Барышев М.Г. Распределение дейтерия в биологических жидкостях и внутренних органах: влияние воды с пониженным содержанием дейтерия на градиент D/H и процессы адаптации // *Доклады академии наук*. 2015. Т. 465. С. 370–373.
102. O'Grady S.P., Wende A.R., Remien C.H., Valenzuela L.O., Enright L.E., Chesson L.A., Dale Abel E., Cerling T.E., Ehleringer J.R. Aberrant Water Homeostasis Detected by Stable Isotope Analysis // *PLoS ONE*. 2010. Vol. 5. № 7. P. e11699.
103. Somlyai G., Jancsó G., Jákli G., Vass K., Barna B., Lakics V., Gaál T. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells // *FEBS Letters*. 1993. Vol. 317. № 1,2. P. 1–4.

104. Kravtsov A.A., Kozin S.V., Vasilevskaya E.R., Elkina A.A., Fedulova L.V., Popov K.A., Malyshko V.V., Moiseev A.V., Shashkov D.I., Baryshev M.G. Effect of Drinking Ration with Reduced Deuterium Content on Brain Tissue Prooxidant-Antioxidant Balance in Rats with Acute Hypoxia Model // Journal of Pharmacy and Nutrition Sciences. 2018. Vol. 8. № 2. P. 42–51.

105. Самков А.А., Джимаков С.С., Барышев М.Г., Волченко Н.Н., Худокормов А.А., Самкова С.М., Карасева Э.В. Влияние изотопного состава воды на продукцию биомассы *Rhodococcus erythropolis* // Биофизика. 2015. Т. 60. № 1. С. 136–142.

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

107. Bild W., Năstasă V., Haulică I. *In vivo* and *in vitro* research on the biological effects of deuterium-depleted water: 1. Influence of deuterium-depleted water on cultured cell growth // Romanian Journal of Physiology. 2004. Vol. 41. № 1-2. P. 53–67.

108. Fraikin G.Y. Signaling Mechanisms Regulating Diverse Plant Cell Responses to UVB Radiation // Biochemistry Moscow. 2018. Vol. 83. P. 787–794.

109. Montagnier L., Aissa J., Del Giudice E., Lavallee C., Tedeschi A., Vitiello G. DNA Waves and Water // Journal of Physics: Conference Series. 2011. Vol. 306. P. 012007.

110. Aroutiounian R., Hovhannisyan G., Gasparian G. Genetic effects of electromagnetic waves // *Brilliant Light in Life and Material Sciences*. 2007. P. 251–265.
111. Ikhlov B.L. Treatment of bacterial diseases by means of resonant microwave therapy // *Journal of New Medical Technologies*. 2019. Vol. 26. № 1. P. 67–71.
112. Alijabbari N., Chen Y., Sizov I., Globus T., Gelmont B. Molecular dynamics modeling of the sub-THz vi- THz vibrational absorption of thioredoxin from *E. coli* // *Journal of Molecular Modeling*. 2012. Vol. 18. № 5. P. 2209–2218.
113. Globus T., Gelmont B. Biological Detection with Terahertz Spectroscopy // *In Bioaerosol Detection Technologies*. 2014. P. 241–264.
114. Globus T. Sub-terahertz Vibrational Spectroscopy with High Resolution for Biological Molecules and Cells Identification // *Journal of Biomolecular Research & Therapeutics*. 2016. Vol. 5. № 3. P.1000e150.
115. Globus T., Moyer A., Gelmont B., Khromova T., Sizov I., Ferrance J. Sub-terahertz resonance spectroscopy of biological macromolecules and cells // *Terahertz Physics, Devices, and Systems VII: Advanced Applications in Industry and Defense*. 2013. P. 87160N.
116. Globus T., Sizov I., Gelmont B. Sub-THz specific relaxation times of hydrogen bond oscillations in *E.coli thioredoxin* // *Molecular dynamics and statistical analysis*. *Faraday Discuss.* 2014. Vol. 171. P. 179–193.

117. Якушевич Л.В., Краснобаева Л.А. Вынужденные колебания оснований дезоксирибонуклеиновой кислоты // Биофизика. 2016. Т. 61. № 2. С. 286–296.

118. Vanderstraeten J., Verschaeve L. Gene and protein expression following exposure to radiofrequency fields from mobile phones // Environmental Health Perspectives. 2008. Vol. 116. № 9. P. 1131–1135.

119. Belyaev I.Y., Koch C.B., Terenius O., Roxström-Lindquist K., Malmgren L.O., Sommer W.H., Salford L.G., Persson B.R. Exposure of rat brain to 915 MHz GSM microwaves induces changes in gene expression but not double stranded DNA breaks or effects on chromatin conformation // Bioelectromagnetics. 2006. Vol. 27. № 4. P. 295–306.

120. Zhi W.J., Wang L.F., Hu X.J. Recent advances in the effects of microwave radiation on brains // Military Medical Research. 2017. Vol. 4. № 1. P. 29.

121. Semchenko I.V., Mikhalka I.S., Faniayeu I.A., Khakhomov S.A., Balmakou A.P., Tretyakov S.A. Optical Forces Acting on a Double DNA-Like Helix, Its Unwinding and Strands Rupture // Photonics. 2020. Vol. 7. P. 83.

122. Pyne A.L.B., Noy A., Main K.H.S., Velasco-Berrelleza V., Piperakis M.M., Mitchenall L.A., Cugliandolo F.M., Beton J.G., Stevenson C.E.M., Hoogenboom B.W., Bates A.D., Maxwell A., Harris S.A. Base-pair resolution analysis of the effect of supercoiling on DNA flexibility and major groove recognition by triplex-forming oligonucleotides // Nature Communications. 2021. Vol. 12. № 1. P. 1053.

123. Manghi M., Destainville N. Physics of base-pairing dynamics in DNA // *Physics Reports*. 2016. Vol. 631. P. 1–41.

124. Якушевич Л.В. Нелинейная физика дизоксирибонуклеиновой кислоты. М.-Ижевск: НИЦ "Регулярная и хаотическая динамика", Ижевский институт компьютерных исследований, 2007. С. 252.

125. Saha D., Mukherjee A. Effect of water and ionic liquids on biomolecules // *Biophysical Reviews*. 2018. Vol. 10. № 3. P. 795–808.

