ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

ВЕСЦІ
НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК. 2021. Т. 57, № 4

ИЗВЕСТИЯ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ ХИМИЧЕСКИХ НАУК. 2021. Т. 57, № 4

Журнал основан в январе 1965 г.

Выходит четыре раза в год

Учредитель – Национальная академия наук Беларуси

Журнал зарегистрирован в Министерстве информации Республики Беларусь, свидетельство о регистрации № 390 от 18.05.2009 г.

Журнал входит в Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований, включен в международную базу данных Scopus и базу данных Российского индекса научного цитирования (РИНЦ)

Главный редактор

Сергей Александрович Усанов – Отделение химии и наук о Земле Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларус

Редакционная коллегия

А. В. Бильдюкевич (*заместитель главного редактора*) – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Н. П. Крутько (*заместитель главного редактора*) – Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Я. В. Рощина (*ведущий редактор журнала*) – Издательский дом «Беларуская навука», Минск, Беларусь

В. Е. Агабеков – Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

М. А. Богдасаров – Брестский государственный университет имени А. С. Пушкина, Брест, Беларусь

И. В. Войтов – Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь
А. А. Гилеп – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
А. И. Иванец – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
Е. Н. Калиниченко – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
М. И. Кузьменков – Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь
А. И. Кулак – Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
Ф. А. Лахвич – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. Г. Левашкевич – Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
И. И. Лиштван – Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. И. Поткин – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
Д. В. Свиридов – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
В. А. Хрипач – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
О. И. Шадыро – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
В. В. Шманай – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Р е д а к ц и о н н ы й с о в е т

В. Балтрунас – Центр исследований природы Литвы Института геологии и географии, Вильнюс, Литва
П. Драшар – Пражский университет химии и технологии, Прага, Чехия
Л. Маркс – Варшавский университет, Варшава, Польша
В. Н. Пармон – Сибирское отделение Российской академии наук, Российская Федерация
В. Я. Прушак – Солигорский институт проблем ресурсосбережения с опытным производством, Солигорск, Беларусь
А. В. Рогачев – Гомельский государственный университет имени Франциска Скорины, Гомель, Беларусь
Чжао Лян – Хэнаньская академия наук, Хэнань, Китай

Адрес редакции:
ул. Академическая, 1, к. 119, 220072, г. Минск, Республика Беларусь.
Тел.: + 375 17 272-19-19; e-mail: himvesti@mail.ru
Сайт: vestichem.belnauka.by

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ.
Серия химических наук. 2021. Том 57, № 4.
Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *Я. В. Рощина*
Компьютерная вёрстка *С. Н. Костюк*

Подписано в печать 08.11.2021. Выход в свет 26.11.2021. Формат 60×84 $^{1}/_{8}$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 14,88. Уч.-изд. л. 16,4. Тираж 58 экз. Заказ 247.
Цена: индивидуальная подписка – 12,51 руб., ведомственная подписка – 29,60 руб.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Республиканское унитарное предприятие «Издательский дом «Беларуская навука».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя, распространителя печатных изданий
№ 1/18 от 02.08.2013. ЛП № 02330/455 от 30.12.2013. Ул. Ф. Скорины, 40, 220141, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука»,
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук, 2021

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

PROCEEDINGS
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

CHEMICAL SERIES, 2021, vol. 57, no. 4

The Journal was founded in January 1965

Periodicity is 4 issues per annum

Founder is the National Academy of Sciences of Belarus

The Journal is registered on May 18, 2009 by the Ministry of Information of the Republic of Belarus in the State Registry of Mass Media, reg. no. 390

The Journal is included in the List of Journals for Publication of the Results of Dissertation Research in the Republic of Belarus, of the international Scopus Database and in the Database of Russian Scientific Citation Index (RSCI)

E d i t o r-i n - C h i e f

Sergey A. Usanov – Department of Chemistry and Earth Sciences of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

E d i t o r i a l b o a r d

Alexandr V. Bildyukevich (*Associate Editor-in-Chief*) – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Nikolay P. Krutko (*Associate Editor-in-Chief*) **–** Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Yanina V. Roshchina (*Lead Editor*) – Publishing House "Belaruskaya Navuka", Minsk, Belarus
Vladimir E. Agabekov – Institute of New Materials Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Maksim A. Bogdasarov – Brest State A. S. Pushkin University, Brest, Belarus
Igor V. Voitov – Belarusian State University of Technology, Minsk, Belarus
Andrey A. Gilep – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Andrei I. Ivanets – Presidium of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Elena N. Kalinichenko – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Mikhail I. Kuzmenkov – Belarusian State University of Technology, Minsk, Belarus
Anatoly I. Kulak – Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Fyodor A. Lakhvich – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Vladimir G. Levashkevich – Department of Chemistry and Earth Science of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Ivan I. Lishtvan – Institute for Nature Management of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Vladimir I. Potkin – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Dmitry V. Sviridov – Belarusian State University, Minsk, Belarus
Vladimir A. Khripach – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Oleg I. Shadyro – Belarusian State University, Minsk, Belarus
Vadim V. Shmanai – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

E d i t o r i a l C o u n c i l

Baltrunas Valentinas – Lithuanian Nature Research Center of the Institute of Geology and Geography, Vilnius, Lithuania
Pavel Drasar – Prague University of Chemistry and Technology, Prague, Czechia
Leszek Marks – University of Warsaw, Warsawa, Poland
Valentin N. Parmon – Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia
Victor Ya. Prushak – Soligorsk Institute of Resource Saving Problems with the Pilot Plant, Soligorsk, Belarus
Alexander V. Rogachev – Francisk Skorina Gomel State University, Gomel, Belarus
Zhao Liang – Henan Academy of Sciences, Henan, China

Address of the Editorial Office:
1, Akademicheskaya Str., room 119, 220072, Minsk, Republic of Belarus.
Tel.: + 375 17 272-19-19; e-mail: himvesti@mail.ru
Website: vestichem.belnauka.by

PROCEEDING OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS.
Chemical series, 2021, vol. 57, no. 4.
Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *Ya. V. Roshchina*
Computer imposition *S. N. Kostsyuk*

It is sent of the press 08.11.2021. Appearance 26.11.2021. Format 60×84$^{1}/_{8}$. Offset paper.
The press digital. Printed pages 14,88. Publisher`s signatures 16,4. Circulation 58 copies. Order 247.
Price: individual subscription – 12,51 byn., departmental subscription – 29,60 byn.

Publisher and printing execution:

Republican unitary enterprise “Publishing House “Belaruskaya Navuka”.
Certificate on the state registration of the publisher, manufacturer, distributor of printing editions no. 1/18 dated August 2, 2013. License for the press no. 02330/455 dated December 30, 2013.
Address: F. Scorina Str., 40, 220141, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE “Publishing House “Belaruskaya Navuka”,
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series, 2021

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

ЗМЕСТ

ФІЗІЧНАЯ ХІМІЯ

Солдатов В. С., Шаченкова Л. Н., Косандрович Е. Г., Нестеронок П. В. Титрование слабоосновных волокнистых анионитов в присутствии комплексообразующих двухвалентных катионов 391

Дикусар Е. А., Пушкарчук А. Л., Безъязычная Т. В., Акишина Е. А., Солдатов А. Г., Кутень С. А., Стёпин С. Г., Низовцев А. П., Килин С. Я., Поткин В. И. Квантово-химическое моделирование кортизон-фуллереноловых агентов терапии онкологических заболеваний..... 400

Карпинчик Е. В., Южик Л. И., Агабеков В. Е. О водорастворимости алкилбензолсульфокислот С17–С24, используемых в качестве присадки к моторным маслам 408

НЕАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Глазов И. Е., Крутько В. К., Власов Р. А., Мусская О. Н., Кулак А. И. Нанокомпозиты на основе апатитного трикальцийфосфата и аутофибрина..... 413

АРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Бей М. П., Ювченко А. П., Поткин В. И., Петкевич С. К. Синтез и свойства амидов, имидов и имидоамидов малеопимаровой кислоты с арилизоксазольным и хинолиновым фрагментами 424

Мартинкевич Д. С., Чернявская Е. Ф., Тарасевич В. А. Синтез пиримидиновых производных на основе халконов и их противомикробная активность..... 431

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Гилевич С. Н., Бречко Ю. В. Получение и характеристика рекомбинантной глутатионтрансферазы P1 человека и скрининг новых ингибиторов фермента 438

Минеева И. В., Фалетров Я. В., Старовойтова В. А., Шкуматов В. М. Синтез новых тиазоло[3,2-a] пиримидинов и *in silico* анализ их биоактивности..... 456

ТЭХНІЧНАЯ ХІМІЯ І ХІМІЧНАЯ ТЭХНАЛОГІЯ

Баранцева С. Е., Позняк А. И., Климош Ю. А., Азаренко И. М., Гундилович Н. Н., Поспелов А. В. Теплоизоляционный пористый материал на основе глауконитсодержащих песков и алевритов Новодворского месторождения Республики Беларусь..... 463

Исмаилов И. И., Бабаханова Х. А., Садриддинов А. А., Бабаханова М. А., Саидова Д. Ш. Поверхностные и оптические свойства бумаги, содержащей карбонат кальция..... 472

Акулова В. М., Соломянский А. Е., Мельникова Г. Б., Некрашевич Д. А., Синькевич Ю. В., Чишанков И. Г., Агабеков В. Е. Защитные покрытия Ленгмюра–Блоджетт на основе высших жирных кислот 480

АГЛЯДЫ

Литвинко Н. М. Сопряжение фосфолиполиза и монооксигеназного катализа..... 488

Болтовский В. С. Ферментативный гидролиз растительного сырья: состояние и перспективы..... 502

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

CONTENTS

PHYSICAL CHEMISTRY

Soldatov V. S., Shachenkova L. N., Kosandrovich E. G., Nesteronok P. V. Titration of weak base fibrous anion exchangers in the presence of complex-forming divalent cations 391
Dikusar E. A., Pushkarchuk A. L., Bezyazychnaya T. V., Akishina E. A., Soldatov A. G., Kuten S. A., Stepin S. G., Nizovtsev A. P., Kilin S. Ya., Potkin V. I. Quantum-chemical modeling of cortisone-fullerenol agents of cancer therapy 400
Karpinchik E. V., Yuzhik L. I., Agabekov V. E. On water solubility of C17–C24 alkylbenzolsulphoic acids used as an additive to motor oils 408

INORGANIC CHEMISTRY

Glazov I. E., Krut'ko V. K., Vlasov R. A. Musskaya O. N., Kulak A. I. Nanocomposites based on apatitic tricalcium phosphate and autofibrin 413

ORGANIC CHEMISTRY

Bei M. P., Yuvchenko A. P., Potkin V. I., Petkevich S. K. Synthesis and properties of maleopimaric acid amides, imides and imidoamides with arylisoxazole and quinoline fragments 424
Martsinkevich D. S., Chernyavskaya K. F., Tarasevich V. A. Synthesis of chalcone-based pyrimidine derivatives and their antimicrobial activity 431

BIOORGANIC CHEMISTRY

Gilevich S. N., Brechka Yu. V. Preparation and characterization of recombinant human glutathione transferase P1 and screening of novel enzyme inhibitors 438
Mineeva I. V., Faletrov Y. V., Starovoytova V. A., Shkumatov V. M. Synthesis of new thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives and *in silico* analysis of their bioactivity 456

TECHNICAL CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING

Barantseva S. E., Pazniak A. I., Klimosh Y. A., Azaranka I. M., Hundzilovich N. N., Pospelov A. V. Heat-insulating porous material based on glauconite-containing sands and aleurites of the Novodvorskoye deposit of the Republic of Belarus 463
Ismailov I. I., Babakhanova Kh. A., Sadriddinov A. A., Babahanova M. A., Saidova D. Sh. Surface and optical properties of calcium carbonate paper 472
Akulova V. M., Salamianski A. E., Melnikova G. B., Nekrashevich D. A., Sinkevich Yu. V., Chishankov I. G., Agabekov V. E. Protective Langmuir-Blodgett coatings based on long-chain fatty acids 480

REVIEWS

Litvinko N. M. Interconnection of phospholipolysis and monooxygenase catalysis 488
Boltovsky V. S. Enzymatic hydrolysis of plant raw materials: state and prospects 502

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

ФІЗІЧНАЯ ХІМІЯ

PHYSICAL CHEMISTRY

УДК 541.183.12
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-391-399

Поступила в редакцию 05.08.2021
Received 05.08.2021

В. С. Солдатов, Л. Н. Шаченкова, Е. Г. Косандрович, П. В. Нестеронок

Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

ТИТРОВАНИЕ СЛАБООСНОВНЫХ ВОЛОКНИСТЫХ АНИОНИТОВ В ПРИСУТСТВИИ КОМПЛЕКСООБРАЗУЮЩИХ ДВУХВАЛЕНТНЫХ КАТИОНОВ

Аннотация. Получены кривые потенциометрического титрования полностью протонизированных волокнистых ионитов гидроксидом калия на фоне 1 М KCl в присутствии хлоридов Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} и Ca^{2+}. Иониты были получены модификацией промышленного полиакрилонитрильного волокна диэтилентриамином и триэтилентетраамином, преимущественно содержали функциональные группы R-CO-NH-$(CH_2CH_2NH)_nH$ (n = 2 или 3) и небольшое количество карбоксильных групп. Из полученных данных рассчитана сорбция Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} и Ca^{2+} ионитами в зависимости от pH среды. Установлено, что исследованные иониты с высокой селективностью сорбируют ионы тяжелых металлов в широком интервале кислотности растворов (pH 2–9) благодаря образованию металл-полимерных комплексов с полиаминными функциональными группами. Максимальная сорбционная емкость составляет 1,5–2,7 и 4–5 мэкв/г для ионитов с n = 2 и 3 соответственно.

Ключевые слова: волокнистые аниониты, сорбция тяжелых металлов, металл-полимерные комплексы, потенциометрическое титрование ионитов

Для цитирования. Титрование слабоосновных волокнистых анионитов в присутствии комплексообразующих двухвалентных катионов / В. С. Солдатов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 391–399. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-391-399

V. S. Soldatov, L. N. Shachenkova, E. G. Kosandrovich, P. V. Nesteronok

Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

TITRATION OF WEAK BASE FIBROUS ANION EXCHANGERS IN THE PRESENCE OF COMPLEX-FORMING DIVALENT CATIONS

Abstract. Curves of potentiometric titration of fully protonized fibrous ion exchangers with potassium hydroxide against the background of 1 M KCl in the presence of chlorides of Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} and Ca^{2+} were obtained. The ion exchangers were synthesized by modifying of industrial polyacrylonitrile fiber with diethylenetriamine and triethylenetetraamine and predominantly contained functional groups R-CO-NH- $(CH_2CH_2NH)_nH$ (n = 2 or 3) and a small amount of carboxyl groups. The sorption of Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} and Ca^{2+} by ion exchangers was calculated from the data obtained depending on the pH of the medium. It was found that the investigated ion exchangers with high selectivity sorb heavy metal ions in a wide range of acidity of solutions (pH 2–9) due to the formation of metal-polymer complexes with polyamine functional groups. The maximum sorption capacity is 1.5–2.7 and 4–5 meq/g for ion exchangers with n = 2 and 3, respectively.

Keywords: fibrous anion exchangers, sorption of heavy metals, metal-polymer complexes, potentiometric titration of ion exchangers

For citation. Soldatov V. S., Shachenkova L. N., Kosandrovich E. G., Nesteronok P. V. Titration of weak base fibrous anion exchangers in the presence of complex-forming divalent cations. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 391–399 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-391-399

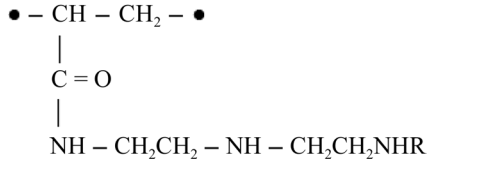
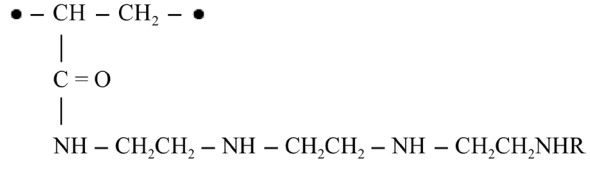
Введение. Слабоосновные аниониты на основе полиакрилонитрильных волокон нашли практическое применение для очистки питьевой воды [1], воздуха чистых комнат [2], производственных помещений от токсичных и плохо пахнущих веществ [3]. Помимо своей анионообменной функции, они обладают значительной сорбционной активностью по ионам переходных, тяжелых

и драгоценных металлов [4] благодаря наличию в них первичных и вторичных аминогрупп, образующих устойчивые комплексы с такими металлами.

Известно, что слабоосновные аниониты, содержащие аминогруппы различной степени замещенности, поглощают ионы металлов, таких как Cu^{2+} и Ni^{2+} [5]. Причина этого явления – образование металл-полимерных комплексов, в которых центральным атомом является металл, а лигандами – фрагменты полимера, обладающие донорно-акцепторными свойствами. Структура этих комплексов достоверно не известна и ее количественных характеристик не имеется. Иониты с амидоаминными группами, получаемые полимер-аналогичными превращениями полимеров с нитрильными группами, также обладают высокой сорбционной активностью по отношению к комплексообразующим ионам. В частности, полученные ранее в Институте физико-органической химии НАН Беларуси волокнистые иониты этого типа перспективны для выделения и разделения ионов металлов в водных средах [6–10]. Сорбция ионов металлов существенно возрастает с увеличением pH равновесных растворов. В исследованиях этих процессов интервал pH, в котором изучается сорбция, ограничивается pH осаждения соответствующих гидроксидов. В работе [11] сорбция ионов металлов изучалась в интервале pH, включающем образование осадков (pH 1–12). Такие исследования имеют практическое значение в связи с проблемой получения гибридных полимерно-неорганических сорбентов, в которых наночастицы или аморфная масса неорганического осадка распределены внутри полимерной матрицы полимера носителя [12, 13]. Подобного рода сорбенты обычно получают при контакте ионита, содержащего один из компонентов, необходимый для осадкообразования, с раствором, содержащим другие компоненты, при изменении pH раствора. Другой возможностью является образование осадка из раствора, содержащего оба компонента, при изменении pH раствора. В этом случае сорбция и образование осадка протекают одновременно. Осадок может образовываться либо в растворе, либо в фазе полимера. Закономерности таких процессов практически не исследовались ранее.

Основная цель настоящей работы – установление принципиальной возможности использования сорбционных комплексов ионитов этого типа в качестве источников микроэлементов при выращивании растений на волокнистых искусственных почвах, предназначенных для выращивания растений в условиях невесомости. Ранее аналогичное исследование было проведено на хелатообразующих сорбентах с аминодиацетатными группами [11], являющихся наиболее распространенными высокоселективными сорбентами двухвалентных катионов. Слабоосновные иониты, содержащие полиаминные радикалы, могут обладать некоторыми преимуществами перед хелатными сорбентами: взаимодействие катиона с аминными лигандами не подвергается конкуренции макроионов K^+, Ca^{2+} и Mg^{2+}, присутствующих в питательном растворе, а способ получения анионитов выбранного типа существенно проще, чем для хелатного сорбента.

Иониты. Исследовано два анионита на основе полиакрилонитрильного волокна Нитрон, полученные его химической модификацией диэтилентриамином (ДЭТА) и триэтилентетраамином (ТЭТА), как описано в [14]. Их условные названия АК-22(2) и АК-22(3) соответственно. Формулы преобладающих анионообменных групп приведены ниже:

АК-22(2)	АК-22(3)
	

Символ «R» в этих формулах может означать либо атом водорода, либо полимерный радикал той же самой или другой полимерной цепи.

Кроме анионообменных групп иониты содержат относительно небольшое количество карбоксильных групп, образующихся в водных средах в процессе гидролиза нитрильных групп волокна при его обработке аминами. Основные характеристики ионитов – обменные емкости в Cl^-/H^+ ($E_{ан}$ – анионообменная; $E_{кат}$ – катионообменная) и водопоглощение (W) приведены в таблице.

Основные характеристики исследованных ионитов

Main characteristics of the studied ion exchangers

Ионит	$E_{ан}$, мэкв/г	$E_{кат}$, мэкв/г	W, $г_{воды}/г_{ионита}$
АК-22(2)	3,5	1,1	0,5
АК-22(3)	5,9	1,0	0,9

Экспериментальная часть. В данной работе применяли метод одновременного исследования сорбции ионов металлов и pH раствора, описанный ранее [11].

Титрование ионита в H^+/Cl^--форме проводилось на фоне 1 н. KCl растворами KOH в присутствии избытка HCl (3–10 ммоль/г, концентрация HCl 1,75 М). Добавление HCl в фоновый раствор было необходимо для полной протонизации всех кислотных и основных групп ионита. К тому же добавление HCl к титруемому иониту было сделано для того, чтобы для всех катионов титрование начиналось с практически одинакового и очень низкого значения pH (~1), когда все виды катионов еще не сорбируются ионитами и целиком находятся в растворе. Если не добавлять избыток кислоты к иониту, то уже в нулевой точке (когда титрант еще не добавлен) будут получены разные значения pH для разных катионов из-за их различной сорбции ионитами и информация, относящаяся к более низким pH, будет потеряна. Высокую концентрацию KOH в титранте необходимо было использовать для предотвращения существенного изменения объема раствора при добавке порций титранта. В этот же раствор добавляли хлориды Ni^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} и Ca^{2+} в количестве, превышающем возможную предполагаемую поглотительную емкость ионита. Кроме того, снимали кривые титрования ионита в их отсутствие и растворов самих солей.

При титровании использовали метод одной навески [15]. Точная навеска нарезанных на фрагменты волокон ионита длиной 2–4 мм и массой ~0,5 г помещалась в исходный подкисленный раствор хлоридов двухвалентных катионов. Объем раствора составлял 30 мл. Суспензия ионита в растворе постоянно интенсивно перемешивалась магнитной мешалкой. Комбинированный стеклянный электрод оставался в перемешиваемой суспензии все время в процессе титрования (обычно около 10 ч). После установления постоянного pH добавляли в суспензию порции титранта 0,15–1 мл микропипеткой и дополнительно контролировали взвешиванием с максимальной погрешностью ± 0,4 мг. Следующую порцию титранта вводили в ячейку для титрования после установления постоянного значения pH, изменяющегося не более чем на 0,01 единицы в течение последующих 5 мин. В это время из ячейки отбирали пробу раствора объемом 0,15 мл (контроль по массе), которую переносили в мерную колбу, подкисляли азотной кислотой для растворения возможных осадков, разбавляли и отдавали на определение концентрации двухвалентного иона на спектрометре с индуктивно связанной плазмой. По окончании титрования суспензии проводили ее обратное титрование раствором HCl. В процессе всего эксперимента ячейка для титрования была герметично закрыта для предотвращения поглощения углекислого газа из воздуха. Небольшое отверстие для введения порции титранта и отбора пробы раствора для анализа открывали на несколько секунд для выполнения этих операций. Общее изменение объема раствора при этих операциях могло составить до 2 % объема раствора и в дальнейших расчетах не учитывалось.

Результаты и их обсуждение. Кривые титрования системы «H^+/Cl^--форма слабоосновного ионита–KCl–HCl–$MeCl_2$» представлены на рис. 1, 2. Оба ионита содержат два типа функциональных групп, способных к взаимодействию с ионами переходных металлов за счет образования ион-полимерных комплексов – COOH и R^+Cl^- с их депротонизованными формами. Сорбция ионов Me^{2+} начинается в сильнокислой среде и прогрессивно увеличивается с ростом pH. Кальций, не образующий прочных комплексов с аммиаком и аминами, поглощается исключительно за счет ионного обмена на карбоксилатных группах. Это же происходит, начиная с pH 3, со всеми двухвалентными катионами. При увеличении pH ионы переходных металлов сорбируются ионитами за счет образования комплексов с участием аминогрупп с различной степенью замещенности, в которых в качестве лигандов выступают также молекулы воды и карбоксилатные группы.

Примечательно, что сорбция ионов переходных металлов продолжает расти с увеличением pH после достижения критических pH осадкообразования, а максимальные значения сорбции

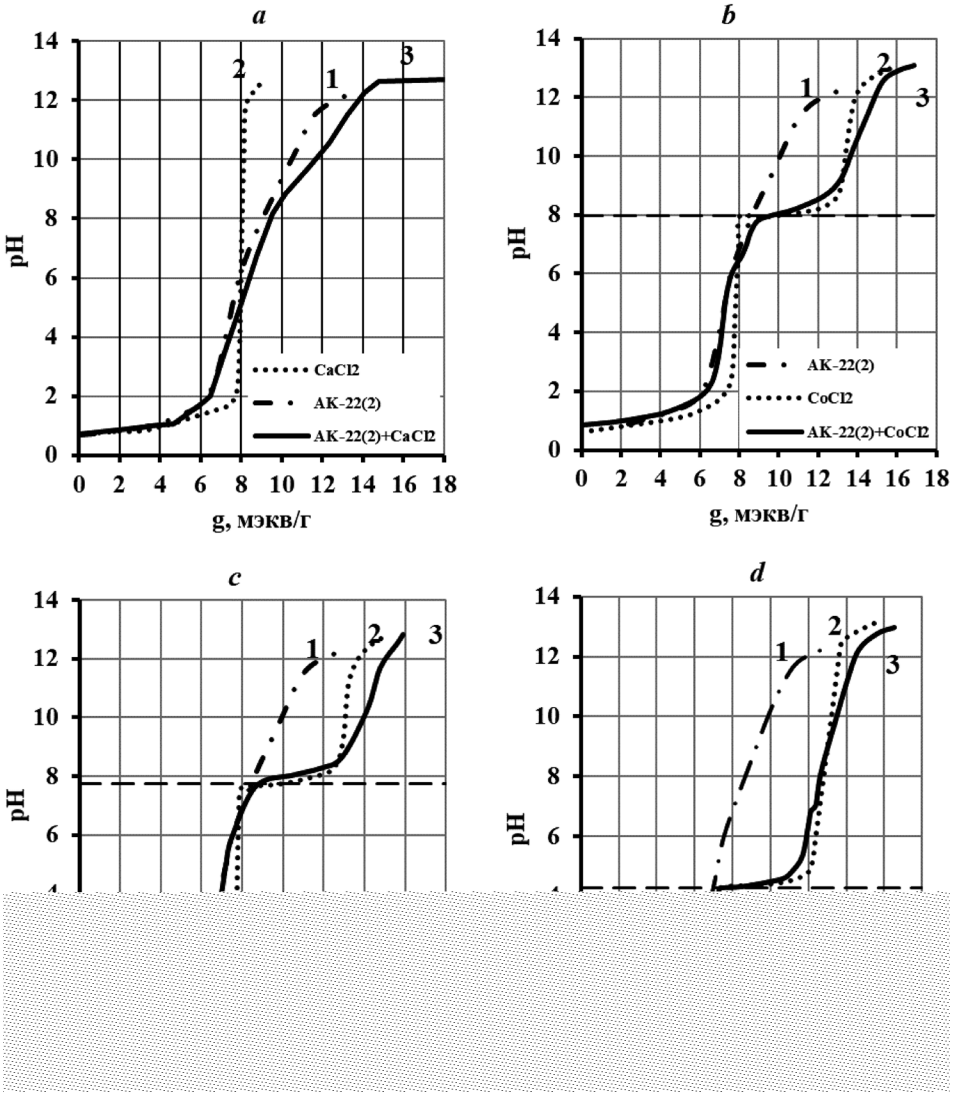


Рис. 1. Кривые титрования КОН системы: H^+/Cl^--форма ионита АК-22(2)–1 М KCl–HCl (стартовый pH 0,85)–$MeCl_2$. Кривая *1* – $MeCl_2$ отсутствует; *2* – ионит отсутствует; *3* – присутствуют все компоненты. Стартовое количество двухвалентных ионов в системе (мэкв/г ионита): *a* – Ca^{2+} 6,5613, *b* – Co^{2+} 5,5595, *c* – Ni^{2+} 5,0981, *d* – Cu^{2+} 5,6332. Горизонтальной чертой указано pH образования осадка

Fig. 1. Titration curves by KOH of the system: H^+/Cl^--form of the ion exchanger AK-22(2)–1 M KCl–HCl (starting pH 0.85)–$MeCl_2$. Curve *1* – $MeCl_2$ is absent; *2* – the ion exchanger is absent; *3* – all components are present. The starting amount of divalent ions in the system (m-eq/g of ion exchanger): *a* – Ca^{2+} 6.5613, *b* – Co^{2+} 5.5595, *c* – Ni^{2+} 5.0981, *d* – Cu^{2+} 5.6332. The horizontal line indicates the pH of the precipitate formation

достигаются при pH на несколько единиц выше этой величины (рис. 3, 4), что находится в соответствии с данными работы [16]. Показано, что структура металл-полимерных комплексов ионитов с амидоаминными группами может резко меняться в щелочной среде с образованием значительно более прочного комплекса.

Структура полимерных комплексов металлов в рассматриваемых ионитах известна только в общих чертах. Считается, что лигандами полиаминных комплексов металла являются атомы азота, образующие координационные связи с центральным атомом. Это следует из известных представлений химии комплексных соединений и не вызывает сомнений [17]. Однако не ясно, какие другие атомные группировки и (или) молекулы заполняют остальные позиции координационной сферы, а также не известно и зарядовое состояние центрального атома и лигандов, прочность, длина связей, степень ковалентности и взаимное расположение лигандов в таких комплексах. Методов экспериментального исследования, позволяющих однозначно ответить

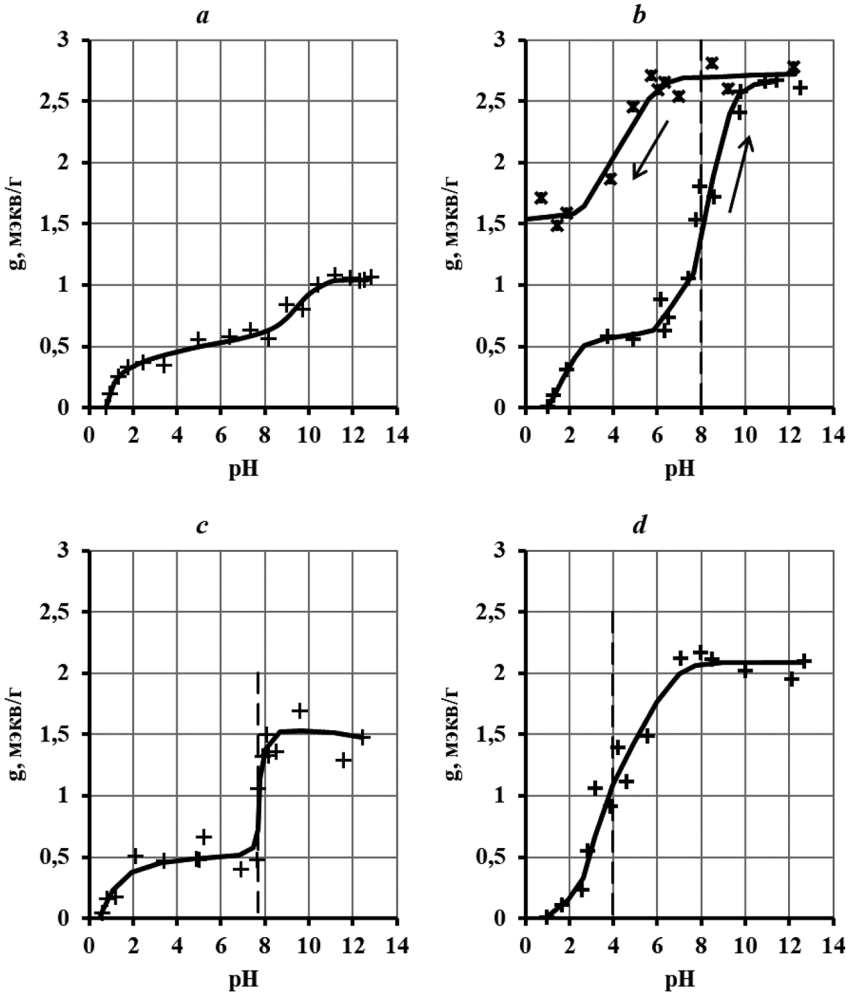


Рис. 3. Сорбция ионов металлов (*g*, мэкв/г) при потенциометрическом титровании ионита АК-22(2) в зависимости от pH раствора. Стартовое количество двухвалентных ионов в системе (мэкв/г ионита): *a* – Ca^{2+} 6,5613, *b* – Co^{2+} 5,5595, *c* – Ni^{2+} 5,0981, *d* – Cu^{2+} 5,6332. Вертикальными линиями обозначена граница pH осадкообразования

Fig. 3. Sorption of metal ions (*g*, meq/g) during potentiometric titration of ion exchanger AK-22(2) depending on the pH of the solution. The starting amount of divalent ions in the system (meq/g of ion exchanger): *a* – Ca^{2+} 6.5613, *b* – Co^{2+} 5.5595, *c* – Ni^{2+} 5.0981, *d* – Cu^{2+} 5.6332. The vertical lines indicate the pH limit of sedimentation

в сорбционном комплексе лигандов, принадлежащих различным функциональным группам, разное координационное число катионов. Кривые прямого и обратного титрования практически совпадают, что свидетельствует о равновесности процесса в каждой точке кривых. Исключение составляют системы с хлоридом кобальта.

Особенностью этой системы является то, что ион двухвалентного кобальта в составе комплексов различных типов легко окисляется, превращаясь в трехвалентный Co^{3+} [17], который образует более прочные комплексы с аминогруппами ионита. Процесс окисления интенсивно проходит в щелочной среде, поэтому при обратном титровании большая часть кобальта не вымывается соляной кислотой из ионита и его сорбция становится практически необратимой. Не совпадают также и кривые прямого и обратного титрования (см. направление стрелок на рис. 3, *b* и 4, *b*). Этого явления не наблюдается при сорбции Co^{2+} хелатообразующим ионитом Фибан Х-1, формирующим более стабильные комплексы с карбоксилатными группами и третичным атомом азота аминодиацететной группы [11].

Для иона никеля наблюдается сравнительно низкая максимальная сорбция на ионите АК-22(2) и наивысшая сорбция на АК-22(3). Возможно, это связано с тем, что этот ион имеет наивысшее координационное число и для его прочного связывания необходимо большее число лигандов, чем содержится в функциональной группе ионита АК-22(2).

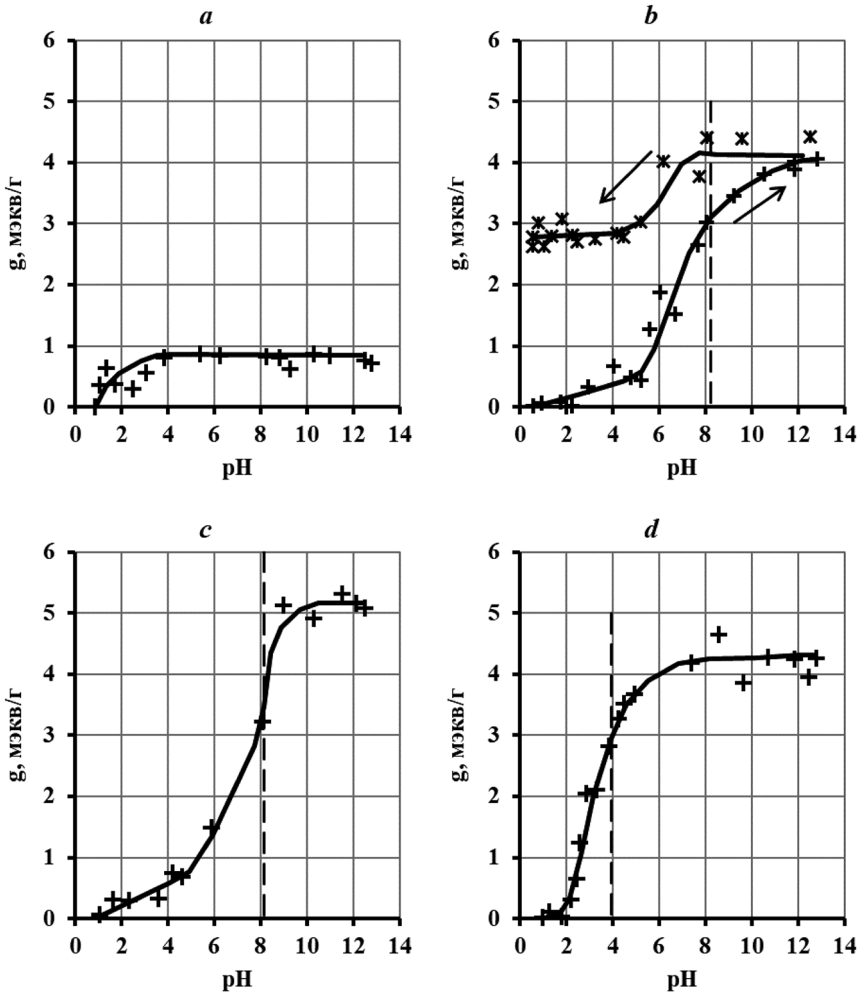


Рис. 4. Сорбция ионов металлов (*g*, мэкв/г) при потенциометрическом титровании ионита АК-22(3) в зависимости от pH раствора. Стартовое количество двухвалентных ионов в системе (мэкв/г ионита): *a* – Ca^{2+} 6,8446, *b* – Co^{2+} 6,4383, *c* – Ni^{2+} 6,4023, *d* – Cu^{2+} 5,5050. Вертикальными линиями обозначена граница pH осадкообразования

Fig. 4. Sorption of metal ions (*g*, meq/g) during potentiometric titration of ion exchanger AK-22(3) depending on the pH of the solution. The starting amount of divalent ions in the system (meq/g of ion exchanger): *a* – Ca^{2+} 6.8446, *b* – Co^{2+} 6.4383, *c* – Ni^{2+} 6.4023, *d* – Cu^{2+} 5.5050. The vertical lines indicate the pH limit of sedimentation

Особое место занимают ионы меди как при взаимодействии с ионитами АК-22(2) и АК-22(3), так и с хелатным сорбентом, описанным ранее [11]. Ионы меди интенсивно поглощаются уже при pH 4. После первого плато поглощения Cu^{2+} при pH 4,2, соответствующему окончанию образования осадка, повышение pH приводит к новому увеличению сорбции за счет растворения осадка из-за ионизации карбоксильных групп при росте pH и дальнейшего поглощения ими ионов. Новое плато образуется при pH около 8, так же как и в случае Ni^{2+}, когда большая часть карбоксильных групп ионизирована. В условиях данного эксперимента увеличение сорбции металлических ионов происходит при уменьшении их концентрации в растворе. Это происходит из-за того, что поглощение ионов Me^{2+} возможно только на ионизированных карбоксильных группах, заряд которых в отсутствие ионов Me^{2+} компенсируется фоновыми ионами K^+ и депротонированными аминогруппами.

Заключение. Волокнистые иониты с амидоаминными группами, содержащие полиаминные радикалы, являются эффективными сорбентами двухвалентных ионов переходных металлов (Cu^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}), не уступающими по сорбционной емкости хелатирующим сорбентам. Сорбция металлических двухзарядных ионов в большинстве случаев обратима, а кривые прямого и обратного титрования систем типа (H^+/Cl^--форма ионита АК-22)–(KCl)–(KOH/HCl)–($MeCl_2$) совпадают, несмотря на то, что они включают процессы образования и растворения осадков гидроксидов.

Исключением является система с ионом Co^{2+}, что связано с его окислением в щелочной среде с переходом в трехвалентное состояние. Эффективность исследованных ионитов возрастает с увеличением числа аминных фрагментов в функциональной группе. Сорбционная емкость ионита с функциональной группой, содержащей четыре атома азота, более чем вдвое превосходит емкость ионита, который содержит три атома азота в группе. Такие иониты могут быть использованы как носители микроэлементов при выращивании растений, в процессах очистки воды от ионов переходных металлов, их предконцентрирования при количественном определении в природных и сточных водах.

Список использованных источников

1. Синтез аминокарбоксильных ионитов на основе полиакрилонитрильного волокна / И. О. Мельников [и др.] // Вода: химия и экология. – 2015. – № 6. – С. 29–38.

2. Солдатов, В. С. Новые фильтрационные материалы для очистки воздуха в электронной промышленности / В. С. Солдатов, Е. Г. Косандрович // New Electrical and Electronic Technologies and their Industrial Implementation: Proc. of the 5th International conference (NEET-2007), Zakopane, Poland, 12–15 June, 2007. – Zakopane, 2007. – С. 55.

3. Общеобменная вентиляция с рециркуляционной очисткой воздуха в животноводческих помещениях / В. Н. Гутман [и др.] // Механизация и электрификация сельского хозяйства: Межведом. темат. сб. – 2009. – Вып. 43, № 2. – С. 80–88.

4. Салдадзе, К. М. Комплексообразующие иониты / К. М. Салдадзе, В. Д. Копылова-Валова. – М.: Химия, 1980. – 335 с.

5. Мясоедова, Г. В. Применение комплексообразующих сорбентов ПОЛИОРГС в неорганическом анализе / Г. В. Мясоедова // Журн. аналит. химии. – 1990. – Т. 45, № 10. – С. 1878–1887.

6. Исследование сорбции некоторых металлов на синтезированных комплексообразующих ионитах / Ф. Б. Эшкурбонов [и др.] // Высокомол. соед. – 2015. – Т. 58, № 10. – С. 85–89.

7. Челнакова, П. Н. Определение устойчивости ионитных комплексов при сорбции катионов меди слабоосновным анионитом АМ-7 / П. Н. Челнакова, В. А. Колодяжный, Е. С. Волкова // Журн. физ. химии. – 2008. – Т. 82, № 12. – С. 2353–2357.

8. Soldatov, V. S. Synthesis, structure and properties of new fibrous ion exchangers / V. S. Soldatov, A. A. Shunkevich, G. I. Sergeev // Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents. – 1988. – Vol. 7, N 1-2. – P. 159–172. https://doi.org/10.1016/0167-6989(88)90136-5

9. Сорбция никеля (II) и кобальта (II) из аммонийных растворов волокнистым ионитом с иминодиацетатными группами / В. С. Солдатов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2010. – № 3. – С. 64–69.

10. Селективное выделение меди и цинка из модельных растворов шахтных вод волокнистыми ионитами / В. С. Солдатов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2011. – № 2. – С. 41–45.

11. Титрование хелатообразующего волокнистого сорбента в присутствии комплекс-образующих двухвалентных катионов / В. С. Солдатов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 3. – С. 263–269. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-3-263-269

12. Polymer supported inorganic nanoparticles: characterization and environmental applications / L. Cumbel [et al.] // Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents. – 2003. – Vol. 54, N 1–3. – P. 167–180. https://doi.org/10.1016/s1381-5148(02)00192-x

13. A new hybrid (polymer/inorganic) fibrous sorbent for arsenic removal from drinking water / O. M. Vatutsina [et al.] // Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents. – 2007. – Vol. 67, N 3. – P. 184–201. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2006.10.009

14. Kosandrovich, E. G. Fibrous ion exchangers / E. G. Kosandrovich, V. S. Soldatov // Ion exchange technology I: theory and materials / Inamuddin Dr. Mohammad Luqman (eds.). – UK: Springer, 2012. – P. 299–371. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1700-8_9

15. Soldatov, V. S. Acid-base properties of ion exchangers. II. Determination of the acidity parameters of ion exchangers with arbitrary functionality / V. S. Soldatov, Z. I. Sosinovich, T. V. Mironova // Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents. – 2004. – Vol. 58. – N 1. – P. 13–26. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2003.11.004

16. Зеленковский, В. М. Компьютерное моделирование структуры полимерных ионитов: дис. ... д-ра хим. наук: 02.00.04 / В. М. Зеленковский. – Минск, 2012. – 327 л.

17. Бьеррум, Я. Образование аминов металлов в водном растворе: теория обратимых ступенчатых реакций / Я. Бьеррум; пер. с англ. Г. Ф. Губской, Г. С. Терешина; под ред. И. В. Тананаева. – М.: Ин. лит-ра, 1961. – 308 с.

References

1. Mel'nikov I. O., Podobedov R. E., Kosandrovich E. G., Korshunova T. A., Soldatov V. S. Synthesis of aminocarboxylic ion exchangers based on polyacrilonitrile fiber. *Voda: khimiya i ecologiya = Water: chemistry and ecology*, 2015, no. 6, pp. 29–38 (in Russian).

2. Soldatov V. S., Kosandrovich E. G. New filtering materials for air purification in the electronic industry. *Proc. of the 5th International conference "New Electrical and Electronic Technologies and their Industrial Implementation" (NEET-2007), Zakopane, Poland, 12-15 June, 2007.* Zakopane, 2007, pp. 55 (in Russian).

3. Gutman V. N., Shevchuk I. O., Rapovich S. P., Pulaeva I. V. General exchange ventilation with recirculated air purification in livestock buildings. *Mezhvedomstvennyi tematicheskii sbornik "Mekhanizatsiya i electrifikatsiya selskogo khozaistva"* [Mechanization and electrification of agriculture: Interdepartmental thematic collection], 2009, iss. 43, no. 2, pp. 80–88 (in Russian).

4. Saldadze K. M., Kopylova-Valova V. D. Complexing ion exchangers. Moscow, Khimiya Publ., 1980. 335 p. (in Russian).

5. Myasoedova G. V. The use of complexing sorbents POLIORGS in inorganic analysis. *Zhurnal analiticheskoy khimii = Journal of analytical chemistry*, 1990, vol. 45, no. 10, pp. 1878–1887 (in Russian).

6. Eshkurbonov F. B., Turaev Kh. Kh., Amonova N. D., Abdurakhmonova N. Kh., Djalilov A. T. Investigation of the sorption of some metals on synthesized complexing ion exchangers. *Vysokomolekularnye soedineniya = Polymer science*, 2015, vol. 58, no. 10, pp. 85–89 (in Russian).

7. Chelnakova P. N., Kolodyazhnyi V. A., Volkova E. S. The estimation of the stability of ionite complexes formed in the sorption of copper cations by weakly alkaline AM-7anionite. *Russian journal of Physical Chemistry A*, 2008, vol. 82, no. 12, pp. 2122–2125. https://doi.org/10.1134/s0036024408120261

8. Soldatov V. S., Shunkevich A. A., Sergeev G. I. Synthesis, structure and properties of new fibrous ion exchangers. *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents*, 1988, vol. 7, no. 1-2, pp. 159–172. https://doi.org/10.1016/0167-6989(88)90136-5

9. Soldatov V. S., Zelenkovskii V. M., Mosunova N. V., Sosinovich Z. I. Sorption of nickel (II) and cobalt (II) from ammonium solutions by fibrous ion exchanger with iminodiacetate groups. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2010, no. 3, pp. 64–69 (in Russian).

10. Soldatov V. S., Zelenkovsky V. M., Sosinovich Z. I., Mosunova N. V., Sokol V. P. Selective isolation of copper and zinc from model solutions of mine waters by fibrous ion exchangers. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2011, no. 2, pp. 41–45 (in Russian).

11. Soldatov V. S., Korshunova T. A., Kosandrovich E. G., Nesteronok P. V. Titration of chelating fibrous sorbent in the presence of complex-forming divalent cations. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2021, vol. 57, no. 3, pp. 263–269 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-3-263-269

12. Cumbel L., Greenleaf J., Leun D., SenGupta A. Polymer supported inorganic nanoparticles: characterization and environmental applications. *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents*, 2003, vol. 54, no. 1–3, pp. 167–180. https://doi.org/10.1016/s1381-5148(02)00192-x

13. Vatutsina O. M., Soldatov V. S., Sokolova V. I., Johann J., Bissen M., Weissenbacher A. A new hybrid (polymer/inorganic) fibrous sorbent for arsenic removal from drinking water. *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents,* 2007, vol. 67, no. 1–3, pp. 184–201. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2006.10.009

14. Kosandrovich E. G., Soldatov V. S. Fibrous ion exchangers. Inamuddin Dr. Mohammad Luqman (eds.). *Ion exchange technology I: theory and materials.* UK: Springer, 2012, pp. 299–371. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1700-8_9

15. Soldatov V. S., Sosinovich Z. I., Mironova T. V. Acid-base properties of ion exchangers. II. Determination of the acidity parameters of ion exchangers with arbitrary functionality. *Reactive Polymers, Ion Exchangers, Sorbents,* 2004, vol. 58, no. 1, pp. 13–26. https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2003.11.004

16. Zelenkovskiy V. M. *Computer modelling of structure of polymeric ion exchanger.* Minsk, 2012. 327 p. (in Russian).

17. Bjerrum J. *Metal ammine formation in aqueous solution: theory of the reversible step reaction*. Copenhagen, P. Haase Publ., 1957. 296 p.

Информация об авторах

Солдатов Владимир Сергеевич – академик, д-р хим. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: soldatov@ifoch.bas-net.by

Шаченкова Лариса Николаевна – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sln13102005@mail.ru

Косандрович Евгений Генрихович – д-р хим. наук, доцент, зав. лаб. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kosandrovich@ifoch.bas-net.by

Нестеронок Петр Викторович – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: petr.nester@gmail.com

Information about the authors

Vladimir S. Soldatov – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Chief Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus. (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: soldatov@ifoch.bas-net.by

Larisa N. Shachenkova – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sln13102005@mail.ru

Evgenii G. Kasandrovich – D. Sc. (Chemistry), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kosandrovich@ifoch.bas-net.by

Petr V. Nesteronok – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: petr.nester@gmail.com

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 574:539.1.04
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-400-407

Поступила в редакцию 02.09.2021
Received 02.09.2021

Е. А. Дикусар[1], А. Л. Пушкарчук[1], Т. В. Безъязычная[1], Е. А. Акишина[1], А. Г. Солдатов[2], С. А. Кутень[3], С. Г. Стёпин[4], А. П. Низовцев[5], С. Я. Килин[5], В. И. Поткин[1]

[1]Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Научно-практический центр по материаловедению Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
[3] Институт ядерных проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь
[4]Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь
[5]Институт физики им. Б. И. Степанова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ КОРТИЗОН-ФУЛЛЕРЕНОЛОВЫХ АГЕНТОВ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Аннотация. С целью терапевтического уничтожения онкологических новообразований обычно применяют химиотерапию или лучевую, а в изотопной медицине – вводят в опухоль соответствующие короткоживущие радионуклиды (^{59}Fe, ^{90}Y, ^{95}Zr, ^{99m}Tc, ^{106}Ru, ^{114*}In, ^{147}Eu, ^{148}Eu, ^{155}Eu, ^{170}Tm, ^{188}Re, ^{210}Po, ^{222}Rn, ^{230}U, ^{237}Pu, ^{240}Cm, ^{241}Cm, ^{253}Es). Бинарная (или нейтронозахватная) – технология, разработанная для избирательного воздействия на злокачественные новообразования и использующая тропные к опухолям препараты, содержащие нерадиоактивные нуклиды (^{10}B, ^{113}Cd, ^{157}Gd и др.). Триадная – последовательное введение в организм комбинации из двух и более по отдельности неактивных и безвредных компонентов, тропных к опухолевым тканям и способных в них селективно накапливаться или вступать друг с другом в химическое взаимодействие и уничтожать опухолевые новообразования под действием определенных сенсибилизирующих внешних воздействий. В настоящей работе проведены квантово-химическое моделирование электронной структуры и анализ термодинамической устойчивости новых кортизон-фуллереноловых агентов терапии опухолевых новообразований. Необходимость предварительных исследований по моделированию такого рода объектов обусловлена очень высокой трудоемкостью, стоимостью и сложностью их практического получения.

Ключевые слова: DFT-моделирование электронной структуры, кортизон, фуллереноловые кластеры, агенты терапии опухолевых новообразований

Для цитирования. Квантово-химическое моделирование кортизон-фуллереноловых агентов терапии онкологических заболеваний / Е. А. Дикусар [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 400–407. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-400-407

E. A. Dikusar[1], A. L. Pushkarchuk[1], T. V. Bezyazychnaya[1], E. A. Akishina[1], A. G. Soldatov[2], S. A. Kuten[3], S. G. Stepin[4], A. P. Nizovtsev[5], S. Ya. Kilin[5], V. I. Potkin[1]

[1]Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2]Scientific-Practical Materials Research Centre of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[3]Institute for Nuclear Problem of the Belarusian State University, Minsk, Belarus
[4]Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus
[5]B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

QUANTUM-CHEMICAL MODELING OF CORTISONE-FULLERENOL AGENTS OF CANCER THERAPY

Abstract. In order to therapeutically destroy oncological neoplasms, chemotherapy or radiotherapy is usually applied, and in isotope medicine – short-lived radio nuclides are injected into the tumor (^{59}Fe, ^{90}Y, ^{95}Zr, ^{99m}Tc, ^{106}Ru, ^{114*}In, ^{147}Eu, ^{148}Eu, ^{155}Eu, ^{170}Tm, ^{188}Re, ^{210}Po, ^{222}Rn, ^{230}U, ^{237}Pu, ^{240}Cm, ^{241}Cm, ^{253}Es). Binary (or neutron capture) therapy is a technology developed for the selective effect on malignant tumors using drugs that are tropic to tumors and contain non-radioactive nuclides (^{10}B, ^{113}Cd, ^{157}Gd at al.). Triadic therapy involves the sequential introduction into the body of a combination of two or more separately inactive and harmless components, which are tropic to tumor tissues and capable of selectively accumulating in them or chemically interacting with each other and destroying tumor neoplasms under the action of certain sensitizing external influences. The aim of this work is quantum-chemical simulation of the electronic structure and analysis of the thermodynamic

stability of new cortisone-fullerenol agents for the treatment of tumor neoplasms. The need for preliminary studies of modeling such objects is due to the very high labor intensity, cost and complexity of their practical production.

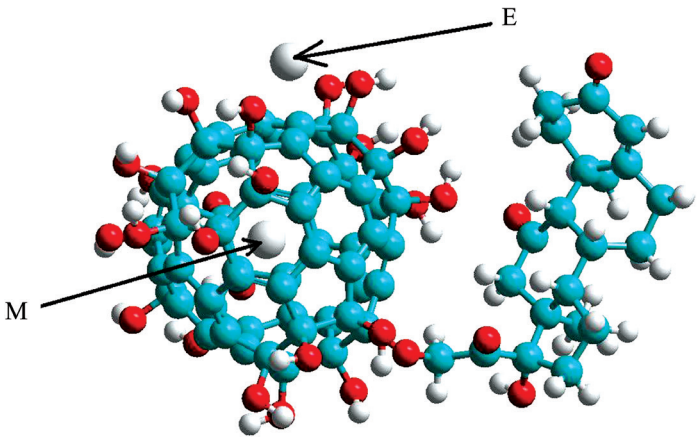
Key words: DFT-modeling of electronic structure, cortisone, fullerenol clusters, agents for the treatment of tumor neoplasms

For citation. Dikusar E. A., Pushkarchuk A. L., Bezyazychnaya T. V., Akishina E. A., Soldatov A. G., Kuten S. A., Stepin S. G., Nizovtsev A. P., Kilin S. Ya., Potkin V. I. Quantum-chemical modeling of cortisone-fullerenol agents of cancer therapy. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 400–407 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-400-407

Введение. С целью терапевтического уничтожения онкологических новообразований обычно применяют химиотерапию или лучевую [1], а в изотопной медицине – вводят в опухоль соответствующие короткоживущие радионуклиды (^{59}Fe, ^{90}Y, ^{95}Zr, ^{99m}Tc, ^{106}Ru, ^{114*}In, ^{147}Eu, ^{148}Eu, ^{155}Eu, ^{170}Tm, ^{188}Re, ^{210}Po, ^{222}Rn, ^{230}U, ^{237}Pu, ^{240}Cm, ^{241}Cm, ^{253}Es). Бинарная (или нейтронозахватная) технология разработана для избирательного воздействия на злокачественные новообразования, использующая тропные к опухолям препараты, содержащие нерадиоактивные нуклиды (^{10}B, ^{113}Cd, ^{157}Gd и др.) [2]. Триадная технология – последовательное введение в организм комбинации из двух и более по отдельности неактивных и безвредных компонентов, тропных к опухолевым тканям и способных в них селективно накапливаться или вступать друг с другом в химическое взаимодействие, уничтожать опухолевые новообразования под действием определенных сенсибилизирующих внешних воздействий [3].

Ранее нами были представлены данные по квантово-химическому моделированию строения и электронной структуры эндоэдрических метотрексат-фуллереноловых кластеров [4]. Необходимость предварительного моделирования такого рода объектов (рис. 1) обусловлена очень высокой трудоемкостью и сложностью их получения. В настоящей работе проведены неэмпирические квантово-химические расчеты ряда потенциальных агентов диагностики и терапии онкологических заболеваний – производных фуллеренола C_{60} [5].

Материалы и методы. Расчеты соединений произведены с использованием уровня теории DFT/BP86/RI/def2-SVP/def2/J/D3 с применением программного пакета ORCA [6]. Для моделирования присутствия растворителя (воды) использовалось приближение «The conductor-like polarizable continuum model» (CPCMC), которое является удобным способом учета эффектов растворителя в квантово-химических расчетах. Растворитель представляет собой диэлектрическую поляризуемую сплошную среду, а растворенное вещество помещается в полость приблизительно молекулярной формы, межмолекулярное взаимодействие учитывалось с помощью D3 дисперсионной поправки Гримме (Grimme) [7–9].



E и M отсутствуют **1**; E = He, M отсутствует **3**; E отсутствует, M = He **4**; E = M = He **5;**
E = Rn, M отсутствует **7**; E отсутствует, M = Rn **8**; E = M = Rn **9**;
E = Na, M = Cl **12**; E = Cl, M = Na **13**; E = K, M = Br **14**; E = Br, M = K **15**

Рис. 1. Модель строения кортизон-фуллереноловых кластеров **3–5, 7–9, 12–15**

Fig. 1. Structure model of cortisone-fullerenol clusters **3–5, 7–9, 12–15**

Для повышения эффективности данных препаратов перспективным является введение в состав их молекул структурных фрагментов известных лекарственных форм, например стероидных гормонов [10]. Поэтому представлены результаты квантово-химического моделирования строения и электронной структуры эндоэдрических кортизон-фуллереноловых кластеров (рис. 1). Кортизон относится к глюкокортикоидным гормонам коры надпочечников. У животных и у человека в небольшом количестве секретируется надпочечниками в кровь. К функциям относится стимуляция синтеза углеводов из белков, угнетение лимфоидных органов, изменение метаболизма и повышение устойчивости организма к стрессу [11].

В качестве эндоэдрических компонентов включения во внутренние сферы кортизон-фуллереноловых кластеров **1** (E и M отсутствуют) были выбраны: He **2** (кластеры: E = He, M отсутствует **3**; E отсутствует, M = He **4**; E = M = He **5**) ^{222}Rn **6** (кластеры: E = Rn, M отсутствует **7**; E отсутствует, M = Rn **8**; E = M = Rn **9**) и галогениды щелочных металлов (E и M) – NaCl **10**, KBr **11** (кластеры E = Na, M = Cl **12**; E = Cl, M = Na **13**; E = K, M = Br **14**; E = Br, M = K **15**). Выбор именно этих супрамолекулярных объектов включения во внутренние полости фуллеренола **1** обусловлены тем, что радионуклид ^{222}Rn **6** – удобный источник терапевтического ионизирующего α-излучения, а He **2** – удобный инертный модельный объект сравнения. В частности, радон ^{222}Rn **6** имеет период полураспада 3,82 сут с выделением энергии 5,59 МэВ [12−15]. Введение одного из ионов от NaCl **10**, KBr **11** во внутренние полости фуллеренола **1** приводит к существенному увеличению полярности образующихся эндоэдрических кластерных систем **12−15** (табл. 1), что является определяющим фактором, облегчающим их проникновение через клеточные мембраны. Этот транспорт осуществляется при помощи особых транспортных молекул, встроенных в мембраны клеток. Обычно в роли такого рода переносчиков выступают белки, которые необходимы для поступления в клетку естественных метаболитов. Данным видом транспорта могут переноситься лекарственные вещества близкие по структуре к эндогенным молекулам, например, витамины, лекарственные соединения [16] или стероидные гормоны [17, 18].

Таблица 1. **Полные энергии систем (*E*, а.е.), энергии ВЗМО (eV) и НВМО (eV) и дипольные моменты (*D*, Дб) соединений 1–15, вычисленные в вакууме и в водной среде**

Table 1. **Total systems energies (*E*, a.u.), HOMO (eV) and LUMO (eV) energies and dipole moments (*D*, Debye) of compounds 1–15 calculated in vacuum and in aqueous medium**

Номер образца	*E*, а.е.	ВЗМО, eV	НВМО, eV	*D*	Номер образца	*E*, а.е.	ВЗМО, eV	НВМО, eV	*D*
В вакууме					*В воде*				
1	−5219,07402666	−5,506	−3,938	9,29	**1**	−5219,14643052	−5,257	−3,483	15,11
2	−2,89831861	−15,549	29,127	0	**2**	−2,89831863	−15,546	29,130	0
3	−5221,93968491	−5,160	−3,607	11,07	**3**	−5222,01911586	−5,214	−3,480	19,87
4	−5221,97101629	−5,260	−3,600	9,31	**4**	−5222,04227484	−5,306	−3,521	15,32
5	−5224,87279648	−5,308	−3,664	8,92	**5**	−5224,94537255	−5,291	−3,501	14,09
6	−288,79669325	−7,854	−0,696	0	**6**	−288,79677397	−7,696	−0,582	0
7	−5507,91134423	–5,288	–3,584	5,09	**7**	–5508.03608603	–5,323	–3,437	7,03
8	−5507,90628875	−5,287	−3,606	9,68	**8**	−5507,97269744	−5,383	−3,596	15,73
9	−5796,77755374	−5,315	−3,619	10,14	**9**	−5796,84333372	−5,378	−3,587	15,82
10	−622,40545322	−4,870	−1,914	7,92	**10**	−622,46027280	−5,439	−0,219	10,23
11	−3174,09336510	−4,335	−1,680	9,98	**11**	−3174,14499324	−5,333	−0,437	13,41
12	−5841,50428089	−4,532	−3,124	10,03	**12**	−5841,60092630	−4,604	−3,175	16,55
13	−5841,46412512	−5,443	−4,080	15,59	**13**	−5841,55994503	−5,506	−3,784	26,91
14	−8393,18927889	−4,516	−3,035	10,43	**14**	−8393,26734584	−4,604	−3,139	16,12
15	−8393,17130445	−5,018	−4,096	15,13	**15**	−8393,25504029	−5,462	−3,897	27,15
16	−1192,31715469	−5,162	−2,276	6,24	**16**	−1192,34965069	−5,473	−2,400	8,80
17	−4103,14701248	−5,421	−3,568	2,17	**17**	−4103,20054563	−5,308	−3,409	3,91
18	−76,36045574	−6,320	0,815	1,97	**18**	−76,37060357	−6,391	1,340	2,28

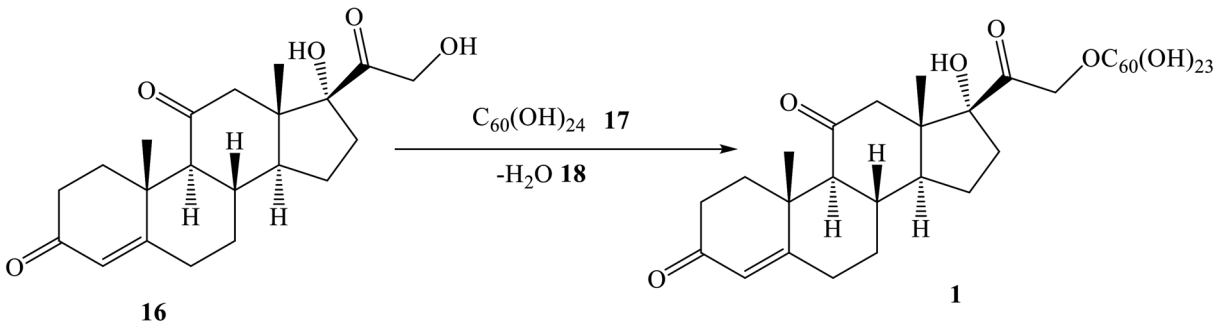


Рис. 2. Схема построения кластера (8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*R*)-17-гидрокси-17-(2-фуллеренол[$C_{60}(OH)_{23}$]оксиацетил)-10,13-диметил-1,2,6,7,8,9,12,14,15,16-декагидроциклопента[*a*]фенантрен-3,11-диона) **1**

Fig. 2. Construction scheme of (8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*R*)-17-hydroxy-17-(2-fullerenol[$C_{60}(OH)_{23}$]oxyacetyl)-10,13-dimethyl-1,2,6,7,8,9,12,14,15,16-decahydrocyclopenta[*a*]phenanthrene-3,11-dione) **1** cluster

Результаты и их обсуждение. Было проведено квантово-химическое моделирование процесса построения кластера $C_{81}H_{50}O_{28}$ [$C_{60}(OH)_{23}OC_{21}H_{27}O_5$, (8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*R*)-17-гидрокси-17-(2-фуллеренол[$C_{60}(OH)_{23}$]оксиацетил)-10,13-диметил-1,2,6,7,8,9,12,14,15,16-декагидроциклопента[*a*]фенантрен-3,11-диона)] **1** исходя из кортизона (8*S*,9*S*,10*R*,13*S*,14*S*,17*R*)-17-гидрокси-17-(2-гидроксиацетил)-10,13-диметил-1,2,6,7,8,9,12,14,15,16-декагидроциклопента[*a*]фенантрен-3,11-дион) $C_{21}H_{28}O_5$ **16** и симметричного фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ **17** (рис. 2).

Различают две разновидности транспорта при помощи переносчиков: облегченная диффузия – осуществляется по градиенту концентрации и активный транспорт – осуществляется против градиента концентрации [19]. Специализированный транспорт не подчиняется закону диффузии Фика и не зависит от наличия заряда у лекарственного вещества. Он является насыщаемым процессом, т. е. скорость абсорбции увеличивается лишь до тех пор, пока количество молекул лекарственного вещества не сравняется с количеством переносчиков. Дальнейшего роста скорости абсорбции, несмотря на повышение концентрации лекарственного препарата, при этом не происходит [20, 21].

В настоящее время является перспективным изучение методом квантово-химического моделирования возможности нанокапсулирования радионуклидов (^{8}Li, ^{21}Na, ^{22}Na, ^{24}Na, ^{25}Na, ^{37}K, ^{40}K, ^{47}K, ^{79}Rb, ^{81}Rb, ^{87}Rb, ^{97}Rb, ^{112}Cs, ^{133}Cs, ^{135}Cs, ^{137}Cs, ^{151}Cs, ^{223}Fr) и (^{18}F, ^{36}Cl, ^{38}Cl, ^{80m}Br, ^{80}Br, ^{81}Br, ^{125}I, ^{128}I, ^{131}I, ^{211}At, ^{218}At, ^{219}At) [22] во внутренние полости фуллеренола **1**. В качестве примера актуальности этих исследований можно привести тот факт, что ^{211}At превосходит радиоактивный йод по своему разрушающему воздействию на опухоль щитовидной железы, что обусловлено локализованным действием излучаемых α-частиц с энергией 5,9 МэВ на расстоянии порядка 70 мкм в живых тканях, в то время как наименее активное β-излучение радиоактивного йода действует на расстоянии до 2000 мкм [23].

Из данных квантово-химических расчетов следует (табл. 1 и 2), что энергия взаимодействия (ΔE_{Int}) кластеров (**3–5, 7–9, 12–15**), полученная по формуле [24, 25]:

$$\Delta E_{Int(\mathbf{3–5,\ 7–9,\ 12–15})} = E_{(\mathbf{3–5,\ 7–9,\ 12–15})} - [E_{(\mathbf{1})} + E_{(\mathbf{2,\ 6,\ 10,\ 11})}], \quad (1)$$

показывает их устойчивость и понижение или повышение полной энергии системы при гипотетическом «растворении» 1 или 2 грамм-атома He **2** или Rn **6**, или 1 грамм-моль соли E_1E_2 (NaCl или KBr) **10, 11** в 1 грамм-моль кортизон-фуллеренола **1**. С другой стороны, процесс формирования эндоструктур можно рассматривать как аналог процесса «сольватации» ионов щелочных металлов и галогенов для кластеров **12**–**15**, который описывается уравнением Борна–Бьеррума [26].

Результаты квантово-химических расчетов, проведенные для кластеров **3–5, 7–9, 12–15** (табл. 1 и 2, уравнение (1)), показывают, что термодинамическая устойчивость [20, 21] кортизон-фуллереноловых кластерных систем C_{60} – производных инертных газов (He, Rn), имеет довольно большой разброс значений от –289 до +86 кДж/моль в вакууме и от –271 до +67 кДж/моль в водной среде. По-видимому, такой разброс значений, особенно заметный для соединений **7–9**, содержащих Rn, обусловлен легкостью поляризации его $4f^{14}5d^{10}$-электронов и возможностью образовывать кластеры с **1**. Этот вывод следует из анализа величин энергий высших занятых

Таблица 2. **Оценка энергии взаимодействия кластеров 3−5, 7−9, 12-15 и 1 (ΔE_{Int}) в вакууме и в водной среде**

Table 2. **Estimation of the interaction energy of clusters 3−5, 7−9, 12-15 and 1 (ΔE_{Int}) in vacuum and in an aqueous medium**

Номер образца	ΔE_{Int}, а.е. (Хартри)	ΔE_{Int}, кДж/моль	Номер образца	ΔE_{Int}, а.е. (Хартри)	ΔE_{Int}, кДж/моль	Номер образца	ΔE_{Int}, а.е. (Хартри)	ΔE_{Int}, кДж/моль
В вакууме								
3	0,03266036	85,75	**4**	0,00132898	3,50	**5**	−0,0021326	−5,60
7	−0,04062432	−106,66	**8**	−0,03556884	−93,39	**9**	−0,11014058	−289,17
12	−0,02480101	−65,12	**13**	0,01535476	40,31	**14**	0,02188713	57,46
15	−0,00391269	−10,27	**1**	0,02968477	77,94			
В воде								
3	0,02563329	67,30	**4**	0,00247431	6,50	**5**	−0,00230477	−6,05
7	–0,09288154	–243,86	**8**	−0,02949295	−77,43	**9**	−0,10335526	−271,36
12	0,00577702	15,17	**13**	0,04675829	122,76	**14**	0,02407792	63,22
15	0,03638347	95,52	**1**	0,03316223	87,07			

и нижних вакантных молекулярных орбиталей (ВЗМО и НВМО, табл. 1). Их значения у соединений **1** и **6** (в отличие от атома Не **2**) достаточно близки.

Ионсодержащие кластеры **12–15** демонстрируют разброс значений ΔE_{Int} в диапазоне от –65 до +57 кДж/моль в вакууме и от +123 до +15 кДж/моль в водной среде, что в основном несколько ниже, чем устойчивость систем, состоящих из «пустых» кортизон-фуллереноловых кластеров C_{60} **1** и изолированных недиссоциированных молекул галогенидов щелочных металлов E_1E_2 **10** и **11**.

По аналогичной методике (2) был рассчитан тепловой эффект получения кластера **1** из кортизона **16** и симметричного фуллеренола **17** (рис. 2 и табл. 2):

$$\Delta E_{Int(\mathbf{1})} = [E_{(\mathbf{1})} + E_{(\mathbf{18})}] - [E_{(\mathbf{16})} + E_{(\mathbf{17})}]. \quad (2)$$

Расчеты показали, что процесс образования кортизон-фуллеренового кластера **1** из исходных компонентов практически не зависит от среды (вакуума или воды) и происходит с понижением полной энергии системы соответственно на 78 и 87 кДж/моль.

Выводы. Кортизон-фуллереновые агенты терапии онкологических заболеваний – соединения **3–5, 7–9, 12–15** могут оказаться перспективны для разработки на их основе нанокапсулированных радионуклидных радонсодержащих агентов терапии онкологических заболеваний. Из полученных данных об устойчивости исследованных методом квантово-химического DFT-моделирования кластеров можно сделать выводы о возможности их практического получения.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Государственной программы научных исследований «Конвергенция 2025».

Acknowledgments. This work was financially supported by the State Program of Scientific Research “Convergence 2025”.

Список использованных источников

1. Mayles, P. Handbook of Radiation Therapy Physics: Theory and Practice / P. Mayles, A. Nahum, J. C. Rosenwald. – Taylon & Francis, 2007. – 1450 p. https://doi.org/10.1201/9781420012026

2. Hosmane, N. S. Boron and Gadolinium Neutron Capture Therapy for Cancer Treatment / N. S. Hosmane, J. A. Maquire, Y. Zhu. –World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2012. – 300 p. https://doi.org/10.1142/8056

3. Vorst, A. V. RF/Microwave interaction with biological tissues / A. V. Vorst, A. Rosen, Y. Kotsuka. – IEEE Press, Wiley Interscience, A John Wiley &Sons., Inc., Publ., 2006. – 346 p. https://doi.org/10.1002/0471752053

4. Квантово-химическое моделирование метотрексат-фуллереноловых радионуклидных агентов терапии онкологических заболеваний / Е. А. Дикусар [и др.] // Вес. Нац. акад. нвук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2019. – Т. 55, № 2. – С. 163–170. https://doi.org/ 10.29235/1561-8331-2019-55-2-163-170

5. Противоопухолевая активность производных фуллерена и возможности их использования для адресной доставки лекарств / М. А. Орлова [и др.] // Онкогематология. – 2013. – № 2. – С. 83–92. https://doi.org/10.17650/1818-8346-2013-8-2-83-92

6. The ORCA quantum chemistry program package / F. Neese [et al.] // J. Chem. Phys. – 2020. – Vol. 152, N 22. – P. 224108(1)–224108(18). https://doi.org/10.1063/5.0004608

7. Ghosh, S. K. Concepts and Methods in Modern Theoretical Chemistry. Atoms, Molecules and Clusters / S. K. Ghosh, P. K. Chattaraj. – CRC Press, 2013. – 856 p. https://doi.org/10.1201/9780429069598

8. Tomasi, J. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models / J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi // Chem. Rev. – 2005. – Vol. 105, N 8. – P. 2999–3094. https://doi.org/10.1021/cr9904009

9. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu / S. Grimme [at al.] // J. Chem. Phys. – 2010. – Vol. 132, N 15. – P. 154104 (1)–154104 (19). https://doi.org/10.1063/1.3382344

10. Diastereoselective Synthesis of Steroid–[60]Fullerene Hybrids and Theoretical Underpinning / D. Alonso [et al.] // J. Org. Chem. – 2020. – Vol. 85, N 4. – P. 2426–2437. https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b03121

11. Физер, Л. Стероиды / Л. Физер, М. Физер. – М.: Мир, 1964. – С. 619–748.

12. Adelstein, S. J. Isotopes for Medicine and the Life Sciences / S. J. Adelstein, F. J. Manning. – Washington, DC: The National Academies Press., 1995. – 144 p. https://doi.org/10.17226/4818

13. Bergmann, H. Radioactive Isotopes in Clinical Medicine and Research / H. Bergmann, H. Sinzinger – Basel: Rirkhäuser Verlag, 1995. – 300 p. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7340-6

14. Thayer, J. S. Relativistic Effects and the Chemistry of the Heavier Main Group Elements / J. S. Thayer // Relativistic Methods of Chemists (Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics) / eds.: M. Barysz, Ya. Ishikawa – N.-Y.: Springer, 2010. – Ch. 2. – P. 63–97. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9975-5_2

15. Atomic weights of the elements. Review 2000 (IUPAC Technical Report) / J. R. de Laeter [et al.] // Pure and Appl. Chem. – 2003. – Vol. 75, N 6. – P. 683–800. https://doi.org/10.1351/pac200375060683

16. Seydel, J. K. Drug-Membrane Interactions: Analysis, Drug Distribution, Modeling / J. K. Seydel, M. Wiese. – Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, 2002. – 362 p. https://doi.org/10.1002/3527600639

17. Free Diffusion of Steroid Hormones Across Biomembranes: A Simplex Search with Implicit Solvent Model Calculations / I. Oren [et al.] // Biophys. J. – 2004. – Vol. 87, N 2. – P. 768–779. https://doi.org/10.1529/biophysj.103.035527

18. Квантово-химическое моделирование эстронсодержащих бисфуллереноловых радионуклидных агентов терапии онкологических заболеваний / Е. А. Дикусар [и др.] // Наноструктуры в конденсированных средах: сб. науч. ст. / под ред. П. А. Витязь [и др.]. – Минск: ИТМО НАН Беларуси, 2016. – С. 67–80.

19. Аномальная диффузия радионуклидов в сильно неоднородных геологических формациях / В. М. Головизнин [и др.]; под ред. Л. А. Большова; Ин-т проблем безопасного развития атомной энергетики РАН. – М.: Наука, 2010. – 342 с.

20. The Structure of Biological Membrans / ed.: P. L. Yeagle. – The 3rd ed. – CRC Press Book: Tailor and Frances Gr., 2011. – 398 p. https://doi.org/10.1201/b11018

21. Transport Across Single Biological Membranes / ed.: D. C. Tosteson. – Berlin; Heidelberg; N.-Y.: Springer-Verlag, 1979. – Vol. 2. – 444 p. https://doi.org/10.1007/978-3-642-46375-4

22. Nanotargeted Radionuclides for Cancer Nuclear Imaging and Internal Radiotherapy / G. Ting [et al.] // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2010. – Vol. 2010. – Article ID 953537. https://doi.org/10.1155/2010/953537

23. Coenen, H. H. No-Carrier-Added Radiohalogenation Methods with Heavy Halogens/ H. H. Coenen, S. M. Moerlein, G. Stöckin // Radiochem. Acta. – 1983. – Vol. 34, N 1–2. – P. 47–68. https://doi.org/ 10.1524/ract.1983.34.12.47

24. Sandler, S. I. Chemical, biochemical, and engineering thermodynamics / S. I. Sandler. – John Wiley & Sons, 2017. – 1040 p.

25. Demerel, Y. Nonequilibrium thermodynamics: Transport and rate processes in physical, chemical and biological systems / Y. Demerel. – 3rd ed. – Amsterdam, Oxford: Elsevier Science, 2014. – 792 p. https://doi.org/10.1016/C2012-0-00459-0

26. Mullin, J. W. Crystallization / J. W. Mullin – 4 th ed. – Oxford: Butterworth Heinemann, 2001. – 356 p. https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-4833-2.X5000-1

References

1. Mayles P., Nahum A., Rosenwald J. C. *Handbook of Radiation Therapy Physics: Theory and Practice*. Taylon & Francis, 2007. 1450 p. https://doi.org/10.1201/9781420012026

2. Hosmane N. S., Maquire J. A., Zhu Y. *Boron and Gadolinium Neutron Capture Therapy for Cancer Treatment*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2012. 300 p. https://doi.org/10.1142/8056

3. Vorst A. V., Rosen A., Kotsuka Y. *RF/Microwave Interaction with Biological Tissues*. IEEE Press, Wiley Interscience, A John Wiley &Sons., Inc., Publ., 2006. 346 p. https://doi.org/10.1002/0471752053

4. Dikusar E. A., Pushkarchuk A. L., Bezyazychnaya T. V., Potkin V. I., Soldatov A. G., Kutsen S. A., Stepin S. G., Nizovtsev A. P., Kilin S. Ya. Quantum-chemical modeling of methotrexate fullerenol radionuclide agents for cancer therapy. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2019, vol. 55, no. 2, pp. 163–170 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-2-163-170

5. Orlova M. A., Trofimova T. P., Orlov A. P., Shatalov O. A., Napolov Yu. K., Svistunov A. A., Chekhonin V. P. Antitumor activity of fullerene derivatives and their possible use for target drug delivery. *Onkogematologiya = Oncohematology*, 2013, vol. 8, no. 2, pp. 83–92 (in Russian). https://doi.org/10.17650/1818-8346-2013-8-2-83-92

6. Neese F., Wennmohs F., Becker U., Riplinger Ch. The ORCA quantum chemistry program package. *The Journal of Chemical Physics*, 2020, vol. 152, no. 22, pp. 224108(1)–224108(18). https://doi.org/10.1063/5.0004608

7. Ghosh S. K., Chattaraj P. K. *Concepts and Methods in Modern Theoretical Chemistry. Atoms, Molecules and Clusters*. CRC Press, 2013. 856 p. https://doi.org/10.1201/9780429069598

8. Tomasi J., Mennucci B., Cammi R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chemical Reviews*, 2005, vol. 105, no. 8, pp. 2999–3094. https://doi.org/10.1021/cr9904009

9. Grimme S., Antony J., Ehrlich S., Krieg H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *Journal of Chemical Physics*, 2010, vol. 132, no. 15, pp. 154104(1)–154104(19). https://doi.org/10.1063/1.3382344

10. Alonso D., Hernández-Castillo D., Almagro L., González-Alemán R., Molero D., Herranz M. Á., Medina-Páez E., Coro J., Martínez-Álvarez R., Suárez M., Martín N. Diastereoselective Synthesis of Steroid–[60]Fullerene Hybrids and Theoretical Underpinning. *Journal of Organic Chemistry*, 2020, vol.85, no. 4, pp.2426–2437. https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b03121

11. Fizer L., Fizer M. *Steroids*. Moscow, Mir Publ., 1964, pp. 619–748 (in Russian).

12. Adelstein S. J., Manning F. J. *Isotopes for Medicine and the Life Sciences*. Washington, DC, The National Academies Press., 1995. 144 p. https://doi.org/10.17226/4818

13. Bergmann H., Sinzinger H. *Radioactive Isotopes in Clinical Medicine and Research*. Basel, Rirkhäuser Verlag, 1995. 300 p. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7340-6

14. Thayer J. S. Relativistic Effects and the Chemistry of the Heavier Main Group Elements. Barysz M., Ishikawa Ya. (ed.). *Relativistic Methods of Chemists (Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics)*. N.-Y., Springer, 2010, vol. 10, pp. 63–97. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-9975-5_2

15. Laeter J. R. Böhlke J. K., Bièvre P., Hidaka H., Peiser H. S., Rosman K. J. R., Taylor P. D. P. Atomic weights of the elements. Review 2000 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 2003, vol. 75, no. 6, pp. 683–800. https://doi.org/10.1351/pac200375060683

16. Seydel J. K. Wiese M. *Drug-Membrane Interactions: Analysis, Drug Distribution, Modeling*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, 2002. 362 p. https://doi.org/10.1002/3527600639

17. Oren I., Sarel J., Kessel A., Ben-Tal N. Free Diffusion of Steroid Hormones Across Biomembranes: A Simplex Search with Implicit Solvent Model Calculations. *Biophysical Journal*, 2004, vol. 87, no. 2, pp. 768–779. https://doi.org/10.1529/biophysj.103.035527

18. Dikusar E. A., Potkin V. I., Pushkarchuk A. L., Bezyazychnaya T. V., Soldatov A. G., Kutsen S. A., Kilin S. Ya., Nizovtsev A. P. Quantum-chemical modeling of estrone-containing bisfullerenol radionuclide agents for the treatment of oncological diseases. *Nanostruktury v kondensirovannykh sredakh: sbornik nauchnykh statei* [Nanostructures in condensed matter. Collection of scientific articles]. Minsk: *A. V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of NAS of Belarus,* 2016, pp. 67–70 (in Russian).

19. Goloviznin V. M., Kondratenko P. S., Matveev L. V., Korotkin I. A., Dranikov I. L. *Anomalous Radionuclide Diffusion in Highly Heterogeneous Geological Formations*. Moscow, Nauka Publ., 2010. 342 p. (in Russian).

20. Yeagle P. L. (ed.). *The Structure of Biological Membrans*. 3rd ed. CRC Press Book: Tailor and Frances Gr., 2011. 398 p. https://doi.org/10.1201/b11018

21. Tosteson D. C. (ed.). *Transport Across Single Biological Membranes. Vol. 2*. Berlin, Heidelberg, N.-Y., Springer-Verlag, 1979. 444 p. https://doi.org/10.1007/978-3-642-46375-4

22. Ting G., Chang C.-H., Wang H.-E., Lee T.-W. Nanotargeted Radionuclides for Cancer Nuclear Imaging and Internal Radiotherapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010, vol. 2010, Article ID 953537. https://doi.org/10.1155/2010/953537

23. Coenen H. H., Moerlein S. M., Stöckin G. No-Carrier-Added Radiohalogenation Methods with Heavy Halogens. *Radiochem. Acta*, 1983, vol. 34, no. 1–2, pp. 47−68. https://doi.org/10.1524/ract.1983.34.12.47

24. Sandler S. I. *Chemical, biochemical, and engineering thermodynamics*. John Wiley & Sons, 2017. 1040 p.

25. Demerel Y. *Nonequilibrium thermodynamics: Transport and rate processes in physical, chemical and biological systems*. 3rd ed. Amsterdam, Oxford: Elsevier Science, 2014. 792 p. https://doi.org/10.1016/C2012-0-00459-0

26. Mullin J. W. *Crystallization*. 4 th ed. Oxford, Butterworth Heinemann, 2001. 356 p. https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-4833-2.X5000-1

Информация об авторах

Дикусар Евгений Анатольевич – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dikusar@ifoch.bas-net.by

Пушкарчук Александр Леонидович – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: alexp51@bk.ru

Безъязычная Татьяна Владимировна – канд. физ.-мат. наук, ст. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kvant@ifoch.bas-net.by

Акишина Екатерина Александровна – аспирант, мл. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: che.semenovaea@mail.ru

Солдатов Андрей Геннадьевич – зав. лаб. Научно-практический центр НАН Беларуси по материаловедению (ул. П. Бровки, 19, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: andreisoldatov@mail.ru

Information about the authors

Evgenij A. Dikusar – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dikusar@ifoch.bas-net.by

Alexander L. Pushkarchuk – Ph. D. (Physics and Mathematics), Senior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: alexp51@bk.ru

Tatsiana V. Bezyazychnaya – Ph. D. (Physics and Mathematics), Senior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kvant@ifoch.bas-net.by

Ekaterina A. Akishina – Postgraduate, Junior Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: che.semenovaea@mail.ru

Andrei G. Soldatov – Head of the Laboratory for Superconducting Material Physics. Scientific-Practical Materials

Кутень Семен Адамович – канд. физ.-мат. наук., зав. лаб. Институт ядерных проблем Белгосуниверситета (ул. Бобруйская, 11, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kut@inp.bsu.by

Стёпин Святослав Генрихович – канд. хим. наук, доцент. Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (пр-т Фрунзе, 27, 210023, Витебск, Республика Беларусь). E-mail: stepins@tut.by

Низовцев Александр Павлович – д-р физ.-мат. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси (пр. Независимости, 68, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: apniz@ifanbel.bas-net.by

Килин Сергей Яковлевич – академик, д-р физ.-мат. наук, профессор, зав. центра квантовой оптики и квантовой информатики. Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси (пр. Независимости, 68, 220072, Минск, Республика Беларусь); E-mail: kilin@ifanbel.bas-net.by

Поткин Владимир Иванович – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор, зав. лаб. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: potkin@ifoch.bas-net.by

Andrei S. Soldatov – Ph. D. (Physics and Mathematics), Head of the Laboratory. Research Center of the National Academy of Sciences of Belarus (19, P. Brovka str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: andreisoldatov@mail.ru

Siamion A. Kutsen – Ph. D. (Physics and Mathematics), Head of the Laboratory. Institute for Nuclear Problems of Belarusian State University (11, Bobruiskaya str., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kut@inp.bsu.by

Svjatoslav G. Stepin – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor. Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (17, Frunze Ave., 210023, Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: stepins@tut.by

Alexander P. Nizovtsev – D. Sc. (Physics and Mathematics), Leading Researcher. B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus (68, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: apniz@ifanbel.bas-net.by

Sergei Ya. Kilin – Academician, D. Sc. (Physics and Mathematics), Professor, Head of the Center of quantum optics and quantum informatics. B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus (68, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kilin@ifanbel.bas-net.by

Vladimir I. Potkin – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of the Laboratory. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: potkin@ifoch.bas-net.by

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 658.382.3:006.354
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-408-412

Поступила в редакцию 19.08.2021
Received 19.08.2021

Е. В. Карпинчик, Л. И. Южик, В. Е. Агабеков

Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

О ВОДОРАСТВОРИМОСТИ АЛКИЛБЕНЗОЛСУЛЬФОКИСЛОТ C_{17}–C_{24}, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ ПРИСАДКИ К МОТОРНЫМ МАСЛАМ

Аннотация. С помощью нефелометрического метода изучена водорастворимость алкилбензолсульфокислот C_{17}–C_{24}. Результаты исследования позволили разработать методику измерений растворимости алкилбензолсульфокислот, используемых в производстве присадок для моторных масел. Применение этой методики в научных и производственных лабораториях позволяет определять содержание АБСК в смесях с водой и квалифицировать это вещество по критерию водорастворимости при присвоении соответствующего кода в ТН ВЭД.

Ключевые слова: растворимость, концентрация, содержание, алкилбензолсульфокислоты, присадки к маслам, мицеллообразование, коллоиды

Для цитирования. Карпинчик, Е. В. О водорастворимости алкилбензолсульфокислот C_{17}–C_{24}, используемых в качестве присадки к моторным маслам / Е. В. Карпинчик, Л. И. Южик, В. Е. Агабеков // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 408–412. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-408-412

E. V. Karpinchik, L. I. Yuzhik, V. E. Agabekov

Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

ON WATER SOLUBILITY OF C_{17}–C_{24} ALKYLBENZOLSULPHOIC ACIDS USED AS AN ADDITIVE TO MOTOR OILS

Abstract. Using the nephelometric method, the water solubility of C_{17}–C_{24} alkylbenzenesulfonic acids has been studied. The results of the study made it possible to develop a technique for measuring the solubility of alkylbenzenesulfonic acids used in the production of additives for motor oils. Using the methodology in scientific and industrial laboratories, it is possible to determine the content of ABSA in mixtures with water and to qualify this substance according to the criterion of water solubility when assigning the appropriate code in the Commodity Nomenclature of Foreign Economic Activity.

Keywords: solubility, concentration, content, alkylbenzenesulfonic acid, oil additives, micelle formation, colloids

For citation. Karpinchik E. V., Yuzhik L. I., Agabekov V. E. On water solubility of C_{17}–C_{24} alkylbenzolsulphoic acids used as an additive to motor oils. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 408–412 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-408-412

Введение. Алкилбензолсульфокислоты (АБСК) – востребованный продукт органической химии, полупродукт для получения алкилбензолсульфонатов – компонентов моющих средств, ПАВ для флотации руд и др. АБСК известны около 80 лет, их получают сульфированием линейного алкилбензола. В последнее время наблюдается возросший интерес к этим соединениям в связи с тем, что они биоразлагаемы и экологически безопасны.

Соли АБСК, главным образом натриевые, аммониевые или триэтаноламмониевые, полученные нейтрализацией соответствующими основаниями, применяют как ПАВ при производстве твердых и жидких моющих, чистящих или специальных средств, а также вспомогательных составов для них. Необходимо отметить, что моющие вещества на основе компонентов, полученных с применением АБСК, не коррозируют поверхность аппаратуры и изделий. Длинный гидрофобный углеводородный радикал (C_{17}–C_{24}) и гидрофильная – SO_3H-группа, присоединенные к бензольному ядру молекулы АБСК, придают ей дифильность. Эти свойства позволяют использовать АБСК при изготовлении составов как на углеводородной или масляной основах, так и на воде, причем совместимость с последней увеличивается у солевых ее форм. К примеру, кальциевая соль АБСК применяется в сельском хозяйстве для защиты растений как эмульгатор водонерастворимых гербицидов, получения концентратов масляных эмульсий пестицидов и др.

© Карпинчик Е. В., Южик Л. И., Агабеков В. Е., 2021

По внешнему виду АБСК представляет собой вязкую жидкость от коричневого до черного цвета и в зависимости от марки имеет классификацию «А», «Б», «В».

Поверхностная активность и дифильность молекул АБСК обусловили ее использование в качестве компонента моторных масел, в том числе производимых СООО «ЛЛК-Нафтан». Присадка АБСК к моторному маслу придает ему моюще-диспергирующие свойства и способствует увеличению ресурса двигателей. Одним из критериев, имеющим принципиальное значение при установлении позиции АБСК как товара по «Товарной номенклатуре внешнеэкономической деятельности» (ТН ВЭД) [1], является ее водорастворимость. Однако в торгово-экономической документации это свойство не получило однозначной трактовки, в связи с чем возникают разночтения.

Цель настоящей работы – исключить неоднозначную трактовку водорастворимости АБСК, в частности *NANSA 117*, используемой в качестве компонента моторных масел, при установлении ее товарной позиции в ТН ВЭД.

Классическое определение термина «растворимость – величина, характеризующая способность вещества образовывать с другим веществом однородную систему» [2]. Растворимость в современной формулировке подразумевает максимально возможное количественное содержание вещества в растворителе в молекулярно-ионном состоянии. Действующие нормативные документы не содержат такой характеристики веществ, как «нерастворимо», а используют термины «практически нерастворимо» [3] или «почти нерастворимо» [4].

В работе использовали термины и определения, установленные Международным стандартом [4], согласно которому растворимость реактивов следует характеризовать следующим образом:

Характеристика растворимости	Масса растворителя на 1 г реактива, г
Очень легко растворимый	До 1
Легко растворимый	> 1 до 10
Растворимый	> 10 до 30
Мало растворимый	> 30 до 100
Плохо растворимый	> 100 до 1000
Очень плохо растворимый	> 1000 до 10000
Почти нерастворимый	> 10000 (< 0,01 %)

П р и м е ч а н и е. Растворимость – это масса растворенного вещества, приходящаяся на 100 или 1000 г растворителя в насыщенном растворе при определенной температуре. В системе СИ данную величину принято измерять в кг/м^3, но обычно используют г/л.

Такие же соотношения растворителя и вещества для характеристики его растворимости, но уже с формулировкой терминов «Очень легко растворим», «Легко растворим», «Растворим», «Умеренно растворим», «Мало растворим», «Очень мало растворим» и «Практически нерастворим» принято употреблять соответственно [3].

Другим Международным стандартом [5] устанавливается, что результаты определения растворимости химического вещества считаются недействительными, если некоторая его часть находится в коллоидном состоянии (п. 5.6.3). Вещество растворено полностью, если при насыщении им растворителя в смеси отсутствует фазовое разделение между этими компонентами. Появление мицелл указывает на предельную растворимость вещества и переход его раствора в статус «коллоидной системы», в которой вещество находится в динамическом равновесии с новой его фазой – мицеллярными образованиями – и считать такую систему раствором неправомерно. Этот стандарт [5] предписывает обязательное предварительное проведение теста на наличие в жидкости эффекта Тиндаля, позволяющего определить состояние вещества в растворителе и установить правомерность применения к нему термина «раствор». Следует отметить, что в коллоидной системе некоторое количество вещества всегда находится в растворенном (молекулярно-ионном) состоянии, которое наряду с мицеллярными образованиями следует учитывать при установлении общего его содержания в растворителе.

Применительно к АБСК это означает:

водорастворимость – массовое ее количество в воде при данной температуре в виде отдельных молекул, т. е. пороговое содержание, предшествующее мицеллообразованию или критическая концентрация мицеллообразования (ККМ);

содержание – общее массовое ее количество в водной системе, включающее как находящееся в виде истинного раствора (т. е. в молекулярно-диспергированном состоянии), так и в виде ассоциатов. Следовательно, величиной растворимости АБСК в воде является максимальное массовое ее содержание в смеси до момента появления эффекта светорассеяния.

Дифильность молекул АБСК обусловливает образование молекулярных ассоциатов и пространственных структур, количество которых зависит от содержания этого вещества и влияет на мутность смеси. Признаком, указывающим на то, что это вещество находится полностью в растворенном состоянии, будет служить отсутствие в системе «вода–АБСК» эффекта Тиндаля. Таким образом, путем измерения величины светорассеяния или мутности этой системы, известного как нефелометрический метод [6], открывается возможность установить водорастворимость последней.

Материалы и методы. Для исследования использовали турбидиметр-нефелометр модели 2100Q фирмы HACH-LANGE (Германия), позволяющий определять величину в единицах мутности по формазину (ЕМФ, в международной транскрипции – NTU). Прибор дает возможность производить измерения в диапазоне 0–1000 NTU (ЕМФ), его калибровка до мутности 1000 NTU осуществлялась по калибровочным стандартам StablCal 20, 100 и 800 NTU, LANGE. Использовали кюветы вместимостью 15 см^3. В диапазоне 0–1000 NTU технические возможности прибора позволяли производить измерения с точностью ± 2 %, воспроизводимость составляла ± 0,01 % NTU или ± 1 % от измеряемого значения. При мутности, превышающей 1000 NTU (ЕМФ), применяли разбавление образца дистиллированной водой.

Для установления кода АБСК *NANSA 117* по ТН ВЭД, используемой в составе моторных масел, предписывается проведение теста на ее водорастворимость в смеси с водой при 0,5 мас.% содержании и выдержке без перемешивания в течение 60 мин при температуре 20,0 ± 0,2 °С.

Результаты и их обсуждение. В эксперименте уже простого визуального наблюдения достаточно для того, чтобы констатировать при таком содержании АБСК образование в смеси коллоидно-дисперсной системы, обусловленной дифильностью ее молекул, в которой вещество одновременно находится как в виде насыщенного раствора (молекулярно-дисперсном состоянии), так и в конденсированном (дисперсная фаза в виде мицелл), между которыми устанавливается динамическое равновесие. Однако оно нарушается, но устанавливается новое, если к смеси добавить тот или другой компонент. Это позволяет путем последовательного разбавления определить концентрацию, при которой возможно состояние АБСК только в виде истинного раствора, т. е. установить ее растворимость.

Признаком перехода всего количества введенной АБСК в растворенное состояние является исчезновение светорассеяния. Применительно к исследуемому объекту это означает, что в смеси АБСК с водой в растворенном состоянии будет находиться то количество из общего ее содержания, которое не входит в структуру мицелл.

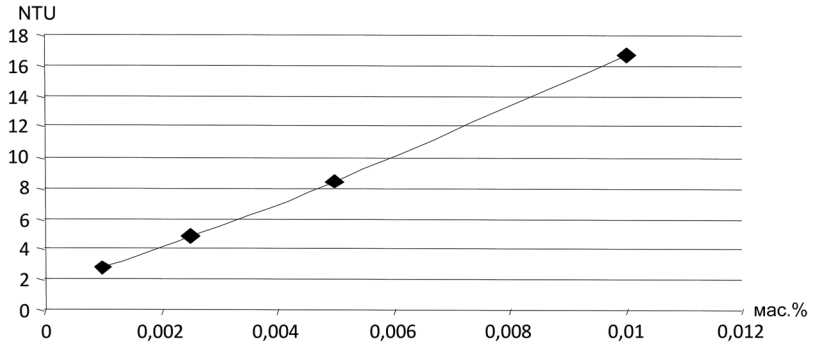
Следовательно, необходимым и достаточным признаком, устанавливающим, что все внесенное в растворитель вещество полностью диспергировалось до молекулярного состояния, является оптическая однородность раствора. С появлением в нем светорассеяния, указывающего на образование фазового раздела между компонентами, утверждение, что все количество вещества находится в растворенном состоянии, неправомерно, поскольку имеет место образование ультрамикрогетерогенной системы с границей раздела между растворителем и коллоидными частицами вещества. Объективно такое образование проявляется через специфическое оптическое его свойство – способность к рассеиванию проходящего пучка света (эффект Тиндаля).

Интенсивность отклоненного (рассеянного) света I_r прямо пропорциональна концентрации части и описывается уравнением:

$$I_r = I_0 k c \text{ или } I_r/I_0 = k c,$$

где I_0 – интенсивность входящего пучка света; k – постоянная измерительного прибора; c – концентрация вещества.

Таким образом, по мутности смеси (отношению I_r/I_0) можно определить содержание в ней вещества. Для установления значений водорастворимости АБСК при уменьшении или увеличении ее содержания в смеси целесообразно начинать с концентрации, относящей это вещество



Зависимость мутности смесей АБСК от массового содержания ее в воде

Dependence of turbidity of ABSA mixtures on its mass content in water

к категории «Почти не растворимо», т. е. 0,01 мас.% [4]. В случае обнаружения в ней светорассеяния этого будет достаточно для однозначного вывода о присутствии ассоциатов.