126. Basov A., Fedulova L., Vasilevskaya E., Dzhimak S. Possible mechanisms of biological effects observed in living systems during $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope fractionation and deuterium interactions with other biogenic isotopes // *Molecules*. 2019. Vol. 24. № 22. P. 4101.

127. Di Rocco G., Battistuzzi G., Borsari M., Bortolotti C.A., Ranieri A., Sola M. The enthalpic and entropic terms of the reduction potential of metalloproteins: Determinants and interplay // *Coordination Chemistry Reviews*. 2021. Vol. 445. P. 214071.

128. Shukla S.K., Mikkola J.-P. Use of Ionic Liquids in Protein and DNA Chemistry // *Frontiers in Chemistry*. 2020. Vol. 8. P. 598662.

129. Liu L., Yang C., Guo Q.-X., A study on the enthalpy-entropy compensation in protein unfolding // *Biophysical Chemistry*. 2000. Vol. 84. № 3. P. 239–251.

130. Dragan A.I., Read C.M., Crane-Robinson C. Enthalpy–entropy compensation: the role of solvation // *European Biophysics Journal*. 2017. Vol. 46. № 4. P. 301–308.

131. Aristov V.V. Biological systems as nonequilibrium structures described by kinetic methods // *Results in Physics*. 2019. Vol. 13. P. 102232.
132. Li R., Mak C.H. A Deep Dive into DNA Base Pairing Interactions under Water // *Journal of Physical Chemistry B*. 2020. Vol. 124. № 27. P. 5559–55709.
133. Kannan S., Zacharias M. Folding of a DNA hairpin loop structure in explicit solvent using replica-exchange molecular dynamics simulations // *Biophysical Journal*. 2007. Vol. 93. № 9. P. 3218–3228.
134. Smrek J., Garamella J., Robertson-Anderson R., Michieletto D. Topological tuning of DNA mobility in entangled solutions of supercoiled plasmids // *Science Advances*. 2021. Vol. 7. № 20. P. eabf9260.
135. Petruska J., Sowers L.C., Goodman M.F. Comparison of nucleotide interactions in water, proteins, and vacuum: Model for DNA polymerase fidelity // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986. Vol. 83. № 6. P. 1559–1562.
136. Tabi C.B., Bineli G., Mohamadou A. Energy patterns in twist-opening models of DNA with solvent interactions // *Journal of Biological Physics*. 2015. Vol. 41. № 4. P. 391–408.
137. Hase F., Zacharias M. Free energy analysis and mechanism of base pair stacking in nicked DNA // *Nucleic Acids Research*. 2016. Vol. 44. № 15. P. 7100–7108.
138. Feng B., Sosa R.P., Martensson A.K.F., Jiang K., Tong A., Dorfman K.D., Takahashi M., Lincoln P., Bustamante C.J., Westerlund F., Norden B.

Hydrophobic catalysis and a potential biological role of DNA unstacking induced by environment effects // PNAS. 2019. Vol. 116. № 35. P. 17169–17174.

139. Kinoshita M. Importance of translational entropy of water in biological self-assembly processes like protein folding // International Journal of Molecular Sciences. 2009. Vol. 10. № 3. P. 1064–1080.

140. Ostermeir K., Zacharias M. Rapid alchemical free energy calculation employing a generalized born implicit solvent model // Journal of Physical Chemistry B. 2015. Vol. 119. № 3. P. 968–975.

141. Frank-Kamenetskii M.D., Prakash S. Fluctuations in the DNA double helix: A critical review // Physics of Life Reviews. 2014. Vol. 11. № 2. P. 153–170.

142. Einert T.R., Orland H., Netz R.R. Secondary structure formation of homopolymeric single-stranded nucleic acids including force and loop entropy: implications for DNA hybridization // European Physical Journal E: Soft Matter. 2011. Vol. 34. № 6. P. 55.

143. Kinoshita M. Roles of translational motion of water molecules in sustaining life // Frontiers in Bioscience. 2009. Vol. 14. № 9. P. 3419–3454.

144. Basu A., Bobrovnikov D.G., Ha T. DNA mechanics and its biological impact // Journal of Molecular Biology. 2021. Vol. 433. № 6. P. 166861.

145. Bryant Z., Oberstrass F.C., Basu A. Recent developments in single-molecule DNA mechanics // Current Opinion Structural Biology. 2012. Vol. 22. № 3. P. 304–312.

146. Yakushevich L.V., Krasnobaeva L.A. Ideas and methods of nonlinear mathematics and theoretical physics in DNA science: the McLaughlin-Scott

equation and its application to study the DNA open state dynamics // *Biophysical Reviews*. 2021. Vol. 13. № 3. P. 315–338.

147. <http://www.discoveryandinnovation.com/bioinformatics/results/Szaute/r/1049B07.html>

148. Svidlov A., Drobotenko M., Basov A., Gerasimenko E., Malyshko V., Elkina A., Baryshev M., Dzhimak S. DNA dynamics under periodic force effects // *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. Vol. 22. № 15. P. 7873.

149. Ferreira L.A., Uversky V.N., Zaslavsky B.Y. Effects of amino acids on solvent properties of water // *Journal of Molecular Liquids*. 2019. Vol. 277. P. 123–1311.

150. Núñez Villacís L., Wong M.S., Ferguson L.L., Hein N., George A.J., Hannan K.M. New roles for the nucleolus in health and disease // *BioEssays*. 2018. Vol. 40. № 5. P. e170023.

151. Tiku V., Antebi A. Nucleolar function in lifespan regulation // *Trends in Cell Biolog.* 2018. Vol. 28. № 8. P. 662–672.

152. Caragine C.M., Haley S.C., Zidovska A. Surface fluctuations and coalescence of nucleolar droplets in the human cell nucleus // *Physical Review Letters*. Vol. 121. № 14. P. 148101.

153. de Vries A.H., Krenn B.E., van Driel R., Subramaniam V., Kanger J.S. Direct observation of nanomechanical properties of chromatin in living cells // *Nano Letters*. 2007. Vol. 7. № 5. P. 1424–1427.

154. Celedon A., Hale C.M., Wirtz D. Magnetic manipulation of nanorods in the nucleus of living cells // *Biophysical Journal*. 2011. Vol. 101. № 8. P. 1880–1886.
155. Palmeri J., Manghi M., Destainville N. Thermal denaturation of fluctuating DNA driven by bending entropy // *Physical Review Letters*. 2007. Vol. 99. № 8. P. 088103.
156. Sicard F., Destainville N., Rousseau P., Tardin C., Manghi M. Dynamical control of denaturation bubble nucleation in supercoiled DNA minicircles // *Physical Review E*. 2020. Vol. 101. № 1. P. 012403.
157. Hogan M., Dattagupta N., Crothers D. M. Transmission of allosteric effects in DNA // *Nature*. 1979. Vol. 278. №. 5704. C. 521–524.
158. Nechipurenko Y.D., Gursky G.V. Cooperative effects on binding of proteins to DNA // *Biophysical Chemistry*. 1986. Vol. 24. №. 3. P. 195–209.
159. Lefstin J.A., Yamamoto K.R. Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators // *Nature*. 1998. Vol. 392. P. 885–888.
160. Kim S., Broströmer E., Xing D., Jin J., Chong S., Ge H., Wang S., Gu C., Yang L., Gao Y.Q., Su X.D., Sun Y., Xie X.S. Probing allostery through DNA // *Science*. 2013. Vol. 339. № 6121. P. 816–819.
161. Petruska J., Goodman M.F. Enthalpy-entropy compensation in DNA melting thermodynamics // *Journal of Biological Chemistry*. 1995. Vol. 270. № 2. P. 746–750.

162. Duboué-Dijon E., Fogarty A.C., Hynes J.T., Laage D. Dynamical Disorder in the DNA Hydration Shell // Journal of the American Chemical Society. 2016. Vol. 138. № 24. P. 7610–7620.

163. Li R., Mak C.H. A Deep Dive into DNA Base Pairing Interactions Under Water // Journal of Physical Chemistry B. 2020. Vol. 124. № 27. P. 5559–5570.

164. Шигаев А.С., Пономарёв О.А., Лахно В.Д., Теоретические и экспериментальные исследования открытых состояний ДНК // Математическая биология и биоинформатика. 2013. Т. 8. № 2. С. 553–664.

165. Svidlov A.A., Drobotenko M.I., Basov A.A., Elkina A.A., Gerasimenko E.O., Malyshko V.V., Baryshev M.G., Dzhimak S.S. Influence of the $^2\text{H}/^1\text{H}$ isotope composition of the water environment on the probability of denaturation bubble formation in a DNA molecule // Physics of Wave Phenomena. 2021. Vol. 29. № 2. P. 180–185.

166. Vologodskii A.V., Amirikyan B.R., Lyubchenko Y.L., Frank-Kamenetskii M.D. Allowance for heterogeneous stacking in the DNA helix-coil transition theory // Journal of Biomolecular Structure and Dynamics. 1984. Vol. 2. № 1. P. 131–148.

167. Forth S., Sheinin M.Y., Inman J., Wang M.D. Torque measurement at the single-molecule level // Annual Review of Biophysics. 2013. Vol. 42. P. 583–604.

168. Chevizovich D., Zdravkovic S., Michieletto D., Mvogo A., Zakiryanov F. A review on nonlinear DNA physics // Royal Society Open Science. 2020. Vol. 7. № 11. P. 200774.

169. Bryant Z., Stone M., Gore J., Smith S.B., Cozzarelli N.R., Bustamante C. Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA // Nature. 2003. Vol. 424. № 6946. P. 338–341.

170. Гриневич А.А., Якушевич Л.В. О моделировании движения транскрипционного пузыря под действием постоянного торсионного момента// Биофизика. 2016. Т. 61. № 4. С. 638–646.

171. Xu X., Zhang Y. Theoretical Model of Transcription Based on Torsional Mechanics of DNA Template // Journal of Statistical Physics. 2019. Vol. 174. № 6. P. 1316–1326.

172. Ma J., Wang M.D. DNA supercoiling during transcription // Biophysical Reviews. 2016. Vol. 8. № 1. P. 75–87.

173. van Oene M.M. Quantifying the Precision of Single-Molecule Torque and Twist Measurements Using Allan Variance // Biophysical Journal. 2018. Vol. 114. № 8. P. 1970–1979.

174. Konyshov I., Byvalov A. Model systems for optical trapping: the physical basis and biological applications // Biophysical Reviews. 2021. Vol. 13. P. 515–529.

175. Sheinin M.Y., Forth S., Marko J.F., Wang M.D. Underwound DNA under Tension: Structure, Elasticity, and Sequence-Dependent Behaviors // Physical Review Letters. 2011. Vol. 107. № 10. P. 108102.

176. Lipfert J., Kerssemakers J.W., Jager T., Dekker N.H. Magnetic torque tweezers: measuring torsional stiffness in DNA and RecA-DNA filaments // *Nature Methods*. 2010. Vol. 7. № 12. P. 977–980.

177. Strick T.R., Bensimon D., Croquette V. Micromechanical measurement of the torsional modulus of DNA // *Genetica*. 1999. Vol. 106. P. 57–62.

178. Ma J., Bai L., Wang M.D. Transcription under torsion // *Science*. 2013. Vol. 340. № 6140. P. 1580–1583.

179. Джима́к С.С., Барышев М.Г., Лясота О.М., Федулова Л.В., Свидлов А.А., Басов А.А., Дроботенко М.И. Математическое моделирование возникновения открытых состояний в молекуле дизоксирибонуклеиновой кислоты в зависимости от концентрации дейтерия в окружающей жидкой среде при разных значениях энергии разрыва водородной связи // *Доклады Академии наук*. 2018. Т. 483. № 5. С. 564–566.

180. Svidlov A., Drobotenko M., Basov A., Gerasimenko E., Elkina A., Baryshev M., Nechipurenko Y., Dzhimak S. Influence of environmental parameters on the stability of the DNA molecule // *Entropy*. 2021. Vol. 23. № 11. P. 1446.

181. Vaks V.L., Semenova A.V., Khodzitsky M.K., Odlyanitskiy E.L., Sedykh E.A., Balya V.K., Smolyanskaya O.A. Gyrotropy and absorption of DNA and amylose at THz frequencies // *International Conference on Infrared, Millimeter, and Terahertz Waves, IRMMW-THz*. 2016. P. 7758458.

182. Дроботенко М.И., Джима́к С.С., Свидлов А.А., Басов А.А., Лясота О.М., Барышев М.Г. Математическая модель двухцепочечной молекулы

дизоксирибонуклеиновой кислоты с учетом открытых состояний // Биофизика. 2018. Т. 63. № 2. С. 258–264.