Образец для проведения нефелометрических измерений с этой концентрацией готовили из смеси АБСК с водой с массовой долей вещества 0,5 %, гомогенизированной путем обработки в диссольвере в течение 1 мин при 20 тыс. оборотов/мин. Образец с концентрацией 0,01 мас.% готовили из смеси АБСК *NANSA 117* и дистиллированной воды путем разведения 2 мл с содержанием 0,5 мас.% до объема 100 мл. Визуально он казался прозрачным, однако при нефелометрических измерениях его мутность составила 17 единиц NTU, что, согласно [3, 4], не позволяет считать его истинным раствором.

С целью достижения полной растворимости АБСК применили последующее разбавление до содержания в смеси 0,005, 0025 и 0,001 мас.%, которые подвергались нефелометрированию.

Как видно из результатов измерений, мутность смесей АБСК с водой изменяется пропорционально ее массовому содержанию (рисунок) и не исчезает даже при 0,001 % (0,1 г на 10000 г растворителя), что в 10 раз меньше значения концентрации, принятой для квалификации веществ по растворимости к самой низкой категории (0,01 % или 1 г на 10000 г растворителя). Таким образом, АБСК *NANSA 117* не дает истинных растворов в воде, ее молекулы находятся в ассоциированном состоянии при всех изученных концентрациях.

Выводы. Результаты исследования позволили разработать методику измерений растворимости (содержания) АБСК, используемых в производстве присадок для моторных масел. Методика позволяет в научных и производственных лабораториях определять содержание АБСК в смесях с водой и квалифицировать это вещество по критерию водорастворимости при присвоении соответствующего кода в ТН ВЭД.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке СООО «ЛЛК-Нафтан».

Acknowledgments. This work was financially supported by LLC-Naftan JLLC.

Список использованных источников

1. Товарная номенклатура внешнеэкономической деятельности Содружества независимых государств (ТН ВЭД СНГ) [Электронный ресурс] // КонсультантПлюс. – Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_133442/

2. Краткая химическая энциклопедия / гл. ред. И. Л. Кнунянц. – М.: Советская энциклопедия, 1965. – Т. 4. – 555 с.

3. Общая фармакопейная статья ОФС.1.2.1.0005.15. Растворимость [Электронный ресурс] // Фармакопея.рф. – Режим доступа: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-0005-15-rastvorimost/

4. Реактивы. Общие указания по проведению испытаний: ГОСТ 27025-86. – Введен 01.01.1987. – Москва: Издательство стандартов, 1987. – 10 с.

5. Методы испытаний химической продукции, представляющей опасность для окружающей среды. Растворимость в воде: ГОСТ 33034-2014. – Введен 01.08.2015. – Москва: СтандартИнформ, 2019. – 15 с.

6. Бабко, А. К. Фотометрический анализ. Методы определения неметаллов / А. К. Бабко, А. Т. Пилипенко. – М.: Химия, 1974. – 360 с.

References

1. Commodity nomenclature of foreign economic activity of the Commonwealth of Independent States (CN FEA CIS). *Consultant Plus.* Available at: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_133442/ (in Russian).

2. Knunyants I. L. *Brief chemical encyclopedia. Vol. 4.* Moscow, Sovetskaya entsiklopediya Publ., 1965. 555 p. (in Russian).

3. General pharmacopoeial monograph OFS.1.2.1.0005.15. Solubility. *Farmakopeya.rf.* Available at: https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-2-1-0005-15-rastvorimost/

4. State Standard 27025-86. *Reagents. General instructions for testing.* Moscow, Publishing house of standards, 1987. 10 p. (in Russian).

5. State Standard GOST 33034-2014. *Methods of testing chemical products posing a threat to the environment. Solubility in water.* Moscow, StandartInform Publ., 2019. 15 p. (in Russian).

6. Babko A. K., Pilipenko A. T. *Photometric analysis. Methods for the determination of non-metals*. Moscow, Khimiya Publ., 1974. 360 p. (in Russian).

Информация об авторах

Карпинчик Евгений Васильевич – вед. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: karpinev@yandex.ru

Южик Любовь Ивановна – науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yozh_ru@mail.ru

Агабеков Владимир Енокович – академик, д-р хим. наук, профессор, зав. отделом. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ichnm@ichnm.by

Information about the authors

Evgeniy V. Karpinchik – Leading Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skaryna str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: karpinev@yandex.ru

Lyubov I. Yuzhik – Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skaryna str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yozh_ru@mail.ru

Vladimir E. Agabekov – Academician, D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of the Department. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skaryna str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ichnm@ichnm.by

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

НЕАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

INORGANIC CHEMISTRY

УДК 661.842.455:612.398.[12+133]
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-413-423

Поступила в редакцию 30.09.2021
Received 30.09.2021

И. Е. Глазов[1], В. К. Крутько[1], Р. А. Власов[2], О. Н. Мусская[1], А. И. Кулак[1]

[1]Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Медицинский центр SANTE ООО «Медандровит», Минск, Беларусь

НАНОКОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ АПАТИТНОГО ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА И АУТОФИБРИНА

Аннотация. Методом осаждения при соотношении Ca/P 1,50, pH 9 и времени созревания от 30 мин до 7–14 сут получены нанокомпозиты в аутофибриновой матрице на основе апатитного трикальцийфосфата. Резорбируемость нанокомпозитов определялась составом кальцийфосфатов, которые при длительном созревании формировались в виде кальцийдефицитного гидроксиапатита при соотношении Ca/P 1,66, а в биополимерной матрице образовывались более растворимые формы кальцийфосфатов при соотношении Ca/P 1,53–1,59. Установлено, что фибриновый сгусток стабилизировал наряду с апатитным трикальцийфосфатом фазу аморфного фосфата кальция, которая после 800 °С превращалась в резорбируемый α-трикальцийфосфат. Цитратная плазма затрудняла превращение апатитного трикальцийфосфата в стехиометрический гидроксиапатит, что также способствовало формированию после 800 °С резорбируемого β-трикальцийфосфата. Совокупное влияние времени созревания и биополимерной матрицы определяло кальцийфосфатный состав, физико-химические и морфологические свойства нанокомпозитов и возможность управления их резорбируемостью.

Ключевые слова: нанокомпозит, апатитный трикальцийфосфат, гидроксиапатит, аморфный фосфат кальция, аутофибрин, резорбируемость

Для цитирования. Нанокомпозиты на основе апатитного трикальцийфосфата и аутофибрина / И. Е. Глазов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 413–423. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-413-423

I. E. Glazov[1], V. K. Krut'ko[1], R. A. Vlasov[2], O. N. Musskaya[1], A. I. Kulak[1]

[1]Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2]Medical-Center SANTE Ltd. "Medandrovit", Minsk, Belarus

NANOCOMPOSITES BASED ON APATITIC TRICALCIUM PHOSPHATE AND AUTOFIBRIN

Abstract. Nanocomposites based on apatitic tricalcium phosphate in an autofibrin matrix were obtained by precipitation at a Ca/P ratio of 1.50, pH 9 and a maturation time from 30 min to 7–14 days. The resorbability of nanocomposites was determined by the composition of calcium phosphates, which, during long-term maturation, formed as the calcium-deficient hydroxyapatite with a Ca/P ratio of 1.66, whereas biopolymer matrix favored the formation of more soluble calcium phosphates with a Ca/P ratio of 1.53–1.59. It was found that the fibrin clot stabilized, along with apatitic tricalcium phosphate, the phase of amorphous calcium phosphate, which after 800 °C was transformed into resorbable α-tricalcium phosphate. Citrated plasma inhibited the conversion of apatitic tricalcium phosphate into stoichiometric hydroxyapatite, which also facilitated the formation of resorbable β-tricalcium phosphate after 800 °C. The combined effect of the maturation time and the biopolymer matrix determined the composition, physicochemical and morphological properties of nanocomposites and the possibililty to control its extent of resorption.

Keywords: nanocomposite, apatitic tricalcium phosphate, hydroxyapatite, amorphous calcium phosphate, autofibrin, resorbability

For citation: Glazov I. E., Krut'ko V. K., Vlasov R. A. Musskaya O. N., Kulak A. I. Nanocomposites based on apatitic tricalcium phosphate and autofibrin. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2021, vol. 57, no. 4, pp. 413–423 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-413-423

Введение. Гидроксиапатит (ГА) обладает уникальными свойствами, которые обусловливают его использование в биоматериалах, системах доставки лекарств, антибактериальных материалах, каталитических системах, наполнителях полимерных матриц, сенсорных системах и адсорбентах [1]. Однако наиболее широкое применение ГА получил в качестве кальцийфосфатного компонента костных имплантатов с остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами [1]. Состав аморфизированного ГА может меняться в широком диапазоне соотношений Ca/P 1,33–1,67, что соответствует формуле $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$, $0 \le x < 2$ [2]. Структура многих природных и синтетических ГА характеризуется присутствием катионных вакансий, поэтому данные апатиты относят к кальцийдефицитным в отличие от стехиометрического ГА $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ при соотношении Ca/P 1,67 [3]. Многообразие возможных составов кальцийдефицитных ГА обусловливает вариабельность параметров термической устойчивости и растворимости материалов на их основе [4]. Известно [5], что уменьшение соотношения Ca/P с 1,67 до 1,50 сопровождается снижением отношения параметров решетки *a*/*c* на 0,22 %. Подобное искажение решетки сопровождается увеличением растворимости [6] и уменьшением термодинамической устойчивости ГА [7]; при Ca/P 1,67 экспериментальные значения параметров составляют: $K_{ПР}$~155 и ΔHf = –13477 кДж/моль, а при Ca/P 1,50 – $K_{ПР}$~114 и ΔHf = –12708 кДж/моль, что соответствует повышенной резорбируемости и реакционной способности кальцийдефицитных ГА по сравнению со стехиометрическим ГА.

Наиболее часто описываемым представителем кальцийдефицитных ГА является апатитный трикальцийфосфат (ТКФ) $Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5OH$ с Ca/P 1,50, который получают на промежуточных стадиях синтеза β-ТКФ $Ca_3(PO_4)_2$ [8] либо в результате гидролиза α-ТКФ [9] и аморфного фосфата кальция (АФК) $Ca_9(PO_4)_6 \cdot nH_2O$ с Ca/P 1,50, где n = 3,0–4,5 [10]. Первое употребление термина “apatitic tricalcium phosphate” в научной публикации относят к 1982 г. [11], а в 1991 г. [12] данный термин соотнесли со структурной формулой $Ca_9(HPO_4)(PO_4)_5OH$. В англоязычной научной литературе данное наименование кальцийдефицитного ГА при соотношении Ca/P 1,50 применяется достаточно широко, однако русскоязычный вариант термина «апатитный ТКФ» встречается крайне редко [13].

Одним из способов модифицирования биоматериалов на основе ГА является их совместное применение с компонентами крови, например фибрином, которые широко применяют для лечения ран и стимуляции заживления поврежденных мягких тканей [14]. Перспективным источником фибрина являются аутофибриновые клеи, такие как цитратная плазма, которые при активации в течение нескольких минут формируют биосовместимую сетку аутофибрина [15, 16]. Сочетание аутофибрина с наноразмерными частицами ГА способствует усилению остеогенных свойств аутофибрина [17] и стабилизации ГА имплантатов в костном дефекте в процессе остеосинтеза [18]. Проведенные нами исследования [19, 20] доказали эффективность применения композитов ГА/аутофибрин в риносептопластике. В наших предыдущих работах [21, 22] описаны физико-химические свойства композитов на основе ГА, осажденных в среде аутофибрина при pH 11. Установлено [22], что присутствие добавки биополимера в среде осаждения ГА с pH 11 способствует стабилизации включений АФК и отклонению состава ГА от стехиометрического [10]. Однако выдерживание образцов в сильнощелочной среде формирования стехиометрического ГА сопровождалось частичным разрушением аутофибрина. Сохранение биополимерной матрицы в композитах можно обеспечить путем их осаждения при pH 9, что аналогично условиям получения апатитного ТКФ [8].

Цель данной работы – изучение физико-химических особенностей формирования и превращения после 800 °C апатитного ТКФ в аутофибриновой матрице при pH 9, Ca/P 1,50 для разработки новых нанокомпозитов с регулируемой степенью резорбции.

Экспериментальная часть. Синтез образцов ТКФ осуществляли по известным методикам [3, 23] путем взаимодействия растворов 1,2 M $CaCl_2$ (Sigma Aldrich) и 0,6 M $(NH_4)_2HPO_4$ (Carl Roth) при соотношении Ca/P 1,50 и величине pH 9, создаваемой водным раствором аммиака. Гибридные композиты ТКФ осаждали в присутствии 0,3 г сгустка фибрина либо 4–24 об.% цитратной плазмы. Источники аутофибрина (фибриновый сгусток либо цитратную плазму) получали из образцов донорской крови мужчин 20–40 лет в соответствии со ст. 44 Закона о здравоохранении РБ.

Фибриновый сгусток выделяли путем многократного встряхивания свежей донорской крови с последующим промыванием холодной дистиллированной водой; цитратную плазму получали смешиванием 18 мл донорской крови с 2 мл 3,8 мас.% раствора цитрата натрия (антикоагулянта) и центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин; отбирали верхнюю фракцию.

Осадки ТКФ выделяли и промывали дистиллированной водой до pH 7,0–7,2 [24] в различных условиях: 1) ТКФ-0 выдерживали под маточным раствором в течение 30 мин и отфильтровывали; 2) ТКФ-1 и его композиты выдерживали под маточном раствором в течение 7 сут и промывали декантацией; 3) ТКФ-2, 3 и их композиты выдерживали под маточным раствором в течение 7 сут (ТКФ-2) либо 14 сут (ТКФ-3) и промывали комбинированным методом, включающим фильтрование до pH~8 с последующей декантацией. Для идентификации методом рентгенофазового анализа (РФА), образцы высушивали при 60 °С и термообрабатывали при 800 °С.

Морфологию поверхности ксерогелей апатитных ТКФ и их композитов после высушивания при 60 °С исследовали на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) LEO 1420 (Carl Zeiss, Германия), на поверхность ксерогелей напыляли золото. Функционально-групповой состав ксерогелей исследовали методом ИК-спектроскопии пропускания на ИК-Фурье спектрометре Tensor-27 (Bruker, Германия) в диапазоне 4000–400 $см^{-1}$ с использованием таблеток бромида калия (2 мг вещества на 800 мг бромида калия). Фазовый состав образцов определяли на дифрактометре ADVANCE D8 (Bruker, Германия) при $Cu_{K\alpha}$ 1,5406 Å, обработку данных РФА осуществляли с использованием программного обеспечения Profex 4.2 [25] и базы данных COD v.210114.

Результаты исследований и их обсуждение. Известно [22], что в сильнощелочной среде с pH 11 фибриновый сгусток неустойчив и растворяется в течение суток, а при pH 9 время растворения фибрина составляет 14 сут, что обеспечивает сохранение биополимерной матрицы в композитах. Осаждение ТКФ в матрице цитратной плазмы сопровождалось схватыванием осадка за счет формирования фибриновой сетки в объеме реакционной смеси [21]. Избыток биополимеров цитратной плазмы постепенно удаляли из реакционной среды многократной декантацией, поэтому аутофибрин являлся основным биополимерным компонентом в композитах ТКФ / фибрин и ТКФ / цитратная плазма. Комбинированный метод выделения композитов ТКФ-2,3 методом фильтрования-декантации использовали для быстрого удаления ионов OH^- из структуры гелеобразных осадков, а также для ускорения времени отмывания образцов до 2 нед. Для сравнения: выделение образцов ГА методом многократной декантации занимает около 2 мес за счет удержания маточного раствора в макропорах кальцийфосфатных гелей, что обусловливает медленное снижение pH и способствует дополнительному созреванию ГА [24].

Согласно данным СЭМ (рис. 1), ксерогели апатитных ТКФ представлены характерными агломератами апатитов неправильной формы со множественными наночастицами до 100 нм. На поверхности ксерогеля ТКФ-0 (рис. 1, *a*) агломераты формировали наслоения за счет малого времени созревания в течение 30 мин и действия вакуумных сил в процессе фильтрования. Созревание ТКФ-2 в течение 7 сут (рис. 1, *b*) способствовало частичному сглаживанию наслоений агрегатов в сравнении с ТКФ-0, а увеличение времени созревания ТКФ-3 до 14 сут (рис. 1, *c*) способствовало формированию ксерогелей с однородной микрогеометрией поверхности.

Микрогеометрия поверхности композитов ТКФ-2/фибрин близка к индивидуальному ТКФ-2, однако присутствие фибринового сгустка способствовало формированию агрегированных апатитных наночастиц размером до 500 нм (рис. 1, *d*, агрегаты отмечены стрелками). На СЭМ-изображениях композитов с цитратной плазмой проявлялась биополимерная матрица (рис. 1, *e*, *f*, отмечено стрелками), а морфология поверхности композитов являлась более развитой по сравнению с ТКФ-2 и ТКФ-2/фибрин за счет влияния поверхностно-активных компонентов цитратной плазмы. В случае ксерогеля ТКФ-2/цитратная плазма (рис. 1, *e*) наблюдались дискретные домены зернистых апатитных агрегатов размером до 3 мкм и гладкой матрицы цитратной плазмы, а на поверхности ТКФ-3/цитратная плазма (рис. 1, *f*) биополимерная и апатитная составляющие распределены в виде наслоений и выступов размером от 300 нм. Соответственно морфология поверхности ксерогелей апатитных ТКФ определялась не только временем созревания кальцийфосфатов и способом выделения, но и присутствием цитратной плазмы в среде осаждения. Развитый

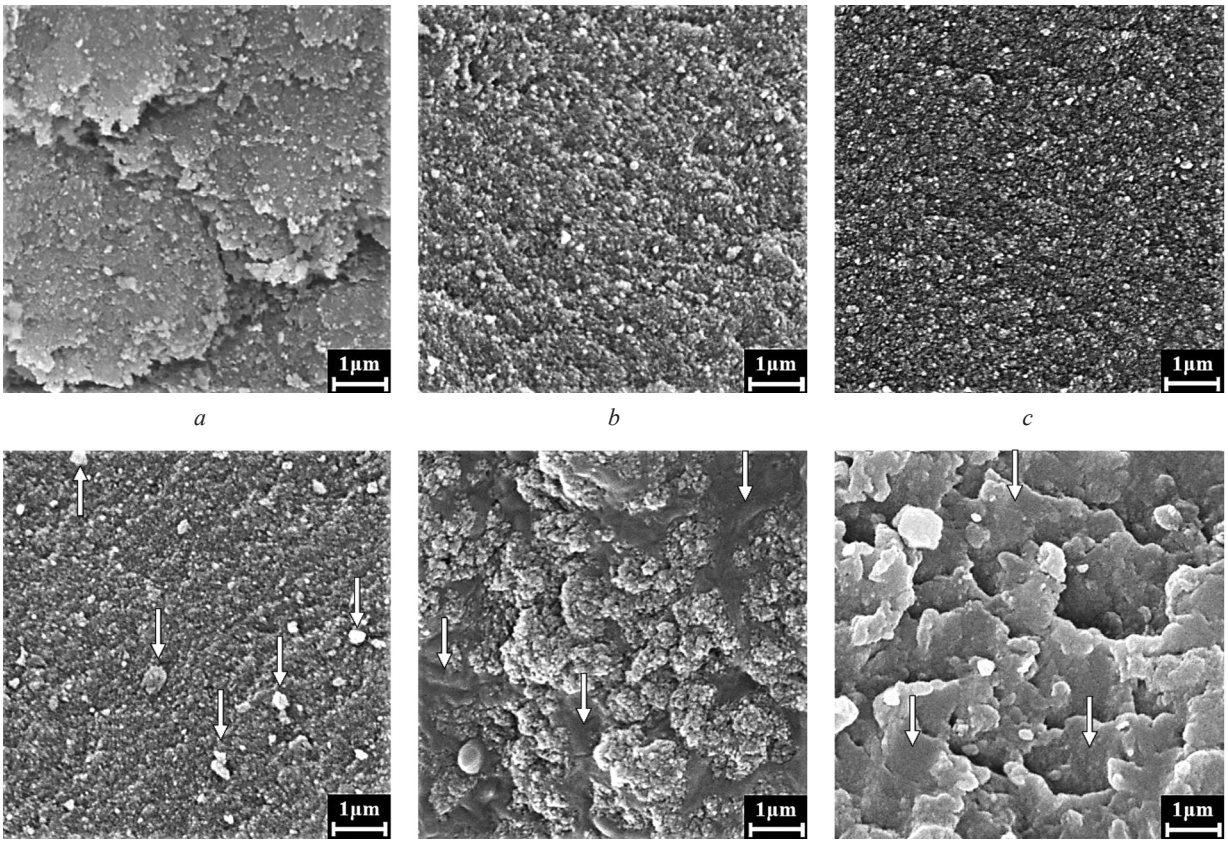


Рис. 1. СЭМ-изображения поверхностей ТКФ-0 (*a*), ТКФ-2 (*b*), ТКФ-3 (*c*), ТКФ-2 / фибрин (*d*), ТКФ-2 / цитратная плазма (*e*), ТКФ-3 / цитратная плазма (*f*)

Fig. 1. SEM images of surface of TCP-0 (*a*), TCP-2 (*b*), TCP-3 (*c*), TCP-2 / fibrin (*d*), TCP-2 / citrated plasma (*e*), TCP-3 / citrated plasma (*f*)

рельеф поверхности композитов ТКФ/цитратная плазма может указывать на их остеоиндуктивные свойства, поскольку дифференциация остеобластов и остеокластов активнее происходит на поверхности ГА с большим числом выступов и шероховатостей [26].

На ИК-спектрах ТКФ и его композитов после высушивания при 60 °С (рис. 2) наблюдались полосы при 3200–3600 и 1660 $см^{-1}$ адсорбированной и структурной воды, а также характеристические полосы ГА: колебаний O–P–O при 1090, 1040, 956, 603, 566, 472 $см^{-1}$ и колебаний O–H при 3570, 633 $см^{-1}$. Характеристические полосы ГА, особенно при 3570, 633 $см^{-1}$ колебаний O–H, на ИК-спектрах ТКФ-0 (рис. 2, кривая *1*) и композитов (рис. 2, кривые *3–5*, *8*, *10*, *11*) обладали пониженной разрешенностью. Наблюдаемая аморфизация композитов с цитратной плазмой может свидетельствовать о наложении полос колебаний биополимера, наиболее интенсивные из которых соответствуют амиду I, II в области при 1700–1500 $см^{-1}$ (рис. 2, кривые *4*, *5*, *8*, *10*, *11*, отмечены стрелками). Причем интенсивность полос амида I, II увеличивалась при повышении содержания цитратной плазмы до 24 об.%. Отсутствие полос амида I, II на ИК-спектрах композитов с фибрином (рис. 2, кривые *3*, *7*), возможно, обусловлено конформационным переходом фибриновых макромолекул от α-спиралей до β-листов [27], движущей силой которого может быть растяжение сгустка фибрина при формировании в нем кальцийфосфатов.

На ИК-спектре ТКФ-0 (рис. 2, кривая *1*) плечо полосы при 870 $см^{-1}$ соответствует колебаниям P–O(H) ионов HPO_4^{2-} в структуре апатитного ТКФ. В отличие от ТКФ со временем созревания 30 мин, на ИК-спектрах ТКФ-1,2,3 (рис. 2, кривые *2–11*) со временем созревания 7–14 сут наблюдались полосы в области при 1550–1420 $см^{-1}$ и при 876 $см^{-1}$ колебаний карбонатного O–C–O, которые свидетельствуют об инкорпорации карбонат-ионов из щелочного раствора [28]. ИК-спектры индивидуальных ТКФ-1,2,3 и их композитов с фибрином (рис. 2, кривые *2*, *3*, *6*, *7*, *9*) содержали

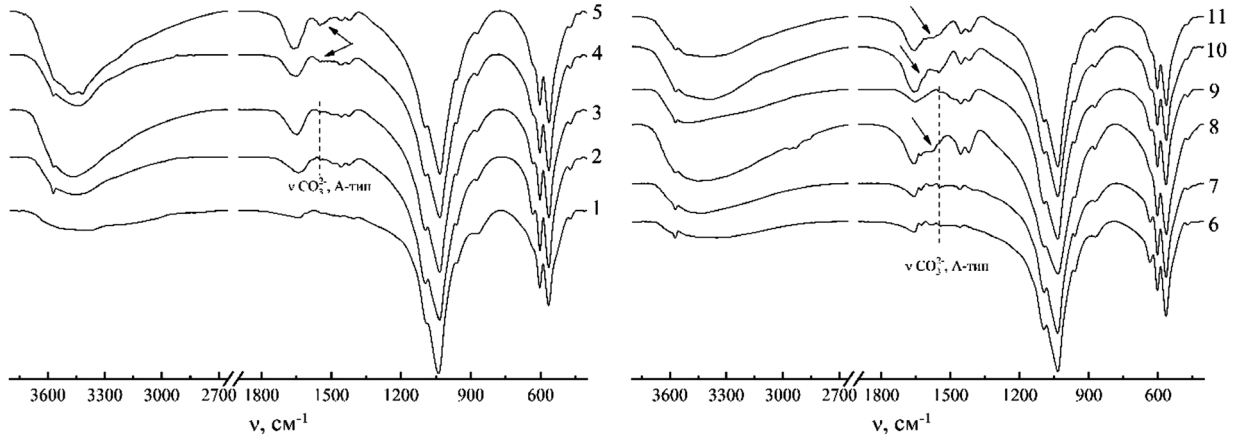


Рис. 2. ИК-спектры ксерогелей после 60 °С: *1* – ТКФ-0; *2* – ТКФ-1; *3* – ТКФ-1 / фибрин; *4*, *5* – ТКФ-1 / 4 об.% цитратная плазма; *6* – ТКФ-2; *7* – ТКФ-2 / фибрин; *8* – ТКФ-2 / 24 об.% цитратная плазма; *9* – ТКФ-3; *10*, *11* – ТКФ-3 / 24 об.% цитратная плазма

Fig. 2. FTIR spectra of the xerogels after 60 °C: *1* – TCP-0; *2* – TCP-1; *3* – TCP-1 / fibrin; *4*, *5* – TCP-1 / 4 vol.% citrated plasma; *6* – TCP-2; *7* – TCP-2 / fibrin; *8* – TCP-2 / 24 vol.% citrated plasma; *9* – TCP-3; *10*, *11* – TCP-3 / 24 vol.% citrated plasma

полосу при 1550 см$^{-1}$, свидетельствующую о карбонатном замещении OH^--ионов в структуре апатитного ТКФ (А-тип замещения), которое протекает наряду с замещением PO_4^{3-}-ионов (Б-тип замещения). Данный факт, по-видимому, связан со слабощелочной средой формирования апатитного ТКФ, в которой растворенные ионы OH^- и CO_3^{2-} присутствуют в сопоставимых концентрациях. Соответственно наблюдаемое замещение по смешанному АБ-типу обусловлено кинетическими факторами, а именно доступностью анионных вакансий V^{OH} в структуре апатитного ТКФ [29] и относительно невысокой интенсивностью протекания конкурирующей реакции внедрения OH^--ионов. Для сравнения: в структуре ГА при pH 11 преобладает Б-тип карбонатного замещения [28], что связано с уменьшением свободной энергии решетки ГА за счет замещения тетраэдров PO_4^{3-}-ионов плоскими CO_3^{2-}-ионами.

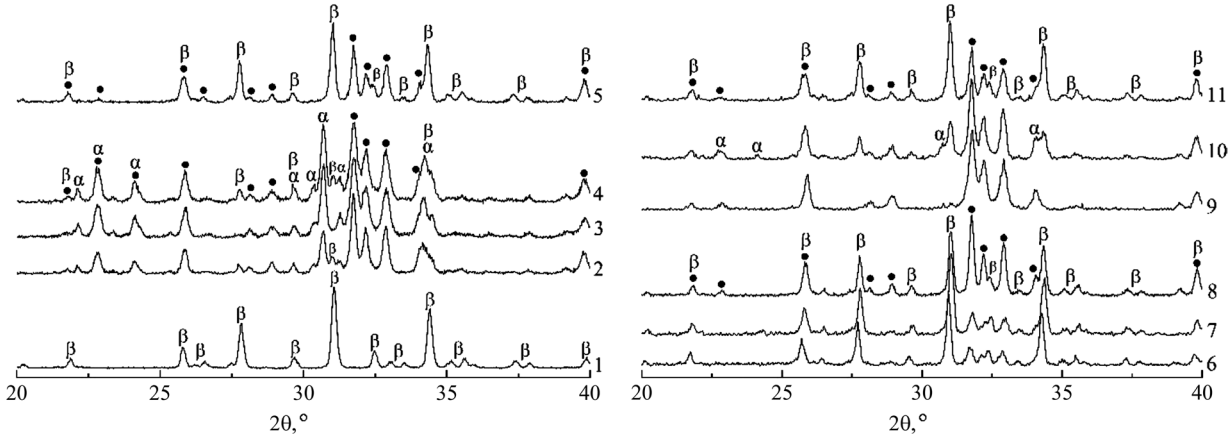
Согласно данным РФА, ксерогели ТКФ после высушивания при 60 °С представлены аморфизированным ГА. Размер кристаллитов ТКФ-0 со временем созревания 30 мин составлял 6,61 нм вдоль грани (1 0 0) и 16,22 нм вдоль грани (0 0 1) (табл. 1). Созревание осадка ТКФ-1 под маточным раствором в течение 7 сут способствовало увеличению кристалличности формирующегося апатита на 35 % вдоль обеих граней по сравнению с ТКФ-0. Влияние биополимерных матриц обусловливало аморфизацию ТКФ-1 на 16–18 % вдоль грани (1 0 0) и на 6–17 % вдоль грани (0 0 1). В присутствии фибринового сгустка аморфизация апатита сопровождалась незначительным вытягиванием кристаллитов вдоль грани (1 0 0), а матрица цитратной плазмы способствовала снижению кристалличности вдоль обеих граней на 17–18 %.

Созревание ТКФ-3 в течение 14 сут способствовало вытягиванию апатитных кристаллитов вдоль грани (0 0 1) на 20 % по сравнению с ТКФ-0 (табл. 1). Формирование наиболее аморфизированного апатита в условиях комбинированного метода выделения ТКФ-3, по сравнению с ТКФ-1,

Таблица 1. **Расчетные кристаллографические параметры ГА после 60 °С**

Table 1. **Calculated crystallographic parameters of HA after 60 °C**

Серия	Биополимерная матрица	Размер кристаллитов, нм		Параметры решетки, Å	
		(1 0 0)	(0 0 1)	*a*	*C*
ТКФ-0	–	6,91	16,22	9,461	6,875
ТКФ-1	–	9,03	22,15	9,440	6,876
	Фибрин	7,48	20,90	9,445	6,870
	4 об.% цитратная плазма	7,33	18,30	9,444	6,876
ТКФ-3	–	6,92	19,40	9,441	6,871
	24 об.% цитратная плазма	6,89	23,00	9,461	6,876



α/β – модификации ТКФ; ● – ГА

Рис. 3. Дифрактограммы образцов после 800 °С: *1* – ТКФ-0; *2* – ТКФ-1; *3* – ТКФ-1 / фибрин; *4*, *5* – ТКФ-1 / 4 об.% цитратная плазма; *6* – ТКФ-2; *7* – ТКФ-2 / фибрин; *8* – ТКФ-2 / 24 об.% цитратная плазма; *9* – ТКФ-3; *10*, *11* – ТКФ-3 / 24 об.% цитратная плазма

Fig. 3. XRD patterns of the samples after calcination at 800 °C: *1* – TCP-0; *2* – TCP-1; *3* – TCP-1 / fibrin; *4*, *5* – TCP-1 / 4 vol.% citrated plasma; *6* – TCP-2; *7* – TCP-2 / fibrin; *8* – TCP-2 / 24 vol.% citrated plasma; *9* – TCP-3; *10*, *11* – TCP-3 / 24 vol.% citrated plasma

может быть связано с быстрым удалением ионов Ca^{2+} и OH^{-}, ответственных за дополнительное созревание ГА в условиях декантации. В композитах ТКФ-3/цитратная плазма влияние биополимера способствовало вытягиванию кристаллитов вдоль грани (0 0 1) с увеличением их размера до 19 %. Данные табл. 1 указывают на зависимость формы кристаллитов апатитного ТКФ не только от времени созревания и способа выделения, но и от действия биополимерной матрицы. Относительные вариации параметров кристаллической решетки апатитного ТКФ не превышали 2 % (табл. 1), что может свидетельствовать о незначительном искажении апатитовой решетки в различных условиях выделения и в присутствии биополимерной матрицы.

Фазовый состав и Ca/P соотношение аморфизированных апатитов оценивали по их термическим превращениям после 800 °С [2, 3]. По данным РФА, образец ТКФ-0 после 800 °С (рис. 3, кривая *1*) представлен однофазным β-ТКФ (табл. 2), который кристаллизовался из апатитного ТКФ в соответствии с реакцией разложения кальцийдефицитных ГА:

$$Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x} \rightarrow (1-x)\ Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 3x\ \beta\text{-}Ca_3(PO_4)_2, \quad (1)$$

где параметр нестехиометричности $0 < x \leq 1$, который для апатитного ТКФ с Ca/P 1,50 составляет 1,00. Формулу кальцийдефицитного ГА $Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$ можно представить в виде твердого раствора апатитного ТКФ со стехиометрическим ГА $xCa_9HPO_4(PO_4)_5OH\cdot(1-x)Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. В таком случае x соответствует мольной доле апатитного ТКФ в твердом растворе и позволяет оценивать степень превращения апатитного ТКФ в стехиометрический ГА, а его изменение Δx свидетельствует об ускорении ($\Delta x > 0$) либо затруднении ($\Delta x < 0$) данного превращения. Известно [30], что условия получения ТКФ-0 при малом времени созревания 30 мин способствуют частичной стабилизации АФК в структуре апатитного ТКФ. При температуре ~650 °С фаза АФК кристаллизуется в метастабильный α-ТКФ, согласно уравнению реакции (2), который после 800 °С превращается в β-ТКФ.

$$Ca_9(PO_4)_6\cdot nH_2O \rightarrow 3\ \alpha\text{–}Ca_3(PO_4)_2 + nH_2O,\ n = 3{,}0\text{–}4{,}5. \quad (2)$$

Предположительно повышенная аморфизация ТКФ-0 в сравнении с ТКФ-1,2,3 обусловлена именно стабилизацией фазы АФК в его структуре.

Индивидуальный ТКФ-1 и его композит с фибрином после 800 °С (рис. 3, кривые *2*, *3*) представлены преимущественно смесью ГА и α-ТКФ с небольшим содержанием β-ТКФ. Кристаллизация включений АФК, согласно уравнению реакции (2), обусловливает присутствие α-ТКФ, который стабилизируется относительно аллотропного превращения при 800 °С за счет основной фазы ГА.

Таблица 2. **Фазовый состав кальцийфосфатов до и после термообработки при 800 °С**

Table 2. **Phase composition of the calcium phosphates before and after calcination at 800 °С**

Серия	Биополимерная матрица	Параметр *x*, 60 °С	Содержание фаз, мас.%			Отношение Ca/P
			60 °С	800 °С		
			АФК	α-ТКФ	β-ТКФ	
ТКФ-0	–	1,00	0,0	0,0	100,0	1,50
ТКФ-1	–	0,15	37,3	35,9	9,0	1,59
	Фибрин	0,02	48,4	46,5	1,1	1,58
	6 об.% цитратная плазма	0,18	45,4	44,0	9,4	1,57
		0,65	1,0	1,0	62,8	1,56
ТКФ-2	–	0,80	1,0	1,0	78,0	1,53
	Фибрин	0,81	1,0	0,0	80,3	1,53
	24 об.% цитратная плазма	0,52	1,4	1,4	49,5	1,58
ТКФ-3	–	0,04	2,9	2,7	3,2	1,66
	24 об.% цитратная плазма	0,38	14,5	14,1	31,4	1,59
		0,66	0,0	0,0	64,6	1,56

Образование смеси ГА / β-ТКФ после 800 °С является следствием термического превращения кальцийдефицитного ГА с $x < 1{,}00$, согласно уравнению реакции (1). Совокупность данных о составе трехкомпонентных смесей на основе ГА, α/β-ТКФ после 800 °С позволило оценить параметр x и содержание АФК в апатитном ТКФ (табл. 2), а также отношение Ca/P нанокомпозитов.

Созревание ТКФ-1 под маточным раствором в течение 7 сут сопровождалось увеличением его соотношения Ca/P до 1,59 (табл. 2) по сравнению с ТКФ-0, что свидетельствует о нестабильности апатитного ТКФ относительно превращения в стехиометрический ГА. В отсутствие избыточных ионов Ca^{2+}, превращение апатитного ТКФ происходило путем растворения–осаждения [3] в соответствии с уравнением реакции (3):

$$10Ca_9HPO_4(PO_4)_5OH + 14OH^- \rightarrow 9Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 6HPO_4^{2-} + 4H_2O. \quad (3)$$

По-видимому, движущей силой реакции (3) является повышенная термодинамическая устойчивость стехиометрического ГА по сравнению с апатитным ТКФ [6]. Влияние фибринового сгустка в композите ТКФ-1 способствовало ускорению превращения (3) на $\Delta x = 0{,}13$ и стабилизации включений АФК (табл. 2). Соответственно фибриновая матрица стабилизировала АФК и затрудняла его превращение в апатит, что ранее наблюдалось в композитах ГА/фибрин при pH 11 [20]. В случае цитратной плазмы установлены два варианта влияния биополимера на фазовый состав ТКФ: 1) стабилизация 45,4 мас.% АФК при незначительном формировании апатитного ТКФ на $\Delta x = 0{,}03$; 2) отсутствие включений АФК при значительном увеличении количества апатитного ТКФ на $\Delta x = 0{,}63$. Стабилизация АФК в присутствии фибрина либо цитратной плазмы, по-видимому, аналогична таковой в присутствии других биополимеров [31], а затруднение превращения (3) обусловлено ограничением диффузии ионов Ca^{2+} под действием полианионов цитратной плазмы [21]. Предположительно, именно условия осаждения (pH 9, Ca/P 1,50, время созревания 7–14 сут) определяли диапазон возможных значений Ca/P от 1,56 до 1,59 формирующихся кальцийфосфатов, что объясняет выраженное проявление одного из вариантов влияния цитратной плазмы – затруднение превращения апатитного ТКФ в стехиометрический ГА либо стабилизация АФК.

Образцы на основе ТКФ-2, которые после 7 сут созревания выделяли комбинированным методом фильтрования-декантации, после 800 °С представлены преимущественно смесью ГА и β-ТКФ (рис. 3, кривые *6*–*8*). Небольшое содержание фазы α-ТКФ в составе ТКФ-2 и его композитов после 800°С может быть обусловлено ее полиморфным превращением в присутствии β-ТКФ, как и в случае ТКФ-0 (рис. 3, кривая *1*). Результаты предварительной оценки составов ТКФ-2 и ТКФ-2 / фибрин до термообработки свидетельствуют о формировании ГА с параметром $x = 0{,}80$ и Ca/P 1,53 (табл. 2), а в ТКФ-2 / цитратная плазма параметр x составил 0,52. Уменьшение отношения Ca/P от 1,59 для ТКФ-1 до 1,53 для ТКФ-2 при одинаковом времени созревания кальцийфосфатов в течение

7 сут обусловлено фильтрованием ТКФ-2 и удалением маточного раствора из объема макропор гелеобразного осадка, что предотвращает возможность дополнительного созревания ГА. Соответственно в условиях комбинированного выделения ТКФ-2 его отношение Ca/P определялось преимущественно временем созревания, что позволяет оценить зависимость степени превращения апатитного ТКФ в стехиометрический ГА от времени его созревания.

Дифрактограммы индивидуального ТКФ-3 после 800 °С (рис. 3, кривая *9*) представлены преимущественно рефлексами ГА при соотношении Ca/P 1,66, а композиты с цитратной плазмой дополнительно содержали α/β-ТКФ (рис. 3, кривые *9–11*) при соотношении Ca/P 1,56–1,59. До термообработки ТКФ-3 представлен фазой ГА с минимальным содержанием апатитного ТКФ с параметром x = 0,04 при соотношении Ca/P 1,66 (табл. 2) в течение 14 сут созревания ТКФ-3. В 24 об.% цитратной плазмы формирование ТКФ-3 определялось двумя вариантами влияния биополимера: 1) стабилизация 14,5 мас.% АФК при затруднении превращения (3) на Δx = 0,34; 2) отсутствие фазы АФК при значительном увеличении количества апатитного ТКФ на Δx = 0,62. Установлено, что влияние цитратной плазмы на формирование кальцийфосфатов изменяется незначительно при увеличении ее содержания от 4 до 24 об.%. Соответственно фазовый состав и соотношение Ca/P нанокомпозитов определялись преимущественно условиями осаждения и выделения кальцийфосфатов, при этом биополимерная матрица (фибрин, цитратная плазма) обеспечивала возможность управления количеством включений АФК и степенью превращения апатитного ТКФ в стехиометрический ГА.

Выводы. Установлены физико-химические особенности формирования апатитного трикальцийфосфата в аутофибриновой матрице при соотношении Ca/P 1,50, pH 9 и времени созревания от 30 мин до 7–14 сут. В отсутствие биополимерной матрицы созревание апатитного трикальцийфосфата $Ca_9HPO_4(PO_4)_5OH$ в течение 7–14 сут сопровождалось увеличением соотношения Ca/P до 1,53–1,66 за счет частичного превращения в стехиометрический гидроксиапатит. В нанокомпозитах фибриновый сгусток способствовал формированию до 48,4 мас.% включений аморфного фосфата кальция, а цитратная плазма затрудняла превращение апатитного трикальцийфосфата в стехиометрический гидроксиапатит, о чем свидетельствовало увеличение содержания β-трикальцийфосфата в нанокомпозитах после 800 °С. Созревание нанокомпозитов в течение 7–14 сут способствовало уменьшению их растворимости при увеличении соотношения Ca/P до 1,53–1,59. Полученные нанокомпозиты перспективны при разработке гибридных скаффолдов для костно-тканевой инженерии с остеоинтеграционными свойствами и управляемой резорбируемостью.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия» по заданию 2.1.04, НИР 7 на 2021–2025 гг. и гранта НАН Беларуси № 2021-27-173 на 2021 г.

Acknowledgements. The work was supported by the State Committee for Science and Technology of the Republic of Belarus “Chemical technologies and materials” (Task 2.1.04, Scientific research work 7 for 2021–2025) and the National Academy of Sciences of Belarus under the grant № 2021-27-173 for 2021.

Список использованных источников

1. A Review on the Synthesis and Properties of Hydroxyapatite for Biomedical Applications / V. G. DileepKumar [et al.] // J. Biomater. Sci., Polym. Ed. – 2021. – N just-accepted. – P. 1–29. https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1980985

2. Ishikawa, K. Determination of the Ca/P ratio in calcium-deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis / K. Ishikawa, P. Ducheyne, S. Radin // J. Mater. Sci.: Mater. Med. – 1993. – Vol. 4, N 2. – P. 165–168. https://doi.org/10.1007/BF00120386

3. Synthesis, identification and impurities detection in bioactive hydroxyapatite / V. K. Tsuber [et al.] // Pharm. Chem. J. – 2006. – Vol. 40, N 8. – P. 455–458. https://doi.org/10.1007/s11094-006-0151-2

4. Uskoković, V. The role of hydroxyl channel in defining selected physicochemical peculiarities exhibited by hydroxyapatite / V. Uskoković // RSC Adv. – 2015. – Vol. 5, N 46. – P. 36614–36633. https://doi.org/10.1039/C4RA17180B

5. Zhang, H. Characterization and thermal behavior of calcium deficient hydroxyapatite whiskers with various Ca/P ratios / H. Zhang, M. Zhang // Mater. Chem. Phys. – 2011. – Vol. 126, N 3. – P. 642–648. https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.12.067

6. Synthesis of calcium orthophosphates by chemical precipitation in aqueous solutions: The effect of the acidity, Ca/P molar ratio, and temperature on the phase composition and solubility of precipitates / M. V. Nikolenko [et al.] // Proc. – 2020. – Vol. 8, N 9. – P. 1009. https://doi.org/10.3390/pr8091009

7. Martin, R. I. Aqueous formation of hydroxyapatite / R. I. Martin, P. W. Brown // J. Biomed. Mater. Res. – 1997. – Vol. 35, N 3. – P. 299–308. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19970605)35:3<299::AID-JBM4>3.0.CO;2-C

8. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate / A. Destainville [et al.] // Mater. Chem. Phys. – 2003. – Vol. 80, N 1. – P. 269–277. https://doi.org/10.1016/S0254-0584(02)00466-2

9. Carrodeguas, R. G. α-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications / R. G. Carrodeguas, S. De Aza // Acta Biomater. – 2011. – Vol. 7, N 10. – P. 3536–3546. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.019

10. Combes, C. Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials / C. Combes, C. Rey // Acta Biomater. – 2010. – Vol. 6, N 9. – P. 3362–3378. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.017

11. Heughebaert, J. C., Montel G. Conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatitic tricalcium phosphate / J. C. Heughebaert, G. Montel // Calcif. Tiss. Int. – 1982. – Vol. 34. – P. S103–S108.

12. Solid state 31 NMR studies of the conversion of amorphous tricalcium phosphate to apatitic tricalcium phosphate / J. E. Roberts [et al.] // Calcif. Tiss. Int. – 1991. – Vol. 49, N 6. – P. 378–382. https://doi.org/10.1007/BF02555846

13. Электрокинетические свойства гелей фосфатов кальция / И. Е. Глазов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2020. – Т. 56, № 4. – С. 419–428. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-419-428

14. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering / A. Noori [et al.] // Int. J. Nanomed. – 2017. – Vol. 12. – P. 4937–4961. https://doi.org/10.2147/IJN.S124671

15. Khodakaram-Tafti, A. An overview on autologous fibrin glue in bone tissue engineering of maxillofacial surgery / A. Khodakaram-Tafti, D. Mehrabani, H. Shaterzadeh-Yazdi // Dent. Res. J. – 2017. – Vol. 14, N 2. – P. 79–86.

16. Ehrenfest, D. M. D. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) / D. M. D. Ehrenfest, L. Rasmusson, T. Albrektsson // Trends in biotechnology. – 2009. – Vol. 27, N 3. – P. 158–167. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009

17. Alam, S. A Comparative Study of Platelet-Rich Fibrin and Platelet-Rich Fibrin with Hydroxyapatite to Promote Healing of Impacted Mandibular Third Molar Socket / S. Alam, G. Khare, K. V. A. Kumar // J. Maxillofac. Oral Surg. – 2020. – P. 1–8. https://doi.org/10.1007/s12663-020-01417-9

18. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering / D. Le Nihouannen [et al.] // Biomater. – 2006. – Vol. 13. – P. 2716–2722. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.038

19. Гибридные биоматериалы на основе гидроксиапатита и компонентов крови / В. К. Крутько [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2019. – Т. 55, № 3. – С. 299–308. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-3-299-308

20. Использование композиционных материалов на основе фибрина и гидрогеля гидроксиапатита в риносептопластике / Р. А. Власов [и др.] // Оториноларингология. Восточная Европа. – 2013. – № 3. – С. 29–32.

21. Синтез композиционных материалов на основе фосфатов кальция и компонентов крови / И. Е. Глазов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2019. – Т. 55, № 2. – С. 135–141. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-2-135-141

22. Effect of platelet-poor plasma additive on the formation of biocompatible calcium phosphates / I. E. Glazov [et al.] // Mater. Today Comm. – 2021. – Vol. 27, N 5. – P. 102224. https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102224

23. Preparation of Bioactive Mesoporous Calcium Phosphate Granules / O. N. Musskaya [et al.] // Inorg. Mater. – 2018. – Vol. 54, N 2. – P. 117–124. https://doi.org/10.1134/S0020168518020115

24. Hydroxyapatite formation under combined treatment of a gel in the secondary maturation stage / S. A. Ulasevich [et al.] // Russian J. Gen. Chem. – 2015. – Vol. 85, N 1. – P. 1–6. https://doi.org/10.1134/S107036321501001

25. Doebelin, N. Profex: a graphical user interface for the Rietveld refinement program BGMN / N. Doebelin, R. Kleeberg // J. Appl. Crystallography. – 2015. – Vol. 48, N 5. – P. 1573–1580. https://doi.org/10.1107/S1600576715014685

26. Hydroxyapatite surface roughness: complex modulation of the osteoclastogenesis of human precursor cells / J. Costa-Rodrigues [et al.] // Acta Biomater. – 2012. – Vol. 8, N 3. – P. 1137–1145. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.032

27. The α-helix to β-sheet transition in stretched and compressed hydrated fibrin clots / R. I. Litvinov [et al.] // Biophys. J. – 2012. – Vol. 103, N 5. – P. 1020–1027. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.07.046

28. Жидкофазный синтез карбонат-гидроксиапатита / И. Е. Глазов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2019. – Т. 55, № 4. – С. 391–399. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-4-391-399

29. Chaair, H. Precipitation of stoichiometric apatitic tricalcium phosphate prepared by a continuous process / H. Chaair, J. C. Heughebaert, M. Heughebaert // J. Mater. Chem. – 1995. – Vol. 5, N 6. – P. 895–899. https://doi.org/10.1039/JM9950500895

30. Глазов, И. Е. Жидкофазное формирование незамещенного и карбонатзамещенного гидроксиапатита / И. Е. Глазов, В. К. Крутько, О. Н. Мусская // Тез. докл. XVIII Междунар. науч. конф. «Молодежь в науке – 2021». – Минск: Беларуская навука, 2021. – Ч. 2. – С. 363–366.