183. Lee Y., Schmitt M., Kleinermanns K., Kim B. Observation of ultraviolet rotational band contours of the DNA base adenine: Determination of the transition moment // Journal of Chemical Physics A. 2006. Vol. 110. № 42. P. 11819–11823.

184. Marvi M., Ghadiri M. A Mathematical Model for Vibration Behavior Analysis of DNA and Using a Resonant Frequency of DNA for Genome Engineering // Scientific Report. 2020. Vol. 10. P. 3439.

185. Adair R.K. Vibrational Resonances in Biological Systems at Microwave Frequencies // Biophysical Journal. 2002. Vol. 82. № 3. P. 1147–1152.

186. Romanenko S., Begley R., Harvey A.R., Hool L., Wallace V.P. The interaction between electromagnetic fields at megahertz, gigahertz and terahertz frequencies with cells, tissues and organisms: risks and potential // Journal of the Royal Society Interface. 2017. Vol. 14. № 137. P. 20170585.

187. Faniayeu I., Khakhomov S.A., Semchenko I.V., Mizeikis V. Highly transparent twist polarizer metasurface // Applied Physics Letters. 2017. Vol. 111. P. 111108.

188. Semchenko I.V., Khakhomov S.A., Samofalov A.L., Qian S. The equilibrium state of bifilar helix as element of metamaterials // Japanese Journal of Applied Physics Conference Proceedings. 2016. Vol. 4. P. 011112.

189. Cosic I., Cosic D., Lazar K. Is it possible to predict electromagnetic resonances in proteins, DNA and RNA? // EPJ Nonlinear Biomedical Physics. 2015. Vol. 3. P. 5.

190. Zimmerman J.W., Jimenez H., Pennison M.J, Brezovich I., Morgan D., Mudry A., Costa F.P., Barbault A., Pasche B. Targeted treatment of cancer with radiofrequency electromagnetic fields amplitude-modulated at tumor-specific frequencies // Chinese Journal of Cancer. 2013. Vol. 32. № 11. P. 573–581.

191. Рубин А.Б. Биофизика: В 2 т. Т. 1: Теоретическая биофизика: Учебник. - 3-е изд. Москва: Изд-во МГУ; изд-во "Наука", 2004. 448 с.

192. Goel A., Frank-Kamenetskii M.D., Ellenberger T., Herschbach D. Tuning DNA "strings": modulating the rate of DNA replication with mechanical tension // PNAS. 2001. Vol. 98. № 15. P. 8485–8489.

193. Krueger A., Protozanova E., Frank-Kamenetskii M., Sequence-dependent base pair opening in DNA double helix // Biophysical Journal. 2006. Vol. 90. P. 3091–3099.

194. Vologodskii A. Biophysics of DNA. Cambridge, England: Cambridge University Press, 2015. P. 272.

195. Irobalieva R.N., Fogg J.M., Catanese D.J.Jr., Sutthibutpong T., Chen M., Barker A.K., Ludtke S.J., Harris S.A., Schmid M.F., Chiu W., Zechiedrich L. Erratum: Structural diversity of supercoiled DNA// Nature Communications. 2015. Vol. 6. P. 8440.

196. Klenin K.V., Frank-Kamenetskii M.D., Langowski J. Modulation of Intramolecular Interactions in Superhelical DNA by Curved Sequences: A Monte Carlo Simulation Study // *Biophysical Journal*. 1995. Vol. 68. № 1. P. 81–88.
197. Frank-Kamenetskii M.D. Biophysics of the DNA molecule // *Physics Reports*. 1997. Vol. 288. № 1. P. 13–60.
198. Yakushevich L.V. Biomechanics of DNA: rotational oscillations of bases // *Journal of Nonlinear Mathematical Physics*. 2011. Vol. 18. № 449. P. 449–461.
199. Yakushevich L.V., Balashova V.N., Zakiryanov F.K. On the DNA kink motion under the action of constant torque // *Mathematical Biology and Bioinformatics*. 2016. Vol. 11. P. 81–90.
200. Yakushevich L.V. Theoretical physics of DNA: New ideas and tendencies in the modeling of the DNA nonlinear dynamics // *Electronic Journal of Theoretical Physics*. 2007. Vol. 4. № 16. P. 97–114.
201. Cuenda S., Sanchez A. Disorder and fluctuations in nonlinear excitations in DNA // *Fluctuation and Noise Letters*. 2004. Vol. 4. P. L491–L504.
202. Kalosakas G., Rasmussen K.O., Bishop A.R., Choi C.H., Usheva A. Sequence-specific thermal fluctuations identify functional sites for DNA transcription // *Europhysics Letters*. Vol. 68. № 1. P. 127–133.
203. Choi C.H., Kalosakas G., Rasmussen K.O., Hiromura M., Bishop A.R., Usheva A. DNA dynamically directs its own transcription initiation // *Nucleic Acids Research*. 2004. Vol. 32. № 4 P. 1584–1590.

204. Понтрягин Л.С. Обыкновенные дифференциальные уравнения. Москва: Наука, 1974. 332 с.

205. Crick F.H., Klug A. Kinky helix // Nature. 1975. Vol. 255. № 5509. P. 530–533.

206. Reaser P.B., Burch G.E. Determination of deuterium oxide in water by measurement of freezing point // Science. 1958. Vol. 128. № 3321. P. 415–416.

207. Parmon V.N. On the possibility of observing kinetic isotopic effects in the life cycles of living organisms at ultralow concentrations of deuterium // Herald of the Russian Academy of Sciences. 2015. Vol. 85. № 2. P. 170–172.

208. Vologodskii A., Frank-Kamenetskii M.D. DNA melting and energetics of the double helix // Physics of Life Reviews. 2018. Vol. 25. P. 1–21.

209. Alexandrov B.S., Gelev V., Monisova Y., Alexandrov L.B., Bishop A.R., Rasmussen K.O., Usheva A. A nonlinear dynamic model of DNA with a sequence-dependent stacking term // Nucleic Acids Research. 2009. Vol. 37. № 7. P. 2405–2410.

210. Grinevich A.A., Yakushevich L.V. The influence of the DNA torque on the dynamics of transcription bubbles in plasmid PTTQ18 // Journal of Theoretical Biology. 2018. Vol. 453. P. 68–77.