31. Reynolds, E. C. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence / E. C. Reynolds // Adv. Dent. Res. – 2009. – Vol. 21, N 1. – P. 25–29. https://doi.org/10.1177/0895937409335619

References

1. DileepKumar V. G., Santosh M. S., Pornanong A., Krut'ko V. K., Musskaya O. N., Glazov I. E., Reddy N. Review on the Synthesis and Properties of Hydroxyapatite for Biomedical Applications. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2021, 03 Oct., pp. 1–29. https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1980985

2. Ishikawa K., Ducheyne P., Radin S. Determination of the Ca/P ratio in calcium-deficient hydroxyapatite using X-ray diffraction analysis. *Journal of Material Sciences: Materials in Medicine*, 1993, vol. 4, no. 2, pp. 165–168. https://doi.org/10.1007/BF00120386

3. Tsuber V. K., Lesnikovich L. A., Kulak A. I., Trofimova I. V., Petrov P. T., Truhacheva T. V., Kovalenko J. D., Krasil'nikova V. L. Synthesis, identification and impurities detection in bioactive hydroxyapatite. *Pharmaseutical Chemistry Journal*, 2006, vol. 40, no. 8, pp. 455–458. https://doi.org/10.1007/s11094-006-0151-2

4. Uskoković V. The role of hydroxyl channel in defining selected physicochemical peculiarities exhibited by hydroxyapatite. *RSC Advances*, 2015, vol. 5, iss. 46, pp. 36614-36633. https://doi.org/10.1039/C4RA17180B

5. Zhang H., Zhang M. Characterization and thermal behavior of calcium deficient hydroxyapatite whiskers with various Ca/P ratios. *Materials Chemistry and Physics*, 2011, vol. 126, no. 3, pp. 642–648. https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.12.067

6. Nikolenko M. V., Vasylenko K. V., Myrhorodska V. D., Kostyniuk A., Likozar B. Synthesis of calcium orthophosphates by chemical precipitation in aqueous solutions: The effect of the acidity, Ca/P molar ratio, and temperature on the phase composition and solubility of precipitates. *Processes*, 2020, vol. 8, no 9, p. 1009. https://doi.org/10.3390/pr8091009

7. Martin R. I., Brown P. W. Aqueous formation of hydroxyapatite. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1997, vol. 35, no. 3, pp. 299–308. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19970605)35:3<299::AID-JBM4>3.0.CO;2-C

8. Destainville A., Champion E., Bernache-Assollant D., Laborde D. Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate. *Materials Chemistry and Physics*, 2003, vol. 80, no. 1, pp. 269–277. https://doi.org/10.1016/S0254-0584(02)00466-2

9. Carrodeguas R. G., De Aza S. α-Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 2011, vol. 7, no. 10, pp. 3536–3546. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.019

10. Combes C., Rey C. Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials. *Acta Biomaterialia*, 2010, vol. 6, no. 9, pp. 3362–3378. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.02.017

11. Heughebaert J. C., Montel G. Conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatitic tricalcium phosphate. *Calcified Tissue Intermational*, 1982, vol. 34, p. S103–S108.

12. Roberts J. E., Heughebaert M., Heughebaert J. C., Bonar L. C., Glimcher M. J., Griffin R. J. Solid state 31 NMR studies of the conversion of amorphous tricalcium phosphate to apatitic tricalcium phosphate. *Calcified Tissue Intermational*, 1991, vol. 49, no. 6, pp. 378–382. https://doi.org/10.1007/BF02555846

13. Glazov I. E., Malakhovsky P. O., Krut'ko V. K., Musskaya O. N., Kulak A. I. Electrokinetic properties of colloid calcium phosphate. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2020, vol. 56, no. 4, pp. 419–428 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2020-56-4-419-428

14. Noori A., Ashrafi S. J., Vaez-Ghaemi R., Hatamian-Zaremi A., Webster T. J. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *International journal of nanomedicine*, 2017, vol. 12, pp. 4937–4961. https://doi.org/10.2147/IJN.S124671

15. Khodakaram-Tafti A., Mehrabani D., Shaterzadeh-Yazdi H. An overview on autologous fibrin glue in bone tissue engineering of maxillofacial surgery. *Dental Research Journal*, 2017, vol. 14, no. 2, pp. 79–86.

16. Ehrenfest D. M. D., Rasmusson L., Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in biotechnology*, 2009, vol. 27, no. 3, pp. 158–167. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009

17. Alam S., Khare G., Kumar K. V. A. A Comparative Study of Platelet-Rich Fibrin and Platelet-Rich Fibrin with Hydroxyapatite to Promote Healing of Impacted Mandibular Third Molar Socket. *Journal of Maxillofacial and Oral Surger*y, 2020, pp. 1–8. https://doi.org/10.1007/s12663-020-01417-9

18. Le Nihouannen D., Le Guehennec L., Rouillon T., Pilet P., Bilban M., Layrolle P., Daculsi G. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, no. 13, pp. 2716–2722. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.11.038

19. Krut'ko V. K., Vlasov R. A., Musskaya O. N., Glazov I. E., Kulak A. I. Hibrid biomaterials based on hydroxyapatite and blood components. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2019, vol. 55, no. 3, pp. 299–308 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-3-299-308

20. Vlasov R. A., Mel'nik V. F., Merkulova E. P., Krut'ko V. K., Musskaya O. N., Kulak A I., Lesnikovich L. A., Ulasevich S. A. Application of composite materials on the basis of fibrin and hydrogel of hydroxyapatite for rhinoseptoplasty. *Otorinolaringologiya. Vostochnaya Evropa = Otorhinolaryngology. Eastern Europe*, 2013, vol. 12, no. 3, pp 29–32 (in Russian).

21. Glazov I. E., Vlasov R. A., Krut'ko V. K., Musskaya O. N. Synthesis of composite materials based on calcium phosphates and blood components. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2019, vol. 55, no. 2, pp. 135–141 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-2-135-141

22. Glazov I. E., Krut'ko V. K., Kulak A. I., Musskaya O. N., Vlasov R. A., Malakhovsky P. O., DileepKumar V. G., Surya P. S., Santosh M. S., Reddy N. Effect of platelet-poor plasma additive on the formation of biocompatible calcium phosphates. *Materials Today Communications*, 2021, vol. 27, no. 5, p. 102224. https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2021.102224

23. Musskaya O. N., Kulak A. I., Krut'ko V. K., Lesnikovich Yu. A., Kazbanov V. V., Zhitkova N. S. Preparation of bioactive mesoporous calcium phosphate granules. *Inorganic Materials*, 2018, vol. 54, no. 2, pp. 117–124. https://doi.org/10.1134/S0020168518020115

24. Ulasevich S. A., Kulak A. I., Krut'ko V. K., Musskaya O. N., Lesnikovich V. K., Safronova T. V. Hydroxyapatite formation under combined treatment of a gel in the secondary maturation stage. *Russian Journal of General Chemistry*, 2015, vol. 85, no. 1, pp. 1–6. https://doi.org/10.1134/S107036321501001

25. Doebelin N., Kleeberg R. Profex: a graphical user interface for the Rietveld refinement program BGMN. *Journal of Applied Crystallography*, 2015, vol. 48, no. 5, pp. 1573–1580. https://doi.org/10.1107/S1600576715014685

26. Costa-Rodrigues J., Fernandes A., Lopes M. A., Fernandes M. H. Hydroxyapatite surface roughness: complex modulation of the osteoclastogenesis of human precursor cells. *Acta Biomaterialia*, 2012, vol. 8, no. 3, pp. 1137–1145. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.032

27. Litvinov R. I., Faizullin D. A., Zuev Y. F., Weisel J. W. The α-helix to β-sheet transition in stretched and compressed hydrated fibrin clots. *Biophysical Journal*, 2012, vol. 103, no. 5, pp. 1020–1027. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.07.046

28. Glazov I. E., Krut'ko V. K., Musskaya O. N., Kulak A. I. Wet synthesis of carbonated hydroxyapatite. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2019, vol. 55, no. 4, pp. 391–399 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2019-55-4-391-399

29. Chaair H., Heughebaert J. C., Heughebaert M. Precipitation of stoichiometric apatitic tricalcium phosphate prepared by a continuous process. *Journal of Materials Chemistry*, 1995, vol. 5, no. 6, pp. 895–899. https://doi.org/10.1039/JM9950500895

30. Glazov I. E., Krut'ko V. K., Musskaya O. N. Wet formation of unsubstituted and carbonated hydroxyapatite. *Tezisy dokladov XVIII Mezhdunarodnoi nauchnoi konferencii «Molodezh' v nauke – 2021»* [Abstracts of the XVIII International Scientific Conference "Youth in Science – 2021"]. Minsk, Belaruskaya navuka Publ., 2021, pp. 363–366 (in Russian).

31. Reynolds E. C. Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence. *Advances in dental research*, 2009, vol. 21, no. 1, pp. 25–29. https://doi.org/10.1177/0895937409335619

Информация об авторах

Глазов Илья Евгеньевич – мл. науч. сотрудник. Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: che.glazov@mail.ru

Крутько Валентина Константиновна – канд. хим. наук, доцент, зав. лаб. Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tsuber@igic.bas-net.by

Власов Роман Алексеевич – ЛОР-врач. Медицинский центр SANTE ООО «Меданровит» (ул. Тростенецкая, 3, 220033, Минск, Республика Беларусь). E-mail: rvalekseevich@mail.ru

Мусская Ольга Николаевна – канд. хим. наук, доцент, ст. науч. сотрудник. Институт общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: musskaja@igic.bas-net.by

Кулак Анатолий Иосифович – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор, директор Института общей и неорганической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 9/1, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kulak@igic.bas-net.by

Information about the authors

Ilya E. Glazov – Junior Researcher. Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganova Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: che.glazov@mail.ru

Valentina K. Krut'ko – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Head of the Laboratory. Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganova Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tsuber@igic.bas-net.by

Roman A. Vlasov – ENT specialist, Medical Center SANTE Ltd. "Medandrovit" (3, Trostenetskaya Str., 220033, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rvalekseevich@mail.ru

Olga N. Musskaya – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Senior Researcher. Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganova Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: musskaja@igic.bas-net.by

Anatoly I. Kulak – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Chemistry), Professor, Director of the Institute of General and Inorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (9/1, Surganova Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kulak@igic.bas-net.by

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

АРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

ORGANIC CHEMISTRY

УДК 547.327+547.786.1+579.63
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-424-430

Поступила в редакцию 28.07.2021
Received 28.07.2021

М. П. Бей[1], А. П. Ювченко[1], В. И. Поткин[2], С. К. Петкевич[2]

[1]Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

СИНТЕЗ И СВОЙСТВА АМИДОВ, ИМИДОВ И ИМИДОАМИДОВ МАЛЕОПИМАРОВОЙ КИСЛОТЫ С АРИЛИЗОКСАЗОЛЬНЫМ И ХИНОЛИНОВЫМ ФРАГМЕНТАМИ

Аннотация. Разработан метод синтеза N-(5-арилизоксазол-3-ил)амидов малеопимаровой кислоты взаимодействием хлорангидрида малеопимаровой кислоты и 3-амино-5-фенил(4-метилфенил)изоксазолов. На основе полученных амидов синтезированы N'-бутил-, N'-(2-гидроксиэтил)имиды N-(5-арилизоксазол-3-ил)амидов малеопимаровой кислоты. Взаимодействием малеопимаровой кислоты и 8-аминохинолина в кипящем толуоле впервые синтезирован гетероциклический имид – N-(хинолин-8-ил)имид малеопимаровой кислоты с выходом 97,1 %. Установлено, что при кипячении в толуоле 8-аминохинолина и канифольно-малеинового аддукта, получаемого обработкой смоляных кислот канифоли малеиновым ангидридом и содержащего не менее 50 % малеопимаровой кислоты, также происходит образование N-(хинолин-8-ил)имида малеопимаровой кислоты с выходом 52,5 % (в расчете на массу канифольно-малеинового аддукта). Методами ИК- и ЯМР ^{1}H спектроскопии и масс-спектрометрии показано, что N-(хинолин-8-ил)имид малеопимаровой кислоты представляет собой смесь двух диастереомерных атропоизомеров в соотношении 1:0,40. Произведена оценка биологической активности ряда полученных соединений. Установлено, что N-(5-(4-метилфенил)изоксазолил-3)амид малеопимаровой кислоты обладает закручивающей способностью (26,0 мкм-1) и может быть использован в качестве хиральной добавки к нематической ЖК-матрице для получения хиральных ЖК-композиций.

Ключевые слова: малеопимаровая кислота, изоксазол, хинолин, амид, имид, имидоамид, смоляная кислота, биоцид, хиральный допант

Для цитирования. Синтез и свойства амидов, имидов и имидоамидов малеопимаровой кислоты с арилизоксазольным и хинолиновым фрагментами / М. П. Бей [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 424–430. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-424-430

M. P. Bei[1], A. P. Yuvchenko[1], V. I. Potkin[2], S. K. Petkevich[2]

[1]Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Science of Belarus, Minsk, Belarus
[2]Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF MALEOPIMARIC ACID AMIDES, IMIDES AND IMIDOAMIDES WITH ARYLISOXAZOLE AND QUINOLINE FRAGMENTS

Abstracts. The method for maleopimaric acid N-(5-arylisoxazol-3-yl)amides synthesis has been developed by reaction of maleopimaric acid chloride with 3-amine-5-phenyl(4-methylphenyl)isoxazoles. N'-butyl-, N'-(2-hydroxyethyl)imides of maleopimaric acid N-(5-arylisoxazol-3-yl)amides were prepared. Heterocyclic imide – maleopimaric acid N-(quinolin-8-yl) imide was prepared by reaction of maleopimaric acid and 8-aminoquinoline in toluene at reflux in 97.1 % yield. It was established that refluxing of toluene solution of 8-aminoquinoline and maleated rosin, prepared by treatment of rosin with maleic anhydride and containing at least 50 % of maleopimaric acid, leads to the formation of maleopimaric acid N-(quinolin-8-yl)imide in 52.5 % yield (based on weight of maleated rosin). It was found by the methods of IR-, ^{1}H NMR spectroscopy and mass-spectrometry that maleopimaric acid N-(quinolin-8-yl)imide consists of two diastereomeric atropisomers at 1:0.40 ratio. The biological properties of the prepared compounds were studied. It was established that maleopimaric acid N-(5-(4-methylphenyl)isoxazol-3-yl)amide possesses rotatory power (26 mkm-1) and may be used as chiral dopant to nematic LC for preparation of chiral LC-compositions.

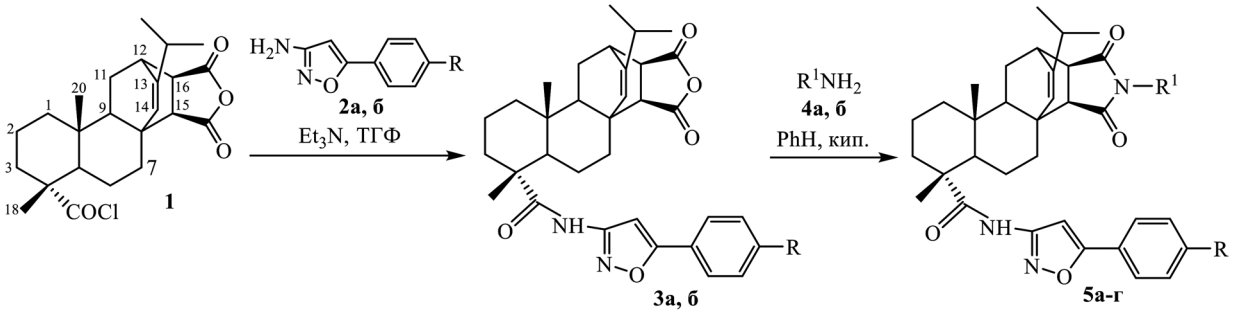
Keywords: maleopimaric acid, isoxazole, quinoline, amide, imide, imidoamide, rosin acid, biocide, chiral dopant

For citation. Bei M. P., Yuvchenko A. P., Potkin V. I., Petkevich S. K. Synthesis and properties of maleopimaric acid amides, imides and imidoamides with arylisoxazole and quinoline fragments. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 424–430 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-424-430

Введение. Из азотсодержащих производных малеопимаровой кислоты (доступного терпеноидного продукта, получаемого на основе возобновляемого лесохимического сырья – канифоли) известны в основном алифатические, ароматические и циклоалифатические амиды, имиды и имидоамиды [1–5]. Описаны отдельные представители гетероциклических амидов малеопимаровой кислоты, содержащие пиперазиновый и морфолиновый фрагменты [6], замещенные пиразолы [7], имидазол [8] с выраженной иммуномодулирующей, антимикробной и фунгицидной активностью. Были получены N-(1-нафтил-, хинолин-8-ил)имиды метиловых эфиров малеопимаровой кислоты и исследованы кинетические параметры взаимопревращения атропоизомеров этих соединений [9]. С использованием разработанного нами ранее [10] аллилового эфира малеопимаровой кислоты получены 4,5-дигидроизоксазолсодержащие производные малеопимаровой кислоты, проявляющие антимикробную и фунгицидную активность [11].

Цель настоящей работы – синтез новых гетероциклических производных малеопимаровой кислоты: N-(5-арилизоксазол-3-ил)амидов **3 а, б**, N'-имидов-N-(5-арилизоксазол-3-ил)амидов **5 а–г** и N-(хинолин-8-ил)имида **8**, оценка антимикробной и фунгицидной активности, термической стабильности и закручивающей способности (по отношению к нематическим ЖК) ряда синтезированных соединений.

Методы исследований. Синтез целевых амидов малеопимаровой кислоты **3 а, б** осуществляли ацилированием изоксазолсодержащих аминов **2 а, б** хлорангидридом малеопимаровой кислоты **1**. Взаимодействие хлорангидрида **1** и 3-амино-5-арилизоксазолов **2 а, б** в тетрагидрофуране с триэтиламином в качестве акцептора хлороводорода при 18–20 °С в течение 10 ч и последующая обработка привела к образованию смеси, содержащей до 70 % целевых амидов **3 а, б**. Увеличение продолжительности (до 50 ч) и температуры реакции (до 45–50 °С) позволяет повысить выход амидов **3 а, б** до 90 %. Попытки получить амиды **3 а, б** в индивидуальном виде путем перекристаллизации реакционных продуктов из ацетона, гексана, тетрагидрофурана, бензола и толуола, а также смесей органических растворителей не увенчались успехом ввиду их высокой растворимости. Индивидуальные амиды **3 а, б** были выделены методом колоночной хроматографии.



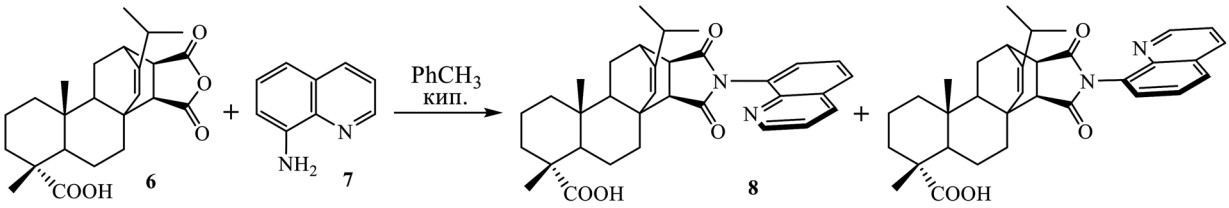
R = H (**2а, 3а**), R^1 = *н*-C_4H_9 (**4а, 5а**), R^1 = CH_2CH_2OH (**4б, 5б**);
R = CH_3 (**2б, 3б**), R^1 = *н*-C_4H_9 (**5в**), R^1 = CH_2CH_2OH (**5г**)

Синтезированы имиды N-(5-арилизоксазол-3-ил)амидов малеопимаровой кислоты **5 а–г**, модифицированные N-бутиламином и моноэтаноламином по ангидридной группе. Синтез целевых имидов **5 а–г** проводили взаимодействием амидов **3 а, б** с бутиламином **4 а** и моноэтаноламином **4 б** кипячением в бензоле в течение 25–30 ч. Индивидуальные N'-бутилимиды и N'-гидроксиэтилимиды N-(5-арилизоксазол-3-ил)амидов малеопимаровой кислоты **5 а–г** были выделены методом колоночной хроматографии с выходами 85–90 %.

Образование амидов **3 а, б** подтверждается отсутствием в ИК-спектрах полос поглощения хлорангидридной группы (C=O)Cl 1781 $см^{-1}$ и появлением полосы поглощения амидной группы (C=O)N в области 1690, 1630 $см^{-1}$, при этом полосы поглощения C=O связи ангидридной группы (1840, 1780 см-1) сохраняются. В спектрах ЯМР ^{1}H синтезированных соединений присутствуют сигналы как фрагмента малеопимаровой кислоты, так и 5-арилизоксазолов. Образование имидов **5 а–г** подтверждено исчезновением в ИК-спектрах полос поглощения C=O связи ангидридной группы в области 1840, 1780 $см^{-1}$ и появлением интенсивной полосы поглощения C=O имидной

группы в области 1690 $см^{-1}$. В спектрах ЯМР ^1H полученных продуктов сохранялись сигналы фрагментов исходных амидов и дополнительно появлялись сигналы NCH_2CH_2 группы (3,38–3,63 м.д.) и бутильной группы (0,86–0,88 м.д. (т, CH_3), 3,06–3,32 м.д. (т, NCH_2)).

Взаимодействием малеопимаровой кислоты **6** и 8-аминохинолина **7** в кипящем толуоле в течение 35 ч впервые синтезирован гетероциклический имид − N-(хинолин-8-ил)имид малеопимаровой кислоты **8** с выходом 97,1 % в виде смеси атропоизомеров.



Установлено, что при кипячении канифольно-малеинового аддукта (образуется при взаимодействия канифоли и малеинового ангидрида при 180–200 °С) и 8-аминохинолина в толуоле в течение 24 ч также происходит образование продукта, содержащего преимущественно имид **8**. Из полученного раствора в толуоле при стоянии при 18−20 °С выделяется индивидуальный имид **8** в виде смеси двух атропоизомеров в соотношении 1:0,40 (данные ЯМР 1Н) с выходом 52,5 % (в расчете на массу канифольно-малеинового аддукта).

Строение имида **8** доказано данными ИК-, ЯМР 1Н спектроскопии, масс-спектрометрическим определением молекулярной массы, элементным анализом. В ИК-спектре полученного имида **8** исчезают характерные полосы поглощения С=О связи ангидридной группы 1790 и 1840 $см^{-1}$ и возникают полосы 1720, 1668 $см^{-1}$ [(C=O)N], характерные для циклических имидов. Масс-спектральный анализ полученного продукта показал наличие вещества с *m/z* 527, что доказывает отщепление молекулы H_2O в ходе реакции. В спектре ЯМР ^1H продукта присутствуют сигналы двух структурно близких соединений в соотношении 1:0,40. Из полученных данных, а также данных работы [9] следует, что конечный продукт представляет собой смесь двух диастереомерных атропоизомеров (изомеров вращения), что связано с высоким барьером вращения вокруг $C–N_{имид}$-связи.

Совместно с кафедрой микробиологии биологического факультета Белорусского государственного университета произведена оценка биологической активности полученных соединений. Среди изоксазолсодержащих амидов и имидоамидов малеопимаровой кислоты наибольший интерес представляет N'-(2-гидроксиэтил)имид-N-(5-фенилизоксазол-3-ил)амида малеопимаровой кислоты **5 б**, проявляющий в отличие от известных ранее амидов и имидов малеопимаровой кислоты антимикробную активность как в отношении ряда грамположительных (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus saprophyticus, Bacillus subtilis, Sarcina lutea*), так и ряда грамотрицательных (*Escherichia coli, Serratia marcessens, Pantoea agglomerans, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida*) бактерий в концентрациях 100 мкг/мл и выше, что делает указанное соединение перспективным для дальнейших исследований. Установлено, что изоксазолсодержащие амиды **3 а, б** и имидоамиды **5 а–г** обладают невысокими фунгицидными свойствами (до 35 %) для исследованных штаммов грибов (*Penicillum Levidum, Botritis Cineria, Alternaria Alterate, Fusarium Oxysporum, Trichoderma Viridae, Aspergillus Niger u Mucor sp.*). Синтезированные производные **3 а, б, 5 а–г** малеопимаровой кислоты могут также представлять интерес для исследований их медико-биологических характеристик, в частности иммуномодулирующих и гепатопротекторных свойств [6].

Использование ЖК-устройств в промышленности требует создания строгоупорядоченных структур жидкокристаллических материалов с заданной ориентацией. С этой целью используются ориентирующие добавки [12]. Совместно с лабораторией материалов и технологий ЖК-устройств Института химии новых материалов (ИХНМ) НАН Беларуси была исследована возможность использования N-(5-(4-метилфенил)изоксазолил-3)амида малеопимаровой кислоты **3 б** в качестве хиральной добавки к нематической жидкокристаллической матрице ЖК 1285 (состав, мас.%: 5-пропил-2-(*п*-цианофенил)пиридин (20), 5-пентил-2-(*п*-цианофенил)пиридин (30), *п*-этоксифениловый эфир *п*-бутилбензойной кислоты (25), *п*-этоксифениловый эфир *п*-гексилбензойной кислоты (15), 5-(*п*-пентилфенил)-2-(*п*-цианофенил)пиридин (10)) и определена сила кручения методом

клина Кано [12]. Установлено, что амид **3 б** обладает закручивающей способностью 26,0 мкм$^{-1}$, что находится на уровне добавок применяемых в промышленности при производстве ЖК-устройств.

Методом дериватографии произведена оценка термической устойчивости N-5-(4-метилфенил)изоксазолил-3-амида **3 б** и N-(хинолин-8-ил)имида **8**. Установлено, что изоксазолсодержащий амид **3 б** начинает разлагаться с заметной скоростью при 285 ºС, а N-(хинолин-8-ил)имид МПК **8** – при 364 °С, что на 79 °С выше температуры начала разложения исходной малеопимаровой кислоты (285 °С).

Экспериментальная часть. ИК-спектры соединений записаны на ИК-Фурье спектрометре Bruker Tensor 27 в таблетках KBr. Спектры ЯМР ^{1}H сняты на спектрометре AVANCE 500 (500 МГц для ^{1}H) для растворов в $CDCl_3$ (**3 а, б**, **5 а, в, г, 8**), ДМСО-d_6 (**5 б, 8**), химические сдвиги определяли относительно остаточного сигнала растворителя (2,50 м.д. в ^{1}H для ДМСО-d_6, 7,27 м.д. в ^{1}H для $CDCl_3$). Масс-спектры соединений получены на масс-спектрометре Accela с масс-детектором LCQ Fleet в режиме химической ионизации (APCI) с детектированием положительных ионов. Элементный анализ выполнен на приборе VARIO Micro Cube CHNS-анализатор. Температуры плавления определяли на приборе OptiMelt Stanford Research Systems MPA 100.

Протекание реакции контролировали методом ТСХ на пластинах с силикагелем 60 F_{254} (Merck Art. 7734).

Термические свойства N-5-(4-метилфенил)изоксазолил-3-амида **3 б** и N-(хинолин-8-ил)имида **8** изучали на дериватографе системы Paulik–Paulik–Erdey в среде аргона с линейной скоростью подъема температуры 5 град/мин. Навески соединений составляли 100 мг (ДТА 1/10, ДТГ 1/10).

Исходные малеопимаровую кислоту **6** и ее хлорангидрид **1** получали по методике [13], 3-амино-5-арилизоксазолы **2 а, б** – по ранее разработанной методике [14]. Канифольно-малеиновый аддукт получен взаимодействием сосновой живичной канифоли (1000 г) и малеинового ангидрида (200 г) в среде аргона при 180−200 °С в течение 8 ч.

Изоксазолсодержащие амиды малеопимаровой кислоты (3 а, б) (общая методика).

Метод А. К раствору 1 г (2,39 ммоль) хлорангидрида малеопимаровой кислоты **1** в 10 мл тетрагидрофурана прикапывали раствор 2,51 ммоль амина **2 а** или **2 б** и 350 мкл (2,51 ммоль) триэтиламина в 5 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь перемешивали в течение 10 ч при 18–20 °С. Ход реакции контролировали методом ТСХ. По окончании реакции растворитель отгоняли на роторном испарителе, к остатку добавляли 25 мл $CHCl_3$ и 25 мл 10 % HCl и перемешивали в течение 1 ч при 18–20 °С. Органический слой отделяли, промывали 3 раза по 20 мл H_2O, сушили над Na_2SO_4, растворитель удаляли. Индивидуальные амиды **3 а, б** из реакционного продукта выделяли методом колоночной хроматографии на Silicagel 60, элюент – гексан–ацетон, 3:2. Выход 0,93 г (71,8 %) амид **3 а,** 0,94 г (70,8 %) амид **3 б**.

Метод Б. К раствору 1 г (2,31 ммоль) хлорангидрида малеопимаровой кислоты **1** в 10 мл тетрагидрофурана прикапывали раствор 2,51 ммоль амина **2 а** или **2 б** и 350 мкл (2,51 моль) триэтиламина в 5 мл тетрагидрофурана. Реакционную смесь перемешивали в течение 50 ч при 45–50 °С. Ход реакции контролировали методом ТСХ. По окончании реакции смесь обрабатывали аналогично предыдущему опыту. Выход 1,17 г (90,3 %) амид **3 а,** 1,19 г (89,6 %) амид **3 б**.

N-(5-фенилизоксазол-3-ил)амид малеопимаровой кислоты (3 а). Т. пл. 128–130 °С. Спектр ЯМР ^{1}H (δ, м.д.): 0,65 с (3H, $C^{20}H_3$), 0,94 м (^{1}H), 1,00 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 1,02 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 1,24 м (1H), 1,33 с (3H, $C^{18}H_3$), 1,34–1,90 м (11H), 2,26 септет (1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$, *J* 7 Гц), 2,52 м (1H, C^7H_{eq}), 2,72 д (1H, $C^{15}H$, *J* 8,5 Гц), 3,01 дд (1H, $C^{16}H$, *J* 8,5 Гц, 3 Гц,), 3,12 уш. с (1H, $C^{12}H$), 5,53 с (1H, $C^{14}H$), 7,35 с (1$H_{аром}$), 7,49 м (3$H_{аром}$), 7,80 м (2$H_{аром}$), 8,78 уш. с (1H, NH). ИК-спектр, см$^{-1}$: 1839, 1778 [(C=O)O], 1684, 1619 [(C=O)N], 1577, 1531, 1476, 1232, 1087. Найдено, %: C 73,63; H 7,29; N 5,45. $C_{33}H_{38}N_2O_5$. Вычислено, %: C 73,40; H 7,06; N 5,16. Масс-спектр, *m/z:* 543 [M^++1].

N-(5-(4-метифенил)изоксазол-3-ил)амид малеопимаровой кислоты (3 б). Т. пл. 131–133 °С. Спектр ЯМР ^{1}H (δ, м.д.): 0,63 с (3H, $C^{20}H_3$), 0,98 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 1,02 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 1,20 м (1H), 1,26 м (1H), 1,31 с (3H, $C^{18}H_3$), 1,34–1,90 м (11H), 2,25 септет (1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$, *J* 7 Гц), 2,45 с (CH_3Ar), 2,51 м (1H, C^7H_{eq}), 2,66 д (1H, $C^{15}H$, *J* 8,5 Гц), 3,01 дд (1H, $C^{16}H$, 8,5 Гц, *J* 3 Гц,), 3,09 уш. с (1H, $C^{12}H$), 5,52 с (1H, $C^{14}H$), 7,30 м (3$H_{аром}$), 7,80 д (2$H_{аром}$, *J* 8 Гц), 9,10 уш. с (1H, NH). ИК-спектр, см$^{-1}$: 1842, 1779 [(C=O)O], 1690, 1622 [(C=O)N], 1540, 1471, 1230, 1086. Найдено, %:

С 73,63; Н 9,29; N 2,79. $C_{34}H_{40}N_2O_5$. Вычислено, %: С 73,36; Н 7,24; N 5,03. Масс-спектр, *m/z*: 557 [M^++1].

N-замещенные имиды изоксазолсодержащие амидов МПК (5 а–г) (общая методика). Раствор 0,50 ммоль амида **3 а, б** и 0,60 ммоль бутиламина или этаноламина в 5 мл бензола кипятили с обратным холодильником 16 ч. По окончании реакции смесь охлаждали до 18–20 °С, добавляли 10 мл бензола. Полученный раствор промывали 2 раза по 5 мл 10 %-ным раствором HCl, 3 раза по 10 мл воды до нейтральной реакции. Органическую фазу отделяли, сушили над $CaCl_2$. Растворитель отгоняли при пониженном давлении, полученный продукт выдерживали в вакууме (1 мм рт. ст.) при температуре 60 °С в течение 1 ч.

Индивидуальные имидоамиды **5 а–г** выделяли методом колоночной хроматографии на Silicagel 60, элюент – гексан–ацетон, 3:2.

N'-бутилимид-N-(5-фенилизоксазол-3-ил)амида малеопимаровой кислоты (5 а). Выход 0,26 г (86 %), т. пл. 144–145 °С. Спектр ЯМР ^{1}H (δ, м.д.): 0,65 с (3H, $C^{20}H_3$), 0,88 т (3H, $(CH_2)_2C\underline{H}_3$, *J* 7 Гц), 0,94 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 0,97 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 1,14 м (2H), 1,31 с (3H, $C^{18}H_3$), 1,34–1,84 м (15H), 2,18 септет (1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$, *J* 7 Гц), 2,37 д (1H, $C^{15}H$, *J* 8,5 Гц), 2,53 м (1H, C^7H_{eq}), 2,74 дд (1H, $C^{16}H$, *J* 8 Гц, 3 Гц,), 3,06 уш. с (1H, $C^{12}H$), 3,32 т (2H, NCH_2), 5,39 с (1H, $C^{14}H$), 7,37 с (1H$_{аром}$), 7,48 м (3H$_{аром}$), 7,80 д (2H$_{аром}$, *J* 6 Гц), 8,85 уш. с (1H, NH). ИК-спектр, см$^{-1}$: 1769, 1697 [(C=O)N]$_{имид}$, 1577 [(C=O)N]$_{амид}$, 1467, 1403. Найдено, %: С 74,58; Н 7,61; N 7,21. $C_{37}H_{47}N_3O_4$. Вычислено, %: С 74,34; Н 7,92; N 7,03. Масс-спектр, *m/z*: 598 [M^++1].

N'-(2-гидроксиэтил)имид-N-(5-фенилизоксазол-3-ил)амида малеопимаровой кислоты (5 б). Выход 0,26 г (90 %), т. пл. 167–169 °С. Спектр ЯМР ^{1}H (δ, м.д.): 0,55 с (3H, $C^{20}H_3$), 0,85 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 0,90 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 1,05 м (1H), 1,10 м (1H), 1,15 с (3H, $C^{18}H_3$), 1,40–1,95 м (11H), 2,08 септет (1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$, *J* 7 Гц), 2,35 м (1H, C^7H_{eq}), 2,47 д (1H, $C^{15}H$, *J* 8 Гц), 2,50 дд (1H, $C^{16}H$, *J* 8 Гц, 3 Гц), 2,88 уш. с (1H, $C^{12}H$), 3,38 м (4H, NCH_2CH_2), 4,77 уш. с (1H, OH), 5,34 с (1H, $C^{14}H$), 7,37 с (1H$_{аром}$), 7,51 м (3H$_{аром}$), 7,88 д (2H$_{аром}$, *J* 8 Гц), 10,60 уш. с (1H, NH). ИК-спектр, см$^{-1}$: 1767, 1693 [(C=O)N]$_{имид}$, 1622 [(C=O)N]$_{амид}$, 1541, 1440, 1165, 803. Найдено, %: С 71,20; Н 7,35; N 7,54. $C_{35}H_{43}N_3O_5$. Вычислено, %: С 71,77; Н 7,40; N 7,17. Масс-спектр, *m/z*: 586 [M^++1].

N'-бутилимид-N-(5-(4-метифенил)изоксазол-3-ил)амида малеопимаровой кислоты (5 в). Выход 0,26 г (85 %), т. пл. 149–151 °С. Спектр ЯМР ^{1}H (δ, м.д.): 0,63 с (3H, $C^{20}H_3$), 0,86 т (3H, $(CH_2)_2C\underline{H}_3$, *J* 7 Гц), 0,92 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 0,96 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 1,20 м (2H), 1,30 с (3H, $C^{18}H_3$), 1,32–1,90 м (15H), 2,17 септет (1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$, *J* 7 Гц), 2,36 д (1H, $C^{15}H$, *J* 8,5 Гц), 2,41 с (3H, $CH_3C_{аром}$), 2,52 м (1H, C^7H_{eq}), 2,74 дд (1H, $C^{16}H$, *J* 8,5 Гц, 3 Гц,), 3,04 уш. с (1H, $C^{12}H$), 3,06 т (2H, NCH_2), 5,38 с (1H, $C^{14}H$), 7,27 м (3H$_{аром}$), 7,68 д (2H$_{аром}$, *J* 8 Гц), 8,65 уш. с (1H, NH). ИК-спектр, см$^{-1}$: 1768, 1697 [(C=O)N]$_{имид}$, 1622 [(C=O)N]$_{амид}$, 1541, 1189, 1019, 946, 802. Найдено, %: С 74,89; Н 8,57; N 6,34. $C_{38}H_{49}N_3O_4$. Вычислено, %: С 74,60; Н 8,07; N 6,87. Масс-спектр, *m/z*: 612 [M^++1].

N'-(2-гидроксиэтил)имид-N-(5-(4-метифенил)изоксазол-3-ил)амида малеопимаровой кислоты (5 г). Выход 0,27 г (90 %), т. пл. 168–170 °С. Спектр ЯМР ^{1}H (δ, м.д.): 0,64 с (3H, $C^{20}H_3$), 0,94 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 0,98 д (3H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 7 Гц), 1,20 м (1H), 1,23 м (1H), 1,31 с (3H, $C^{18}H_3$), 1,32–1,90 м (11H), 2,18 септет (1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$, *J* 7 Гц), 2,42 с ($CH_3C_{аром}$), 2,45 д (1H, $C^{15}H$, *J* 8,5 Гц), 2,53 м (1H, C^7H_{eq}), 2,79 дд (1H, $C^{16}H$, *J* 8,5 Гц, 3 Гц,), 3,04 уш. с (1H, $C^{12}H$), 3,57 м, 3,63 м (4H, NCH_2CH_2), 5,41 с (1H, $C^{14}H$), 7,30 д (2H$_{аром}$, *J* 8 Гц), 7,37 с (1H$_{аром}$), 7,68 д (2H$_{аром}$, *J* 8 Гц), 8,34 уш. с (1H, NH). ИК-спектр, см$^{-1}$: 1769, 1697 [(C=O)N]$_{имид}$, 1622 [(C=O)N]$_{амид}$, 1541, 1469, 1404, 1190, 1139. Найдено, %: С 72,38; Н 7,84; N 7,43. $C_{36}H_{45}N_3O_5$. Вычислено, %: С 72,09; Н 7,56; N 7,01. Масс-спектр, *m/z*: 600 [M^++1].

N-(хинолин-8-ил)имид малеопимаровой кислоты (8).

Метод А. Раствор 5 г (12,5 ммоль) малеопимаровой кислоты **6** и 2 г (13,8 ммоль) 8-аминохинолина **7** в 25 мл толуола кипятили с обратным холодильником 35 ч. Реакционную смесь оставляли на 72 ч при 18–20 °С, выпавший осадок отфильтровывали, промывали 2 раза по 10 мл толуола, сушили на воздухе 48 ч. Выход 97,1 % (6,40 г), т. пл. 364–366 °С.

Метод Б. Раствор 10 г канифольно-малеинового аддукта, 2,5 г (17,2 ммоль) 8-аминохинолина **7** в 25 мл толуола кипятили с обратным холодильником 30 ч. К реакционной смеси добавляли еще

15 мл толуола и оставляли на 48 ч при 18–20 °С. Выпавший осадок имида отфильтровывали, промывали 2 раза по 10 мл толуола. Выход 52,5 мас. % в расчете на КМА (5,25 г), т. пл. 364–366 °С.

Спектр ЯМР ^{1}H (ДМСО-d_6), δ, м.д. (смесь двух ротомеров в соотношении 1/0,40, приведен спектр основного изомера): 0,60 с (3H, $C^{20}H_3$), 0,92 м (2H), 1,00 д, 1,02 д (6H, $(C\underline{H}_3)_2CH$, *J* 6,5 Гц), 1,06 с (3H, $C^{18}H_3$), 1,18 м (2H), 1,39−1,72 м (10H), 2,14 септет (1H, $(CH_3)_2C\underline{H}$), 2,41 м (1H, C^7H_{eq}), 2,93 д (1H, $C^{15}H$, *J* 8 Гц), 3,02 уш. с (1H, $C^{12}H$), 3,23 дд (1H, $C^{16}H$, *J* 8 Гц, 3 Гц), 5,61 с (1H, $C^{14}H$), 7,28 м (1H, $H_{аром}$), 7,61 м (1H, $H_{аром}$), 7,70 м (1H, $H_{аром}$), 8,11 дд (1H, $H_{аром}$, *J* 8 Гц, 1 Гц), 8,46 дд (1H, $H_{аром}$, *J* 8 Гц, 1 Гц), 8,88 дд (1H, $H_{аром}$, *J* 5 Гц, 2 Гц). ИК-спектр, см$^{-1}$: 3450, 2960, 1720, 1668, 1512, 1475, 1405, 1253, 1193. Масс-спектр, *m/z*: 527 [M^++1]. Найдено, %: С 75,37; Н 7,51; N 5,04. $C_{33}H_{38}N_2O_4$. Вычислено, %: С 75,26; Н 7,27; N 5,32.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Института химии новых материалов НАН Беларуси кандидату физико-математических наук, доценту, заведующему лабораторией матералов и технологий ЖК-устройств, Ал. Ан. Муравскому (определение закручивающей способности амида **3 б**) и кандидату биологических наук, доценту Р. А. Желдаковой (оценка биологической активности амидов **3 а, б,** имидоамидов **5 а–г**) за проведение совместных исследований.

Acknowledgments. Authors are grateful to the staff of the Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Candidate of Physical and Mathematical Sciences, Associate Professor, Head of the Laboratory of Materials and Technologies of LCD Devices, A. A. Muravsky (determination of the rotatory power of amide **3 b**) and Candidate of Biological Sciences, Associate Professor R. A. Zheldakova (assessment of the biological activity of amides **3 a, b,** imidoamides **5 a–d**) for joint research.

Список использованных источников

1. Robust antimicrobial compounds and polymers derived from natural resin acids / J. Wang [et al.] // Chem. Commun. – 2012. – Vol. 48, N 6. – P. 916−918. https://doi.org/10.1039/C1CC16432E

2. Synthesis of a 2,3-Dienoate Based on Methyl Maleopimarate / I. M. Sakhautdinov [et al.] // Chemistry of Natural Compounds. – 2015. – Vol. 51, N 2. – P. 383–384. https://doi.org/10.1007/s10600-015-1292-x

3. Novel One-Component Positive-Tone Chemically Amplified I-Line Molecular Glass Photoresists / J. Yu [et al.] // ACS Applied Materials & Interfaces. – 2012. – Vol. 4, N 5. – P. 2591–2596. https://doi.org/10.1021/am300259g

4. Bei, M. P. Synthesis and Properties of Maleopimaric *N*-(*n*-Alkyl)imides / M. P. Bei, A. P. Yuvchenko // Russ. J. Gen. Chem. – 2010. – Vol. 80, N 2. – P. 253–257. https://doi.org/10.1134/S107036321002012X

5. Bei, M. P. Efficient Synthesis of Maleopimaric Acid *N*-Arylimides / M. P. Bei, A. P. Yuvchenko, N. V. Puchkova // Russ. J. Gen. Chem. – 2015. – Vol. 85, N 5. – P. 1034–1039. https://doi.org/10.1134/S1070363215050047

6. Method of inducing immunostimulating activity: pat. 4880803 USA, МПК7 A 61 K 31/535, 31/495 / F. Delevalee, R. Deraedt, J. Benzoni. – Publ. 14.11.1989.

7. Sultanova, R. M. Nitrogen-containing heterocyclic derivatives of maleopimaric acid by carboxyl function and their Antioxidant activity / R. M. Sultanova, I. M. Sakhautdinov // Chem. Nat. Comp. – 2019. – Vol. 55, N 1. – P. 47–51. https://doi.org/10.1007/s10600-019-02612-y

8. Vafina, G. F. Synthesis of the conjugate of maleopimaric acid and metronidazole / G. F. Vafina, A. A. Mukhamed'yanova // Chem. Nat. Comp. – 2018. – Vol. 54, N 6. – P. 1180–1181. https://doi.org/10.1007/s10600-018-2588-4

9. Protonation-controlled axial chirality in maleopimaric imides / G. Yao [et al.] // New J. Chem. – 2014. – Vol. 38, N 2. – P. 693–699. https://doi.org/10.1039/C3NJ01194A

10. Bei, M. P. Synthesis, Film-Forming, and Light-Sensitivity Properties of Allyl and Propargyl Maleopimarates and Cytraconopimarates / M. P. Bei, V. A. Azarko, A. P. Yuvchenko // Russ. J. Gen. Chem. – 2010. – Vol. 80, N 5. – P. 940–943. https://doi.org/10.1134/S1070363210050130

11. Synthesis of 4,5-dihydroisoxazole derivatives of maleopimaric acid by 1,3-dipolar cycloaddition reaction between its allyl derivatives and aromatic nitrile oxides / G. F. Vafina [et al.] // Chem. Het. Comp. – 2018. – Vol. 54, N 8. – P. 796–803. https://doi.org/10.1007/s10593-018-2352-5

12. Chirality in Liquid Crystals / eds.: H.-S. Kitzerow, C. Bahr. New York: Springer-Verlag, 2001. – 501 p. https://doi.org/10.1007/b97374

13. Schuller, W. H. Somenewderivativesofmaleopimaricacid / W. H. Schuller, R. V. Lawrence // Journal of Chemical & Engineering Data. – 1967. – Vol. 12, N 2. – P. 267–269.https://doi.org/10.1021/je60033a030

14. 5-(*p*-Tolyl)isoxazol-3-amine–Palladium(II) Complex: Preparation, Structure, and Catalytic Application in the Suzuki–Miyaura Reaction in Water / V. I. Potkin [et al.] // Synthesis. – 2012. – Vol. 44, N 1. – P. 151–157. https://doi.org/10.1055/s-0031-1289618

References

1. Wang J., Chen Y. P., Yao K., Wilbon P. A., Zhang W., Ren L., Zhou J., Nagarkatti M., Wang C., Chu F., He X., Decho A. W., Tang C. Robust antimicrobial compounds and polymers derived from natural resin acids. *Chem. Commun.*, 2012, vol. 48, no. 6, pp. 916−918. https://doi.org/10.1039/C1CC16432E

2. Sakhautdinov I. M., Gumerov A. M., Gibadullina G. G., Zakir'yanova O. V., Yunusov M. S. Synthesis of a 2,3-Dienoate Based on Methyl Maleopimarate. *Chemistry of Natural Compounds*, 2015, vol. 51, no. 2, pp. 383–384. https://doi.org/10.1007/s10600-015-1292-x

3. Jinxing Y., Na X., Zhengping L., Liyuan W. Novel One-Component Positive-Tone Chemically Amplified I-Line Molecular Glass Photoresists. *ACS Applied Materials & Interfaces,* 2012, vol. 4, no. 5, pp. 2591–2596. https://doi.org/10.1021/am300259g

4. BeiM. P., Yuvchenko A. P. Synthesis and Properties of Maleopimaric N-(n-Alkyl)imides. *Russian Journal of General Chemistry*, 2010, vol. 80, no. 2, pp. 253–257. https://doi.org/10.1134/S107036321002012X

5. BeiM. P., Yuvchenko A. P., Puchkova N. V. Efficient Synthesis of Maleopimaric Acid N-Arylimides. *Russian Journal of General Chemistry,* 2015, vol. 85, no. 5, pp. 1034–1039. https://doi.org/10.1134/S1070363215050047

6. Delevalee F., Deraedt R., Benzoni J. *Method of inducing immunostimulating activity.* Patent USA no. 4880803. Publ. date 14 November 1989 (in Russian).

7. Sultanova R. M., Sakhautdinov I. M. Nitrogen-containing heterocyclic derivatives of maleopimaric acid by carboxyl function and their antioxidant activity. *Chemistry of Natural Compounds,* 2019, vol. 55, no. 1, pp. 47–51. https://doi.org/10.1007/s10600-019-02612-y

8. Vafina G. F., Mukhamed'yanova A. A. Synthesis of the conjugate of maleopimaric acid and metronidazole. *Chemistry of Natural Compounds*, 2018, vol. 54, no. 6, pp. 1180–1181. https://doi.org/10.1007/s10600-018-2588-4

9. Guiyang Y., Yajun L., Yongtao Z., Yingming P., Fuping H., Hengshan W., Zhixin L. Protonation-controlled axial chirality in maleopimaric imides. *New J. Chem.*, 2014, vol. 38, no. 2, pp. 693–699. https://doi.org/10.1039/C3NJ01194A

10. Bei M. P., Azarko V. A., Yuvchenko A. P. Synthesis, Film-Forming, and Light-Sensitivity Properties of Allyl and Propargyl Maleopimarates and Cytraconopimarates. *Russian Journal of General Chemistry*, 2010, vol. 80, no. 5, pp. 940–943. https://doi.org/10.1134/ S1070363210050130.

11. Vafina G. F., Mukhamed'yanova A. A., Khanova M. D., Spirikhin L. V. Synthesis of 4,5-dihydroisoxazole derivatives of maleopimaric acid by 1,3-dipolar cycloaddition reaction between its allyl derivatives and aromatic nitrile oxides. *Chemistry of Heterocyclic Compounds,* 2018, vol. 54, no. 8, pp. 796–803. https://doi.org/10.1007/s10593-018-2352-5

12. Kitzerow H.-S., Bahr C. (eds.). *Chirality in Liquid Crystals.* New York: Springer-Verlag, 2001. 501 p. https://doi.org/10.1007/b97374

13. Schuller W. H., Lawrence R. V. Some new derivatives of maleopimaric acid. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 1967, vol. 12, no. 2, pp. 267–269. https://doi.org/10.1021/je60033a030

14. Potkin V. I., Bumagin N. A., Petkevich S. K., Lyakhov A. S., Rudakov D. A., Livantsov M. V., Golantsov N. E. 5-(p-Tolyl)isoxazol-3-amine–Palladium(II) Complex: Preparation, Structure, and Catalytic Application in the Suzuki–Miyaura Reaction in Water. *Synthesis*, 2012, vol. 44, no. 1, pp. 151–157. https://doi.org/10.1055/s-0031-1289618

Информация об авторах

Бей Максим Петрович – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: beymaksim@gmail.com, bey@ichnm.by

Ювченко Анатолий Петрович – канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: mixa@ichnm.by

Поткин Владимир Иванович – член-корреспондент, д-р хим. наук, профессор, зав. отделом. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: potkin@ifoch.bas-net.by

Петкевич Сергей Константинович – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт физико-органической химии НАН Беларуси (ул. Сурганова, 13, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: petkevich@ifoch.bas-net.by

Information about the authors

Maksim P. Bei – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoriny str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: beymaksim@gmail.com, bey@ichnm.by

Anatolij P. Yuvchenko – Ph. D. (Chemistry), Senior Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoriny str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mixa@ichnm.by

Vladimir I. Potkin – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Chemistry), Professor, Head of the Department. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: potkin@ifoch.bas-net.by

Sergey K. Petkevich – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (13, Surganov str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: petkevich@ifoch.bas-net.by

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 547.638.1, 547.853.3, 547.855.3
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-431-437

Поступила в редакцию 23.08.2021
Received 23.08.2021

Д. С. Мартинкевич[1], Е. Ф. Чернявская[2], В. А. Тарасевич[1]

[1]Институт химии новых материалов НАН Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

СИНТЕЗ ПИРИМИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НА ОСНОВЕ ХАЛКОНОВ И ИХ ПРОТИВОМИКРОБНАЯ АКТИВНОСТЬ

Аннотация. Синтезирован ряд замещенных халконов и пиримидиновых производных на их основе. Исследована противомикробная активность полученных соединений, а также их способность усиливать действие существующих противомикробных средств. Синтезированные на основе халконов пиримидиновые производные обладают антибактериальной и противомикробной активностью, а также способны усиливать противомикробную активность существующих препаратов.

Ключевые слова: халконы, гуанидин, циклоконденсация, пиримидины, противомикробная активность

Для цитирования. Мартинкевич, Д. С. Синтез пиримидиновых производных на основе халконов и их противомикробная активность / Д. С. Мартинкевич, Е. Ф. Чернявская, В. А. Тарасевич // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 431–437. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-431-437

D. S. Martsinkevich[1], K. F. Chernyavskaya[2], V. A. Tarasevich[1]

[1]Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2]Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus

SYNTHESIS OF CHALCONE-BASED PYRIMIDINE DERIVATIVES AND THEIR ANTIMICROBIAL ACTIVITY

Abstract. A series of substituted chalcones and pyrimidine derivatives on their base was synthesized. Obtained compounds were tested for antimicrobial activity and ability to increase activity of known antimicrobial substances. Pyrimidine products shown good activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida tropicalis*. These compounds also could increase activity of modified polyguanidines against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: chalcones, guanidine, cyclocondensation, pyrimidines, antimicrobial activity

For citation. Martsinkevich D. S., Chernyavskaya K. F., Tarasevich V. A. Synthesis of chalcone-based pyrimidine derivatives and their antimicrobial activity. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 431–437 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-431-437

Введение. В последнее время прослеживается тенденция к расширению исследований различных природных соединений. Такие вещества, как правило, обладают биологической активностью различного вида, что обуславливает их применение во многих сферах жизнедеятельности человека. Существует потребность в разработке новых веществ с антибактериальной активностью, которая вызвана появлением штаммов бактерий, устойчивых к существующим лекарственным и дезинфицирующим средствам. Новые соединения могут использоваться как самостоятельные противомикробные средства, так и в качестве добавок к существующим препаратам. Для этих целей подходят халконы – природные α,β-ненасыщенные карбонильные соединения, относящиеся к классу флавоноидов. Как и другие соединения этой группы, халконы проявляют широкий спектр биологической активности [1, 2], а простота синтеза и высокая реакционная способность делает их перспективными исходными веществами для синтеза новых лекарственных препаратов. Исследования по синтезу новых халконов ведутся как в направлении введения в состав халкона различных заместителей [3, 4], в том числе и фармакофорных групп, так и в направлении синтеза из халконов новых веществ, прежде всего гетероциклических производных [5–7].

Азотсодержащие гетероциклические вещества широко распространены среди природных продуктов и обладают широким спектром биологической активности. Одним из таких веществ является

© Мартинкевич Д. С. , Чернявская Е. Ф., Тарасевич В. А., 2021

пиримидин, широко встречающийся в живой природе и проявляющий разнообразную биологическую активность [8]. Можно ожидать, что пиримидиновые производные, полученные из халконов, будут обладать увеличенной противомикробной активностью по сравнению с исходными халконами.

Цель настоящей работы – получение новых халконов, синтез из них пиримидиновых производных и изучение противомикробной активности полученных веществ.

Результаты и их обсуждение. Среди описанных в литературе способов синтеза халконов наиболее простым при выполнении и не требующим дорогих реагентов и катализаторов оказался синтез халконов по реакции Кляйзена–Шмидта. Был осуществлен синтез халконов с различными заместителями по методике [9]. Смесь соответствующих бензальдегида, ацетофенона и гидроксида натрия перемешивали в этаноле при комнатной температуре в течение 2 ч (рис. 1). Выходы халконов **1**–**4** составили 51–78 %.

Полученные халконы использовали в синтезе замещенных пиримидинов путем циклизации халконов с гидрохлоридом гуанидина. Были использованы условия реакции, описанные в статье [10]. Во взаимодействие с халконом **2** вводили 1,5-кратный избыток гидрохлорида гуанидина и 4,5-кратный избыток твердого NaOH в этаноле (рис. 2, *a*). Смесь кипятили в течение 9 ч, а превращение халкона контролировали с помощью ТСХ. Выход продукта **5** составил 70 %. При взаимодействии халконов **3** и **4** с гидрохлоридом гуанидина при указанных выше условиях образовывались соответствующие дигидропиримидины **6**, **7** (рис. 2, *b*) с выходами 75 и 67 % соответственно.

Полученные халконы и их пиримидиновые производные были исследованы на наличие антибактериальной и противогрибковой активности. В качестве тест-культур использовали грибы *Aspergillus niger, Penicillium* sp.*, Candida tropicalis* и бактерии *Escherichia coli* ATCC 8739*, Staphylococcus aureus* ATCC 6538. На первом этапе исследовали способность халконов **1**–**4** усиливать противомикробное действие известных антибиотиков – стрептомицина и цефотаксима. Было обнаружено, что ни один из халконов не усиливает антибактериальную активность антибиотиков.

На втором этапе исследовали противомикробную активность пиримидина **5** и дигидропиримидинов **6**, **7**. Было показано, что все образцы обладают антибактериальной и противогрибковой активностью (табл. 1). Наиболее чувствительными к исследуемым образцам оказались бактерии

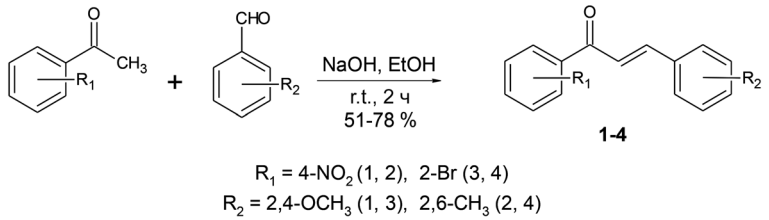


Рис. 1. Схема синтеза халконов по реакции Кляйзена–Шмидта

Fig. 1. Scheme of chalcones synthesis via Claisen-Shmidt reaction

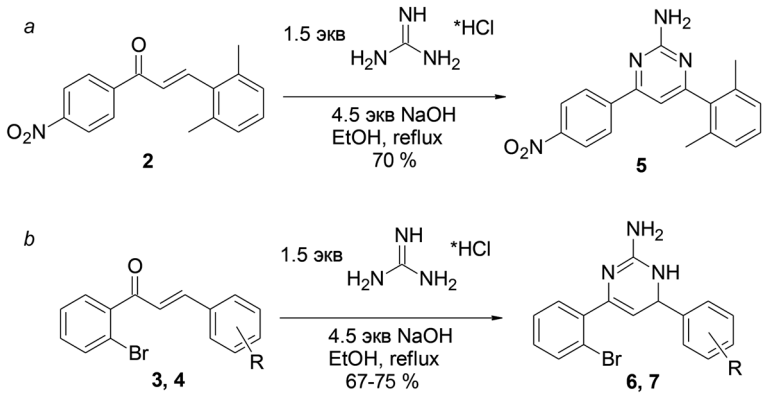


Рис. 2. Взаимодействие халконов **2**–**4** с гидрохлоридом гуанидина

Fig. 2. Interaction of chalcones **2**–**4** with guanidine hydrochloride

Staphylococcus aureus ATCC 6538 и дрожжи *Candida tropicalis*. Далее изучали синергическое действие данных соединений при совместном использовании с другими противомикробными препаратами – модифицированным полигексаметиленгуанидином (ПГМГ), ампициллином, хлорамфениколом, тетрациклином, цефалексином. Было показано, что пиримидиновые производные **5**–**7** обладают небольшим эффектом усиления противомикробных свойств исследуемых препаратов (табл. 2). Данный эффект зависит от типа препарата и вида тест-организмов, тем не менее наибольшим эффектом для большинства культур обладали дигидропиримидины **6** и **7**.

Таблица 1. **Результаты исследования противомикробной активности пиримидиновых производных халконов**

Table 1. **Results of antimicrobial activity evaluation of chalcone-based pyrimidines**

Тест-микроорганизм	Диаметр зон ингибирования роста для различных веществ, мм			
	5	**6**	**7**	DMSO
Penicillium sp.	0	0	11	0
Aspergillus niger	0	0	0	0
C. tropicalis	19	15	16	0
E.coli ATCC 8739	21	13	14	0
Staphylococcus aureus ATCC 6538	34	30	29	0

Таблица 2. **Результаты оценки синергического влияния пиримидиновых производных на противомикробные препараты (диффузионный метод)**

Table 2. **Results of synergetic activity evaluation of synthesized pyrimidines on known antimicrobial substances (by diffusion method)**

Диаметр зон ингибирования роста, мм						
Вещество	Amp	Chl	Ttc	Cef	ПГМГ	К – нет антимикробного агента
E. coli ATCC 8739						
5	17	0	13	16	11	0
6	17	0	12	15	13	0
7	17	0	0	17	12	0
К – нет халкона	16	12	11	14	0	
Staphylococcus aureus ATCC 6538						
5	11	14	0	0	19	0
6	11	18	13	0	16	0
7	12	18	12	12	15	11
К – нет халкона	22	15	16	13	14	
Aspergillus niger						
5	–	–	–	–	17	0
6	–	–	–	–	16	0
7	–	–	–	–	14	0
К – нет халкона	–	–	–	–	0	
Penicillium sp.						
5	–	–	–	–	16	0
6	–	–	–	–	22	16
7	–	–	–	–	22	20
К – нет халкона	–	–	–	–	12	
C. tropicalis						
5	–	–	–	–	16	11
6	–	–	–	–	16	11
7	–	–	–	–	16	12
К – нет халкона	–	–	–	–	0	

Примечание. Amp – Ампициллин, Chl – Хлорамфеникол, Ttc – Тетрациклин, Cef – Цефалексин.

Выявленное усиление действия противомикробных препаратов дополнительно оценивали суспензионным способом. Полученные результаты подтвердили наличие эффекта усиления противомикробных свойств модифицированного ПГМГ при совместном культивировании с растворами пиримидиновых производных. Наилучшие результаты были получены для тест-культуры *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и соединения **7** (табл. 3).

Таблица 3. **Результаты оценки синергического влияния полученных пиримидиновых производных на противомикробные препараты (суспензионный метод)**

Table 3. **Evaluation of synergetic activity of synthesized pyrimidines on known antimicrobial substances (by suspension method)**

	Концентрация жизнеспособных клеток *S. aureus* ATCC 6538 при высеве из разведений, КОЕ/мл						FR
	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	
Положительный контроль (К+)	–	–	–	$1{,}7\times10^7$	–	$2{,}6\times10^7$	–
ПГМГ (0,0005 %)	газон	–	$3{,}3\times10^5$	–	–	–	1,9
5 (0,005 %)	газон	–	$1{,}7\times10^5$	–	–	–	2,2
6 (0,005 %)	$9{,}8\times10^3$	–	$2{,}4\times10^4$	–	–	–	3,0
7 (0,005 %)	$7{,}7\times10^3$	–	$8{,}4\times10^3$	–	–	–	3,5
5 (0,005 %) + ПГМГ (0,0005 %)	$3{,}4\times10^4$	–	$2{,}6\times10^4$	–	–	–	2,9
6 (0,005 %) + ПГМГ (0,0005 %)	$4{,}7\times10^3$	–	$5{,}0\times10^3$	–	–	–	3,7
7 (0,005 %) + ПГМГ (0,0005 %)	$4{,}5\times10^2$	–	–	–	–	–	4,7

Экспериментальная часть. Использованные в работе реактивы и растворители имели квалификацию «ч.» и «ч. д. а.». Спектры ЯМР ^{1}H и ^{13}C записаны на спектрометре BrukerAvance-500 в $CDCl_3$, DMSO-d6, внутренний стандарт – ТМС, рабочая частота 500 МГц для ^{1}H и 125 МГц для ^{13}C. ИК-спектры записаны в таблетке из KBr на ИК-Фурье спектрометре Bruker Tensor-27. Температуры плавления определяли с помощью прибора MPA100 OptiMelt. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках Kieselgel 60F 254 (Merck) в системе этилацетат : гексан, 1 : 2.

(Е)-1-(4-нитрофенил)-3-(2,4-диметоксифенил)проп-2-ен-1-он 1. В 50-мл колбу вносили 1,06 г (6,4 ммоль) 1-(4-нитрофенил)этанона, 1,06 г (6,4 ммоль) 2,4-диметоксибензальдегида, 0,26 г (6,4 ммоль) гидроксида натрия и 30 мл этилового спирта. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч (контроль по ТСХ). Образовавшуюся суспензию выливали в 80 мл ледяной воды и нейтрализовывали разбавленной соляной кислотой. Выпавший осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре, промывали водой, этиловым спиртом и снова водой. Полученный продукт использовали далее без дополнительной очистки. Выход 1,55 г (77,5 %) – желтый порошок, т. пл. = 176,1–177,7 °С. Спектр ЯМР ^{1}H, ДМСО-d6 (δ, м.д.): 3,876 с (3H, OMe), 3,932 с (3H, OMe), 6,669 д (2H, HAr), 7,794 д (1H, C=CH), 7,971 д (1H, HAr), 8,061 д (1H, C=CH), 8,321 д (2H, HAr), 8,383 д (2H, HAr); Спектр ЯМР ^{13}C, ДМСО-d6 (δ, м.д.): 56,11, 56,41 (OMe), 98,79, 107,06, 116,14, 119,22 (CAr), 124,33 (C=C), 130,12, 131,04, 140,84 (CAr), 143,45 (C=C), 150,12, 160,80, 164,13 (CAr), 188,69 (C=O). ИК-спектр, KBr ($\tilde{\upsilon}$, см$^{-1}$): 3111,71 сл (C_{Ar}–H), 3004,81 сл (=C–H), 2842,68 сл (OMe), 1657,48 с (C=O), 1605,12 с (C=C–CO), 1587,36 с, 1562,01 с, 1522,35 с (фенил), 1507,11 ср (N–O), 1454,97 ср δ(CH–O), 1443,12 ср (фенил), 1342,82 с (N–O), 1312,19 с, 1295,05 с (=C–H), 1258,62 с (C_{Ar}–OMe), 1217,75 с, 1193,57 ср (C_{Ar}–H), 1108,28 сл, 1041,35 с, 1024,65 с, 1010,66 ср (C_{Ar}–H), 988,39 ср (=C–H), 875,40 сл, 851,85 с (C_{Ar}–H), 837,16 с (Ar–NO_2).

(2Е)-1-(4-нитрофенил)-3-(2,6-диметилфенил)проп-2-ен-1-он 2. В 50-мл колбу вносили 1,17 г (7,1 ммоль) 1-(4-нитрофенил)этанона, 0,95 г (7,1 ммоль) 2,6-диметилбензальдегида, 0,384 г (9,6 ммоль) гидроксида натрия и 30 мл этилового спирта. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч (контроль по ТСХ). Реакционную смесь выливали в 80 мл ледяной воды и нейтрализовывали разбавленной соляной кислотой. Выпавший осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре, промывали водой, этанолом и снова водой. Полученный сырой продукт сушили на воздухе и перекристаллизовывали из 21 мл этанола. Выход 1,21 г (60,5 %) – оранжевый порошок, т. пл. = 113,2–115,4 °С. Спектр ЯМР ^{1}H, ДМСО-d6 (δ, м.д.): 2,407 с (6H, $2CH_3$), 7,162 д (2H, HAr), 7,219 м (1H, HAr), 7,446 д (1H, C=CH), 7,919 д (1H, C=CH), 8,311 д (2H, HAr), 8,386 д (2H, HAr).

Спектр ЯМР^{13}С, ДМСО-d6 (δ, м.д.): 21,30 ($2CH_3$), 124,41 (C=C), 128,05, 128,81, 129,28, 130,42, 134,28, 137,39 (CAr), 142,13 (C=C), 150,35 (CAr), 189,10 (C=O). ИК-спектр, KBr ($\bar{\upsilon}$, см$^{-1}$): 3105,07 сл (=C–H), 2964, 23 сл (CH_3), 1661,40 с (C=O), 1585,59 с (C=C–CO), 1520,83 с (N–O), 1467,34 ср (CH_3), 1382,94 сл (CH_3), 1343,88 с (N–O), 1195,30 ср, 1172,11 ср, 1107,50 сл, 1026,38 ср, 1009,40 ср (C_{Ar}–H), 853,12 с, 776,62 ср, 698,90 ср (C_{Ar}–H).

(2E)-1-(2-бромофенил)-3-(2,4-диметоксифенил)проп-2-ен-1-он 3. В 50-мл колбу вносили 1,15 г (5,76 ммоль) 1-(2-бромофенил)этанона, 0,96 г (5,76 ммоль) 2,4-диметоксибензальдегида, 0,34 г (8.5 ммоль) гидроксида натрия и 25 мл этилового спирта. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч (контроль по ТСХ). Реакционную смесь выливали в 10 мл воды и нейтрализовывали разбавленной соляной кислотой. Выпавший осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре, промывали водой, этиловым спиртом и снова водой. Полученный сырой продукт сушили на воздухе и перекристаллизовывали из 17 мл этанола. Выход 1,50 г (75,0 %) – желтые кристаллы, т. пл. = 92,1–92,6 °С. Спектр ЯМР ^{1}H, ДМСО-d6 (δ, м.д.): 3,841 с (3H, OMe), 3,849 с (3H, OMe), 6,621 дд (1H, HAr), 6,640 д (1H, HAr), 7,110 д (1H, C=CH), 7,456 дд (1H, HAr), 7,481 м (1H, HAr), 7,499 д (1H, HAr), 7,526 дд (1H, HAr), 7,566 д (1H, C=CH), 7,753 дд (2H, HAr). Спектр ЯМР ^{13}C, ДМСО-d6 (δ, м.д.): 56,09, 56,38 (OMe), 98,85, 107,03, 115,71 (CAr), 119,04 (C=C), 124,05, 128,27, 129,43, 131,09, 132,02, 133,55 (CAr), 141,73 (C=C), 141,99, 160,46, 164,02 (CAr), 194,77 (C=O). ИК-спектр, KBr ($\bar{\upsilon}$, см$^{-1}$): 3043,67 сл (C–H)$_{Ar}$, 3004,63 сл (=C–H), 2964,51 сл (OC–H), 2831,06 сл (OC–H), 1625,44 с (C=O), 1589,08 оч.с (C=C–CO), 1505,36 ср, 1465,82 ср (фенил), 1452,33 ср, 1336,77 сл. (CH–O), 1293,99 с (=C–H), 1278,40 оч. с, 1253,12 оч. с (C_{Ar}–OMe), 1172,59 ср, 1121,88 сл, 1099,63 с, 1029,29 с (C_{Ar}–H), 986,98 ср, 874,33 сл, 827,43 ср, 759,49 ср, 743,70 сл (C_{Ar}–H), 591,37 ср (C–Br).

(2E)-1-(2-бромофенил)-3-(2,6-диметилфенил)проп-2-ен-1-он 4. В 50-мл колбу вносили 0,86 мл (6,35 ммоль) 1-(2-бромофенил)этанона, 0,85 г (6,35 ммоль) 2,6-диметилбензальдегида, 0,37 г (9,4 ммоль) гидроксида натрия и 20 мл этилового спирта. Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч (контроль по ТСХ). Реакционную смесь выливали в 50 мл воды и нейтрализовывали разбавленной соляной кислотой. Выпавший осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре и промывали водой. Полученный сырой продукт перекристаллизовывали из 2 мл этанола. Выход 1,02 г (51,0 %) – бежевый порошок, т. пл. = 52,1–53,3 °С. Спектр ЯМР ^{1}H, ДМСО-d6 (δ, м.д.): 2,313 с (6H, $2CH_3$), 6,753 д (1H, C=CH), 7,3115 д (2H, HAr), 7,185 м (1H, HAr), 7,455 с (1H, HAr), 7,489 с (1H, HAr), 7,565 дд (2H, HAr), 7,773 д (1H, C=CH). Спектр ЯМР ^{13}C, ДМСО-d6 (δ, м.д.): 21,14 ($2CH_3$), 118,97 (C=C), 128,38, 128,81, 129,40, 129,55, 132,16, 132,37, 133,58, 137,01 (CAr), 141,00 (C=C), 145,88 (CAr), 194,95 (C=O). ИК-спектр, KBr ($\bar{\upsilon}$, см$^{-1}$): 2918,10 сл (C–H)$_{Ar}$, 1654,67 с (C=C–CO), 1619.47 с (C=O), 1588,36 ср, 1464,63 ср (фенил), 1426,57 ср (C_{Ar}–CH_3), 1378,05 сл (C_{Ar}–CH_3), 1289,62 с (=C–H), 1248,98 ср, 1161,25 сл, 1121,16 сл, 1100,83 ср, 1025,19 ср (C_{Ar}–H), 989,16 ср (=C–H), 785,16 ср, 771,30 ср, 759,60 ср, 736,49 ср, 657,43 сл (C_{Ar}–H), 615,28 ср (C–Br).

4-(2,6-диметилфенил)-6-(4-нитрофенил)пиримидин-2-амин 5. В 50-мл колбу вносили 0,30 г (1,07 ммоль) халкона **2**, 0,15 г (1,6 ммоль) гидрохлорида гуанидина, 0,19 г (4,8 ммоль) гидроксида натрия и 10 мл этанола. Смесь кипятили 7 ч (контроль по ТСХ), выливали в ледяную воду и нейтрализовывали разбавленной соляной кислотой. Выпавший осадок отфильтровывали на стеклянном фильтре, промывали водой, этиловым спиртом и сушили на воздухе, затем – 20 мин при 100 °С. Дополнительную очистку продукта не проводили. Выход 0,24 г (70,2 %) – оранжевый порошок, т. пл. = 115,2 °С, разл. Спектр ЯМР ^{1}H, ДМСО-d6 (δ, м.д.): 2,138 м (6H, $2CH_3$), 2,198 с (NH_2), 6,861 д (1H, HAr), 6,951 д(1H, HAr), 7,153 д (2H, HAr), 7,230 д (1H, HAr), 8,270 д (1H, HAr), 8,364 т (1H, HAr), 8,422 с (1H, H-hetAr). Спектр ЯМР ^{13}C, ДМСО-d6 (δ, м.д.): 20,17 (CH_3), 123,02, 124,29, 127,83, 128,35, 12,.65, 134,99, 164,65 (CAr). ИК-спектр, KBr ($\bar{\upsilon}$, см$^{-1}$): 3387,38 ср (NH_2), 2921,54 сл (OC–H), 1601,15 с (фенил, NH_2), 1518,41 с, 1465,43 ср (фенил), 1339,41 с (C_{Ar}–NH_2), 1176,84 сл, 1108,58 сл, 1031,93 сл, 967,76 сл (C_{Ar}–H), 854,48 ср (C_{Ar}–H), 744,09 оч. с (NH_2), 521,89 сл (C–Br).

4-(2-бромофенил)-6-(2,4-диметоксифенил)-1,6-дигидрпопиримидин-2-амин 6. В 25-мл колбу вносили 0,35 г (1,00 ммоль) халкона **3**, 0,14 г (1,5 ммоль) гидрохлорида гуанидина, 0,18 г (4,5 ммоль) гидроксида натрия и 10 мл этанола. Смесь кипятили 9 ч (контроль по ТСХ), выливали в ледяную воду и нейтрализовывали разбавленной соляной кислотой. Выпавший осадок отфильтровывали на фильтре Шотта, промывали водой, этиловым спиртом и снова водой, сушили на воздухе. До-

полнительную очистку продукта не проводили. Выход 0,29 г (75,1 %) – светло-бежевый порошок, т. пл. = 88,4–88,8 °С. Спектр ЯМР ^{1}H, $CDCl_3$ (δ, м.д.): 3,854 с (3H, OMe), 3,865 с (3H, OMe), 5,545 с (2H, NH_2), 6,504 д (1H, HAr), 6,566 дд(1H, HAr), 7,160 тд (1H, H-hetAr), 7,289 д (1H, HAr), 7,448 дд (1H, HAr), 7,547 д (1H, HAr), 7,600 д (1H, HAr). Спектр ЯМР ^{13}C, $CDCl_3$(δ, м.д.): 48,39, 55,39 (OMe), 98,68, 104,24, 122,22, 124,65, 127,25, 128,91 (CAr), 129,26 (C-H hetAr), 130,53, 133,07 (CAr), 152,57 (C-N hetAr), 157,38 (CAr), 160,55 (C-N hetAr).

4-(2-бромофенил)-6-(2,6-диметилфенил)-1,6-дигидрпопиримидин-2-амин 7. В 25-мл колбу вносили 0,32 г (1,02 ммоль) соединения **4**, 0,14 г (1,5 ммоль) гидрохлорида гуанидина, 0,18 г (4,55 ммоль) гидроксида натрия и 10 мл этанола. Смесь кипятили 9 ч (контроль по ТСХ), выливали в ледяную воду и нейтрализовывали разбавленным раствором HCl. Выпавший осадок отфильтровывали на фильтре Шотта, промывали водой, этанолом и снова водой, сушили на воздухе, затем – 20 мин при 100 °С. Дополнительную очистку продукта не проводили. Выход 0,24 г (66,8 %) – коричневые кристаллы, т. пл. = 95,5 °С, разл. Спектр ЯМР ^{1}H, ДМСО–d6 (δ, м.д.): 2,129 с (1H, NH), 2,466 с (6H, $2CH_3$), 4,549 д (1H, CH), 5,880 д (1H, C=CH), 7,036 д (2H, HAr), 7,064 д (1H, HAr), 7,190 д (1H, HAr), 7,339 д (1H, HAr), 7,399 д (1H, HAr), 7,566 д (1H, HAr). Спектр ЯМР ^{13}C, ДМСО-d6 (δ, м.д.): 20,51 (CH_3), 51,54 (CH), 99,01 (=CH), 121,62, 127,38, 127,68, 127,79, 129,21, 129,75, 130,96, 133,13, 140,56, 154,24 (CAr).

Биологические испытания. *Диффузионный метод.* На поверхности агара, засеянного тест-организмами, готовили лунки (∅ 10 мм). В лунки вносили по 200 мкл анализируемых образцов (концентрация 0,0005–1,0000 %). Посевы в течение 2 ч выдерживали в холодильнике, затем инкубировали при 30 °С в течение 24–48 ч. Определяли ширину зон ингибирования роста культур.

Суспензионный метод. Суточную культуру (2 мл), разведенную до концентрации 10^5 КОЕ/мл в питательном бульоне, инкубировали с анализируемыми препаратами различных концентраций (0,0005–0,005 %) в течение 6 ч. После инкубации осуществляли высев на плотную питательную среду. Результаты оценивали через 24–48 ч. Оценку антимикробной активности проводили по показателю FR:

$$FR = \log(C_{конт}/C_{обр}),$$

где $C_{конт}$ – концентрация клеток после инкубирования контроля (КОЕ/мл); $C_{обр}$ – концентрация клеток после инкубирования опытного образца (КОЕ/мл).

Заключение. Были получены четыре халкона с различными заместителями в бензольных кольцах, два из них – **2** и **4** – синтезированы впервые. На их основе были синтезированы новые пиримидиновые производные: пиримидин **5** и дигидропиримидины **6** и **7**. Изучена противомикробная активность полученных веществ и синергетическое действие по отношению к известным противомикробным средствам. Установлено, что пиримидиновые производные на основе халконов обладают противомикробной активностью, наиболее сильно по отношению к бактериям *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и дрожжам *Candida tropicalis*. Также полученные гетероциклические соединения обладают способностью усиливать действие противомикробных препаратов, в частности модифицированного ПГМГ. Наиболее активным из пиримидиновых производных является дигидропиримидин **7**. Таким образом, гетероциклические производные на основе халконов могут обладать более сильной, чем у халконов, биологической активностью. Это делает халконы перспективными исходными веществами для поиска и синтеза новых противомикробных средств.

Список использованных источников

1. Recent developments in biological aspects of chalcones: the odyssey continues / A. Rani [et al.] // Expert Opinion on Drug Discovery. – 2019. – Vol. 14, N 3. – P. 249–288. https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1573812

2. Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review / A. Rammohan [et al.] // Environ Chem Lett. – 2020. – Vol. 18, N 2. – P. 433–458. https://doi.org/10.1007/s10311-019-00959-w

3. Synthesis and antibacterial evaluation of novel cationic chalcone derivatives possessing broad spectrum antibacterial activity / W.-C. Chu [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2018. – Vol. 143 – P. 905–921. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.009

4. Synthesis, crystal structure and antimicrobial potential of some fluorinated chalcone-1,2,3-triazole conjugates / P. Yadav [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2018. – Vol. 155. – P. 263–274. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.055

5. Microwave assisted synthesis of chalcone and its polycyclic heterocyclic analogues as promising antibacterial agents: In vitro, in silico and DFT studies / S. A. Khan [et al.] // Journal of Molecular Structure. – 2019. – Vol. 1190 – P. 77–85. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.046

6. Synthesis and Utility of α,β-Unsaturated Ketone Bearing Naphthalene and Benzofuran Rings in the Synthesis of Some N-heterocycles with Their Antiviral and Antitumor Activity Evaluation: Synthesis and Utility of Naphthalene-Benzofuran Chalcone in the Synthesis of New Heterocycles / R. S. Gouhar [et al.] // J. Heterocyclic Chem. – 2018. – Vol. 55, N 10. – P. 2368–2380. https://doi.org/10.1002/jhet.3301

7. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Pyrazole, Oxazole, and Pyridine Derivatives as Potential Anticancer Agents Using Mixed Chalcone / M. H. Ahmed [et al.] // J. Heterocyclic Chem. – 2019. – Vol. 56, N 1. – P. 114–123. https://doi.org/10.1002/jhet.3380

8. Pyrimidine candidate as promising scaffold and their biological evaluation / J. Alam [et al.] // Int. J. Pharmacol. Pharm. Sci. – 2015. – Vol. 2, N 4. – P. 55–69.

9. Синтез и противомикробная активность халконов с бензотриазолилметильными и имидазолилметильными заместителями / Л. В. Тинь [и др.] // ЖОрХ. – 2014. – Т. 50, № 12. – С. 1786–1793.

10. Synthesis, antiviral, antituberculostic, and antibacterial activities of some novel, 4-(4-substituted phenyl)-6-(4-nitrophenyl)-2-(substituted imino)pyrimidines / A. A. Siddiqui [et al.] // Arch. Pharm. Chem. – 2007. – Vol. 340, N 2. – P. 95–102. https://doi.org/10.1002/ardp.200600121

References

1. Rani A., Anand A., Kumar K., Kumar V. Recent developments in biological aspects of chalcones: the odyssey continues. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2019, vol. 14, no. 3, pp. 249–288. https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1573812

2. Rammohan A., Reddy J. S., Sravya G., Rao C. N., Zyryanov G. V. Chalcone synthesis, properties and medicinal applications: a review. *Environmental Chemistry Letters,* 2020, vol. 18, no. 2, pp. 433–458. https://doi.org/10.1007/s10311-019-00959-w

3. Chu W.-C., Bai P.-Y., Yang J.-Q., Cui D.-Y., Hua Y.-G., Yang Y., Yang Q.-Q., Zhang E. Qin S. Synthesis and antibacterial evaluation of novel cationic chalcone derivatives possessing broad spectrum antibacterial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*,2018, vol. 143, pp. 905–921. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.009

4. Yadav P., Lal K., Kumar L., Kumar A., Kumar A., Paul A. K., Kumar R. Synthesis, crystal structure and antimicrobial potential of some fluorinated chalcone-1,2,3-triazole conjugates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018. vol. 155, pp. 263–274. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.05.055

5. Khan S. A., Asiri A.M., Al-Ghamdi N. S. M., Asad M., Zayed M. E. M., Elroby S. A. K., Aqlan F. M., Wani M. Y., Sharma K. Microwave assisted synthesis of chalcone and its polycyclic heterocyclic analogues as promising antibacterial agents: In vitro, in silico and DFT studies. *Journal of Molecular Structure*, 2019, vol. 1190, pp. 77–85. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.04.046

6. Gouhar R. S., Ewies E. F., El-Shehry M. F., Shaheen M. N. F., Ibrahim E.-M. M. E. Synthesis and Utility of α,β-Unsaturated Ketone Bearing Naphthalene and Benzofuran Rings in the Synthesis of Some N -heterocycles with Their Antiviral and Antitumor Activity Evaluation: Synthesis and Utility of Naphthalene-Benzofuran Chalcone in the Synthesis of New Heterocycles. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2018, vol. 55, pp. 2368–2380. https://doi.org/10.1002/jhet.3301

7. Ahmed M. H., El-Hashash M. A., Marzouk M. I., El-Naggar A. M. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Pyrazole, Oxazole, and Pyridine Derivatives as Potential Anticancer Agents Using Mixed Chalcone. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2019, vol. 56, pp. 114–123. https://doi.org/10.1002/jhet.3380

8. Alam J., Alam O., Shrivastava N., Naim M., Alam P. Pyrimidine candidate as promising scaffold and their biological evaluation. *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Sciences*, 2015, vol. 2, no. 4, pp. 55–69.

9. Chinh L V., Hung T. N., Nga N. T., Hang T. T. N., Mai T. T. N. Tarasevich V. A. Synthesis and antimicrobial activity of chalcones containing benzotriazolylmethyl and imidazolylmethyl substituents. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2014, vol. 50, no. 12, pp. 1767–1774. https://doi.org/ 10.1134/S1070428014120094

10. Siddiqui A. A., Rajesh R., Mojahid-Ul-Islam, Alagarsamy V., De Clercq E. Synthesis, Antiviral, Antituberculostic, and Antibacterial Activities of Some Novel, 4-(4-substituted phenyl)-6-(4-nitrophenyl)-2-(substituted imino)pyrimidines. *Archiv der Pharmazie – Chemistry in Life Sciences*, 2007, vol. 340, no. 2, pp. 95–102. https://doi.org/10.1002/ardp.200600121

Информация об авторах

Мартинкевич Денис Сергеевич – мл. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: den13martinkevich@gmail.com

Чернявская Екатерина Федоровна – ассистент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет, (ул. Свердлова, 13 а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: chernyavskaya@belstu.by

Тарасевич Владимир Александрович – д-р хим. наук, профессор, гл. науч. сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: tar@ichnm.by

Information about the authors

Denis S. Martsinkevich – Junior Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skaryna str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: den13martinkevich@gmail.com

Katerina F. Chernyavskaya – Assistant of Biotechnology Department. Belarusian State Technological University (13 a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: chernyavskaya@belstu.by

Vladimir A. Tarasevich – D. Sc. (Chemistry), Professor, Chief Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skaryna str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: tar@ichnm.by

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 577.152.28:577.151.042+547.758.5
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-438-455

Поступила в редакцию 26.08.2021
Received 26.08.2021

С. Н. Гилевич, Ю. В. Бречко

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОЙ ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗЫ P1 ЧЕЛОВЕКА И СКРИНИНГ НОВЫХ ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТА

Аннотация. Глутатионтрансфераза P1 человека (GSTP1) играет важную роль во второй фазе биотрансформации ксенобиотиков и в регуляции апоптотических сигнальных путей. Направленный скрининг новых ингибиторов фермента является актуальной задачей, так как избирательное подавление активности GSTP1 в опухолевых клетках может существенно повысить их чувствительность к химиотерапии. Известные методы получения рекомбинантной GSTP1 с гексагистидиновым тэгом в структуре отличаются сложностью, трудоемкостью и значительными потерями активности фермента. С целью создать простую и эффективную систему бактериальной экспрессии бестэговой GSTP1 с нативной структурой и высокой активностью, в настоящей работе проведено клонирование полноразмерного гена gstp1 в плазмидный вектор pTXB1 с последующей трансформацией клеток *E. coli*. Оптимизированный уровень экспрессии составил 30–32 мг фермента/л среды. С использованием глутатионсодержащих аффинных мембран из бактериального лизата выделен очищенный фермент (выход 75,7 %, удельная активность 102,6 Ед/мг белка). Гомогенность препарата подтверждена данными гель-электрофореза и масс-спектрометрии. Физико-химические и каталитические свойства рекомбинантной GSTP1 практически совпали с таковыми для нативного фермента из эритроцитов. По результатам скрининга *in silico* и *in vitro* выявлены структурные факторы и взаимодействия, определяющие эффективность ингибирования фермента карбо- и N-гетероциклическими лигандами. Установлена предпочтительная ориентация «хороших» ингибиторов в H-сайте GSTP1. Обнаружены новые ингибиторы фермента: 1,10-фенантролин-5,6-дион, ализариновый красный С и индигокармин с величиной IC_{50} соответственно 31, 16 и 2,3 мкМ. Найденные соединения представляют интерес для создания новых лидерных структур с потенциальной противоопухолевой активностью.

Ключевые слова: глутатионтрансфераза P1 (GSTP1), клонирование, бактериальная экспрессия, рекомбинантный фермент, кинетические параметры, молекулярный докинг, ингибиторы, индигокармин

Для цитирования. Гилевич, С. Н. Получение и характеристика рекомбинантной глутатионтрансферазы P1 человека и скрининг новых ингибиторов фермента / С. Н. Гилевич, Ю. В. Бречко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 438–455 https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-438-455

S. N. Gilevich, Yu. V. Brechka

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HUMAN GLUTATHIONE TRANSFERASE P1 AND SCREENING OF NOVEL ENZYME INHIBITORS

Abstract. Human glutathione transferase P1 (GSTP1) plays an important role in the second phase of xenobiotic biotransformation and in the regulation of apoptotic signal pathways. Directed screening of new enzyme inhibitors is an actual task since selective suppression of GSTP1 activity in tumor cells may substantially increase their sensitivity to chemotherapy. Known methods to obtain recombinant GSTP1 with a hexahistidine tag in the structure are complex, laborious, and suffer from significant losses of the enzyme activity. With the aim to create a simple and effective bacterial expression system for tagless GSTP1 posessing native structure and high activity, in the present work the full-length gstp1 gene was cloned into the pTXB1 plasmid vector, followed by transformation of *E. coli* cells. The optimized expression level amounted to 30–32 mg of the enzyme per liter of broth. Using glutathione-containing affinity membranes, the purified enzyme was isolated from bacterial lysate with the yield of 75.7 % and specific activity of 102.6 U/mg protein. The enzyme homogeneity was confirmed by gel-electrophoretic and mass-spectrometric data. Physico-chemical and catalytic properties of recombinant GSTP1 practically

© Гилевич С. Н., Бречко Ю. В., 2021

coincided with those of the native erythrocytary enzyme. The results of *in silico* and *in vitro* screening allowed to reveal structural factors and interactions determining the efficiency of the enzyme inhibition by carbocyclic and N-heterocyclic ligands. The preferable orientation of "good" inhibitors in the GSTP1 H-site was also established. Three strong enzyme inhibitors were found: 1,10-phenanthroline-5,6-dione, Alizarin Red S, and indigo carmine, with their respective IC_{50} values of 31, 16 and 2.3 μM. The new inhibitors are of certain interest for the development of novel lead structures with potential antitumor activity.

Keywords: glutathione transferase P1 (GSTP1), cloning, bacterial expression, recombinant enzyme, kinetic parameters, molecular docking, inhibitors, indigo carmine

For citation. Gilevich S. N., Brechka Yu. V. Preparation and characterization of recombinant human glutathione transferase P1 and screening of novel enzyme inhibitors. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 438–455 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-438-455

Введение. Глутатионтрансферазы (GST; КФ 2.5.1.18) катализируют реакции конъюгации восстановленного глутатиона (GSH) с различными электрофильными соединениями и играют ключевую роль во второй фазе биотрансформации ксенобиотиков, обеспечивая их детоксикацию и последующую экскрецию из клетки в виде глутатионовых производных. Подсемейство цитозольных GST человека насчитывает 17 изоформ в составе 7 геннезависимых классов, обозначаемых греческими буквами α, μ, π, σ, θ, ω и ζ [1, 2]. Особенно важные каталитические и регуляторные функции выполняет относящаяся к π-классу изоформа P1 (GSTP1). Гиперэкспрессия GSTP1 во многих твердых опухолях и лимфомах сопряжена с формированием множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Уровень экспрессии данной изоформы является одним из прогностических факторов в терапии рака [3]. Фермент также участвует в блокировании апоптотического сигнального пути, образуя комплекс с N-концевой киназой JNK [2].

GSTP1 является гомодимерным глобулярным белком с молекулярной массой мономера 23,2 кДа. По данным рентгеноструктурного анализа, каждый мономер содержит гидрофильный G-сайт для связывания субстрата (GSH) и расположенный рядом, более гидрофобный H-сайт, где связываются косубстраты, ингибиторы и другие амфифильные молекулы [4]. Известные природные и синтетические ингибиторы фермента (куркумин, некоторые флавоноиды, пиперлонгумин, производные этакриновой кислоты и 2,1,3-бензоксадиазола) обладают средней или умеренно высокой ингибирующей силой, но недостаточно селективны в отношении изоформы P1 [5, 6]. Направленный скрининг новых, более специфичных и эффективных ингибиторов фермента из числа конденсированных карбо- и гетероциклических соединений до сих пор остается актуальной задачей, поскольку избирательное подавление активности GSTP1 в опухолевых клетках может существенно повысить их чувствительность к химиотерапии. Такой молекулярный механизм действия имеет новый противоопухолевый препарат канфосфамид, разработанный в США. Канфосфамид представляет собой аналог GSH, модифицированный по остаткам Cys и Gly, и проходит клинические испытания как препарат второй линии терапии [6].

Опубликованные методы выделения нативной GSTP1 из плаценты [7] и эритроцитов [8] имеют ряд недостатков. Недавно нами предложена эффективная процедура очистки эритроцитарной GSTP1 с использованием GSH-содержащих аффинных мембран [9], но она не позволяет получить более 1 мг очищенного фермента за цикл выделения в силу его низкого содержания в исходном материале. Дополнительные сложности при выделении связаны с эндогенным протеолизом, а также с генетическим полиморфизмом ферментного белка в положениях 104 и 113 полипептидной цепи. Для систематического тестирования ингибиторных свойств новых соединений *in vitro* требуется не менее 5–10 мг очищенной GSTP1, откуда следует необходимость получения рекомбинантного фермента.

Из литературы известны два основных варианта экспрессии GSTP1 в клетках *E. coli*: либо с дополнительным гексагистидиновым пептидом (6xHis-тэг) для последующей очистки методом металлоаффинной хроматографии, либо без тэга, и тогда для выделения используют аффинную хроматографию на колонке с GSH-агарозой. В работе [10] уровень экспрессии GSTP1 с N-концевым 6xHis-тэгом составил 30 мг/л культуральной среды, но более 20 % активности фермента найдено в бактериальном осадке. Другие авторы [11] встроили сайт расщепления энтерокиназой (6 аминокислот) между тем же тэгом и последовательностью GSTP1. Несмотря на высокий уровень экспрессии (50–60 мг/л культуральной среды), в осадке обнаружено 27 % активности. После дополнитель-

ных процедур (отщепление тэга, хроматография на колонке с GSH-агарозой) удельная активность фермента в стандартных условиях (72 Ед/мг белка) оказалась меньше максимально возможной (100–110 Ед/мг). Кроме того, интенсивность собственной флуоресценции GSTP1 с тэгом была заметно ниже, чем у фермента без тэга, что указывает на различия в белковом окружении остатков Trp.

Чтобы экспрессировать бестэговую GSTP1, в работе [12] вынужденно исходили из транкированной кДНК гена gstp1, не содержащей кодоны для N-концевых 34 аминокислот. После оптимизации кодонов недостающий фрагмент ДНК синтезировали химически, встраивали вместе с кДНК в плазмидный вектор и трансформировали им клеточную линию *JM103*. В конечном итоге достигнут очень высокий уровень цитозольной экспрессии высокоактивного фермента (200 мг/л культуральной среды), но по трудоемкости и материалозатратности авторская процедура клонирования, очевидно, далека от оптимальной. С той же целью в работе [13] использовали полноразмерную кДНК из плаценты и сложную, многостадийную методику создания экспрессионного вектора. Уровень цитоплазматической экспрессии GSTP1 в клеточной линии *TOP10* составил 35–50 мг/л среды; 24 % активности обнаружено в периплазме как результат коэкспрессии с молекулярными шаперонами. Очищенный фермент обладал умеренно высокой удельной активностью (81 Ед/мг) и структурной микрогетерогенностью: половина ферментного белка, как выяснилось, содержит дополнительный N-концевой остаток Met.

Цель настоящей работы – создать простую, экономичную и эффективную систему бактериальной экспрессии бестэговой рекомбинантной GSTP1 с нативной структурой, охарактеризовать очищенный фермент по физико-химическим и каталитическим свойствам и провести скрининг *in silico* и *in vitro* для выявления новых, высокоактивных ингибиторов активности фермента из числа конденсированных карбо- и гетероциклических соединений.

Материалы и методы исследования. В работе использовали: фенольный реагент Purezol («Bio-Rad», США); набор для обратной транскрипции ОТ-1 («Синтол», Россия); дезоксинуклеотидтрифосфаты, эндонуклеазы рестрикции *NdeI*, *AseI* и *XhoI*, ДНК-лигазу фага T4, плазмидный вектор pTXB1 («New England BioLabs», США); ДНК-полимеразу Phusion, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG), набор маркеров молекулярной массы ДНК («Thermo Scientific», США); микроколоночные наборы для выделения ДНК NucleoSpin Gel and PCR Clean-up («Macherey-Nagel», Германия) и Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System («Promega», США); среду Лурия-Бертани (LB, «Condalab», Испания); агарозу для гель-электрофореза (тип A6013), набор белковых маркеров для гель-электрофореза, дитиотреит (DTT), трис(гидроксиметил)аминометан (трис), акриламид, N,N′-метиленбисакриламид «Sigma-Aldrich», США); DEAE-сефарозу CL-6B («Pharmacia», Швеция); сывороточный альбумин человека (HSA, «Serva», Германия); 1-хлор-2,4-динитробензол (CDNB), GSH («Alfa Aesar», Германия). Остальные реактивы имели квалификацию не ниже «ч. д. а.». 1,10-фенантролин-5,6-дион (phedon), 2,2′-бипиридин-3,3′-дикарбоновую кислоту (bipydca) и дипиридо-[3,2-a:2′,3′-c]-феназин (dppz) получали из 1,10-фенантролина (phen) известными методами [14, 15]. 2-Метил-1*H*-имидазо[4,5-b]феназин (MIP) синтезировали согласно [16]. Хлороформ и изопропанол перед использованием перегоняли без доступа влаги. Стерильную безнуклеазную воду для работы с нуклеиновыми кислотами получали ультрафильтрацией деионизованной воды на центрифужных фильтрах Amicon Ultra-15 («Millipore», США) с молекулярно-массовым пределом задерживания 10 кДа. Специфичные олигонуклеотидные праймеры синтезированы ОДО «Праймтех» (Беларусь). Получение аффинных мембран с иммобилизованным GSH описано ранее в работе [9].

Выделение суммарной РНК и синтез кДНК. Лейкоцитарную фракцию крови получали, взяв за основу методику [17] с предварительным лизисом эритроцитов. Исходным материалом служила кровь здоровых доноров, стабилизированная цитратом и хранившаяся во льду не более 3 ч после взятия. К 1,5 мл крови в пробирке типа Falcon добавляли 7,5 мл охлажденного лизирующего раствора (155 мМ NH_4Cl, 10 мМ $KHCO_3$, 0,2 мМ EDTA; pH 7,4). Закрытую смесь выдерживали во льду 20 мин с периодическим переворачиванием. Далее пробы центрифугировали 5 мин при 500 *g* и 4 °C; темно-красный супернатант (гемолизат эритроцитов) удаляли. Осадок лейкоцитов осторожно ресуспендировали в 3 мл лизирующего раствора и переосаждали в том же режи-

ме. Затем осадок аналогично промывали 3 мл охлажденного стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS). Промытый осадок (объем ~ 50 мкл) немедленно использовали для выделения РНК.

Осадок лейкоцитов суспендировали в 1 мл реагента Purezol, инкубировали 50 мин при комнатной температуре и оставляли на ночь при 2–4 °С. После прогрева (25 °С, 3 мин) и перемешивания на вортексе пробы переносили в стерильные микропробирки. Дальнейшие операции (обработка хлороформом, разделение фаз, осаждение РНК из водной фазы изопропанолом) проводили согласно инструкции к реагенту. Осадок РНК промывали 1 мл 75 %-ного этанола, высушивали на воздухе 5 мин, растворяли в 30 мкл 4 мМ трис-ацетатного буферного раствора (0,1×TAE) и инкубировали 10 мин при 55 °С в твердотельном термостате СН-100 («BioSan», Латвия), после чего немедленно охлаждали раствор в ледяной бане. Полученные препараты анализировали на микрокапельном спектрофотометре NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», США). Для консервации к препаратам добавляли 3М ацетат натрия (0,1 объема) и 95 %-ный этанол (3 объема); осажденную РНК хранили при –20 °С в течение 3–6 мес без значительного снижения индекса A_{260}/A_{280}.

Полноразмерную кДНК гена gstp1 (первую цепь) получали с помощью реакции обратной транскрипции. В реакции использовали 0,4 мкг свежевыделенной лейкоцитарной РНК, обратный геноспецифичный праймер gstp1r (структуру см. ниже), а также обратную транскриптазу MMLV из набора ОТ-1. Реакцию проводили в амплификаторе Т-100 «Bio-Rad, США» согласно инструкции к набору и останавливали прогреванием реакционной смеси 5 мин при 92 °С. Охлажденную смесь хранили во льду не более суток.