211. Parmon V.N. On the possibility of observing kinetic isotopic effects in the life cycles of living organisms at ultralow concentrations of deuterium // Herald of the Russian Academy of Sciences. 2015. Vol. 85. № 2. P. 170–172.

212. Murray P.J., Cornelissen B., Vallis K.A., Chapman S.J. DNA double-strand break repair: a theoretical framework and its application // *Journal of the Royal Society Interface*. 2016. Vol. 13. № 114. P. 20150679.
213. Yakushevich L.V. On the mechanical analogue of DNA // *Journal of Biological Physics*. 2017. Vol. 43. № 1. P. 113–125.
214. Essevaz-Roulet B., Bockelmann U., Heslot F. Mechanical separation of the complementary strands of DNA // *PNAS*. 1997. Vol. 94. № 22. P. 11935–11940.
215. Bockelmann U., Thomen Ph., Essevaz-Roulet B., Viasnoff V. Unzipping DNA with Optical Tweezers: High Sequence Sensitivity and Force Flips // *Biophysical Journal*. 2002. Vol. 82. № 3. P. 1537–1553.
216. Coman D., Russu I.M. Base Pair Opening in Three DNA-unwinding Elements // *Biophysical Journal*. 2005. Vol. 280. № 21. P. 20216–20221.
217. Шайтан К.В. Распределение скоростей диссипации энергии по степеням свободы при конформационных движениях и фолдинге макромолекулярной цепи в вязкой среде // *Биофизика*. 2017. Т. 62. № 1. С. 5–8.
218. Косенков А.В., Лобышев В.И., Гуляев М.В., Юсубалиева Г.М., Гриненко Н.Ф. Дейтерообмен в нормальных и опухолевых тканях мышей // *Актуальные вопросы биологической физики и химии*. 2017. Т. 2. С. 120–124.
219. Rehakova R., Klimentova J., Cebova M., Barta A., Matuskova Z., Labas P., Pechanova O. Effect of deuterium-depleted water on selected cardiometabolic parameters in fructose-treated rats // *Physiological Research*. 2016. Vol. 65. № 3. P. S401–S407.

220. Kirkina A.A., Lobyshev V.I., Lopina O.D., Doronin Y.K., Burdeinaya T.N., Chernopyatko A.S. Isotopic effects of low concentration of deuterium in water on biological systems // *Biofizika*. 2014. Vol. 59. № 2. P. 399–407.

221. Pershin S.M., Ismailov E.S., Dibirova M.M., Akhmedov M.E., Tagirova F.V., Shashkov D.I., Abdulmagomedova Z.N. Multiple increase in productivity of the yeast at reducing the fraction of D₂O in water // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017. Vol. 476. № 1. P. 299–302.

222. Halenova T., Zlatskiy I., Syroeshkin A., Maximova T., Pleteneva T. Deuterium-depleted water as adjuvant therapeutic agent for treatment of diet-induced obesity in rats // *Molecules*. 2019. Vol. 25. № 1. P. 23.

223. Dzhimak S.S., Basov A.A., Kopytov G.F., Kashaev D.V., Sokolov M.E., Artsybasheva O.M., Sharapov K.S., Baryshev M.G. Application of NMR spectroscopy to the determination of low concentrations of nonradioactive isotopes in liquid media // *Russian Physics Journal*. 2015. Vol. 58. № 7. P. 923–929.

224. Lobysheva N.V., Nesterov S.V., Skorobogatova Y.A., Lobyshev V.I. The Functional Activity of Mitochondria in Deuterium Depleted Water // *Biophysics*. 2020. Vol. 65. № 2. P. 272–276.

225. Zlatskiy I., Pleteneva T., Skripnikov A., Grebennikova T., Maksimova T., Antipova N., Levitskaya O., Makarova M., Selivanenko I., Syroeshkin A. Dependence of Biocatalysis on D/H Ratio: Possible Fundamental Differences for High-Level Biological Taxons // *Molecules*. 2020. Vol. 25. № 18. P. 4173.

226. Zhang X., Gaetani M., Chernobrovkin A., Zubarev R.A. Anticancer Effect of Deuterium Depleted Water - Redox Disbalance Leads to Oxidative Stress // *Molecular and Cellular Proteomics*. 2019. Vol. 18. № 12. P. 2373–2387.

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

228. Dzhimak S.S., Svidlov A.A., Basov A.A., Baryshev M.G., Drobotenko M.I. The effect of single deuterium substitutions for protium in a DNA molecule on the occurrence of open states // *Biophysics*. 2018. Vol. 63. № 4. P. 497–500.

229. Xie X., Zubarev R.A. Isotopic Resonance Hypothesis: Experimental Verification by *Escherichia coli* Growth Measurements // *Scientific reports*. 2015. Vol. 5. P. 9215.

230. Dennis C.A., MacNeil M.A., Rosati J.Y., Pitcher T.E., Fisk A.T. Diet discrimination factors are inversely related to $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values of food for fish under controlled conditions // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2010. Vol. 24. P. 3515–3520.

231. Xin Y.-B., Hu Q., Niu D.-H., Zheng X.-H., Shi H.-L., Wang M., Xiao Z.-S., Huang A.-P., Zhang Z.-B. Research progress of hydrogen tunneling in two-dimensional materials // *Acta Physica Sinica*. 2017. Vol. 66. № 5. P. 056601.

232. Northrop D.B. Unusual origins of isotope effects in enzyme-catalysed reactions // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2006. Vol. 361. № 1472. P. 1341–1349.

233. Uphaus R.A., Flaumenhaft E., Katz J.J. A living organism of unusual isotopic composition. Sequential and cumulative replacement of stable isotopes in *Chlorella vulgaris* // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1967. Vol. 141. № 3. P. 625–632.

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

235. Symes C., Skhosana F., Butler M., Gardner B., Woodborne S. 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 // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. 2017. Vol. 53. № 6. P. 580–596.

236. Лысенко О.Б., Скульский Н.А., Шатило В.Б., Кошлякова Т.А., Лысенко М.О., Собонович Э.В. Проблемы и перспективы использования внутримолекулярных изотопных соотношений основных биогенных элементов как нового ресурса диагностики патологий разной этиологии // *Живые и биокосные системы*. 2014. Т. 8.