Амплификация и клонирование гена gstp1. Полученную кДНК в составе смеси использовали как матрицу для амплификации гена gstp1 методом ПЦР. Геноспецифичные олигонуклеотидные праймеры для ПЦР конструировали, исходя из известной нуклеотидной последовательности гена gstp1 [18]. При этом учитывали вероятность образования праймерами вторичных структур и частоту использования кодонов в процессе трансляции у *E. coli*. Структура прямого праймера gstp1f (5′-AGGATTAATGCCGCCGTACACCGTG-3′) содержит сайт рестрикции *AseI* (подчеркнут), перекрывающийся со старт-кодоном ATG таким образом, что после рестрикции общий динуклеотидный фрагмент AT сохраняется и обеспечивает функциональность кодона. В структуру обратного праймера gstp1r (5′-CATCTCGAGTCACTGTTTCCCGTTGCC-3′) непосредственно за триплетом, комплементарным стоп-кодону TGA, встраивали сайт рестрикции *XhoI* (подчеркнут). ПЦР проводили в амплификаторе Т-100 с помощью ДНК-полимеразы Phusion; фермент брали в количестве 1 Ед/50 мкл смеси. Процесс состоял из следующих этапов: начальная денатурация (95 °С, 2 мин); 35 циклов денатурации (98 °С, 10 с) – отжига (60 °С, 30 с) – элонгации (72 °С, 30 с); заключительная элонгация (72 °С, 10 мин). Продукты ПЦР разделяли методом гель-электрофореза в 1,2 %-ном агарозном геле с добавкой бромида этидия. В каждом опыте проводили положительный и отрицательный контроль амплификации. Фрагменты геля, содержащие целевой ампликон с длиной ~ 650 п. н., визуализировали в трансиллюминаторе, аккуратно вырезали и помещали в стерильные микропробирки для временного хранения во льду. Экстракцию и очистку ДНК из геля проводили с помощью микроколоночного набора NucleoSpin Gel and PCR Clean-up по протоколу производителя. На каждую микроколонку наносили солюбилизат 3–4 гелей с ампликоном из одного и того же ПЦР-эксперимента. В дальнейшую работу брали препараты очищенной ДНК с величиной индекса $A_{260}/A_{280} \geq 1{,}70$.

Секвенирование ампликона проводили по методу Сэнгера [19] на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США) с помощью набора реактивов «BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit» и геноспецифичных праймеров.

Для клонирования использовали плазмидный вектор pTXB1 (размер 6706 п. н.) с рестрикцией по сайтам *NdeI* и *XhoI* в полилинкерном участке. Так как ген gstp1 имеет внутренний сайт рестрикции *NdeI* в положениях 536–541 нуклеотидной последовательности [18], рестрикцию ампликона осуществляли по встроенным сайтам *AseI* и *XhoI* (см. выше). Сайт *AseI* в структуре ампликона служит удобной альтернативой *NdeI*; рестрикция по этим сайтам приводит к образованию идентичного «липкого» конца ДНК с одноцепочечным выступом AT [20]. Расщепление ампликона и вектора проводили раздельно в двух микропробирках, добавляя к тому или иному субстрату (1 мкг ДНК) соответствующие эндонуклеазы рестрикции (по 10 Ед активности каждого фермента). Обе смеси

инкубировали 1 ч при 37 °С, после чего смесь с ампликоном наносили на микроколонку из набора Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System и выделяли рестрикт по стандартному протоколу. Смесь с вектором дополнительно инкубировали 20 мин при 65 °С и фракционировали электрофорезом в 1 %-ном агарозном геле. Фрагменты геля, содержащие расщепленный вектор, вырезали, переносили в микропробирки и выделяли целевой продукт при помощи того же набора. Ферментативное лигирование очищенных рестриктов проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей 77,8 нг вектора, 22,2 нг ампликона и 400 Ед активности ДНК-лигазы фага Т4. Смесь выдерживали 4 ч при 20 °С, а затем хранили не более 5 дней при –20 °С до использования.

Трансформацию компетентных клеток *E. coli* DH5α полученной лигирующей смесью проводили на фоне KCl, $CaCl_2$, и $MgCl_2$ (КСМ-метод), согласно процедуре [21] с незначительными изменениями. В контрольных опытах лигирующую смесь заменяли нативной плазмидой pTXB1 (положительный контроль) или водой (отрицательный контроль). После трансформации клетки из контрольных и опытных проб высевали в чашки Петри на агаризованную среду LB с добавлением ампициллина (LB-Amp) и инкубировали 18 ч при 37 °С. Колонии трансформантов, предположительно содержащих рекомбинантную плазмиду pTXB1 со вставкой gstp1, использовали для наработки генетического материала. Колонии индивидуально переносили в пробирки с жидкой средой LB-Amp, выращивали ночную культуру и проводили выделение минипрепаратов плазмидной ДНК методом щелочного лизиса [22]. Наличие вставки определяли постановкой ПЦР с геноспецифичными праймерами и гель-электрофорезом полученного амплификата. Целевой продукт ПЦР (~ 650 п. н.) выделяли из фрагментов геля и очищали на микроколонках, как описано выше. Отсутствие мутаций во вставке проверяли автоматическим секвенированием. Далее лучшие минипрепараты дополнительно очищали агарозным гель-электрофорезом и микроколоночной хроматографией. Очищенный рекомбинантный вектор амплифицировали посредством ПЦР с использованием специальных праймеров. Прямой праймер T7univ1f со структурой 5′-TAATACGACTCACTATAGGG-3′ комплементарен Т7-промотору pTXB1 и отжигается на расстоянии 70–89 п. н. перед старт-кодоном ATG (рис. 1). Обратный праймер intein1r со структурой

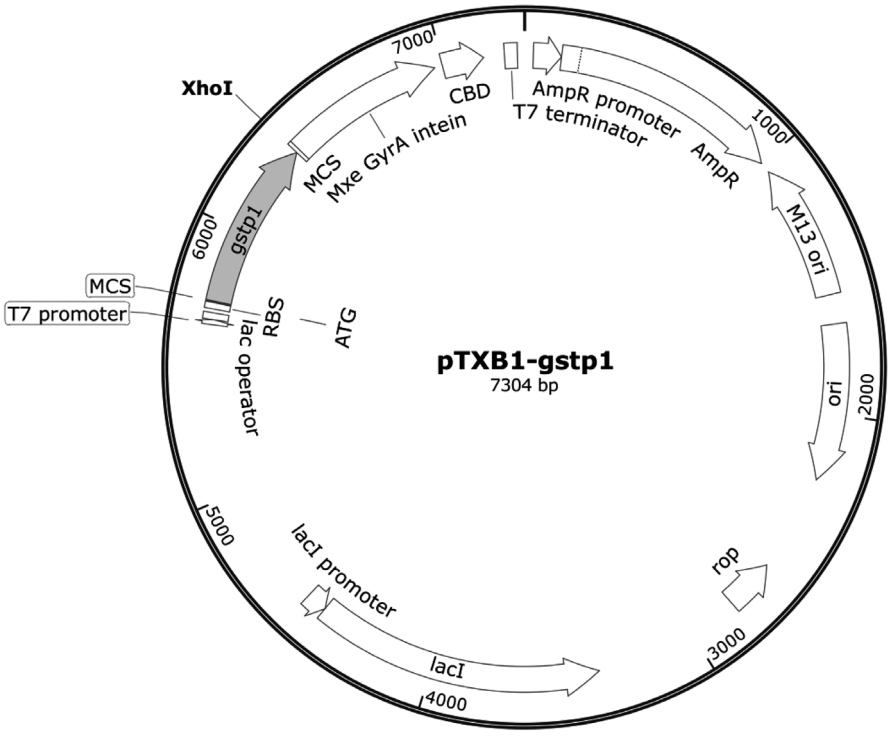


Рис. 1. Генетическая карта рекомбинантного вектора pTXB1-gstp1. Вставка гена gstp1 в полилинкерный участок (MCS) обозначена серой стрелкой. Размер вектора 7304 п. н.

Fig. 1. Genetic map of the recombinant vector pTXB1-gstp1. The insert of gstp1 gene into the polylinker region (MCS) is designated with a grey arrow. The vector is 7304 bp in size

5′-GATGGCGTTGTCACTGTTG-3′ комплементарен интеиновому фрагменту вектора и отжигается на расстоянии 95–113 п. н. после сайта *XhoI* (см. рис. 1).

Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантной GSTP1. Компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3) и BL21(DE3)RIPL трансформировали вектором pTXB1-gstp1 с помощью КСМ-метода [21]. Рекомбинантные клоны переносили с чашек Петри в жидкую среду LB с антибиотиком (ампициллин для клеток BL21(DE3), ампициллин и хлорамфеникол – для BL21(DE3)RIPL) и выращивали ночную культуру в объеме 5 мл. Затем ночной культурой инокулировали аналогичную среду объемом 100 мл в 500 мл-колбе. Клетки культивировали аэробно при 37 °C с интенсивным встряхиванием (180 об/мин) в шейкере-инкубаторе Multitron Pro («INFORS HT», Швейцария). Когда оптическая плотность культуры при 600 нм достигала 0,5–0,6, вносили индуктор экспрессии IPTG. Условия экспрессии оптимизировали, варьируя концентрацию IPTG (0,2, 0,5 и 1 мМ), а также температуру (20 и 37 °C) и длительность постиндукционного периода. Через 2, 6, 10 и 24 ч после внесения индуктора клетки осаждали центрифугированием 15 мин при 3000 *g* и 4 °C. Осадок клеток суспендировали в охлажденном 0,1 М КФБ (калий-фосфатный буфер с добавкой 1 мМ EDTA и 1 мМ DTT, pH 6,5) и лизировали под давлением в гомогенизаторе Emulsiflex C5 («Avestin», Канада); лизат осветляли центрифугированием 30 мин при 35000 *g* и 4 °C. Количество GSTP1 в супернатанте (осветленный лизат) оценивали по активности фермента в реакции конъюгации GSH и CDNB. В специальных опытах осадок лизированных клеток солюбилизировали 0,6 %-ным тритоном X-100 и определяли ферментативную активность солюбилизата таким же образом.

С целью препаративного выделения и очистки рекомбинантную GSTP1 экспрессировали в клетках BL21(DE3)RIPL по оптимизированному протоколу (см. ниже). Осветленный бактериальный лизат (100 мл) концентрировали, обессоливали и переводили в 15 мМ КФБ, используя центрифужные фильтры Amicon Ultra-15 с молекулярно-массовым пределом задерживания 10 кДа. Дальнейшую очистку препарата проводили по процедуре, разработанной ранее для выделения эритроцитарного фермента [9]. Процедура включает анионообменную хроматографию на колонке с DEAE-сефарозой и аффинную хроматографию на картридже с GSH-содержащими мембранами. Условия хроматографии подробно изложены в той же работе.

Определение активности GSTP1. Активность фермента в реакции конъюгации GSH и CDNB определяли на двухлучевом спектрофотометре при pH 6,5 и 25 °C согласно [9]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль S-(2,4-динитрофенил)глутатиона (GDN) за 1 мин. В кинетических экспериментах концентрацию GSH варьировали в диапазоне 0,1–2 мМ на фоне 1 мМ CDNB, а концентрацию CDNB – в диапазоне 0,05–2 мМ на фоне 2 мМ GSH. При изучении влияния циклических лигандов на активность очищенной GSTP1 рабочие растворы водонерастворимых соединений готовили в этаноле или диметилсульфоксиде высокой чистоты. Фермент (15–20 мЕд активности) выдерживали с предполагаемым ингибитором 10 мин при 25 °C и pH 6,5, после чего запускали реакцию внесением растворов GSH и CDNB. Максимальная концентрация органического растворителя в среде инкубации не превышала 5 %, что не влияет на активность GSTP1. Для соединений с явно выраженным ингибиторным действием строили концентрационную зависимость «доза–эффект» и проводили ее нелинейную регрессию в программе Sigmaplot, используя логистическое уравнение сигмоиды с 4 параметрами [23]; из уравнения находили величину IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования).

Молекулярный докинг лигандов в активном центре GSTP1. Молекулярный докинг амфифильных карбо- и гетероциклических соединений в лигандсвязывающем центре GSTP1 (H-сайт) проводили *in silico* с помощью программы AutoDock Vina [24]. Белковым рецептором служила трехмерная кристаллическая структура фермента в комплексе с GSH, депонированная в базе данных Protein Data Bank (код 6GSS, [25]). Для подготовки рецептора к жесткому докингу (удаление молекул воды, GSH и других лигандов, ионов, неполярных атомов H) использовали программный пакет AutoDock Tools [24]. Область докинга задавали в форме куба с ребром 24 Å; куб центрировали по координатам атома O фенольной OH-группы остатка Tyr108, экспонированного в H-сайт. Исходные трехмерные структуры лигандов загружали из публичной базы данных PubChem [26]. Подготовку структур к докингу проводили в программных пакетах Vega ZZ [27] и AutoDock Tools следующим образом: 1) редактировали химические связи; 2) присваивали частичный заряд

по Гастайгеру при pH 7,0; 3) минимизировали энергию в силовом поле Amber методом сопряженных градиентов; 4) устанавливали число вращательных степеней свободы. В параметрах файла конфигурации AutoDock Vina повышали интенсивность поиска (exhaustiveness) до уровня 128 и увеличивали максимальное число позиций лиганда до 20; энергетический барьер между наилучшей и наихудшей позициями задавали равным 5 ккал/моль. Результаты докинга визуализировали и анализировали в программном пакете UCSF Chimera [28]. Каждый лиганд докировали трижды и выбирали хорошо воспроизводимые позиции с минимумом энергии, для которых оценивали природу и локализацию взаимодействий с белком, а также степень перекрывания с известными закристаллизованными положениями GSH и GDN в активном центре GSTP1. Позицию, соответствующую ингибиторному поведению лиганда *in vitro*, считали наиболее вероятной.

Аналитические методы. Гель-электрофорез белковых фракций проводили на приборе Mini-Protean Tetra Cell («Bio-Rad», США) по Лэммли [29] в 13 %-ном полиакриламидном геле на фоне додецилсульфата натрия и 2-меркаптоэтанола. Белковые полосы в гелях окрашивали красителем Coomassie R-250. Концентрацию белка определяли по Бредфорду [30], используя раствор HSA при построении калибровочной кривой.

Для подготовки к трипсинолизу очищенную GSTP1 (0,19 мг белка в 0,35 мл раствора) осаждали 4 объемами ацетона с выдержкой 16 ч при –20 °C. Осадок белка собирали центрифугированием, растворяли в 8 М мочевине, карбоксиметилировали и обрабатывали трипсином по протоколу [31] при соотношении трипсин:белок = 1:25 по массе. Полученные пептиды выделяли на картридже для твердофазной экстракции SampliQ C18 EC («Agilent Technologies», США); N-концевой триптический пептид элюировали 80 %-ным ацетонитрилом с добавкой 0,2 % муравьиной кислоты. Масс-спектры очищенной GSTP1 и триптического пептида регистрировали методом MALDI-TOF с помощью времяпролетного масс-спектрометра Microflex LRF System («Bruker Daltonics», США).

Результаты и их обсуждение. В работе использовали лейкоцитарную фракцию крови как доступный источник генетического материала (РНК) с удовлетворительным уровнем экспрессии гена gstp1 (25–40 % от уровня экспрессии референсного гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [32]). Выходы суммарной РНК составили 3,1–3,9 мкг/мл крови, что соответствует производительности лучших коммерческих наборов. Целостность РНК подтверждена электрофорезом в 1,2 %-ном агарозном геле, содержащем бромид этидия; выявлены две четкие полосы рибосомальной 28S- и 18S-РНК с несколько более интенсивной 28S-полосой. В реакцию обратной транскрипции брали РНК с высоким спектрофотометрическим индексом чистоты A_{260}/A_{280}, равным 1,91–2,04. В результате получена полноразмерная кДНК гена gstp1, которую амплифицировали с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Phusion и тщательно подобранных геноспецифичных праймеров (их структура приведена выше). На электрофореграммах продуктов ПЦР в 1,2 %-ном агарозном геле обнаружена одна доминантная полоса, соответствующая ампликону gstp1 с ожидаемой длиной ~ 650 п. н. По данным секвенирования, нуклеотидная последовательность очищенного ампликона, фланкированная сайтами рестрикции *AseI* и *XhoI*, полностью совпадает с первичной структурой гена gstp1 из базы данных GenBank [18].

Амплифицированный ген gstp1 клонировали в коммерчески доступный плазмидный вектор pTXB1 с умеренной копийностью (~ 20 копий/клетку). Вектор содержит ген устойчивости к ампициллину и предназначен для IPTG-индуцируемой экспрессии целевых генов в *E. coli* под контролем сильного промотора бактериофага T7 и lac-оператора (рис. 1). Согласно производителю, рекомбинантный белок экспрессируется без дополнительных N-концевых аминокислот, но может быть получен с С-концевым тэгом в виде небольшого белка интеина, имеющего сродство к хитину. Чтобы удалить тэг, химерный белок адсорбируют на хитиновой колонке и расщепляют действием DTT активированную связь между С-концевым аминокислотным остатком целевого белка и N-концевым остатком Cys интеина, причем выходы в реакции расщепления значительно варьируют [33]. В настоящей работе интеиновый фрагмент ДНК вектора не экспрессировали, так как существует возможность получить бестэговую рекомбинантную GSTP1 напрямую, исключив дополнительные стадии химической или ферментативной модификации первичного продукта экспрессии, и использовать для выделения фермента аффинный сорбент с иммобилизо-

ванным GSH. Поэтому в создаваемой генетической конструкции стоп-кодон располагали между вставкой gstp1 и сайтом рестрикции *XhoI*, который предшествует интеиновому фрагменту (рис. 1).

Раздельную рестрикцию вставки и вектора, очистку рестриктов и их лигирование проводили согласно рекомендациям производителей ферментов и микроколоночных наборов. Массовое соотношение вектор/вставка в реакции лигирования составляло 3,5:1. При трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5α полученной лигирующей смесью на чашках с отрицательным и положительным контролем выявлено 0 и более 100 колоний соответственно. На чашках с опытными пробами обнаружено 4–40 колоний в зависимости от концентрации клеток, взятых в опыт. Клоны, предположительно содержащие рекомбинантную плазмиду со вставкой, подращивали в ночной культуре и выделяли минипрепараты плазмидной ДНК. В 5 из 9 минипрепаратов наличие вставки подтвердилось постановкой ПЦР с геноспецифичными праймерами и гель-электрофорезом амплификата. После выделения и очистки суммарный выход целевого продукта ПЦР (650 п. н.) составил 2,8 мкг ДНК. Автоматическим секвенированием доказано, что ДНК-последовательность вставки не содержит мутаций и соответствует наиболее распространенному аллелю дикого типа gstp1a [34]. Чтобы проверить целостность полилинкера и прилегающих к нему участков, лучшие минипрепараты после дополнительной очистки амплифицировали методом ПЦР с использованием пары встречных векторспецифичных праймеров T7univ1f и intein1r, которые отжигаются на ДНК-мишенях, расположенных по разные стороны от полилинкера; структура праймеров приведена выше. Электрофореграммы амплификатов, полученных для нативной плазмиды pTXB1 и рекомбинантного вектора pTXB1-gstp1, представлены на рис. 2. В первом случае амплифицируется небольшой фрагмент ДНК с длиной ~ 230 п. н., близкой к расчетной величине (228 п. н.). Во втором случае размер ампликона значительно больше (~ 880 п. н.), что обусловлено наличием вставки gstp1 с длиной ~ 650 п. н. По данным автоматического секвенирования, нуклеотидная последовательность амплифицированного участка совпала с ожидаемой.

Эксперименты по бактериальной экспрессии рекомбинантной GSTP1 проводили на лизогенных клеточных линиях *E. coli* BL21(DE3) и BL21(DE3)RIPL; вторая линия обогащена транспортными РНК для редких кодонов, требуемых при трансляции мРНК генов млекопитающих. Обнаружено, что в отсутствие индуктора (IPTG) экспрессия не происходит. Установлены оптимальные условия

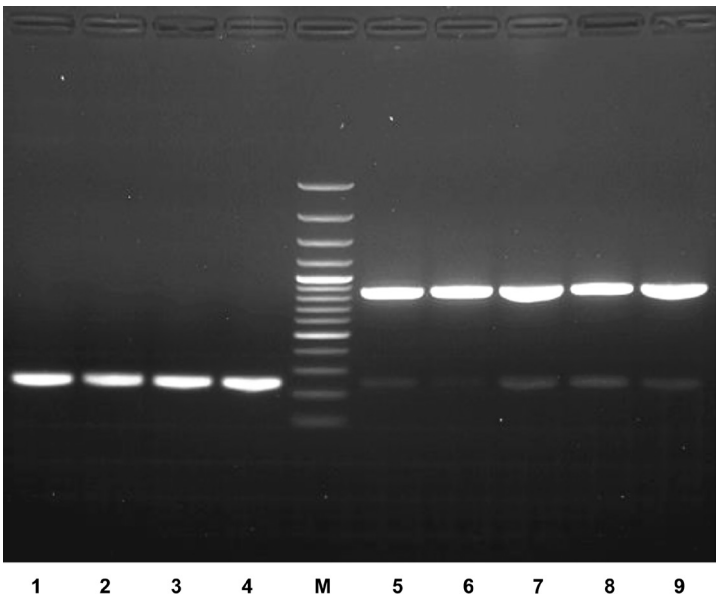


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов ПЦР-амплификации нативного и рекомбинантного вектора с использованием векторспецифичных праймеров. Обозначения треков: **1**–**4** – нативный вектор pTXB1; **5**–**9** – рекомбинантный вектор pTXB1-gstp1; **M** – маркер молекулярной массы ДНК (100–3000 п. н.). Агарозный гель (1,2 %) с бромидом этидия

Fig. 2. Electrophoregrams of PCR amplification products for the native and recombinant vector with the use of vector-specific primers. Track designations: **1**–**4** – native vector pTXB1; **5**–**9** – recombinant vector pTXB1-gstp1; **M** – DNA molecular mass marker (100–3000 bp). Agarose gel (1.2 %) with ethidium bromide

экспрессии: 0,5 мМ концентрация IPTG; температура индукции 37 °С; длительность инкубации с индуктором 24 ч. Существенно то, что почти весь рекомбинантный фермент экспрессируется при 37 °С в цитозоле как растворимый белок; в осадке лизированных клеток выявлено лишь 6–10 % активности. При оптимальных условиях уровень экспрессии GSTP1 клетками BL21(DE3) достигает 200–300 Ед/л среды; с учетом удельной активности чистого фермента (~100 Ед/мг) данная величина соответствует концентрации ферментного белка, равной 2–3 мг/л среды. У линии BL21(DE3)RIPL аналогичный показатель на порядок выше и составляет 30–32 мг фермента/л среды. Достигнутый в настоящей работе уровень экспрессии бестэговой GSTP1 не уступает лучшим зарубежным данным для фермента, экспрессированного с гексагистидиновым тэгом [10, 11].

Результаты очистки рекомбинантной GSTP1 из осветленного бактериального лизата суммированы в табл. 1. Общий выход очищенного фермента составил 75,7 %. Полученный препарат обладает высокой удельной активностью (102,6 Ед/мг белка). Найденная величина очень близка к максимальным литературным значениям активности нативной и рекомбинантной GSTP1 – соответственно 104,5 и 112 Ед/мг белка [9, 10].

Т а б л и ц а 1. **Схема очистки рекомбинантной GSTP1 из 100 мл осветленного лизата**

T a b l e 1. **Scheme of recombinant GSTP1 purification from 100 ml of clarified lysate**

Стадия очистки	Общий белок, мг	Активность, Ед	Удельная активность, Ед/мг	Степень очистки	Выход, %
Осветленный лизат	30,6	314,2	10,3	1	100
DEAE-сефароза	3,34	288,5	86,4	8,4	91,8
Аффинный картридж	2,32	237,9	102,6	10,0	75,7

Таким образом, нами успешно осуществлена бестэговая гетерологическая экспрессия гена gstp1 в клетках *E. coli*. Впервые получены миллиграммовые количества очищенного высокоактивного препарата рекомбинантной GSTP1, что позволяет развернуть структурно-функциональное исследование ферментного белка и провести направленный скрининг новых ингибиторов фермента с потенциальной противоопухолевой активностью.

Электрофореграммы белковых фракций, полученных в ходе очистки фермента, представлены на рис. 3. Как выяснилось, исходный материал содержит значительное количество (~ 10 %) целевого продукта экспрессии и примесные бактериальные белки (трек 1). Очищенный препарат GSTP1 имеет чистоту не менее 98 % (трек 3). Электрофоретическая подвижность основной белковой зоны соответствует ожидаемой молекулярной массе 23 кДа. Гомогенность очищенного фермента также подтверждена масс-спектрометрией MALDI-TOF. Наряду с главным пиком протонированного молекулярного иона (M+H)+ с величиной *m/z* = 23350 в спектре имеются минорные пики, соответствующие дважды протонированной молекуле (M+2H)2+, а также протонированным димерным и тримерным молекулярным ассоциатам (2M+H)+ и (3M+H)+ (рис. 4, *a*). Сигналы от примесных белков практически отсутствуют. Экспериментальное значение молекулярной массы, найденное масс-спектрометрическим методом, равно 23349 Да, что с точностью 7 Да соответствует расчетной массе 23356 Да для продукта экспрессии доминантного аллеля gstp1a, содержащего аминокислотные остатки Ile105 и Ala114 [34], а также N-концевой остаток Met.

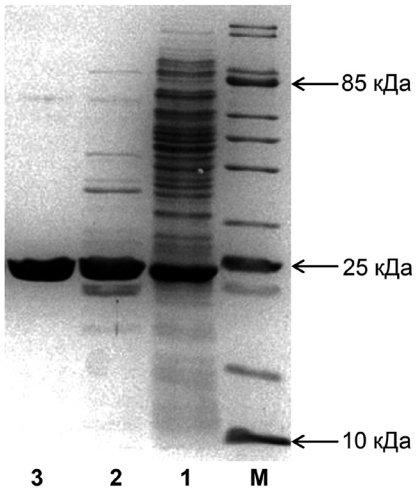


Рис. 3. Электрофореграммы стадий очистки рекомбинантной GSTP1. Обозначения треков: **1** – осветленный лизат; **2** – препарат фермента после DEAE-сефарозы; **3** – очищенный фермент; **M** – маркерные белки с указанием молекулярной массы. Полиакриламидный гель (13 %) с додецилсульфатом натрия и 2-меркаптоэтанолом

Fig. 3. Electrophoregrams of recombinant GSTP1 purification steps. Track designations: **1** – clarified lysate; **2** – enzyme preparation after DEAE-sepharose; **3** – purified enzyme; **M** – marker proteins with molecular mass indicated. Polyacrylamide gel (13 %) containing sodium dodecyl sulfate and 2-mercaptoethanol

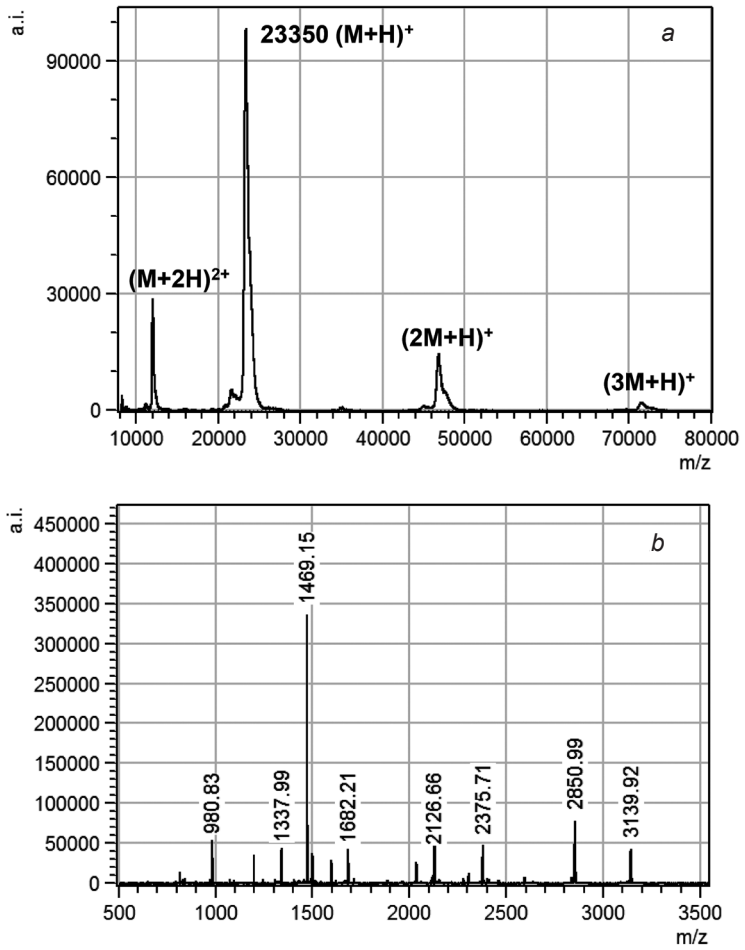


Рис. 4. Масс-спектры (MALDI-TOF) очищенной GSTP1 (*a*) и N-концевого пептида, полученного трипсинолизом ферментного белка (*b*)

Fig. 4. Mass-spectra (MALDI-TOF) of purified GSTP1 (*a*) and N-terminal peptide obtained by trypsinolysis of the enzyme protein (*b*)

Наличие N-концевого Met доказано в специальном эксперименте по трипсинолизу рекомбинантной GSTP1 с последующей масс-спектрометрической идентификацией N-концевого триптического додекапептида Met-Pro-Pro-Tyr-Thr-Val-Val-Tyr-Phe-Pro-Val-Arg (рис. 4, *b*). Расчетная величина *m/z* для протонированного молекулярного иона $(M+H)^+$ этого пептида составляет 1469,77. Экспериментальное значение *m/z* основного пика в спектре MALDI-TOF оказалось равным 1469,15, что практически совпадает с расчетным в пределах погрешности измерений. Следовательно, в выбранных нами условиях экспрессии N-концевой Met не отщепляется бактериальной метионинаминопептидазой и представляет собой единственное, незначительное структурное отличие рекомбинантного фермента от нативного. В то же время ферментный препарат, полученный в настоящей работе, выгодно отличается от литературного аналога [13] отсутствием структурной микрогетерогенности по N-концевой аминокислоте.

Каталитические свойства рекомбинантной GSTP1 изучали при pH 6,5 и 25 °C в реакции конъюгации GSH и CDNB. Параметры стационарной кинетики определяли, варьируя начальную концентрацию одного из субстратов при фиксированной начальной концентрации второго субстрата. Установлено, что для каждого субстрата экспериментальная зависимость начальной скорости реакции от его концентрации описывается гиперболой, согласно уравнению Михаэлиса–Ментен (рис. 5). Экспериментальные величины константы Михаэлиса K_M и каталитической константы k_{cat} по обоим субстратам, рассчитанные из графиков, приведены в табл. 2. Найденные значения оказались весьма близки к аналогичным показателям для нативного фермента из эритроцитов [9]; во всех случаях разница составляет менее 15 %. Результаты свидетельствуют о том,

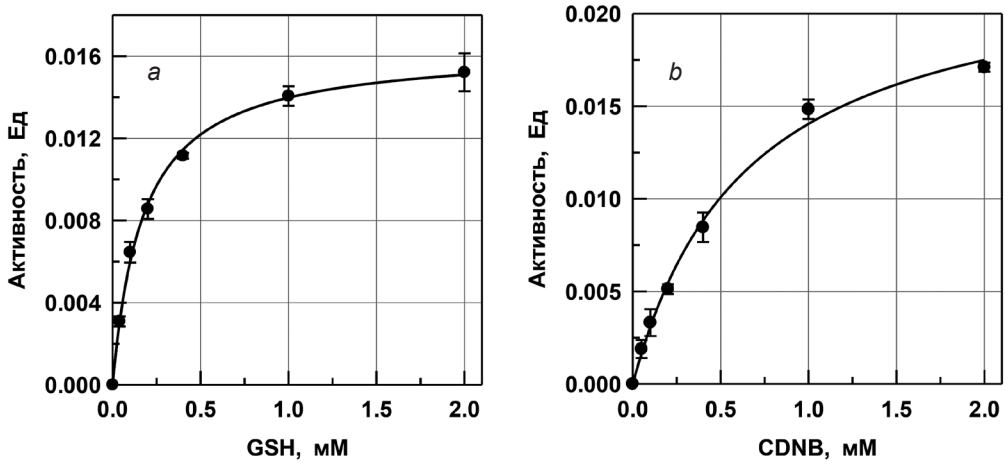


Рис. 5. Зависимость активности рекомбинантной GSTP1 от концентрации GSH и CDNB (соответственно кривые *a* и *b*)

Fig. 5. Dependence of recombinant GSTP1 activity on the concentration of GSH and CDNB (curves *a* and *b*, respectively)

что в ходе экспрессии происходит корректный фолдинг рекомбинантной GSTP1. По основным физико-химическим и каталитическим характеристикам полученный нами препарат практически идентичен нативному ферменту.

Таблица 2. **Кинетические параметры рекомбинантной и нативной GSTP1 в реакции конъюгации GSH и CDNB**

Table 2. **Kinetic parameters of recombinant and native GSTP1 in the conjugation reaction of GSH with CDNB**

Субстрат	Рекомбинантная GSTP1		Нативная GSTP1 [9]	
	K_M, мМ	k_{cat}, $с^{-1}$	K_M, мМ	k_{cat}, $с^{-1}$
GSH	0,17	40,9	0,19	47,8
CDNB	0,65	57,9	0,68	54,3

Характерными отличиями H-сайта GSTP1 от аналогичных сайтов других цитозольных GST являются более крупный размер и частичная гидрофильность [35]. Логично предположить, что высоким сродством к H-сайту могут обладать амфифильные моно- или полициклические ароматические молекулы подходящего размера с заместителями, способными к образованию водородных связей. Поэтому предварительный отбор возможных ингибиторов фермента проводили из числа коммерчески доступных и стабильных ароматических или гетероароматических соединений (pH- и комплексонометрические индикаторы, красители, лабораторные реактивы) с моно-, би-, три- или тетрациклической структурой и амфифильными свойствами. Критерии отбора были следующими: 1) наличие атомов или функциональных групп, обеспечивающих малую или умеренную растворимость в воде при нейтральных значениях pH; 2) соответствие правилам Липински [36] и Вебера [37] для орально биодоступных молекул (допускалось несоответствие только по одному пункту из каждого набора правил). В результате найдено более 50 структурно разнообразных соединений-кандидатов; 9 из них представляют различные классы карбо- и гетероциклов и были отобраны для тестирования ингибиторной активности *in silico* и *in vitro.* Кроме того, в исследование включили замещенный имидазофеназин MIP и ряд производных phen, так как ингибирование GSTP1 конденсированными N-гетероциклами изучено недостаточно.

Установлено, что небольшие молекулы моно- и бициклических лигандов (синапиновая и хинальдиновая кислоты, 2-меркаптобензотиазол, 4-(2-пиридилазо)резорцин, 8-гидроксихинолин) в концентрации 100 мкМ не ингибируют GSTP1 (табл. 3). По данным молекулярного докинга, эти же лиганды либо связываются вне H-сайта, либо занимают только его часть, не создавая стерических препятствий для катализа. Как оказалось, хинальдиновая кислота ускоряет реакцию на 36 %, вероятно, за счет образования водородной связи между карбоксилатной группой лиганда

Таблица 3. **Влияние некоторых карбо- и гетероциклических соединений на *in vitro* активность GSTP1 и расчетная энергия их связывания с ферментом *in silico***

Table 3. **Effect of some carbo- and heterocyclic compounds on the *in vitro* GSTP1 activity and calculated energy of their binding to the enzyme *in silico***

Соединение	Концентрация, мкМ	Активность GSTP1, % к контролю[1]	Свободная энергия связывания $E_{св}$, ккал/моль[2]
Синапиновая кислота (анион)	100	103,1	–5,6
2-меркаптобензотиазол	100	96,7	–5,4
4-(2-пиридилазо)резорцин	100	104,1	–6,9[3]
8-гидроксихинолин	100	101,9	–5,7
Хинальдиновая кислота (анион)	100	136	–6,4
Патентный синий VF (анион)	100	85,6	–7,9
MIP	100	54,1	–8,0
Галлоцианин (цвиттер-ион)	100	34,5	–7,5
Phen	100	96,7	–6,2
Bipydca (дианион)	100	103,0	–5,5
Dppz	20	101,3	–7,9
Phedon	20	64,7	–6,4
ARS[4] (анион)	20	42,1	–8,1
Индигокармин (дианион)	20	11,7	–9,3

Примечание. [1]Среднее арифметическое из двух независимых определений. [2]Оценка методом молекулярного докинга *in silico*. [3]Связывание вне H-сайта. [4]Ализариновый красный С. Расшифровка остальных сокращенных названий дана в разделе «Материалы и методы».

и тиольной группой GSH, что облегчает депротонирование последней. Некоторые три- и тетрациклические лиганды (триарилметановый краситель патентный синий VF, галлоцианин, протяженная тетрациклическая система MIP) слабо или умеренно ингибируют фермент с величиной IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) > 50 мкМ. Выявлены также новые, более эффективные ингибиторы GSTP1 (IC_{50} < 50 мкМ): phedon, ARS и индигокармин.

Согласно моделированию *in silico*, молекула phedon располагается в H-сайте фермента так, что карбонильный кислород при атоме C5 образует водородные связи с OH-группой Tyr108 и NH-группой Gly205 (рис. 6). Одно из пиридиновых колец лиганда и бензольное кольцо Phe8 лежат в параллельных плоскостях и сближены на расстояние 3,6 Å, что обеспечивает их π-π взаимодействия (стэкинг). Кроме того, комплекс стабилизируется гидрофобными взаимодействиями phedon с Trp38 и Val35; участие Trp38 в связывании лигандов H-сайтом ранее не было отмечено в литературе. Позиция phedon частично перекрывается с закристаллизованным положением GDN в активном центре GSTP1, что коррелирует с выявленным *in vitro* наличием ингибиторных свойств у данного лиганда. По экспериментальной величине IC_{50} (31 мкМ) phedon близок к кемпферолу и кверцетину – природным флавоноидным ингибиторам GSTP1 средней силы [38]. В то же время незамещенный phen и некоторые его производные (дианион bipydca с неплоской структурой, а также пентациклический ДНК-интеркалятор dppz с Т-образной формой молекулы) в концентрации 20–100 мкМ не ингибируют фермент. Указанные соединения связываются *in silico* в H-сайте слабее (bipydca) или прочнее (dppz), чем phedon, и тоже взаимодействуют с Phe8 путем стэкинга, но при этом их позиции не перекрывают закристаллизованные положения GSH и GDN, что согласуется с отсутствием ингибирования. Так как phedon является редокс-активным гетероциклическим *о*-хиноном, дополнительно проверяли возможность его химической реакции с GSH или GSTP1 при определении активности фермента. Для этого соответствующие бинарные смеси инкубировали 10–120 мин при pH 6,5 и 25 °C и анализировали их состав методами масс-спектрометрии (MALDI-TOF, ESI-QTOF) и спектрофотометрии. Как выяснилось, phedon не образует прочных ковалентных аддуктов с GSTP1 или GSH, но медленно окисляет тиольную группу трипептида с образованием дисульфида GSSG и 1,10-фенантролин-5,6-диола (phedol), который в свою очередь реокисляется на воздухе, генерируя phedon и H_2O_2. Также обнаружено, что 20 мкМ phedol и 100 мкМ H_2O_2 в стандартных условиях определения активности не ингибируют GSTP1,

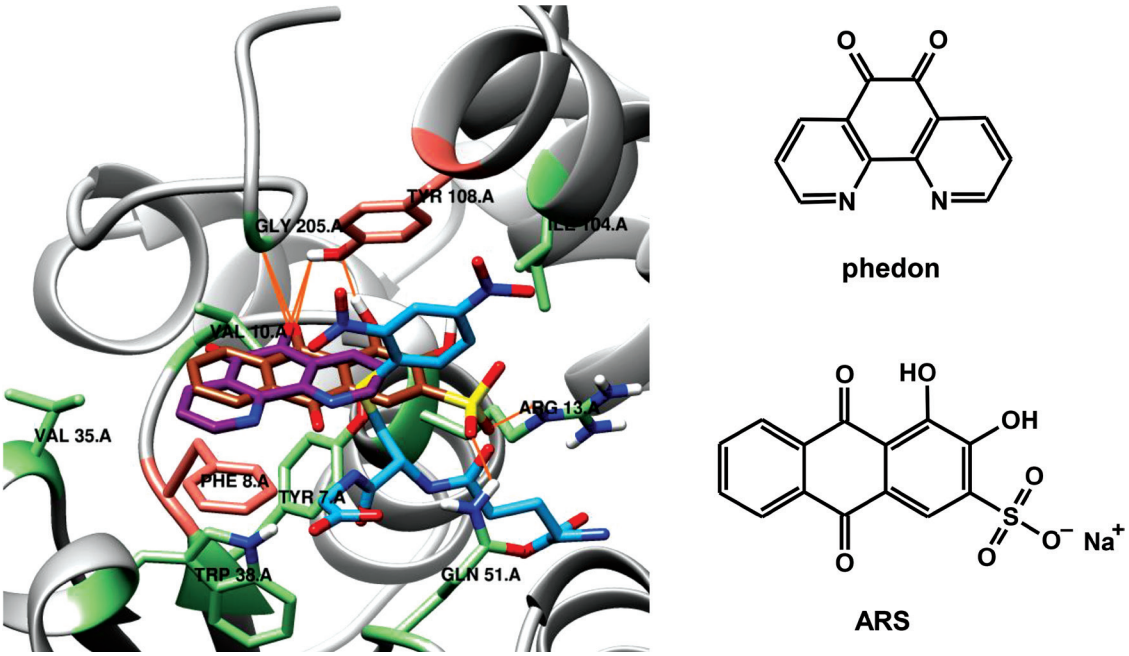


Рис. 6. Предпочтительные ориентации phedon и ARS в H-сайте GSTP1, найденные *in silico*. Атомы C показаны пурпурным (phedon), коричневым (ARS), персиковым (боковые цепи Phe8 и Tyr108), светло-зеленым (боковые цепи других аминокислотных остатков) и голубым цветом (GDN); оранжевые линии – водородные связи лигандов с белковым окружением. Справа – структурные формулы лигандов

Fig. 6. Preferable orientations of phedon and ARS in the H-site of GSTP1 found *in silico*. Carbon atoms are colored in purple (phedon), brown (ARS), peach (side chains of Phe8 and Tyr108), light green (side chains of other amino acid residues), and cyan (GDN); orange lines are hydrogen bonds of the ligands with protein environment. To the right are given structural formulas of the ligands

а конверсия GSH в GSSG во всех случаях не превышает 3 %; это позволяет исключить непрямые механизмы ингибирования фермента.

Антрахиноновый краситель ARS ингибирует GSTP1 заметно сильнее, чем phedon: экспериментальное значение IC_{50} равно 16 мкМ. Результаты докинга указывают на более прочное связывание ARS в H-сайте фермента; расчетная величина $E_{св}$ (–8,1 ккал/моль) по модулю значительно превышает аналогичный параметр для phedon (табл. 3). Полученный *in silico* комплекс GSTP1-ARS стабилизирован пятью водородными связями (рис. 6): две из них образует карбонильный кислород при атоме C10 ARS – с OH-группой Tyr108 и NH-группой Gly205, две другие связывают сульфонатные атомы O с Gln51 (амид в боковой цепи) и Arg13 (гуанидиновая группа), еще одна локализована между OH-группой лиганда (при атоме C4) и одноименной группой Tyr108. В образование комплекса также вносят вклад стэкинг-взаимодействия с Phe8 и гидрофобные взаимодействия с Val10 и Ile104. Ориентация ARS в комплексе явно вступает в стерический конфликт с динитрофенильной группой GDN и в меньшей степени с GSH, что согласуется с ингибиторной активностью лиганда *in vitro*.

Среди всех изученных соединений максимальная (по модулю) расчетная величина $E_{св}$, равная –9,3 ккал/моль, найдена у индигокармина (5,5′-дисульфоиндиго). В предпочтительной ориентации *in silico* лиганд занимает практически весь H-сайт и проксимальную часть G-сайта, образуя 4 водородные связи с белковым окружением (рис. 7): карбонильный кислород при атоме C3 связан с OH-группой Tyr108, атомы O одной из сульфонатных групп лиганда – с гуанидиновой группой Arg13 и боковой амидной группой Gln51 (2 связи), а атом O другой сульфонатной группы – с NH-группой Val35. Следует отметить существенное сходство комплексов индигокармина и ARS по локализации водородных связей лиганд–белок, а также по наличию стэкинг-взаимодействий с Phe8 и гидрофобных взаимодействий с участием Val10 и Ile104. Позиция, занимаемая индигокармином, стерически блокирует связывание продукта ферментативной реакции (GDN) в пространстве между Tyr108, Ile104 и Arg13, что позволило прогнозировать ингибиторные свойства

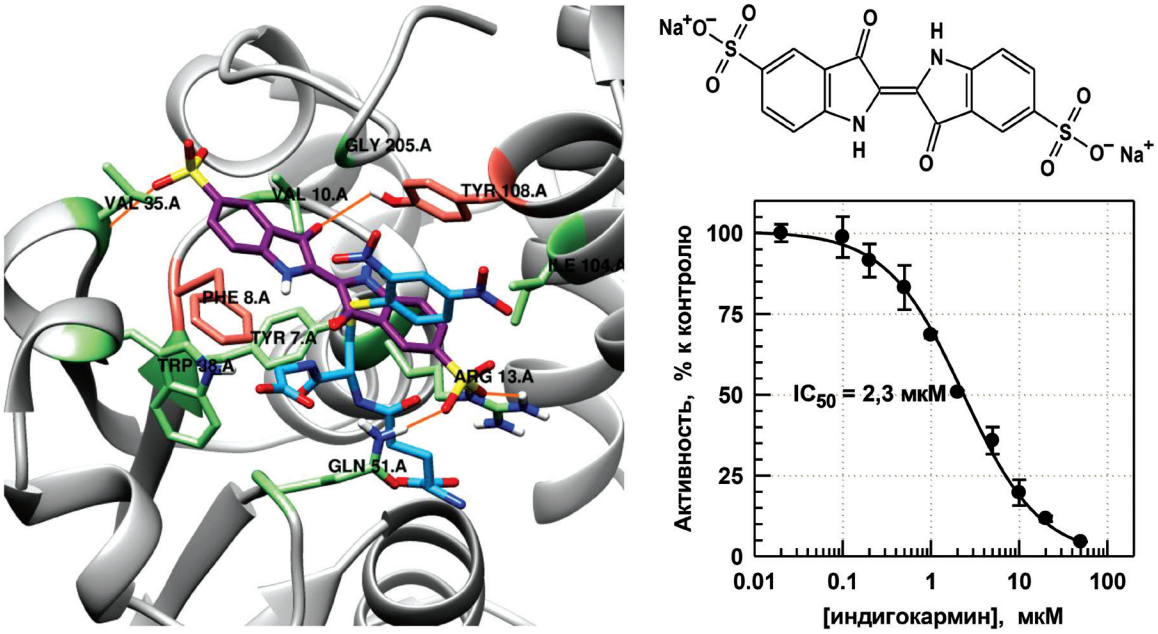


Рис. 7. Слева – предпочтительная ориентация индигокармина в H-сайте GSTP1, найденная *in silico*. Атомы С лиганда показаны пурпурным цветом, остальные элементы окрашены как на рис. 6. Справа – структурная формула лиганда и кривая ингибирования фермента *in vitro*

Fig. 7. To the left is given preferable orientation of indigo carmine found *in silico*. Carbon atoms of the ligand are shown in purple, other elements are colored as on Fig. 6. To the right are the ligand structural formula and the *in vitro* enzyme inhibition curve

данного соединения. Как показали эксперименты *in vitro*, индигокармин в микромолярных концентрациях сильно ингибирует GSTP1 (рис. 7). Значение IC_{50}, рассчитанное из кривой ингибирования, составляет 2,3 мкМ. По силе ингибирования индигокармин примерно вдвое превосходит этакриновую кислоту – известный ингибитор фермента с величиной IC_{50}, равной 4,9 мкМ [39]. Полученные результаты впервые демонстрируют способность индигоидных соединений эффективно ингибировать GSTP1. Так как индигокармин практически не связывается с альбумином и другими белками сыворотки крови человека при pH ≥5 [40], ингибирование GSTP1 данным соединением, по-видимому, имеет специфический характер.

Известно, что моно- и полиароматические лиганды, связываясь в H-сайте GSTP1, могут взаимодействовать по механизму стэкинга с Tyr108 или Phe8 [4]. Лиганды первой группы, которые подобно GDN и этакриновой кислоте взаимодействуют с Tyr108, заведомо будут создавать стерические препятствия для катализа и ингибировать GSTP1 более или менее эффективно. Лиганды второй группы, взаимодействующие с Phe8, не обязательно будут обладать ингибиторными свойствами. Для лигандов этой группы в настоящей работе выявлены особенности молекулярной архитектуры, присущие «хорошим» ингибиторам: 1) три- или тетрациклическая ароматическая или гетероароматическая структура с вытянутой формой молекулы и ее максимальной длиной 14–15 Å; 2) карбонильная или гидроксильная группа ближе к центру молекулы, способная к образованию водородной связи с Tyr108; 3) один или два отрицательно заряженных (или полярных) заместителя, расположенных на противоположных концах молекулы и способных образовать водородные связи с остатками из числа Arg13, Val35 и Gln51.

Заключение. Нами создана экономичная и эффективная система бактериальной экспрессии бестэговой рекомбинантной GSTP1 человека в клетках *E. coli*. Разработана несложная процедура выделения фермента из бактериального лизата с использованием глутатионсодержащих аффинных мембран. Впервые получены миллиграммовые количества очищенной GSTP1, что позволяет развернуть структурно-функциональное исследование ферментного белка. Высокий уровень экспрессии соответствует лучшим мировым показателям и, в отличие от зарубежных аналогов, позволяет нарабатывать очищенный фермент с нативной бестэговой структурой и высокой удель-

ной активностью (≥ 100 Ед/мг белка). В результате проведенных исследований *in silico* и *in vitro* выявлены структурные факторы и взаимодействия, определяющие эффективность ингибирования фермента карбо- и N-гетероциклическими лигандами. Получены новые научные данные о предпочтительной ориентации «хороших» ингибиторов в активном центре GSTP1. Обнаружены новые ингибиторы фермента: phedon, ARS и индигокармин с величиной IC_{50} соответственно 31, 16 и 2,3 мкМ. Найденные соединения, в особенности индигокармин, представляют интерес для создания новых лидерных структур с потенциальной противоопухолевой активностью. Результаты работы могут найти применение в научно-исследовательских лабораториях молекулярно-биологического и биохимического профиля. Очищенная GSTP1 также может использоваться как биоаналитический реагент в диагностических тест-системах для оценки токсичности различных ксенобиотиков.

Список использованных источников

1. Wu, B. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery / B. Wu, D. Dong // Trends Pharmacol. Sci. – 2012. – Vol. 33, N 12. – P. 656–668. https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.007

2. Калинина, Е. В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е. В. Калинина, Н. Н. Чернов, М. Д. Новичкова // Успехи биол. хим. – 2014. – Т. 54. – С. 299–348.

3. Townsend, D. M. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance / D. M. Townsend, K. D. Tew // Oncogene. – 2003. – Vol. 22, N 47. – P. 7369–7375. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940

4. The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site) / A. J. Oakley [et al.] // J. Mol. Biol. – 1999. – Vol. 291, N 4. – P. 913–926. https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3029

5. Mathew, N. Glutathione *S*-transferase (GST) inhibitors / N. Mathew, M. Kalyanasundaram, K. Balaraman // Expert Opin. Ther. Patents. – 2006. – Vol. 16, N 4. – P. 431–444. https://doi.org/10.1517/13543776.16.4.431

6. Glutathione transferases: substrates, inihibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases / N. Allocati [et al.] // Oncogenesis. – 2018. – Vol. 7, N 1. https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3

7. Mannervik, B. Glutathione Transferase (Human Placenta) / B. Mannervik, C. Guthenberg // Methods Enzymol. – 1981. – Vol. 77. – P. 231–235. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77030-7

8. Awasthi, Y. C. Purification and characterization of a new form of glutathione S-transferase from human erythrocytes / Y. C. Awasthi, S. V. Singh // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – Vol. 125, N 3. – P. 1053–1060. https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)91390-1

9. Гилевич, С. Н. Получение высокоактивной глутатион-S-трансферазы P1-1 из эритроцитов человека с помощью аффинных мембран и свойства очищенного фермента / С. Н. Гилевич, Ю. В. Бречко, К. Ю. Рипинская // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2017. – № 2. – С. 66–79.

10. Chang, M. Expression and purification of hexahistidine-tagged human glutathione S-transferase P1-1 in *Escherichia coli* / M. Chang, J. L. Bolton, S. Y. Blond // Protein Expr. Purif. – 1999. – Vol. 17, N 3. – P. 443–448. https://doi.org/10.1006/prep.1999.1149

11. Wu, Y. Expression, purification and functional analysis of hexahistidine-tagged human glutathione S-transferase P1-1 and its cysteinyl mutants / Y. Wu, J. Shen, Z. Yin // Protein J. – 2007. – Vol. 26, N 6. – P. 359–370. https://doi.org/10.1007/s10930-006-9043-2

12. High-level bacterial expression of human glutathione transferase P1-1 encoded by semisynthetic DNA / R. H. Kolm [et al.] // Protein Expr. Purif. – 1995. – Vol. 6, N 3. – P. 265–271. https://doi.org/10.1006/prep.1995.1034

13. Battistoni, A. Cytoplasmic and periplasmic production of human placental glutathione transferase in *Escherichia coli* / A. Battistoni [et al.] // Protein Expr. Purif. – 1995. – Vol. 6, N 5. – P. 579–587. https://doi.org/10.1006/prep.1995.1076

14. Denisova, A. S. Synthesis of bifunctional ligands based on azaheterocycles and fragments of 12-crown-4 / A. S. Denisova [et al.] // Russ. J. Org. Chem. – 2005. – Vol. 41, N 11. – P. 1690–1693. https://doi.org/10.1007/s11178-006-0020-1

15. Kleineweischede, A. Synthesis of amino- and bis(bromomethyl)-substituted bi- and tetradentate N-heteroaromatic ligands: building blocks for pyrazino-functionalized fullerene dyads / A. Kleineweischede, J. Mattay // Eur. J. Org. Chem. – 2006. – Vol. 2006, N 4. – P. 947–957. https://doi.org/10.1002/ejoc.200500548

16. On the synthesis of pyrazino[2,3-b]phenazine and 1H-imidazo[4,5-b]phenazine derivatives / A. M. Amer [et al.] // Monatsh. Chem. – 1999. – Vol. 130, N 10. – P. 1217–1225. https://doi.org/10.1007/PL00010183

17. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy / T. E. Witzig [et al.] // Clin. Cancer Res. – 2002. – Vol. 8, N 5. – P. 1085–1091.

18. Homo sapiens full open reading frame cDNA clone RZPDo834C083D for gene GSTP1, glutathione S-transferase pi; complete cds; without stopcodon [Electronic resource] // The National Center for Biotechnology Information. – 2016. – Mode of access: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/47496668. – Date of access: 19.04.2017.

19. Sanger, F. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors / F. Sanger, S. Nicklen, A. R. Coulson // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – Vol. 74, N 12. – P. 5463–5467. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463

20. Design, expression, and purification of a Flaviviridae polymerase using a high-throughput approach to facilitate crystal structure determination / K. H. Choi [et al.] // Protein Sci. – 2004. – Vol. 13, N 10. – P. 2585–2692. https://doi.org/10.1110/ps.04872204

21. Gateway recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames ORFeomes / A. J. Walhout [et al.] // Methods Enzymol. – 2000. – Vol. 328 – P. 575–592. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)28419-x

22. Engebrecht, J. Minipreps of plasmid DNA / J. Engebrecht, R. Brent, M. A. Kaderbhai // Current protocols of molecular biology / eds. F. M. Ausubel [et al.]. – Wiley, 2003. – Ch. 1.6. – P. 1.6.1.–1.6.2. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0106s15

23. Motulsky, H. Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting / H. Motulsky, A. Christopoulos. Oxford: Oxford University Press, 2004. – 351 p.

24. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite / S. Forli [et al.] // Nat. Protocols. – 2016. – V. 11, N 5. – P.905–919. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051

25. 6GSS. Human glutathione s-transferase p1-1, complex with glutathione [Electronic resource] // RCSB Protein Data Bank. – Mode of access: https://www.rcsb.org/structure/6gss. – Date of access: 14.10.2016.

26. PubChem Compound Database [Electronic resource]. – Mode of access: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. – Date of access: 28.01.2020.

27. Pedretti, A. VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. / A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli // J. Mol. Graph. Model. – 2002. – Vol. 21, N 1. – P. 47–49. https://doi.org/10.1016/s1093-3263(02)00123-7

28. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis / E. F. Pettersen [et al.] // J. Comput. Chem. – 2004. – Vol. 25, N 13. – P. 1605–1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084

29. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

30. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. – 1976. – Vol. 72, N 1–2. – P. 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

31. Shotgun analysis of membrane proteomes using a novel combinative strategy of solution-based sample preparation coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Y. Lin [et al.] // J. Chromatogr. B. – 2012. – Vol. 901, N 1. – P. 18–24. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.035

32. GSTP1 mRNA expression in human circulating blood leukocytes is associated with GSTP1 genetic polymorphism / E. Reszka [et al.] // Clin. Biochem. – 2011. – Vol. 44, N 13. – P. 1153–1155. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.05.024

33. pTXB1 vector [Electronic resource] // BioLabs. – Mode of access: https://international.neb.com/products/n6707-ptxb1-vector#Protocols, Manuals & Usage. – Date of access: 28.01.2018.

34. Glutathione S-transferase P1: gene sequence variation and functional genomic studies / A. M. Moyer [et al.] // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68, N 12. – P. 4791–4801. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6724

35. Structure and function of the xenobiotic substrate-binding site and location of a potential non-substrate-binding site in a class π glutathione S-transferase / X. Ji [et al.] // Biochemistry – 1997. – Vol. 36, N 32. – P. 9690–9702. https://doi.org/10.1021/bi970805s.

36. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C. A. Lipinski [et al.] // Adv. Drug Deliv. Rev. – 1997. – Vol. 23, N 1–3. – P. 3–25. https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0

37. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates / D. F. Veber [et al.] // J. Med. Chem. – 2002. – Vol. 45, N 12. – P. 2615–2623. https://doi.org/10.1021/jm020017n

38. Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells / J. J. van Zanden [et al.] // Biochem. Pharmacol. – 2004. – Vol. 67, N 8. – P. 1607–1617. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.12.032

39. FDA-approved drugs and other compounds tested as inhibitors of human glutathione transferase P1-1 / Y. Musdal [et al.] // Chem. Biol. Interact. – 2013. – Vol. 205, N 1 – P. 53–62. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.06.003

40. Zhang, X. Fluorometric method for the microdetermination of protein using indigo carmine / X. Zhang, F. Zhao, K. Li // Microchem. J. – 2001. – Vol. 68, N 1. – P. 53–59. https://doi.org/10.1016/S0026-265X(00)00177-6

References

1. Wu B., Dong D. Human cytosolic glutathione transferases: structure, function, and drug discovery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2012, vol. 33, no. 12, pp. 656–668. http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.007

2. Kalinina E. V., Chernov N. N., Novichkova M. D. Role of glutathione, glutathione reductase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochemistry (Moscow)*, 2014, vol. 79, no. 13, pp. 1562–1583. https://doi.org/10.1134/s0006297914130082

3. Townsend D. M., Tew K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 2003, vol. 22, no. 47, pp. 7369–7375. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940

4. Oakley A. J., Lo Bello M., Nuccetelli M., Mazzetti A. P., Parker M. W. The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). *Journal of Molecular Biology*, 1999, vol. 291, no. 4, pp. 913–926. https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3029

5. Mathew N., Kalyanasundaram M., Balaraman K. Glutathione *S*-transferase (GST) inhibitors. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 2006, vol. 16, no. 4, pp. 431–444. https://doi.org/10.1517/13543776.16.4.431

6. Allocati N., Masulli M., Di Ilio C., Federici L. Glutathione transferases: substrates, inihibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 2018, vol. 7, article no. 8. https://doi.org/1038/s41389-017-0025-3

7. Mannervik B., Guthenberg C. Glutathione Transferase (Human Placenta). *Methods Enzymology*, 1981, vol. 77, pp. 231–235. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)77030-7

8. Awasthi Y. C., Singh S. V. Purification and characterization of a new form of glutathione S-transferase from human erythrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1984, vol. 125, no. 3, pp. 1053–1060. https://doi.org/10.1016/0006-291x(84)91390-1

9. Gilevich S. N., Brechka Yu. V., Ripinskaya K. Yu. Preparation of highly active human erythrocyte glutathione-S-transferase P1-1 using affinity membranes, and properties of the purified enzyme. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2017, no. 2, pp. 66–79 (in Russian).

10. Chang M., Bolton J. L., Blond S. Y. Expression and purification of hexahistidine-tagged human glutathione S-transferase P1-1 in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 1999, vol. 17, no. 3, pp. 443–448. https://doi.org/10.1006/prep.1999.1149

11. Wu Y., Shen J., Yin Z. Expression, purification and functional analysis of hexahistidine-tagged human glutathione S-transferase P1-1 and its cysteinyl mutants. *Protein Journal*, 2007, vol. 26, no. 6, pp. 359–370. https://doi.org/10.1007/s10930-006-9043-2

12. Kolm R. H., Stenberg G., Widersten M., Mannervik B. High-level bacterial expression of human glutathione transferase P1-1 encoded by semisynthetic DNA. *Protein Expression and Purification*, 1995, vol. 6, no. 3, pp. 265–271. https://doi.org/10.1006/prep.1995.1034

13. Battistoni A., Mazzetti A. P., Petruzzelli R., Muramatsu M., Federici G., Ricci G., Lo Bello M. Cytoplasmic and periplasmic production of human placental glutathione transferase in *Escherichia coli. Protein Expression and Purification*, 1995, vol. 6, no. 5, pp. 579–587. https://doi.org/10.1006/prep.1995.1076

14. Denisova A. S., Degtyareva M. B., Dem'yanchuk E. M., Simanova A. A. Synthesis of bifunctional ligands based on azaheterocycles and fragments of 12-crown-4. *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2005, vol. 41, no. 11, pp. 1690–1693. https://doi.org/10.1007/s11178-006-0020-1

15. Kleineweischede A., Mattay J. Synthesis of amino- and bis(bromomethyl)-substituted bi- and tetradentate N-heteroaromatic ligands: building blocks for pyrazino-functionalized fullerene dyads. *European Journal of Organic Chemistry*, 2006, vol. 2006, no. 4, pp. 947–957. https://doi.org/10.1002/ejoc.200500548

16. Amer A. M., El-Bahnasawi A. A., Mahran M. R. H., Lapib M. On the synthesis of pyrazino[2,3-b]phenazine and 1H-imidazo[4,5-b]phenazine derivatives. *Chemical Monthly*, 1999, vol. 130, no. 10, pp. 1217–1225. https://doi.org/10.1007/PL00010183

17. Witzig T. E., Bossy B., Kimlinger T., Roche P. C., Ingle J. N. et al. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clinical Cancer Research*, 2002, vol. 8, no. 5, pp. 1085–1091.

18. Homo sapiens full open reading frame cDNA clone RZPDo834C083D for gene GSTP1, glutathione S-transferase pi; complete cds; without stopcodon. *The National Center for Biotechnology Information*. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/47496668 (accessed 19 April 2017).

19. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463

20. Choi K. H., Groarke J. M., Young D. C., Rossmann M. G., Pevear D. C. et al. Design, expression, and purification of a Flaviviridae polymerase using a high-throughput approach to facilitate crystal structure determination. *Protein Science*, 2004, vol. 13, no. 10, pp. 2585–2692. https://doi.org/10.1110/ps.04872204

21. Walhout A. J., Temple G. F., Brasch M. A., Hartley J. L., Lorson M. A. et al. Gateway recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames ORFeomes. *Methods in Enzymology*, 2000, vol. 328, pp. 575–592. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)28419-x

22. Engebrecht J., Brent R., Kaderbhai M. A. Minipreps of plasmid DNA. Ausubel F. M. (ed.) [et al.] *Current protocols of molecular biology*. Wiley, 2003, ch. 1.6, pp. 1.6.1.–1.6.2. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0106s15

23. Motulsky H., Christopoulos A. *Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: a practical guide to curve fitting*. Oxford University Press, 2004. 351 pp.

24. Forli S., Huey R., Pique M. E., Sanner M. F., Goodsell D. S. et al. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, 2016, vol. 11, no. 5, pp. 905–919. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051

25. 6GSS. Human glutathione s-transferase p1-1, complex with glutathione. *RCSB Protein Data Bank*. Available at: https://www.rcsb.org/structure/6gss (accessed 14 October 2016).

26. *PubChem Compound Database*. Available at: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov (accessed 28 January 2020).

27. Pedretti A., Villa L., Vistoli G. VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2002, vol. 21, no. 1, pp. 47–49. https://doi.org/10.1016/s1093-3263(02)00123-7

28. Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., Greenblatt D. M. et al. UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 2004, vol. 25, no. 13, pp. 1605–1612. https://doi.org/10.1002/jcc.20084

29. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

30. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 1976, vol. 72, no. 1–2, pp. 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

31. Lin Y., Liu H., Liu Z., Wang X., Liang S. Shotgun analysis of membrane proteomes using a novel combinative strategy of solution-based sample preparation coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2012, vol. 901, no. 1, pp. 18–24. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.035

32. Reszka E., Jabłonowski Z., Wieczorek E., Gromadzińska J., Sosnowski M. et al. GSTP1 mRNA expression in human circulating blood leukocytes is associated with GSTP1 genetic polymorphism. *Clinical Biochemistry*, 2011, vol. 44, no. 13, pp. 1153–1155. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.05.024

33. pTXB1 vector. *BioLabs*. Available at: https://international.neb.com/products/n6707-ptxb1-vector#Protocols, Manuals & Usage (accessed 28 October 2018).

34. Moyer A. M., Salavaggione O. E., Wu T.-Y., Moon I., Eckloff B. W. et al. Glutathione S-transferase P1: gene sequence variation and functional genomic studies. *Cancer Research*, 2008, vol. 68, no. 12, pp. 4791–4801. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6724

35. Ji X., Tordova M., O'Donnell R., Parsons J. F., Hayden J. B. et al. Structure and function of the xenobiotic substrate-binding site and location of a potential non-substrate-binding site in a class π glutathione S-transferase. *Biochemistry*, 1997, vol. 36, no. 32, pp. 9690–9702. https://doi.org/10.1021/bi970805s

36. Lipinski C. A., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, vol. 23, no. 1–3, pp. 3–25. https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0

37. Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H.-Y., Smith B. R, Ward K. W. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, vol. 45, no. 12, pp. 2615–2623. https://doi.org/10.1021/jm020017n

38. van Zanden J. J., Geraets L., Wortelboer H. M., van Bladeren P. J., Rietjens I. M. et al. Structural requirements for the flavonoid-mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology*, 2004, vol. 67, no. 8, pp. 1607–1617.https://doi.org/10.1016/j.bcp.2003.12.032

39. Musdal Y., Hegazy Y. M., Aksoy Y., Mannervik B. FDA-approved drugs and other compounds tested as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. *Chemico-Biological Interactions*, 2013, vol. 205, no. 1, pp. 53–62. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.06.003

40. Zhang X., Zhao F., Li K. Fluorometric method for the microdetermination of protein using indigo carmine. *Microchemical Journal*, 2001, vol. 68, no. 1, pp. 53–59. https://doi.org/10.1016/S0026-265X(00)00177-6

Информация об авторах

Гилевич Сергей Нилович – канд. хим. наук, вед. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: gilevich@iboch.by

Бречко Юлия Владимировна – мл. науч. сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. акад. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: julia-brechko@yandex.ru

Information about the authors

Syargey N. Gilevich – Ph. D. (Chemistry), Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, acad. Kuprevich str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: gilevich@iboch.by

Yuliya V. Brechka – Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, acad. Kuprevich str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: julia-brechko@yandex.ru

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 547.316 + 547.326 + 547.824 + 577.112 + 004.942
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-456-462

Поступила в редакцию 04.10.2021
Received 04.10.2021

И. В. Минеева[1], Я. В. Фалетров[1,2], В. А. Старовойтова[2], В. М. Шкуматов[1,2]

[1]Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
[2]Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ, Минск, Беларусь

СИНТЕЗ НОВЫХ ТИАЗОЛО[3,2-А]ПИРИМИДИНОВ И *IN SILICO* АНАЛИЗ ИХ БИОАКТИВНОСТИ

Аннотация. Разработан эффективный метод получения и синтезированы новые тиазоло[3,2-а]пиримидины, содержащие *н*-пентановый или *β*-гидроксициклопропановый, а также флуоресцирующий бензо[f]кумариновый заместители с выходами более 60 %. Компьютерными методами (*in silico*) показана способность полученных соединений проникать через липидный бислой и оценено их сродство к ряду протеинкиназ (соединения **4** и **6** связываются с протеинкиназой AKT1 с кодом PDB 3o96; величины, рассчитываемые программой Autodock Vina энергии связывания (E_{bind}), составили: -10,9 и -10,6 ккал/моль), ацетилхолинэстеразе и цитохромам Р450 человека (для цитохрома Р450 3А4, pdb 5vcd, E_{bind} -12,3 ккал/моль).

Ключевые слова: тиазоло[3,2-а]пиримидины, гидроксициклопропаны, бензо[f]кумарины, *in silico* анализ проницаемости мембран, докинг, протеинкиназа В, цитохромы Р450

Для цитирования. Синтез новых тиазоло[3,2-а]пиримидинов и *in silico* анализ их биоактивности / И. В. Минеева [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 456–462. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-456-462

I. V. Mineeva[1], Y. V. Faletrov[1,2], V. A. Starovoytova[2], V. M. Shkumatov[1,2]

[1]Belarusian State University, Minsk, Belarus
[2] Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Belarus

SYNTHESIS OF NEW THIAZOLO[3,2-A]PYRIMIDINE DERIVATIVES AND *IN SILICO* ANALYSIS OF THEIR BIOACTIVITY

Аннотация. An effective method of synthesis thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives was developed and the compounds with *n*-pentyl or *β*-acetoxycyclopropyl as well as fluorescent benzo[f]coumarin substituents were obtained with yields 60 % and more. Using computational (*in silico*) approaches we demonstrated the ability of the obtained compounds to permeate lipid bilayer as well as their affinity to some protein kinases (compounds **4** and **6** bind with a protein kinase AKT1 with PDB code 3o96; Autodock Vina-computed energy of binding (E_{bind}) values were -10.9 and -10.6 kcal/mol, respectively), acethylcholine esterase and some human cytochromes P450 (for P450 3A4, pdb 5vcd, E_{bind} -12.3 kcal/mol).

Keywords: thiazolo[3,2-a]pyrimidine, acetoxycyclopropyl, benzo[f]coumarin, *in silico* membrane permeability, docking, protein kinase, cytochromes P450

For citation. Mineeva I. V., Faletrov Y. V., Starovoytova V. A., Shkumatov V. M. Synthesis of new thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives and *in silico* analysis of their bioactivity. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 456–462 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-456-462

Введение. Традиционные методы получения тиазоло[3,2-а]пиримидинов из предшественников 3,4-дигидропиримидин-2(1Н)-тионов (продуктов мультикомпонентной реакции Биджинелли, обладающих различными видами биоактивности [1]) с 1,2-диалкилирующими реагентами, например с α-галогенированными кетонами или эфирами [2]. В современных зарубежных публикациях производные тиазоло[3,2-а]пиримидинов характеризуются наличием цитотоксичной активности против раковых клеток [3, 4]. Структурно близкие тиено[2,3-d]пиримидины и тиазоло[5,4-d]пиримидины описаны как потенциальные противораковые пероральные ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы [5]. Такие вещества также описаны как ингибиторы ацетилхолинэстеразы – потенциальные лекарства для лечения заболеваний периферической нервной системы (неврит, полиневрит, полиневропатия, полирадикулопатия), паралича, пареза и болезни Альцгеймера [6]. В литературе упоминается ряд белков-мишеней для производных 3,4-дигидропиримидин-2(1Н)-тионов и тиазоло[3,2-а]пиримидинов, среди которых протеинкиназа В [7], β-глюкуронидаза [8], микросомаль-

ная простагландин Е2-синтаза-1 [9], белки семейства Bcl-2 [10], фосфатаза 25-го цикла деления клеток [11], циклооксигеназа-2 [12], связанных с патогенезом раковых заболеваний, с гемагглютинин-нейраминидазой вируса болезни Ньюкасла [13], интегразой ВИЧ-1 [14], кальциевым каналом [15].

Цель работы – синтез новых производных тиазоло[3, 2-а]пиримидинов на основании 3,4-дигидропиримидин-2(1Н)-тионов **1–3** (рис. 1), а также в оценке биологических свойств полученных уникальных тиазоло[3, 2-а]пиримидинов **4–6** с использованием методов *in silico* (проницаемость через мембрану, докинга) в сравнении с некоторыми соединениями (рис. 2) [7–15].

Оригинальными аспектами *in silico* части данной работы является тестирование большого числа структур потенциальных белков-мишеней, выбранных на основе данных вышеприведенной литературы и вовлечение в расчеты структур цитохромов Р450 – гемсодержащих монооксигеназ, ответственных как за биосинтез важных биорегуляторов (например, стероидных гормонов, желчных кислот, эйкозаноидов), так и биодеградацию множества известных лекарств [16, 17]. Такие расчеты обычно не проводятся в аналогичных работах несмотря на важность интеракций позиционирующихся как потенциальные лекарства веществ с Р450. Аналогично обстоит дело с оценкой проницаемости через мембрану. Также присутствующие в структурах **4–6** циклопропановые фрагменты при окислении Р450 могут генерировать электрофильные метаболиты [18]. Способность бензо[f]кумаринов флуоресцировать и собственные биологические свойства придают дополнительный интерес для их биологических исследований [19]. Для синтеза тиазоло[3,2-а]пиримидинов **4–6** по реакции Ганча осуществлялось кипячение в уксусной кислоте 3,4-дигидропиримидин-2(1Н)-тионов **1–3** и 3-(2-бромацетил)бензо[f]кумарина (**7**), что позволило получить соединения **4–6** с умеренными выходами в 60–65 % (рис. 1).

Чтобы оценить биологические свойства **4–6** была проведена *in silico* оценка проникновения исследуемых веществ в клетку по механизму пассивной диффузии через липидный бислой при помощи сервиса PerMM (Permeability of Molecules across Membranes) [20], который позволяет на основании 3D структуры исследуемой молекулы предсказать проницаемость мембраны для пассивной диффузии этой молекулы. Основные результаты данного теста приведены в табл. 1.

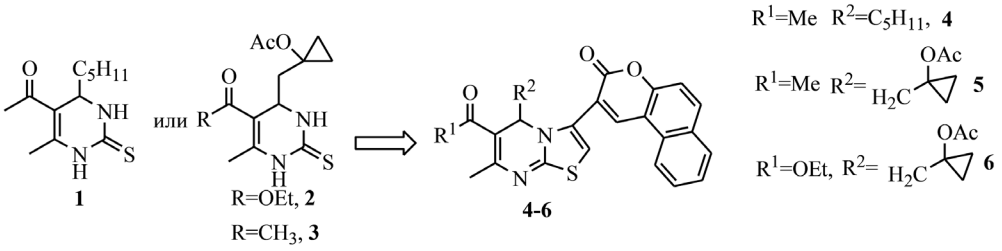


Рис. 1. Схема химического синтеза производных тиазоло[3, 2-а]пиримидинов **4**–**6**, содержащих *н*-пентановый (или ацетоксициклопропановый) и бензо[f]кумариновый заместители

Fig. 1. Scheme of chemical synthesis of thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives **4**–**6**, bearing *n*-penthyl (or acethoxycyclopropyl) and benzo[f]coumarin substituents

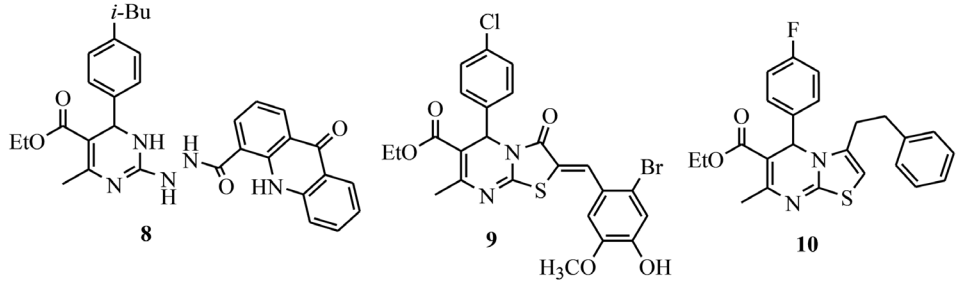


Рис. 2. Химические формулы соединений **8–10**, описанных в [7–15], выбранных для *in silico* сравнения биологических свойств оригинальных соединений **4**–**6**

Fig. 2. Chemical formulas of compounds **8**–**10** from [7–15] selected for *in silico* comparison of biological properties pf original compounds **4–6**

Таблица 1. **Теоретически рассчитанные значения свободной энергии связывания и логорифмов коэффициентов проницаемости различных мембран для соединений 4–6 и контрольных соединений 8–10 [7–15]**

Table 1. **Theoretically calculated values for free energy of binding with a membrane, Logs of permeability coefficients of different membranes for 4–6 and control compounds 8–10 [7–15]**

Соединение	Свободная энергия связывания, ккал/моль	Log коэффициента проницаемости (плазматическая мембрана)	Log коэффициента проницаемости (ГЭБ)*	Log коэффициента проницаемости (Caco-2)**
4	–7,37	2,20	–2,12	–2,92
5	–6,23	1,10	–2,51	–3,20
6	–6,09	0,94	–2,56	–3,24
8	–4,84	–2,38	–3,74	–4,09
9	–4,18	–3,20	–4,02	–4,30
10	–6,04	–0,28	–2,99	–3,55

* pH 7,35, T = 37 °C; значения Log$P$ > –4,35 для ГЭБ указывают на способность вещества к пассивному транспорту через соответствующие мембраны. ** Относительно мембраны клеток колоректальной аденокарциномы человека [20].

Логарифмы коэффициентов проницаемости для моделей трех различных мембран имеют значение, превышающее –4,35, следовательно, **4–6** даже превосходят по этим параметрам ранее описанные производные **8–10**, т. е. способны участвовать во внутриклеточных процессах [20].

Компьютерное моделирование белок-лигандных взаимодействий (молекулярный докинг) является современным подходом для предварительной оценки эффективности и пространственных особенностей взаимодействия низкомолекулярных соединений с белками. В результате проведенного докинга соединений **4–6** и **8–10** получено множество моделей комплексов белок–лиганд, которые характеризовались рассчитываемой программой Autodock Vina энергией связывания (E_{bind}) в диапазоне от –11,6 (**8** со структурой ацетилхолинэстеразы PDB с кодом 2ace) до –5,9 ккал/моль (**10** со структурой циклинзависимой киназы CDK2 с кодом PDB 2c6i). Данные по *in silico* взаимодействию с двумя структурами киназ показаны в табл. 2; для контрольных соединений **8–10** лучшее (меньшее) значение E_{bind} в случае CDK2 (PDB 1aq1) найдено для **8** и составило –9,4 ккал/моль, для структуры в случае AKT1 (PDB 3o96) оно также найдено для **8** и составило –11,4 ккал/моль.

Таблица 2. **Значения E_{bind} и аминокислотное окружение 4–6 в комплексах с киназами**

Table 2. **E_{bind} values and amino acids surrounding for 4–6 in complexes with kinases**

PDB Код белка	Номер соединения	Описание белка	E_{bind}, ккал/моль	Аминокислотное окружение лиганда в комплексе (0,4 нм)
1aq1	**4**	CDK2	–9,1	Gly11, Glu12, Ile10, Asp86, Leu83, Leu134, His84, Gln85, Ala31, Val18, Phe80, Glu81, Gln131, Asn132, Ala144, Asp145, Gly13
1aq1	**5**	CDK2	–7,2	Arg214, Arg217, Arg200, Ala201, Thr198, Val251, Lys250, Pro253, Thr218, Leu202, Phe203
1aq1	**6**	CDK2	–7,2	Arg217, Arg200, Ala201, Leu202, Arg214, Thr198, Val251, Lys250, Pro253, Thr218
3o96	**4**	AKT1	–10,9	Asn53, Ser56, Ala58, Trp80, Ser205, Lys268, Val201, Val270, Leu264, Asn199, Gln59, Leu78, Gln79
3o96	**5**	AKT1	–9,3	Asn199, Val201, Lys268, Trp80, Asn53, Val270, Leu264, Ser205, Gln59, Leu78
3o96	**6**	AKT1	–10,6	Asn53, Ala58, Trp80, Ser205, Lys268, Val201, Leu264, Val270, Asn199, Gln59, Leu78, Gln79

Отметим, что оригинальная структура **4** показала схожую аффинность, что указывает на перспективу его дальнейшего исследования. При моделировании взаимодействий соединений с ацетилхолинэстеразой были получены результаты, которые представлены в табл. 3.

Для контрольных соединений **8–10** лучшее (меньшее) значение E_{bind} в случае данной структуры AChE найдено для **8** и составило –11,3 ккал/моль. Отметим, что оригинальная структура показала схожую аффинность, что указывает на перспективу его дальнейшего исследования.

При моделировании взаимодействия цитохромов P450 человека с соединением **4**, которое показало лучшую аффинность к киназе AKT1 и ацетилхолинэстеразе, определены взаимодействия,

Таблица 3. **Значения E_{bind} и аминокислотное окружение 4–6 в смоделированных комплексах с ацетилхолинэстеразой (AChE)**

Table 3. **E_{bind} values and amino acids surrounding for 4–6 in modeled complexes with acethylcholine esterase (AChE)**

PDB Код белка	Номер соединения	Описание белка	E_{bind}, ккал/моль	Аминокислотное окружение лиганда в комплексе (0,4 нм)
1h22	**4**	AchE	–11,1	Tyr121, Gly118, Ser122, Trp84, Asp72, Phe330, Tyr334, Phe331, Trp279, His440, Gly441, Glu199, Ser200
1h22	**5**	AchE	–7,8	Asn525, His406, Asn230, Pro403, Pro232, Ser235, Ile296, Leu305, Glu306, Pro529, His362, His398
1h22	**6**	AchE	–8,3	Leu305, Glu306, Trp524, Pro529, Asn230, His398, Asn525, His362, Leu532, Pro232, Ser235

Таблица 4. **Значения E_{bind} и аминокислотное окружение 4 в смоделированных комплексах с цитохромами Р450 человека**

Table 4. **E_{bind} values and amino acids surrounding for 4 in modeled complexes with human P450**

PDB Код белка	Номер соединения	Описание белка	E_{bind}, ккал/моль	Аминокислотное окружение лиганда в комплексе (0,4 нм)
5vcd	**4**	CYP3A4	–12,3	Arg212, Arg105, Ser119, *HEM601*, Arg106, Phe108, Glu374, Phe215, Thr224, Phe220, Phe213, Phe304
6ma7	**4**	CYP3A4	–11,8	*HEM601*, Arg105, Ala370, Arg372, Phe215, Phe57, Phe108, Phe304, Arg212, Thr309
6bcz	**4**	CYP3A4	–11,7	Arg212, *HEM601*, Arg105, Arg372, Leu373, Glu374, Ala370, Phe57, Phe215, Arg106, Phe108, Phe304
6bd6	**4**	CYP3A4	–11,6	Arg212, *HEM601*, Arg105, Arg372, Leu373, Glu374, Ala370, Arg106, Phe215, Phe57, Pro107, Phe108
5vcc	**4**	CYP3A4	–11,6	Arg212, Arg105, Ser119, *HEM601*, Arg106, Phe108, Glu374, Phe215, Thr224, Phe220, Phe213, Phe304
4dvq	**4**	CYP11B2	–11,1	Phe381, *HEM601*, Gly379, Phe130, Leu382, Thr318, Trp116, Glu310, Gly314, Phe231, Trp260, Ala313
4zgx	**4**	CYP11B2	–10,8	Phe130, Phe381, *HEM601*, Arg110, Leu382, Glu383, Gly379, Val378, Ile488, Phe231, Phe487, Trp116

характеризующиеся $E_{bind\ =}$ от –12,3 до –5,7 ккал/моль (структура Р450 2B6 (Y226H/K262R) с кодом 3qu8. Наилучшие по величинам E_{bind} пять интеракций представлены в табл. 4.

Из полученных данных видно, что наиболее аффинные взаимодействия реализовались в случае структур метаболизирующего лекарства цитохрома Р450 печени, CYP3A4 (табл. 4, строки 1–4). Соответственно это следует учитывать при биологическом тестировании данного соединения. Наиболее аффинные взаимодействия получены для альдостеронсинтазы CYP11B2.

Материалы и оборудование. Использованные в ходе работы реактивы и растворители имели квалификацию «ч.» и «ч. д. а.». Оценку индивидуальности синтезируемых веществ и наблюдение за ходом проводимых реакций осуществляли методом ТСХ на пластинках «Sorbfil». В качестве элюента использованы смеси растворителей – петролейный эфир и этилацетат в различных соотношениях. Выделение индивидуальных веществ осуществляли методом колоночной хроматографии на силикагеле (70–230 меш) производства фирмы Merck с использованием в качестве элюентов смесей тех же растворителей. Спектры ^{1}H ЯМР 5–10 % растворов синтезированных соединений в дейтерохлороформе ($CDCl_3$) были получены на приборе Bruker Avance – 500 (Германия) с рабочей частотой 500 МГц. Химические сдвиги измеряли по шкале δ сигнала остаточных протонов дейтерохлороформа (δ = 7,26 м.д.). ИК спектры веществ записаны в пленке на спектрофотометре Bruker FT – IR Alpha (Германия).

Общая методика получения тиазолов 4–6. К раствору 1,0 ммоль 3,4-дигидропиримидин-2(1H)-тионов **1–3** добавляли 1,2 ммоль (0,38 г) 2-(бромацетил)-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-она (**7**) и кипятили 12 ч в 10 мл уксусной кислоты до полного завершения реакции. Кислоту нейтрализовывали 10 %-ным водным раствором аммиака, продукт реакции из водного слоя экстрагировали

EtOAc (3×15 мл), объединенные органические вытяжки сушили Na_2SO_4. После удаления растворителя при пониженном давлении, продукт выделяли колоночной хроматографией (элюент – смесь петролейного эфира и EtOAc).

2-(6-Ацетил-7-метил-5-пентил-5*H*-[1,3]тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-3-ил)-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-он (4). Выход 60 %. ИК спектр, ν, см$^{-1}$: 1609, 1558, 1458, 1444, 1316, 1237, 1180. Спектр ЯМР ^{1}H, δ, м.д.: 0,68 т [3H, $(CH_2)_4C\underline{H}_3$, *J* 7,1 Гц], 0,82–1,75 м [8H, $(C\underline{H}_2)_4CH_3$], 2,45 с (3H, CH_3C=), 2,46 с (3H, CH_3C=O), 5,53 т [1H, $C\underline{H}(CH_2)_4CH_3$, *J* 5,8 Гц], 6,82 с (1H, =CHS), 7,38 д (1H, Ph, *J* 7,8 Гц), 7,54 д (1H, Ph, *J* 8,9 Гц), 7,59–7,87 м (2H, Ph), 7,98 д (1H, Ph, *J* 8,2 Гц), 8,11 д (1H, Ph, *J* 9,1 Гц), 8,30 д (1H, Ph, *J* 8,2 Гц), 8,53 с (1H, C=CH). Найдено, %: C 67,51; H 8,68. $C_{27}H_{26}N_2O_3S$. Вычислено, %: C 70,72; H 5,71.

1-{[6-Ацетил-7-метил-3-(3-оксо-3*H*-бензо[*f*]хромен-2-ил)-5*H*-[1,3]тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-5-ил]метил}циклопропил ацетат (5). Выход 65 %. ИК спектр, ν, см$^{-1}$: 1749, 1684, 1652, 1541, 1521, 1223, 1067. Спектр ЯМР ^{1}H, δ, м.д.: 0,13–0,18 м (1H, $CH_{2\text{циклопроп}}$), 0,46–0,51 м (1H, $CH_{2\text{циклопроп}}$), 0,56–0,61 м (1H, $CH_{2\text{циклопроп}}$), 0,68–0,73 м (1H, $CH_{2\text{циклопроп}}$), 1,92–2,11 м (2H, $CHC\underline{H}_2C$), 2,44 с (3H, CH_3C=), 2,45 с (3H, CH_3C=O), 2,47 с [3H, CH_3C(=O)O], 2,19–2,36 м (2H, $CHC\underline{H}_2C$), 5,80 д.д (1H, $C\underline{H}CH_2C$, J_1 8,6 Гц, J_2 3,7 Гц), 7,02 с (1H, =CHS), 7,52 д (1H, Ph, *J* 9,0 Гц), 7,64 т (1H, Ph, *J* 7,5 Гц), 7,80 т (1H, Ph, *J* 7,7 Гц), 7,96 д (1H, Ph, *J* 8,1 Гц), 8,09 д (1H, Ph, *J* 9,0 Гц), 8,34 (1H, Ph, *J* 8,5 Гц), 8,50 с (1H, C=CH). Найдено, %: C 67,51; H 8,68. $C_{28}H_{24}N_2O_5S$. Вычислено, %: C 67,18; H 4,83.

Этил 5-{[1-(ацетилокси)циклопропил]метил}-7-метил-3-(3-оксо-3*H*-бензо[*f*]хромен-2-ил)-5*H*-[1,3]тиазоло[3,2-*a*]пиримидин-6-карбоксилат (6). Выход 69 %. ИК спектр, ν, см$^{-1}$: 1714, 1591, 1488, 1258, 1217, 1101. Спектр ЯМР ^{1}H, δ, м.д.: 0,09–0,14 м (1H, $CH_{2\text{циклопроп}}$), 0,49–0,54 м (1H, $CH_{2\text{циклопроп}}$), 0,63 д.д.д (1H, $CH_{2\text{циклопроп}}$, J_1 13,7 Гц, J_2 12,0 Гц, J_3 6,9 Гц), 0,74–0,79 м (1H, $CH_{2\text{циклопроп}}$), 1,11 т (3H, $C\underline{H}_3CH_2O$, *J* 7,0 Гц), 1,16–1,72 м (2H, $CHC\underline{H}_2C$), 2,49 с (6H, CH_3C=O, CH_3C=), 4,07–4,26 м (2H, $CH_3C\underline{H}_2O$), 5,62–5,68 м (1H, $C\underline{H}CH_2C$), 7,09 с (1H, =CHS), 7,51 д (1H, Ph, *J* 9,0 Гц), 7,57–7,83 м (2H, Ph), 7,96 д (1H, Ph, *J* 8,0 Гц), 8,10 д (1H, Ph, *J* 10,5 Гц), 8,29 д (1H, Ph, *J* 8.5 Гц), 8,50 с (1H, C=CH). Найдено, %: C 67,51; H 8,68. $C_{29}H_{26}N_2O_6S$. Вычислено, %: C 65,65; H 4,94.

Расчеты и анализ результатов поведены с использованием программного пакета AutoDockTools 1.5.6 и программы Autodock Vina, используя параметры тщательности (exhaustiveness) и число моделей (number of models), равными 12 и 5 соответственно. Из интернет-ресурса Protein Data Bank (PDB, https://www.rcsb.org/) для докинга были отобраны структуры киназ (3O96, 3MVH, 2C5Y, 2C6Y, 1A9U, 1AQ1, 3CQU, 4GV1), ацетилхолинэстеразы (1H22, 2ACE, 1B41) и цитохромов P450 человека (180 структур). Для подготовки структур лигандов использовали программный комплекс ChemBioDraw и молекулярный редактор Avogadro для генерации 3D-структур, MGL Tools для преобразования формата лигандов и анализа результатов. Эффективность связывания оценивали по автометически рассчитываемому программой Autodock Vina параметру энергии взаимодействия (docking score, binding energy, E_{bind}) как параметр аффинности взаимодействия. Расчеты проводились для *R*-изомеров соединений **4**–**6**. В тексте приведены данные только для лучших взаимодействий среди белков одного типа. Анализ проницаемости соединений через фосфолипидные мембраны *in silico* был проведен согласно [20].

Заключение. Выполнен синтез уникальных гетероциклических соединений, одновременно содержащих фрагменты тиазола, пиримидина, циклопропанола и флуоресцентного бензо[f]кумарина с умеренным выходом. Компьютерными методами (*in silico*) показана способность полученных соединений проникать через липидный бислой. Методом молекулярного докинга показано, что соединения **4** и **6** связываются с протеинкиназой AKT1 (код PDB 3o96) с величинами, рассчитываемой программой Autodock Vina, энергии связывания –10,9 и –10,6 ккал/моль соответственно. Оценено *in silico* сродство ацетилхолинэстеразе и цитохромам P450 человека, что выгодно отличает данное исследование от аналогичных, тестирующих соединение только к желаемым белкам-мишеням. В целом использование методов *in silico* для прогноза биологической активности веществ предоставляет уникальные возможности для научной кооперации ученых с целью выбора наиболее перспективных направлений синтеза и применения новых и ранее полученных соединений.

Благодарности. Расчетно-теоретическая часть работы выполнена при поддержке задания Государственной программы научных исследований № г.р. 20210560.

Acknowledgements. Theoretical calculations work was supported by SPSR grant № 20210560.

Список использованных источников

1. Recent synthetic and medicinal perspectives of dihydropyrimidinones: a review / R. Kaur [et al.] // Eur. J. Med. Chem. – 2017. – Vol. 132. – P. 108–134. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.025

2. One-pot synthesis of 1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-2(1*H*)-thione derivatives and their biological activity / M. A. I. Salem [et al.] // J. Heterocyclic Chem.– 2016. – Vol. 53, N 2. – P. 545–557. https://doi.org/10.1002/jhet.2358

3. One-pot synthesis of thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives, their cytotoxic evaluation and molecular docking studies / T. Sekhar [et al.] // Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. – 2020. – Vol. 231. – P. 118056. https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118056

4. Synthesis and antitumor activity of isolongifoleno[7,8-d]thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives via enhancing ROS level / C. Ma [et al.] // Chem. Biol. Drug Des. – 2019. – Vol. 94. – P. 1457–1466. https://doi.org/10.1111/cbdd.13522

5. Discovery of new thieno[2,3-d]pyrimidine and thiazolo[5,4-d]pyrimidine derivatives as orally active phosphoinositide 3-kinase inhibitors / Y. Sun [et al.] // Bioorg. Med. Chem. – 2021. – Vol. 29. – P. 115890. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115890

6. Synthesis, crystal Ssructure, and biological evaluation of fused thiazolo[3,2-a]pyrimidines as new acetylcholinesterase inhibitors / M. Y. Mahgoub[et al.] // Molecules. – 2019. – Vol. 24, N 12. – P. 2306. https://doi.org/10.3390/molecules24122306

7. Acridone-pyrimidine hybrids- design, synthesis, cytotoxicity studies in resistant and sensitive cancer cells and molecular docking studies / M. Murahari [et al.] // Eur. J. Med. Chem. – 2017. – Vol. 139. – P. 961–981. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.023

8. Acetylcholinesterase inhibitors: structure based design, synthesis, pharmacophore modeling and virtual screening / K. R. Valasani [et al.] // J. Chem. Inf. Mod. – 2013.– Vol. 53, N 8. – P. –2033–2046. https://doi.org/10.1021/ci400196z

9. Dihydropyrimidones: as novel class of β-glucuronidase inhibitors / F. Ali [et al.] // Bioorg. Med. Chem. – 2016. – Vol. 24, N 16. – P. 3624–3635. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.06.002

10. Exploration of the dihydropyrimidine scaffold for the development of new potential anti-inflammatory agents blocking prostaglandin E2 synthase-1 enzyme (mPGES-1) / G. Lauroa [et al.] // Eur. J. Med. Chem. – 2014. – Vol. 80. – P. 407–415. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.061

11. Identification of substituted [3, 2-a] pyrimidines as selective antiviral agents: Molecular modeling study / K. R. Babu [et al.] // Antiviral Research. – 2012. – Vol. 95, N 2. – P. 118–127. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.05.010

12. Synthesis of dihydropyrimidine α, γ-diketobutanoic acid derivatives targeting HIV integrase / O. Sari [et al.] // Eur. J. Med. Chem. – 2015. – Vol. 104. – P. 127–138. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.09.015

13. Synthesis, molecular docking, and cardioprotective activity of 2-methylthio-1,4-dihydropyrimidines / R. L. Sawant [et al.] // Med. Chem. Res. – 2012. – Vol. 21, N 8. – P. 1825–1832. https://doi.org/10.1007/s00044-011-9700-7

14. Discovery and development of thiazolo[3,2-a]pyrimidinone derivatives as general inhibitors of Bcl-2 family proteins / B. Zhou [et al.] // Chem. Med. Chem. – 2011. – Vol. 6, N 5. – P. 904–921. https://doi.org/10.1002/cmdc.201000484

15. Development of novel thiazolopyrimidines as CDC25B phosphatase inhibitors / S. Kolb [et al.] // Chem. Med. Chem. – 2009. – Vol. 4, N 4. – P .633–648. https://doi.org/10.1002/cmdc.200800415

16. A new insight into subinteractomes of functional antagonists: thromboxane (CYP5A1) and prostacyclin (CYP8A1) synthases / P. V. Ershov[et al.] // Cell Biol. Int. – 2021.– Vol. 45, N 6. – P.1175–1182. https://doi.org/10.1002/cbin.11564

17. От структуры и функции ферментов биосинтеза стероидов к новым генно-инженерным технологиям / Л. А. Новикова [и др.] // Успехи биол. химии. – 2009. – Т. 49.–Р. 159–208.