237. Gregg C.T., Hutson J.Y., Prine J.R., Ott D.G., Furchner J.E. Substantial replacement of mammalian body carbon with carbon-13 // *Life Sciences*. 1973. Vol. 13. № 7. P. 775–782.

238. Strable M.S., Tschanz C.L., Varamini B., Chikaraishi Y., Ohkouchi N., Brenna J.T. Mammalian DNA $\delta^{15}\text{N}$ exhibits 40‰ intramolecular variation and is unresponsive to dietary protein level // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2011. Vol. 25. P. 3555–3562.

239. Felsing M., Telfer T., Glencross B. ^{15}N -enrichment of an aquaculture diet and tracing of cage culture waste in an estuarine environment // *Journal of Applied Ichthyology*. 2006. Vol. 22. P. 419–426.

240. Crotty F.V., Blackshaw R.P., Murray P.J. Tracking the flow of bacterially derived ^{13}C and ^{15}N through soil faunal feeding channels // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2011. Vol. 25. № 11. P. 1503–1513.

241. Gorokhova E. Shifts in rotifer life history in response to stable isotope enrichment: testing theories of isotope effects on organismal growth // *Royal Society Open Science*. 2017. Vol. 4. № 3. P. 160810.

242. Avdeeva L.V., Koltover V.K. Nuclear spin catalysis in living nature // *Moscow University Chemistry Bulletin*. 2016. Vol. 71. № 3. P. 160–166.

243. Buchachenko A.L. Mass-independent isotope effects // *Journal of Physical Chemistry B*. 2013. Vol. 117. № 8. P. 2231–2238.

244. Джимак С.С., Басов А.А., Шашков Д.И., Арцыбашева О.М., Кашаев Д.В., Барышев М.Г. Определение концентраций природного уровня ^2H в жидких средах с помощью ЯМР спектроскопии // *Ученые записки физического факультета МГУ*. 2017. № 6. С. 1760901.

245. Monakhova Y.B., Godelmann R., Hermann A., Kuballa T., Cannet C., Schäfer H., Spraul M., Rutledge D.N. Synergistic effect of the simultaneous chemometric analysis of ^1H NMR spectroscopic and stable isotope (^{18}O , ^{13}C) data: application to wine analysis // *Analytica Chimica Acta*. 2014. Vol. 833. P. 29–39.

246. Барышев М.Г., Кашаев Д.В., Джимаков С.С., Ломакина Л.В., Соколов М.Е., Шлапаков М.С. Способ определения количественного содержания дейтерия в воде и водных растворах, заявка № 2014105789 от 17.02.14. Патент РФ № 2558433. Опубликовано: 10.08.2015 Бюл. № 22

247. Czank C., Cassidy A., Zhang Q., Morrison D.J., Preston T., Kroon P.A., Botting N.P., Kay C.D. Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: a (13)C-tracer study // *American Journal of Clinical Nutrition*. 2013. Vol. 97. P. 995–1003.

248. Martinelli L.A., Gat J.R., Camargo P.B., Lara L.L., Ometto J.P.H.B. The Piracicaba River basin: isotope hydrology of a tropical river basin under anthropogenic stress // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. 2004. Vol. 40. № 1. P. 45–56.

249. Ofukany A.F., Wassenaar L.I., Bond A.L., Hobson K.A. Defining fish community structure in Lake Winnipeg using stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{34}\text{S}$): Implications for monitoring ecological responses and trophodynamics of mercury & other trace elements // *Science of The Total Environment*. 2014. Vol. 497–498. P. 239–249.

250. Werner R.A., Roßmann A. Multi element (C, H, O) stable isotope analysis for the authentication of balsamic vinegars // *Isotopes in Environmental and Health Studies*. 2015. Vol. 51. P. 58–67.

251. Быков М.И., Джимаков С.С., Басов А.А., Арцыбашева О.М., Шашков Д.И., Барышев М.Г. Сравнительная характеристика изотопного D/H состава и антиоксидантной активности свежевыжатых соков из овощей и фруктов,

выращенных в различных географических регионах // Вопросы питания. 2015. Т. 84. № 4. С. 89–96.

252. Brendel O. Is the coefficient of variation a valid measure for variability of stable isotope abundances in biological materials? // Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2014. Vol. 28. P. 370–376.

253. Gilbert A., Yamada K., Yoshida N. Accurate Method for the Determination of Intramolecular ^{13}C Isotope Composition of Ethanol from Aqueous Solutions // Analytical Chemistry. 2013. Vol. 85. P. 6566–6570.

254. Magdas D.A., Cuna S., Cristea G., Ionete R.E., Costinel D. Stable isotopes determination in some Romanian wines // Isotopes in Environmental and Health Studies. 2012. Vol. 48. P. 345–353.

255. Gilbert A., Silvestre V., Robins R.J., Remaud G.S. Accurate Quantitative Isotopic ^{13}C NMR Spectroscopy for the Determination of the Intramolecular Distribution of ^{13}C in Glucose at Natural Abundance // Analytical Chemistry. 2009. Vol. 81. P. 8978–8985.

256. Miller C.B., Wheeler P.A. Biological Oceanography. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, 2012. 464 p.

257. Caytan E., Botosoa E.P., Silvestre V., Robins R.J., Akoka S., Remaud G.S. Accurate Quantitative ^{13}C NMR Spectroscopy: Repeatability over Time of Site-Specific ^{13}C Isotope Ratio Determination // Analytical Chemistry. 2007. Vol. 79. P. 8266–8269.

258. Aguilar-Cisneros B.J., Lopez M.G., Richling E., Schreier P. Tequila Authenticity Assessment by Headspace SPME-HRGC-IRMS Analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$

and $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ Ratios of Ethanol // Journal of Agricultural Food Chemistry. 2002. Vol. 50. P. 7520–7523.

259. Джимаков С.С., Басов А.А., Бузько В.Ю., Копытов Г.Ф., Кашаев Д.В., Шашков Д.И., Шлапаков М.С., Барышев М.Г. Определение изотопного соотношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в спиртах различного происхождения с помощью ЯМР-спектроскопии ядер ^1H // Известия вузов Физика. 2016. Т. 59. № 10. С. 167–171.

260. Фролов В.Ю., Джимаков С.С. Линия по получению биологически активной воды с пониженным содержанием дейтерия. Патент РФ № 97994 с приоритетом от 25.05.2010. Оpubл. 27.09.2010. Бюл. № 27. Зарегистрир. 27.09.2010.

261. Фролов В.Ю., Барышев М.Г., Ломакина Л.В., Джимаков С.С., Долгов М.А. Линия по получению биологически активной питьевой воды с модифицированным изотопным составом. С приоритетом от 17.11.2011. Решение о выдаче от 23.01.2012. Патент РФ № 113977 Опубликовано: 10.03.2012.

262. Черешнев В.А. Гусев Е.Ю. Иммунология воспаления: роль цитокинов // Медицинская иммунология. 2001. Т. 3. № 3. С. 361–368.

263. Бучаченко А.Л., Кузнецов Д.А. Ядерно-магнитное управление синтезом энергоносителей в живых организмах // Вестник Российской академии наук. 2008. Т. 78. № 7. С. 579–583

264. Нокс П.П., Баптиста М.С., Учоа А.Ф., Захарова Н.И. Влияние кислорода, дейтерирования и глицерина на перенос электрона в акцепторной

части реакционных центров бактерий *Rhodobacter sphaeroides* // Биохимия. 2005. Т. 11. С. 1541–1547.

265. Мосин О.В., Игнатов И. Изучение биологических эффектов тяжелой воды (D_2O) в биологических системах на примере клеток прокариот и эукариот // Биомедицина. 2012. Т. 3. С. 35–50.

266. Басов А.А., Барышев М.Г., Быков И.М., Павлюченко И.И., Джимак С.С., Сепиашвили Р.И. Воздействие воды с модифицированным изотопным составом на интенсивность свободнорадикальных процессов в эксперименте на лабораторных животных // Аллергология и иммунология. 2012. Т. 13. № 4. С. 314–320.

267. Коронелли Т.В., Нестерова Е.Д. Экологическая стратегия бактерий, использующих гидрофобный субстрат // Микробиология. 1990. № 6. С. 993–997.

268. Bell K.S., Philp J.C., Aw D.W.J., Christophi N. The genus *Rhodococcus* // Journal of Applied Microbiology. 1998. Vol. 85. № 2. P. 195–210.

269. Самков А.А., Карасева Э.В. Взаимосвязь конвективного переноса углеводородокисляющих микроорганизмов со степенью гидрофобности клеток и эффективностью биоремедиации / Биотехнология. 2007. № 4. С. 69–75.

270. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Serebrennikova M.K., Krivorutchko A.B., Podorozhko E.A., Ivanov R.V., Lozinsky V.I. Petroleum-contaminated water treatment in a fluidized-bed bioreactor with immobilized *Rhodococcus* cells // International Biodeterioration & Biodegradation. 2009. Vol. 63. № 4. P. 427–432.

271. Данилец В.М., Карасева Э.В., Самков А.А., Самкова С.М., Худокормов А.А., Алешина Н.Ю., Калитка С.А., Карпов В.Г. Комплексная биотехнология ликвидации и рекультивации накопителей опасных отходов в инфраструктуре нефтеперерабатывающего предприятия // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2011. № 8. С. 13–20.

272. Барышев М.Г., Болотин С.Н., Васильев Н.С., Джимак С.С., Долгов М.А., Фролов В.Ю. Электрохимический способ получения и биологические свойства воды с пониженным содержанием дейтерия // Наука Кубани. 2010. № 3. С. 18–20.

273. Барышев М.Г., Басов А.А., Болотин С.Н., Джимак С.С., Кашаев Д.В., Федосов С.Р., Фролов В.Ю., Шашков Д.И., Лысак Д.А., Тимаков А.А. Оценка антирадикальной активности воды с модифицированным изотопным составом с помощью ЯМР-, ЭПР- и масс-спектрологии // Известия РАН. Серия Физическая. 2012. Т. 76. № 12. С. 1507.

274. Карасёва Э.В. Волченко Н.Н., Худокормов А.А., Самков А.А., Карасёв С.Г., Батина Е.В., Самкова С.М. Нефтеокисляющий штамм *Rhodococcus erythropolis* В2 как основа создания биопрепарата для ликвидации углеводородных загрязнений и рекультивации земель // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2012. № 83. С. 154–167.

275. Brown W.A., Punchik R., Cooper D.G. Determining biomass from differential total organic carbon // Biotechnology Techniques. 1997. Vol. 11. № 3. P. 213–216.

276. Marino F., Karp J.M., Cooper D.G. Biomass measurement in hydrocarbon fermentation // *Biotechnology Techniques*. 1998. Vol. 12. № 5. P. 385–388.

277. Герхардта Ф. Методы общей бактериологии. Москва: Мир, 1983. 536 с.

278. Семенов К.Т., Асланян Р.Р. Особенности роста культуры одноклеточных зеленых водорослей после воздействия электромагнитного поля на средах с дейтерированной водой // *Биофизика*. 2013. № 1. С. 70–74.

279. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяций бактерий и процесс диссоциации. Москва: МГУ, 1991. 144 с.

280. Милько Е.С., Максимович М.О., Лопатина Л.И., Породенко Е.В. Особенности роста диссоциантов углеводородокисляющих родококков и псевдомонад в моно- и смешанных культурах / *Прикладная биохимия и микробиология*. 2010. № 5. С. 538–542.

281. Rottenberg H. The generation of proton electrochemical potential gradient by cytochrome c oxidase // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998. Vol. 1364. № 1. P. 1–16.

282. Lepp H., Brzezinski P. Internal charge transfer in cytochrome c oxidase at a limited proton supply: proton pumping ceases at high pH // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009. Vol. 1790. № 6. P. 552–557.

283. Brändén G., Gennis R.B., Brzezinski P. Transmembrane proton translocation by cytochrome c oxidase // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. Vol. 1757. P. 1052–1063.

284. Verkhovsky M.I., Belevich I., Bloch D.A., Wikström M. Elementary steps of proton translocation in the catalytic cycle of cytochrome oxidase // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. Vol. 1757. P. 401–407.

285. Chakrabarty S., Namslauer I., Brzezinski P., Warshel A. Exploration of the cytochrome c oxidase pathway puzzle and examination of the origin of elusive mutational effects // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011. Vol. 1807. P. 413–426.

286. Kishikawa J., Kabashima Y., Kurokawa T., Sakamoto J. The cytochrome bcc-aa3-type respiratory chain of *Rhodococcus rhodochrous* // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2010. Vol. 110. № 1. P. 42–47.

287. Brändén G., Brzezinski P. Deuterium isotope effect of proton pumping in cytochrome c oxidase Lina Salomonsson // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008. Vol. 1777. P. 343–350.

288. Johansson A.L., Chakrabarty S., Berthold C.L., Högbom M., Warshel A., Brzezinski P. Proton-transport mechanisms in cytochrome c oxidase revealed by studies of kinetic isotope effects // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011. Vol. 1807. № 9. P. 1083–1094.

289. Hallén S., Nilsson T. Proton transfer during the reaction between fully reduced cytochrome c oxidase and dioxygen: pH and deuterium isotope effects // *Biochemistry*. 1992. Vol. 31. № 47. P. 11853–11859.

290. Riistama S., Hummer G., Puustinen A., Dyer R.B., Woodruff W.H., Wikström M. Bound water in the proton translocation mechanism of the haem-copper oxidases // *FEBS Letters*. 1997. Vol. 414. № 2. P. 275–280.

291. Brzezinski P. Redox-driven membrane-bound proton pumps // Trends in Biochemical Sciences. 2004. Vol. 29. № 7. P. 380–387.

292. Koepke J., Olkhova E., Angerer H., Müller H., Peng G., Michel H. High resolution crystal structure of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase: new insights into the active site and the proton transfer pathways // Biochimica et Biophysica Acta. 2009. Vol. 1787. № 6. P. 635–645.

293. Сокольчик Т.И., Леонтьев В.Н., Гриц Н.В. Зависимость активностей оксидоредуктаз и содержания цитохромов b5 и P--711 ‰ у бактерий рода *Pseudomonas* от структуры шестиуглеродного субстрата // Микробиология. 1999. Т. 68. № 3. С. 299–303.

294. Сияк Ю.Е., Турусов В.С., Григорьев А.И., Заридзе Д.Г., Гайдадымов В.Б., Гуськова Е.И., Антошина Е.Е., Горькова Т.Г., Труханова Л.С. Возможность использования бездейтериевой воды в марсианской экспедиции // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2003. Т. 37. № 6. С. 60–63.

295. Барышев М.Г., Басов А.А., Болотин С.Н., Джимаков С.С., Кашаев Д.В., Федосов С.Р., Фролов В.Ю., Малышко В.В., Власов Р.В. ЯМР и ЭПР исследование влияния воды с пониженным содержанием дейтерия на показатели прооксидантно-антиоксидантной системы у лабораторных животных // Экологический вестник научных центров ЧЭС. 2011. Т. 8. № 3. С. 16–20.

296. Gyöngyi Z., Budán F., Szabó I., Ember I., Kiss I., Krempels K., Somlyai I., Somlyai G. Deuterium depleted water effects on survival of lung cancer

patients and expression of Kras, Bcl2, and Myc genes in mouse lung // Nutrition and Cancer. 2013. Vol. 65. № 2. P. 240–246.

297. Krempels K., Somlyai I., Somlyai G. A retrospective evaluation of the effects of deuterium depleted water consumption on 4 patients with brain metastases from lung cancer // Integrative Cancer Therapies. 2008. Vol. 7. № 3. P. 172–181.

298. O'Brien D.M., Wooller M.J. Tracking human travel using stable oxygen and hydrogen isotope analyses of hair and urine // Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2007. Vol. 21. № 15. P. 2422–2430.

299. Goodall K.B. In Search of the Fountain of Youth (Preliminary Analysis of Deuterium's Role in DNA Degradation). Anti-Aging Medical News. Fall 2003, pp. 7-31.

300. Griffiths T. R. A new unifying theory for the initiation of ageing mechanisms and processes. Mechanisms of Ageing and Development, 1973. V. 2, Issue C. P. 295-307.

301. Seal R.R., Shanks W.C. Oxygen and hydrogen isotope systematics of Lake Baikal, Siberia: Implications for paleoclimate studies // Limnology and Oceanography. V. 43, Issue 6. 1998. P. 1251-1261.

302. Zamana L.V. Isotopes of hydrogen and oxygen in nitrogen hot springs of Baikal Rift Zone in terms of interaction in the water-rock system // Doklady Earth Sciences. Vol. 442. Issue 1. 2012. P. 81-85.

303. Bykov M.I., Dzhimak S.S., Basov A.A., Arcybasheva O.M., Shashkov D.I., Baryshev M.G. Comparative characteristics of the isotopic D/H composition and antioxidant activity of freshly squeezed juices from fruits

- and vegetables grown in different geographical regions // *Voprosy Pitaniia*. 2015. V. 84. №4. P.89–96.
304. Koziat J., Rossmann A., Martin G.J., Johnson P. Determination of the oxygen-18 and deuterium content of fruit and vegetable juice water: An European inter-laboratory comparison study. *Analytica Chimica Acta* 302 (1995) 29-37.
305. European Treaty Series - No. 123. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg, 1986.
306. Фролов В.Ю., Барышев М.Г., Болотин С.Н., Джимаков С.С. Способ получения биологически активной питьевой воды с пониженным содержанием дейтерия. Патент РФ № 2438765 с приоритетом от 25.05.2010. Опубл. 10.01.2012. Заявка № 2010121324/05.
307. Marcondes F.K., Bianchi F. J. and Tanno A.P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz. J. Biol.* vol.62 no.4a. 609-614. 2002.
308. Dzhimak S.S., Barishev M.G., Basov A.A., Timakov A.A. Influence of deuterium depleted water on freeze dried tissue isotopic composition and morphofunctional body performance in rats of different generations // *Biophysics*. 2014. Vol. 59. No. 4. P. 614–619.
309. Basov A., Fedulova L., Baryshev M., Dzhimak S. Deuterium-depleted water influence on the isotope $^2\text{H}/^1\text{H}$ regulation in body and individual adaptation // *Nutrients*. 2019. 11(8), P. 1903; doi:10.3390/nu11081903.

310. Miller B.H., Takahashi J.S. Central circadian control of female reproductive function. *Front. Endocrinol.* – 2014. doi: 10.3389/fendo.2013.00195.
311. Dzhimak S.S., Shikhliarova A.I., Zhukova G.V., et al. Some systemic effects of deuterium depleted water on presenile female rats // *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 2018. V. 13. №3. P. e83494.