18. Bioactivation of cyclopropyl rings by P450: an observation encountered during the optimisation of a series of hepatitis C virus NS5B inhibitors / X. Zhuo [et al.] // Xenobiotica. – 2018. – Vol. 48, N 12. – P. 1215–1226. https://doi.org/10.1080/00498254.2017.1409915

19. Recent progress in the drug development of coumarin derivatives as potent antituberculosis agents / R. S. Keri [et al.] // Eur. J. Med. Chem.– 2015. – Vol. 100. – P.257–269. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.017

20. Lomize, A. L. Anisotropic solvent model of the lipid bilayer. 2. Energetics of insertion of small molecules, peptides, and proteins in membranes / A. L. Lomize, I. D. Pogozheva, H. I. Mosberg// J. Chem. Inf. Mod. – 2011. – Vol. 51, N 4. – P. 930–946. https://doi.org/doi 10.1021/ci200020k

21. Ethyl 2-(benzylidene)-7-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-5H-thiazolo[3, 2-a]pyrimidine-6-carboxylate analogues as a new scaffold for protein kinase casein kinase 2 inhibitor / C.-H. Jin[et al.] // Bioorg. Med. Chem. – 2014. – Vol. 22, N 17. – P. 4553–4565. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.bmc.2014.07.037

References

1. Kaur R., Chaudhary S., Kumar K., Gupta M. K., Rawal R. K. Recent synthetic and medicinal perspectives of dihydropyrimidinones: a review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, vol. 132, pp. 108–134. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.025

2. Salem M. A. I., Marzouk M. I., Salem M. S., Alshibani G. A. One-pot synthesis of 1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-2(1*H*)-thione derivatives and their biological activity. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 2016, vol. 53, no. 2, pp. 545–557. https://doi.org/10.1002/jhet.2358

3. Sekhar T., Thriveni P., Venkateswarlu A., Daveedu T., Peddanna K., Sainath S. B. One-pot synthesis of thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives, their cytotoxic evaluation and molecular docking studies. *Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, vol. 231, pp. 118056. https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118056

4. Ma C., Wang Y., Dong F., Wang Z., Zhao Y., Shan Y., Gu W., Wang S. Synthesis and antitumor activity of isolongifoleno[7,8-d]thiazolo[3,2-a]pyrimidine derivatives via enhancing ROS level. *Chemical Biology and Drug Design*, 2019, vol. 94, pp. 1457–1466. https://doi.org/10.1111/cbdd.13522

5. Sun Y., Fu R., Lin S., Zhang J., Ji M., Zhang Y., Wu D., Zhang K., Tian H., Zhang M., Sheng L., Li Y., Jin J., Chen X., Xu H. Discovery of new thieno[2,3-d]pyrimidine and thiazolo[5,4-d]pyrimidine derivatives as orally active phosphoinositide 3-kinase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2021, vol. 29, pp. 115890. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115890

6. Mahgoub M. Y., Elmaghraby A. M., Harb A. A., Ferreira da Silva J. L., Justino G. C., Marques M. M. Synthesis, crystal Structure, and biological evaluation of fused thiazolo[3,2-a]pyrimidines as new acetylcholinesterase inhibitors. *Molecules*, 2019, vol. 24, no. 12, pp. 2306. https://doi.org/10.3390/molecules24122306

7. Murahari M., Prakash K. V., Peters G. J., Mayur Y. C. Acridone-pyrimidine hybrids-design, synthesis, cytotoxicity studies in resistant and sensitive cancer cells and molecular docking studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017, vol. 139, pp. 961–981. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.08.023

8. Valasani K. R., Chaney M. O., Day V. W, Yan S. S. Acetylcholinesterase inhibitors: structure based design, synthesis, pharmacophore modeling and virtual screening. *Journal of the Chemical Information and Modeling*, 2013, vol. 53, no. 8, pp. 2033–2046. https://doi.org/10.1021/ci400196z

9. Ali F., Khan K. M., Salar U., Iqbal S., Taha M., Ismail N. H., Perveen S., Wadood A., Ghufran M., Ali B. Dihydropyrimidones: as novel class of β-glucuronidase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2016, vol. 24, no. 16, pp. 3624–3635. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.06.002

10. Lauroa G., Strocchia M., Terracciano S., Bruno I., Fischer K., Pergola C., Werz O., Riccio R., Bifulco G. Exploration of the dihydropyrimidine scaffold for the development of new potential anti-inflammatory agents blocking prostaglandin E2 synthase-1 enzyme (mPGES-1). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, vol. 80, pp. 407–415. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.04.061

11. Babu K. R., Rao V. K., Kumar Y. N., Polireddy K., Subbaiah K. V., Bhaskar M., Lokanatha V., Raju C. N. Identification of substituted [3, 2-a] pyrimidines as selective antiviral agents: Molecular modeling study. *Antiviral Research,* 2012, vol. 95, no. 2, pp. 118–127. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.05.010

12. Sari O., Roy V., Metifiot M., Marchand C., Pommier Y., Bourg S., Bonnet P., Schinazi R. F., Agrofoglio L. A. Synthesis of dihydropyrimidine α, γ-diketobutanoic acid derivatives targeting HIV integrase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, vol. 104, pp. 127–138. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.09.015

13. Sawant R. L., Sarode V. I., Jadhav G. D., Wadekar J. B. Synthesis, molecular docking, and cardioprotective activity of 2-methylthio-1,4-dihydropyrimidines. *Medicinal Chemistry Research*, 2012, vol. 21, no. 8, pp. 1825–1832. https://doi.org/10.1007/s00044-011-9700-7

14. Zhou B., Li X., Li Y., Xu Y., Zhang Z., Zhou M., Zhang X., Liu Z., Zhou J., Cao C., Yu B., Wang R. Discovery and development of thiazolo[3,2-a]pyrimidinone derivatives as general inhibitors of Bcl-2 family proteins. *Chem. Med. Chem*., 2011, vol. 6, no. 5, pp. 904–921. https://doi.org/10.1002/cmdc.201000484

15. Kolb S., Mondesert O., Goddard M.-L., Jullien D., Villoutreix B. O., Ducommun B., Garbay C., Braud E. Development of novel thiazolopyrimidines as CDC25B phosphatase inhibitors. *Chem. Med. Chem*., 2009, vol. 4, no. 4, pp. 633–648. https://doi.org/10.1002/cmdc.200800415

16. Ershov P. V., Yablokov E., Zgoda V., Mezentsev Y., Gnedenko O., Kaluzhskiy L., Svirid A., Gilep A., Usanov S. A., Ivanov A. A new insight into subinteractomes of functional antagonists: thromboxane (CYP5A1) and prostacyclin (CYP8A1) synthases. *Cell Biology International*, 2021, vol. 45, no. 6, pp. 1175–1182. https://doi.org/10.1002/cbin.11564

17. Novikova L.A., Faletrov Y. V., Kovaleva I. E., Mauersberger S., Luzikov V. N., Shkumatov V. M. From the structure and function of steroid biosynthetic enzymes to new genetically engineered technologies. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii = Biological chemistry reviews*, 2009, vol. 49, pp. 159–208 (in Russian).

18. Zhuo X., Wang Y. Z., Yeung K. S., Zhu J., Huang X. S., Parcella K. E., Eastman K. J., Kadow J. F., Meanwell N. A., Shu Y. Z., Johnson B. M. Bioactivation of cyclopropyl rings by P450: an observation encountered during the optimisation of a series of hepatitis C virus NS5B inhibitors. *Xenobiotica*, 2018, vol. 48, no. 12, pp. 1215–1226. https://doi.org/10.1080/00498254.2017.1409915

19. Keri R. S., Sasidhar B. S., Nagaraja B. M., Santos M. A. Recent progress in the drug development of coumarin derivatives as potent antituberculosis agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, vol. 100, pp. 257–269. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.06.017

20. Lomize A. L., Pogozheva I. D., Mosberg H. I. Anisotropic solvent model of the lipid bilayer. 2. Energetics of insertion of small molecules, peptides, and proteins in membranes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011, vol. 51, no. 4, pp. 930–946. https://doi.org/ 10.1021/ci200020k

21. Jin C.-H., Jun K.-Y., Lee E., Kim S., Kwon Y., Kim K., Na Y. Ethyl 2-(benzylidene)-7-methyl-3-oxo-2,3-dihydro-5H-thiazolo[3, 2-a]pyrimidine-6-carboxylate analogues as a new scaffold for protein kinase casein kinase 2 inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2014, vol. 22, no. 17, pp. 4553–4565. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.bmc.2014.07.037

Информация об авторах

Минеева Ирина Владимировна – канд. хим. наук, доцент, докторант кафедры органической химии. Белорусский государственный университет (пр. Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: i.mineyeva@yandex.ru

Фалетров Ярослав Вячеславович – канд. хим. наук, доцент, докторант кафедры высокомолекулярных соединений, вед. науч. сотрудник. НИИ физико-химических проблем БГУ (ул. Ленинградская, 14, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: yaroslav82@tut.by

Старовойтова Виктория Александровна – стажер мл. науч. сотрудник. НИИ физико-химических проблем БГУ (ул. Ленинградская, 14, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vika.starovoytova.2000@mail.ru

Шкуматов Владимир Макарович – член-корреспондент, д-р биол. наук, профессор, зав. лаб. НИИ физико-химических проблем БГУ (ул. Ленинградская, 14, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vlad.shkumatov@tut.by

Information about the authors

Iryna V. Mineeva – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Doctoral Student of the Department of Organic Chemistry. Belarusian State University (4, Nezavisimosti ave., 220030, Minsk, Belarus). E-mail: i.mineyeva@yandex.ru

Yaroslav V. Faletrov – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Doctoral Student of the Department of Macromolecular Compounds, Leading Researcher. Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: yaroslav82@tut.by

Victoria A. Starovoytova – Research Assistant. Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vika.starovoytova.2000@mail.ru

Vladimir M. Shkumatov – Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, D. Sc. (Biology), Professor, Head of the Laboratory. Research Institute for Physical-Chemical Problems of the Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vlad.shkumatov@tut.by

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

ТЭХНІЧНАЯ ХІМІЯ І ХІМІЧНАЯ ТЭХНАЛОГІЯ

TECHNICAL CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING

УДК 666.616; 552.11
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-463-471

Поступила в редакцию 26.08.2021
Received 26.08.2021

С. Е. Баранцева[1], А. И. Позняк[2], Ю. А. Климош[1], И. М. Азаренко[1], Н. Н. Гундилович[1], А. В. Поспелов[1]

[1]Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь
[2]Университет Дуйсбург-Эссен, Дуйсбург, Германия

ТЕПЛОИЗОЛЯЦИОННЫЙ ПОРИСТЫЙ МАТЕРИАЛ НА ОСНОВЕ ГЛАУКОНИТСОДЕРЖАЩИХ ПЕСКОВ И АЛЕВРИТОВ НОВОДВОРСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

Аннотация. Приведены результаты исследования по получению теплоизоляционных пористых керамических материалов с использованием вскрышных пород Новодворского месторождения Пинского района Брестской области в качестве основного компонента сырьевых композиций и рекомендовано использование валовой породы, состоящей из глауконитовых песков и алевритов. В качестве дополнительных составляющих использованы легкоплавкая глина, базальт и порообразователь, рациональное сочетание которых обеспечивает формовочную способность керамических масс и необходимый комплекс физико-химических свойств материала. Установлена зависимость показателей насыпной плотности, коэффициента вспучивания, коэффициента теплопроводности от химико-минерального состава используемых пород и сырьевых композиций, что явилось критерием выбора составов с максимальным использованием вскрышной породы и необходимой пластичностью керамической массы, требуемой для осуществления процесса формования сырцовых гранул. Результаты исследования могут служить основанием для масштабного использования не только полезных ископаемых Новодворского месторождения (базальтов и туфов), но и попутных – глауконитсодержащих вскрышных пород, что внесет существенный вклад в расширение минерально-сырьевой базы Республики Беларусь.

Ключевые слова: глауконитсодержащие породы, пески, алевриты, алевролиты, теплоизоляционный материал, пористость, объемная плотность, коэффициент теплопроводности, термообработка

Для цитирования. Теплоизоляционный пористый материал на основе глауконитсодержащих песков и алевритов Новодворского месторождения Республики Беларусь / С. Е. Баранцева [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 463–471. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-463-471

S. E. Barantseva[1], A. I. Pazniak[2], Y. A. Klimosh[1], I. M. Azaranka[1], N. N. Hundzilovich[1], A. V. Pospelov[1]

[1]Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus
[2]University of Duisburg-Essen, Duisburg, Germany

HEAT-INSULATING POROUS MATERIAL BASED ON GLAUCONITE-CONTAINING SANDS AND ALEURITES OF THE NOVODVORSKOYE DEPOSIT OF THE REPUBLIC OF BELARUS

Abstract. The results on the research of heat-insulating porous ceramic materials produced using overburden rocks of the Novodvorsk deposit of Pinsk district of the Brest region as the main component of raw materials are presented in the study and the use of bulk rock consisting of glauconite sands and aleurites is recommended. Low-melting clay, basalt and a blowing agent are used as additional components, rational combination of which would ensure the forming ability of ceramic masses and the required set of the physicochemical properties of the material. The dependence of the bulk density, swelling coefficient, coefficient of thermal conductivity on the chemical and mineral composition of the used and raw materials is established, wich is the criteria for choosing composition with the maximum use of overburden and the necessary plasticity of the ceramic mass required for the molding process of raw granules. The obtained results can serve as a basis for the large-scale use of not only the minerals of the Novodvorsk deposit (basalts and tuffs), but also associated – glauconite-containing overburden. This will make a significant contribution to the expanding the mineral resource base of the Republic of Belarus.

Keywords: glauconite-containing rocks, sands, aleurites, aleurolites, heat-insulating material, porosity, bulk density, coefficient of thermal conductivity, heat treatment

For citation. Barantseva S. E., Pazniak A. I., Klimosh Y. A., Azaranka I. M., Hundzilovich N. N., Pospelov A. V. Heat-insulating porous material based on glauconite-containing sands and aleurites of the Novodvorskoye deposit of the Republic of Belarus. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 463–471 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-463-471

Введение. Актуальной задачей промышленности является расширение минерально-сырьевой базы стекольной и керамической отраслей за счет широкого использования полезных ископаемых новых месторождений. В Республике Беларусь завершены работы по предварительной разведке базальтов и туфов месторождения Новодворское Пинского района Брестской области [1]. На основании этого Министерство природных ресурсов и охраны окружающей среды РБ утвердило суммарные запасы базальтов и туфов по категориям С1+С2, подсчитанные на площади 144,5 га, в объеме 164,1 млн т. По данному месторождению также утверждены предварительно оцененные запасы попутных полезных ископаемых, залегающих во вскрышных породах месторождения, к которым относятся глауконитсодержащие породы (пески, алевриты, алевролиты) в объеме 10,1 млн м^3.

Ранее в Беларуси проводились исследования глауконитовых пород и концентратов с целью изучения их качественных и технологических характеристик, а также возможных областей применения в промышленном производстве и сельском хозяйстве. Так, изучалась возможность использования глауконитсодержащих пород и глауконитового концентрата месторождений «Добруш» (Гомельская область) и «Карповцы» (Гродненская область) в качестве сорбентов и ионообменников для получения пигмента, используемого в производстве глазурованной плитки, керамических изделий, масляных, клеевых и известковых красок, а также в качестве удобрения и структурирующего почву материала в растениеводстве [2–13].

Строение толщи Новодворского месторождения, приведенное в табл. 1, позволило оценить местоположение изучаемых пород (пласт 1–3) и их мощность.

Таблица 1. **Строение толщи Новодворского месторождения**

Table 1. **Structure of the stratum of the Novodvorskoye deposit**

Название породы	Средняя мощность, м
Вскрыша	1,26
Песок строительный	20,52
Породы глауконитсодержащие (пласт 1)	12,7
Внутренняя вскрыша (пласт 2)	9,1
Породы глауконитсодержащие (пласт 3)	6,2
Породы базальтовые (Т2+Т1)	17,2
Туф (Т3) прослой в 70 % скважин	5,9
Породы базальтовые (Т2+Т1)	6,4
Туф и туффит (Т3)	26,3

Глауконитсодержащие породы представляют собой глауконит-кварцевые слюдистые алевриты и алевролиты. Содержание минерала глауконита ($K(Fe^{3+}, Al, Fe^{2+}, Mg)$, $[Al\ Si_3\ O_{10}](OH)_2 \cdot nH_2O$) в породах варьирует в пределах 10–25 мас.%; остальные минералы представлены преимущественно кварцем (SiO_2), полевыми шпатами (альбит $Na[AlSI_3O_8]$, анортит $Ca[AI_2Si_2O_8]$, ортоклаз $K[AlSi_3O_8]$), каолинитом ($Al4[Si_4O_{10}](OH)_8$), мусковитом ($KAl_2[AISi_3O_{10}](OH)_2$); возможно присутствие сидерита ($FeCO_3$) и фосфатов ($((CH_3O)_nP(O)(OH)_{3-n}$) в небольших количествах [1].

По химико-минеральному составу, как первому и главному признаку пригодности сырья, глауконитовые пески и алевриты являются перспективной сырьевой основой для получения силикатных материалов, однако вопрос их использования для получения керамических пористых теплоизоляционных материалов остается практически неизученным.

Цель настоящего исследования – разработка рецептуры сырьевых композиций и технологических параметров получения теплоизоляционных пористых керамических материалов на основе глауконитсодержащих пород Новодворского месторождения, а также установление зависимостей

физико-химических свойств от химико-минерального состава и режимов термообработки материала.

Объектом исследования являются керамические массы, содержащие в качестве основного компонента валовую пробу трех вышеуказанных горизонтов (табл. 1), а также пластификатор – легкоплавкую глину, плавни – различные магматические породы кристаллического фундамента Республики Беларусь (базальт, гранитоиды) и техногенные отходы промышленности (пыль газоочистительных установок различных производств).

Методика исследований. Проведение исследования базировалось на основании определения температурных интервалов плавления вскрышных глауконитсодержащих пород при термообработке как критериального фактора, обеспечивающего формирование структуры теплоизоляционных пористых керамических материалов, с последующей разработкой рецептур их сырьевых композиций и изучением зависимости показателей физико-химических свойств от составов и температурных параметров термической обработки.

Для изготовления теплоизоляционного пористого материала приготовление массы осуществляли поэтапно путем тщательного смешивания в сухом состоянии тонкомолотой глауконитсодержащей породы и порообразователя, затем добавляли пластификатор, плавень и воду. Далее в грануляторе формовали полуфабрикат в виде сырцовых гранул, которые подсушивались в естественных условиях и поступали на термическую обработку по режиму, обеспечивающему заданный коэффициент вспучивания и объемную плотность.

Физико-химические процессы при нагревании исследуемых образцов породы и сырьевых композиций анализировали по кривым ДСК, полученным с помощью дифференциально-сканирующего калориметра *DSC* 404 *F3 Pegasus* (*NETZSC*Н, Германия) в интервале температур 30–1400 °С в среде аргона (Ar).

Определение элементного химического состава осуществляли с использованием сканирующего электронного микроскопа *JSM*-5610 *LV*, оснащенного системой электронно-зондового энергодисперсионного химического анализа *EDX JED*-2201 (*JEOL*, Япония) и программным обеспечением с возможностью автоматической идентификации характеристических максимумов рентгеновского излучения элементов. В соответствии с нормативно-техническими документами (СТБ ЕН 13055-1 и СТБ ЕН 14013-1) определялись основные свойства полученных материалов.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследования проведено изучение физико-химических процессов и фазовых превращений при нагревании в интервале 30–1400 °С экспериментальных пород трех вышеуказанных горизонтов и их валовой пробы (рис. 1).

По результатам дифференциальной сканирующей калориметрии (рис. 1) установлено, что в исследуемых пробах глауконитсодержащих пород в интервале температур 80–145 °С наблюдаются эндотермические эффекты, обусловленные удалением свободной и физически связанной воды. Экзотермический эффект при 305–410 °С обусловлен окислением структурного железа (II) и переходом его в трехвалентное состояние, а также сгоранием органических примесей, присутствующих в исследуемых пробах. При температурах 490–540 °С происходит удаление конституционной воды из слоистой структуры глинистых и гидрослюдистых минералов (каолинит, мусковит, глауконит и др.) и их последующее разложение. Эндоэффект в интервале температур 572–578 °С объясняется полиморфным превращением кварца, в интервале температур 870–910 °С – процессами диссоциации карбонатов кальция и магния и удалением ионов OH^-, присутствующих в структуре глауконита и глинистых минералов. При температурах 900–940 °С происходит процесс формирования кристаллической фазы (вероятно, муллита) с выделением тепла. Начало плавления, согласно кривым ДСК, фиксируется при температурах выше 1200 °С, о чем свидетельствует небольшое снижение величины теплового потока в данном интервале температур. В связи с этим целесообразным является введение плавня, роль которого может выполнять более легкоплавкий базальт, являющийся полезным ископаемым этого же месторождения, залегающим ниже трех горизонтов вскрышных пород [1], используемых в данном исследовании. Для обоснованного подхода к вопросу корректировки сырьевых композиций, основу которых составляют тугоплавкие вскрышные породы (индексы приведены на рис. 1), определен их химический состав с использованием электронно-зондового энергодисперсионного химического анализа (табл. 2).

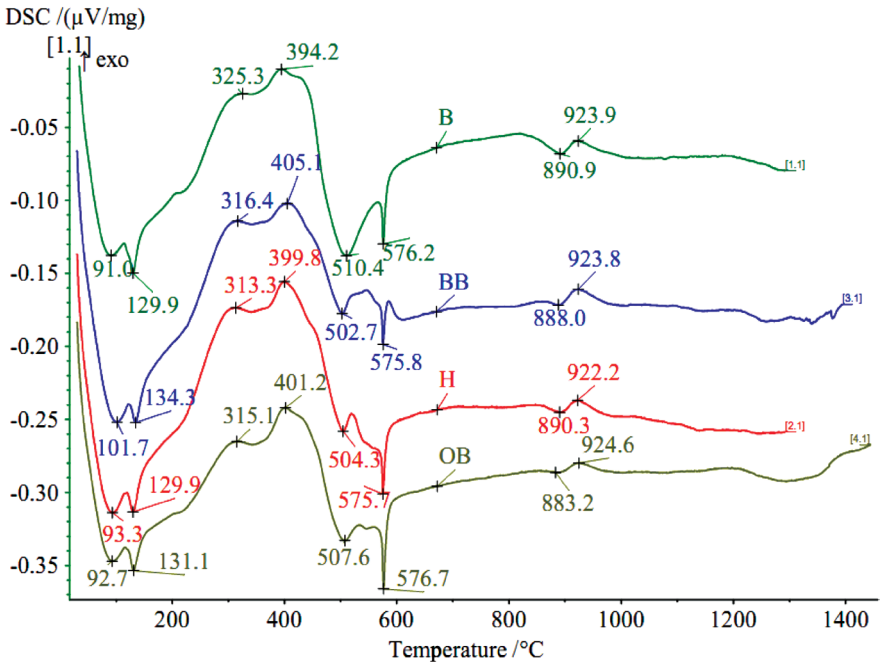


Рис. 1. Кривые ДСК исходных глауконитсодержащих пород и валовой пробы. Обозначения: В – верхний горизонт (глауконитовые пески и алевриты); ВВ – внутренняя вскрыша (глауконитсодержащий песок); Н – нижний горизонт (алевролиты); ОВ – валовая проба

Fig. 1. DSC curves of initial glauconite-containing rocks and bulk sample. Designations: B – upper horizon (glauconite sands and silts); BB – internal overburden (glauconite-containing sand); H – lower horizon (siltstones); OB – bulk sample

Таблица 2. **Химический состав проб порошкообразного исходного сырья**

Table 2. **Chemical composition of powder samples of raw materials**

Индекс пробы	Массовое содержание оксидов, %									
	SiO_2	Al_2O_3	TiO_2	FeO	CaO	MgO	K_2O	Na_2O	MnO	SO_3
B	70,07	10,04	0,74	14,19	0,74	–	2,74	–	–	1,48
BB	75,65	7,63	–	11,97	0,77	1,30	2,22	–	–	0,46
H	69,53	9,15	0,65	13,65	1,10	0,76	2,70	1,01	0,41	1,05
OB	74,26	8,28	0,79	9,29	1,21	1,79	1,96	0,34	0,14	1,94

Данные по химическому оксидному составу пород каждого горизонта и общей валовой пробы свидетельствуют о значительном суммарном содержании тугоплавких оксидов (SiO_2+Al_2O_3), составляющем 78,68–83,28 мас.%. Породы трех горизонтов по химическому составу близки, а поскольку их селективная добыча не представляется возможной, наиболее целесообразным является изучение сырьевых композиций на основе породы валового состава (проба ОВ, табл. 2).

Учитывая опыт предыдущих исследований по получению теплоизоляционных пористых материалов на основе магматических пород [14], для обеспечения необходимых формовочных свойств керамических масс экспериментальные сырьевые композиции были дополнены легкоплавкой глиной, базальтом, гранитоидными отсевами и пылевидными отходами электроплавильного производства стали (пыль ПГУ), производства цемента (пыль ОПЦ) и извести (пыль ОПИ). Химический состав вышеуказанных компонентов представлен в табл. 3, качественный состав сырьевых композиций – в табл. 4.

По результатам ранее проведенных исследований изучения пористых теплоизоляционных материалов на основе магматических пород [15] определено, что оптимальным температурным интервалом обжига является 1190 ± 5 °С. Отформованные и высушенные сырцовые гранулы экспериментальных составов (табл. 4) были подвергнуты термической обработке, затем оценивались основные критериальные показатели свойств – объемная плотность (рис. 2, *a*), коэффициент вспучивания (рис. 2, *b*) и водопоглощение (рис. 2, *c*).

Таблица 3. **Химический состав дополнительных компонентов**

Table 3. **Chemical composition of additional components**

Компонент	Массовое содержание оксидов, %														
	SiO_2	Al_2O_3	CaO	MgO	$FeO+Fe_2O_3$	K_2O+Na_2O	TiO_2	P_2O_5	MnO	ZnO	Cr_2O_3	SO_3	Cl	CuO	п.п.п.
Глина «Лукомль»	56,00	14,10	5,70	3,10	7,60	4,50	–	–	–	–	–	–	–	–	9,00
Базальт	46,11	11,49	5,00	7,87	14,00	4,30	1,74	0,31	–	–	–	–	–	–	9,18
Гранитоиды	61,63	14,86	4,38	3,32	8,94	2,52	0,93	0,35	0,19	–	–	–	–	–	2,87
Пыль ПГУ	3,12	1,03	3,82	–	34,42	7,63	–	–	–	42,24	0,29	1,23	2,63	1,92	1,67
Пыль ОПЦ	4,96	3,14	37,77	0,26	1,04	29,63	0,25	–	–	2,60	–	12,00	–	2,81	5,54
Пыль ОПИ	5,93	1,68	85,17	0,18	0,40	1,76	–	–	–	–	–	–	–	–	4,88

Таблица 4. **Качественные составы сырьевых композиций**

Table 4. **Qualitative compositions of raw materials**

Компоненты	Номер сырьевой композиции							
	1*	2	3	4*	5*	6*	7	8
Валовая проба пород трех горизонтов (ОВ)	+	+	+	+	+	+	+	+
Легкоплавкая глина «Лукомль»	+	+	+	+	+	+	+	+
Порообразователь (SiC)	+	+	+	+	+	+	+	+
Базальт	–	–	–	–	–	–	+	–
Гранитоидные отсевы	–	–	–	–	–	–	–	+
Пылевидные отходы сталеплавильного производства (пыль ПГУ)	–	–	–	+	–	+	–	–
Пылевидные отходы получения цемента (пыль ОПЦ)	–	+	–	–	–	–	–	–
Пылевидные отходы получения извести (пыль ОПИ)	–	–	+	–	–	–	–	–

* Составы № 1 и 5, 4 и 6 отличаются содержанием компонентов.

Комплексный анализ показателей физико-химических свойств и характера пористости явился основой для выбора перспективных составов сырьевых композиций, при этом учитывался фактор максимального использования вскрышной породы, с одной стороны, и обеспечения необходимой пластичности керамической массы, требуемой для осуществления процесса формования сырцовых гранул за счет использования глины, – с другой.

Одновременно производилась визуальная оценка состояния поверхности гранул и их структуры. Характерно, что образцы составов № 2, 3 и 5 (табл. 4.) имели остеклованную поверхность и повышенную объемную плотность; образцы состава № 4 отличались крупнопористой структурой и недостаточной прочностью при сжатии (до 1,0 МПа). Анализ результатов определения объемной плотности, коэффициента вспучивания, водопоглощения и визуальной оценки экпериментальных

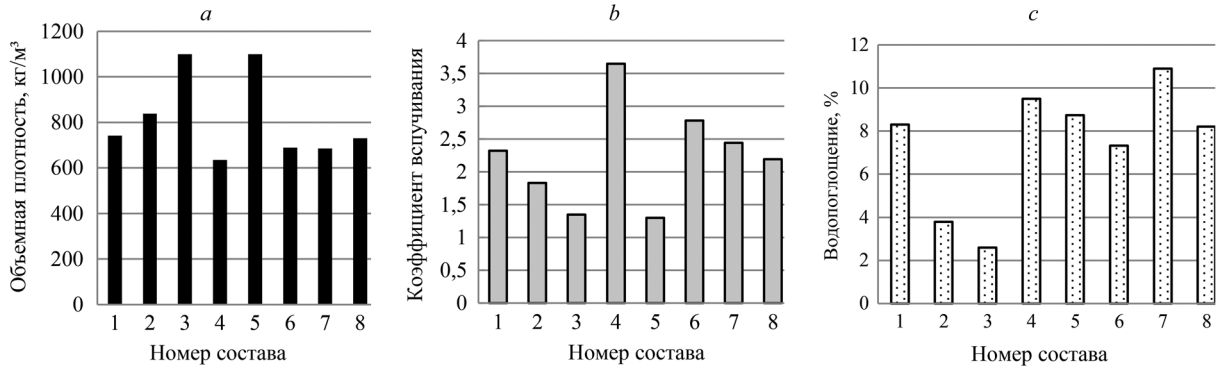


Рис. 2. Показатели объемной плотности (*a*), коэффициента вспучивания (*b*) и водопоглощения (*c*) экспериментальных образцов теплоизоляционных материалов на основе вскрышных пород

Fig. 2. Bulk density (*a*), swelling coefficient (*b*) and water absorption (*c*) of experimental samples of thermal insulation materials based on overburden

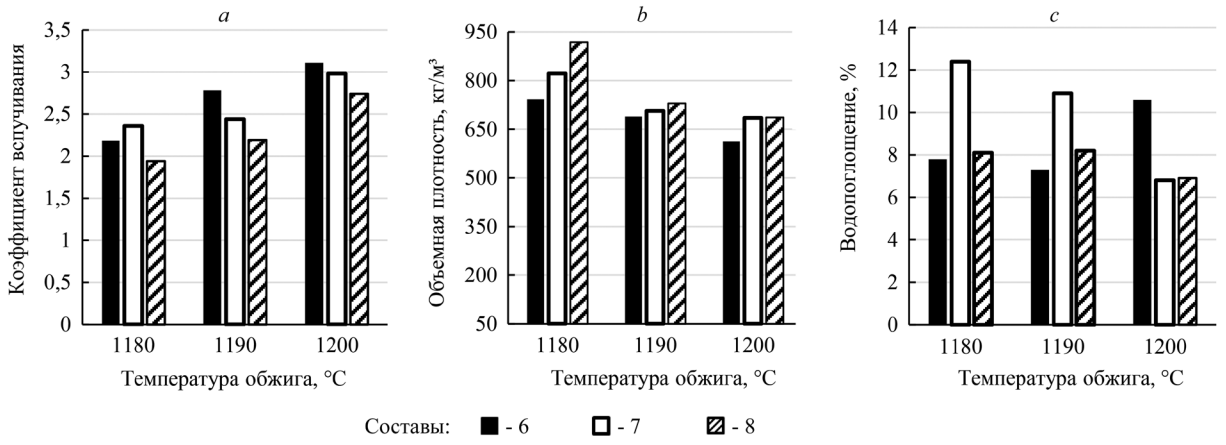


Рис. 3. Показатели коэффициента вспучивания (*a*), объемной плотности (*b*) и водопоглощения (*c*) экспериментальных образцов перспективных составов в зависимости от температуры обжига

Fig. 3. Bulk swelling coefficient (*a*), density (*b*) and water absorption (*c*) of experimental samples of promising compositions, depending on the annealing temperature

образцов показал, что наиболее перспективными для получения пористых теплоизоляционных материалов являются составы № 6, 7 и 8, характеризующиеся приемлемыми показателями основных критериальных свойств. Так, значения объемной плотности образцов № 6, 7 и 8 составляют: 689, 685 и 730 кг/м^3; коэффициента вспучивания – 2,78, 2,44 и 2,19; водопоглощения – 7,32, 10,9 и 8,2 % соответственно.

Для уточнения и конкретизации температурных параметров обжига, обеспечивающих необходимую пористую структуру при сохранении показателей критериальных свойств, была проведена термическая обработка образцов составов № 6, 7 и 8 при температурах 1180, 1190 и 1200 °С с выдержкой на каждой максимальной температурной экспозиции 10 мин (рис. 3).

В результате проведенного эксперимента установлено, что температура обработки 1180 °С является недостаточной, поскольку не обеспечивает завершенности процессов порообразования в образцах и формирование однородной структуры. В связи с этим рекомендуемая температура обжига теплоизоляционных пористых материалов на основе глауконитсодержащих песков и алевритов составляет 1195 ± 5 °С, при которой показатели свойств и структура материалов соответствуют требованиям нормативно-технической документации.

Таким образом, по комплексу технологических характеристик (пластичность керамической массы, спекаемость), показателям физико-химических свойств и характеру пористой структуры в качестве оптимального выбран состав № 7 (табл. 4). Помимо этого преимуществом его сырьевой композиции является возможность комплексного использования не только попутных полезных ископаемых Новодворского месторождения, к которым относятся глауконитсодержащие вскрышные породы, но и основного полезного ископаемого этого же месторождения – базальта в качестве плавня, что способствует образованию жидкой фазы и активному порообразованию при получении керамических теплоизоляционных материалов.

На рис. 4 приведены изображения обожженной гранулы состава № 7 и фрагментов ее поверхности и поперечного среза. Следует отметить, что на частично остеклованной поверхности гранулы (рис. 4, *a*, *b*) присутствует большое количество открытых мелких пор, что обеспечит адгезию цементного теста к поверхности гранул и соответственно прочность легких бетонов. На фотографии среза гранулы (рис. 4, *c*) видно, что внутренняя структура образца характеризуется достаточно равномерным распределением в объеме изометричных пор, размеры которых преимущественно составляют от 0,05 до 0,5 мм.

Полученный на основе глауконитсодержащих вскрышных пород пористый заполнитель наиболее востребованной фракции 10–16 мм характеризуется следующими показателями физико-химических свойств: объемная плотность – 650–660 кг/м^3; насыпная плотность – 420–440 кг/м^3; коэффициент вспучивания – 2,6–2,8; водопоглощение – 7,3–8,1 %; механическая прочность

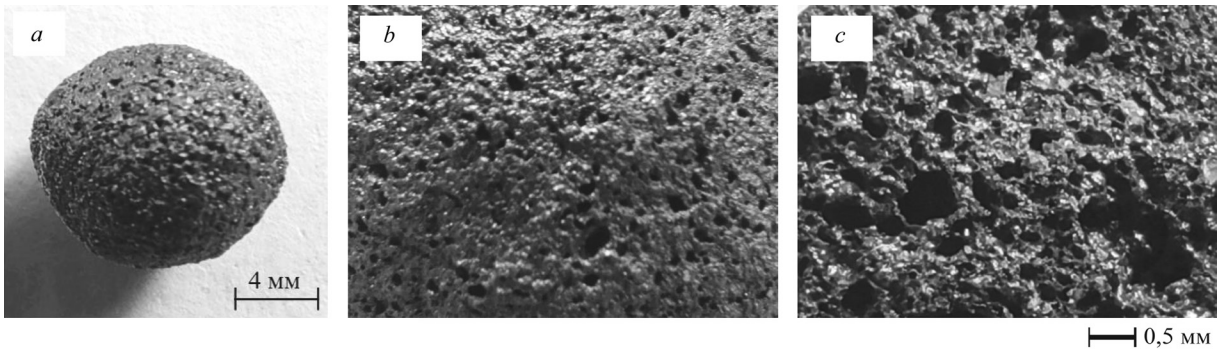


Рис. 4. Фотография обожженной гранулы (*a*), фрагментов ее поверхности (*b*) и поперечного среза (*c*)

Fig. 4. Photo of the annealed granule (*a*), fragments of its surface (*b*) and cross-section (*c*)

при сжатии – 2,1–2,3 МПа; коэффициент теплопроводности – 0,085–0,09 Вт/м·К; потери при прокаливании – 0,16–0,18 %; гидролитическая стойкость – 99,7–99,8 %; химическая устойчивость к концентрированной серной кислоте – 98,2–98,5 %, к 20 %-ному раствору NaOH – 95,4–96,1 %; удельная эффективная активность естественных радионуклидов – 98–127 Бк/кг, что соответствует требованиям нормативно-технической документации, предъявляемым к теплоизоляционным пористым материалам аналогичного назначения. В частности, показатели свойств широко применяемого в строительстве пористого заполнителя легких бетонов – керамзита составляют: насыпная плотность не более 600–700 кг/м^3; коэффициент теплопроводности не более 0,092–0,130 Вт/м·К; водопоглощение – до 20 %; удельная эффективная активность естественных радионуклидов – 300 Бк/кг.

Заключение. Результаты исследования по использованию вскрышных пород Новодворского месторождения Пинского района Брестской области для получения теплоизоляционных пористых керамических материалов подтвердили целесообразность их применения в составе сырьевых композиций, основным компонентом которых является валовая порода, состоящая из глауконитсодержащих песков, алевритов и алевролитов. В качестве дополнительных составляющих используются пластификатор – легкоплавкая глина, плавень – базальт и порообразователь – карбид кремния. Рациональное сочетание указанных компонентов обеспечивает необходимую формовочную способность керамических масс и комплекс физико-химических свойств гранулированного теплоизоляционного материала. Обладая вышеперечисленными свойствами, разработанный на основе глауконитсодержащих вскрышных пород пористый материал может использоваться не только в качестве заполнителя легких бетонов и теплоизоляционных блоков, но и в качестве теплоизоляционных засыпок, оснований в дорожном строительстве, благоустройстве объектов частного домостроения, тепло- и звукоизоляции полов и перекрытий.

Таким образом, попутные полезные ископаемые Новодворского месторождения, к которым относятся вскрышные породы – глауконитсодержащие пески, алевриты и алевролиты, являются приемлемым белорусским сырьем для получения керамических пористых теплоизоляционных материалов. Результаты исследований могут служить рекомендацией для комплексного масштабного использования как основных, так и попутных полезных ископаемых при промышленной разработке Новодворского месторождения базальтов и туфов, что внесет определенный вклад в расширение минерально-сырьевой базы Республики Беларусь и улучшение экологической ситуации этого региона.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Государственного предприятия «НПЦ по геологии» – зам. генерального директора Г. Б. Качанко за предоставленные пробы вскрышных пород и научным сотрудникам О. Ф. Кузьменковой, Г. Д. Стрельцовой и С. С. Манкевичу за оказание консультаций по геологическим вопросам.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to the staff of the State Enterprise «Scientific Research Center for Geology»– Deputy General Director G. B. Kachanko for the provided samples of overburden rocks and to scientific workers O. F. Kuzmenkova, G. D. Streltsova and S. S. Mankevich for consulting on geological issues.

Список использованных источников

1. Глауконитсодержащие породы поискового участка Пинский (Беларусь) / О. Ф. Кузьменкова [и др.] // Геология и минерально-сырьевые ресурсы запада Восточно-Европейской платформы: проблемы изучения и рационального использования. – Минск: СтройМедиаПроект, 2017. – С. 172–176.

2. Нетрадиционные виды минерального сырья Беларуси / Э. А. Высоцкий [и др.] // Природные ресурсы. – 1999. – № 2. – С. 5–16.

3. Ещенко, Л. С. Применение глауконитсодержащих пигментов в производстве строительных материалов / Л. С. Ещенко, В. А. Салоников, Г. М. Жук // Наука и технология строительных материалов: состояние и перспективы: материалы междунар. науч.-техн. конф. – Минск, 2005. – С. 86–89.

4. Кольненков, В. П. Геоэкологические аспекты использования глауконита как сорбента долгоживущих радионуклидов / В. П. Кольненков, Л. И. Мурашко // Минерально-сырьевая база Республики Беларусь: состояние и перспективы. – Минск: БелНИГРИ, 1997. – С. 246–247.

5. Об использовании глауконитового сырья в производстве изделий строительного назначения / И. А. Левицкий [и др.] // Геология, поиски и освоение месторождений полезных ископаемых: сб. науч. тр. – Минск: БЕЛГЕО, 2010. – Вып. 3. – С. 195–201.

6. Новые данные о перспективах использования глауконита в народном хозяйстве Беларуси / Л. И. Мурашко [и др.] // Минерально-сырьевая база Республики Беларусь: состояние и перспективы. – Минск: БелНИГРИ, 1997. – С. 118–119.

7. Мурашко, Л. И. Методика извлечения глауконита из отложений палеогена Беларуси / Л. И. Мурашко, Т. Е. Колосова // Геология, поиски и освоение месторождений полезных ископаемых Беларуси: сб. науч. тр. – Минск: БЕЛГЕО, 2005. – С. 105–110.

8. Павлюкевич, Ю. Г. Использование глауконита для получения облицовочных керамических материалов / Ю. Г. Павлюкевич, И. А. Левицкий, Л. И. Мурашко // Техника и технология силикатов. – 2000. – № 12. – С. 113–115.

9. Оценить возможности комплексного использования глауконитсодержащих пород в народном хозяйстве Беларуси : отчет о НИР / А. К. Карабанов [и др.]. – Минск: ИГН НАНБ, 1999. – 108 с.

10. Оценка целесообразности подготовки к промышленному освоению в Беларуси нетрадиционных видов минерального сырья: глауконит и кремень : отчет о НИР / Э. А. Левков [и др.]. – Минск: ИГН НАНБ, 1995. – 140 с.

11. Получение и внедрение розового и голубовато-серого керамических пигментов на основе белорусского минерального сырья: отчет о НИР / А. А. Махнач [и др.]. – Минск: ИГГиГ АНБ, 1993. – 9 с.

12. Павлюкевич, Ю. Г. Глауконитовое сырье – основа получения функциональных материалов строительного назначения / Ю. Г. Павлюкевич, И. А. Левицкий, С. Е. Баранцева // Научные основы химии и технологии переработки комплексного сырья и синтеза на его основе функциональных материалов: материалы всерос. науч.-техн. конф. – Апатиты: Кольский науч. центр РАН, 2008. – Ч. 2. – С. 199–202.

13. Левицкий, И. А. Керамические и стеклокристаллические материалы с использованием глауконитов Беларуси / И. А. Левицкий, Ю. Г. Павлюкевич, С. Е. Баранцева // Актуальные проблемы геологии, геохимии и геофизики: материалы междунар. науч.-практ. конф. 2–4 февр. 2016 г. – Минск: НПЦ по геологии, 2016. – С. 41–43.

14. Получение пористых теплоизоляционных материалов из магматических пород Республики Беларусь / С. Е. Баранцева [и др.] // Актуальные вопросы геологии: материалы междунар. науч.-практ. конф. / ред. кол.: Т. Ю. Серпуховитина, С. А. Рыбакова. – Белгород: КОНСТАНТА, 2019. – С. 223–228.

15. Исследование физико-химических процессов, происходящих при формировании пористой структуры теплоизоляционных материалов на основе гранитоидных пород Беларуси / С. Е. Баранцева [и др.] // Труды БГТУ. Сер. 2. Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. – 2020. – № 2. – С. 13–20.

References

1. Kuzmenkova O. F. Strel'tsova G. D., Minenkova T. M., Kachanko G. B.,Laptsevich A. G., Lugin V. G., Mankevich S. S. Glauconite-bearing rocks of the Pinsky prospecting site (Belarus). *Geology and Mineral Resources of the West of the East European Platform: Problems of Study and Rational Use.* Minsk, StroiMediaProekt Publ., 2017, pp. 172–176 (in Russian).

2. Vysotsky E. A., Makhnach A. A., Gudak S. P., Petrova N. S., Khomich P. Z., Rachevskii A. N., Vecher V. A., Yartsev V. I. Non-traditional types of mineral raw materials in Belarus. *Prirodnye resursy = Natural resources*, 1999, no. 2, pp. 5–16 (in Russian).

3. Eshchenko L. S., Salonikov V. A., Zhuk G. M. The use of glauconite-containing pigments in the production of building materials. *Nauka i tekhnologiya stroitel'nykh materialov: sostoyanie i perspektivy: materialy mezhdunar. nauch.-tekhn. konf.* [Science and technology of building materials: state and prospects. Proceedings of the Int. sci.-tech. conf.]. Minsk, 2005, pp. 86–89 (in Russian).

4. Kolnenkov V. P., Murashko L. I. Geoecological aspects of using glauconite as a sorbent for long-lived radionuclides. *Mineral resource base of the Republic of Belarus: state and prospects*. Minsk, BelNIGRI Publ., 1997, pp. 246–247 (in Russian).

5. Levitsky I. A., Pavlyukevich Yu. G., Dyatlova E. M., Papko L. F., Barantseva S. E., Strel'tsova G. D. On the use of glauconite raw materials in the manufacture of construction products. *Geologiya, poiski i osvoenie mestorozhdenii poleznykh iskopaemykh: sb. nauch. tr.* [Geology, prospecting and development of mineral deposits. Collection of scientific works]. Minsk, BELGEO Publ., 2010, vol. 3, pp. 195–201 (in Russian).

6. Murashko L. I., Karabanov A. K., Kolnenkov V. P., Klebanovich N. V. New data on the prospects for the use of glauconite in the national economy of Belarus. *Mineral resource base of the Republic of Belarus: state and prospects*. Minsk, BelNIGRI Publ., 1997, pp. 118–119 (in Russian).

7. Murashko L. I., Kolosova T. E. Methods of extracting glauconite from deposits of the Paleogene of Belarus. *Geologiya, poiski i osvoenie mestorozhdenii poleznykh iskopaemykh: sb. nauch. tr.* [Geology, prospecting and development of mineral deposits. Collection of scientific works]. Minsk, BELGEO Publ., 2005, pp. 105–110 (in Russian).

8. Pavlyukevich Yu. G., Levitsky I. A., Murashko L. I. The use of glauconite for facing ceramic materials. *Tekhnika i tekhnologiya silikatov = Technics and technology of silicates*, 2000, no. 12, pp.113–115 (in Russian).

9. Karabanov A. K., Murashko L. I., Klebanovich N. V., Kol'nenkov V. P. [et al.]. *To assess the possibilities of the integrated use of glauconite-containing rocks in the national economy of Belarus*. Report on research. Minsk, IGS NASB, 1999. 108 p. (in Russian).

10. Levkov E. A., Murashko L. I. [et al.] *Evaluation of the feasibility of preparing for industrial development in Belarus of non-traditional types of mineral raw materials: glauconite and flint*. Report on research. Minsk, IGS NASB, 1995. 140 p. (in Russian).

11. Makhnach A. A., Gulis L. F. [et al.] *Obtaining and introducing pink and bluish-gray ceramic pigments based on Belarusian mineral raw materials*. Report on research. Minsk, IGGiG ASB, 1993. 9 p. (in Russian).

12. Pavlyukevich Yu. G., Levitsky I. A., Barantseva S. E. Glauconite raw materials - the basis for obtaining functional materials for construction purposes. *Nauchnye osnovy khimii i tekhnologii pererabotki kompleksnogo syr'ya i sinteza na ego osnove funktsional'nykh materialov: materialy vseros. nauch.-tekhn. konf. Ch. 2* [Scientific foundations of chemistry and technology for processing complex raw materials and synthesis of functional materials on its basis: Materials of the All-Russian Scientific and Technical Conference. Part 2]. Apatity, Publishing house of the Kola Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, 2008, pp. 199–202 (in Russian).

13. Levitsky I. A., Pavlyukevich Yu. G., Barantseva S. E. Ceramic and glass-crystalline materials using glauconites of Belarus. *Aktual'nye problemy geologii, geokhimii i geofiziki: materialy mezhdunar. nauch.-prakt. konf., 2–4 fevr. 2016 g.* [Actual problems of geology, geochemistry and geophysics: Proceedings of the international scientific and practical conference, February 2–4, 2016]. Minsk, State Enterprise "Scientific Research Center for Geology", 2016, pp. 41–43 (in Russian).

14. Barantseva S. E., Klimosh Yu. A., Gundilovich N. N., Azarenko I. M. Obtaining porous heat-insulating materials from igneous rocks of the Republic of Belarus. *Aktual'nye voprosy geologii: materialy mezhdunar. nauch.-prakt. konf.* [Topical issues of geology: materials of the International scientific-practical conference]. Belgorod, KONSTANTA Publ., 2019, pp. 223–228 (in Russian).

15. Barantseva S. E., Klimosh Yu. A., Khmylko L. I., Poznyak A. I., Gundilovich N. N., Azarenko I. M., Pospelov A. V. Investigation of the physicochemical processes occurring during the formation of the porous structure of heat-insulating materials based on granitoid rocks of Belarus. *Trudy BGTU. Seriya 2: khimicheskie tekhnologii, biotekhnologiya, geoekologiya* [Proceedings of BSTU. Chemical Technologies. Biotechnology. Geoecology], 2020, no. 2, pp. 13–20 (in Russian).

Информация об авторах

Баранцева Светлана Евгеньевна – канд. техн. наук, доцент, ст. науч. сотрудник. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svetbar@tut.by

Позняк Анна Ивановна – канд. техн. наук, исследователь департамента эксперим. физики. Университет Дуйсбург-Эссен, (Lotharstrasse, 1, 47057, Дуйсбург, ФРГ). E-mail: poznyak.a87@gmail.com

Климош Юрий Александрович – канд. техн. наук, доцент, декан. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: klim-aspir@mail.ru

Азаренко Ирина Михайловна – стажер мл. науч. сотрудника. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ir_z@mail.ru

Гундилович Николай Николаевич – канд. техн. наук, ассистент кафедры технологии стекла и керамики. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: kolgund@mail.ru

Поспелов Андрей Владимирович – мл. науч. сотрудник. Центр физико-химических методов исследования, Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: Andrei29088@mail.ru

Information about the authors

Svetlana E. Barantseva – Ph. D. (Engineering), Associate Professor, Senior Researcher. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail*:* svetbar@tut.by

Anna I. Pazniak – Ph. D. (Engineering), PostDoc Researcher, Experimental Physics, University of Duisburg-Essen (1, Lotharstarsse, 47057, Duisburg, Germany). E-mail: poznyak.a87@gmail.com

Yuri A. Klimosh – Ph. D. (Engineering), Associate Professor. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: klim-aspir@mail.ru

Irina M. Azarenko – trainee Junior Researcher. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ir_az@mail.ru

Nikolay N. Gundilovich – Ph. D. (Engineering), Assistant of the Department of Glass and Ceramics. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: kolgund@mail.ru

Andrey V. Pospelov – Junior Researcher. Center for Physical and Chemical Research Methods, Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Andrei29088@mail.ru

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 676.054.6
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-472-479

Поступила в редакцию 02.07.2021
Received 02.07.2021

И. И. Исмаилов, Х. А. Бабаханова, А. А. Садриддинов, М. А. Бабаханова, Д. Ш. Саидова

Ташкентский институт текстильной и легкой промышленности, Ташкент, Узбекистан

ПОВЕРХНОСТНЫЕ И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БУМАГИ, СОДЕРЖАЩЕЙ КАРБОНАТ КАЛЬЦИЯ

Аннотация. Исследованы поверхностные и оптические свойства бумаги из карбоната кальция, полученной в условиях Узбекско-китайского предприятия Fergana stone paper company (Узбекистан), с целью выявления возможности ее использования на полиграфических предприятиях для печати многокрасочной продукции с применением традиционных способов печати. По результатам количественной оценки качества поверхности косвенным методом Бека можно утверждать, что образец бумаги № 1 обладает гладкостью, как у мелованной бумаги (750–1500 с), образцы бумаги № 2 и 3, как у бумаг каландрированных, которые можно рекомендовать для изданий с повышенными требованиями к качеству. Меньшие значения шероховатости *Ra* и небольшие углубления, выраженные затемнением на топографических АСМ-изображениях, характеризовали достаточную однородность и плотность структуры. Также выявлено, что поверхность образцов бумаги обладает высокой способностью зеркально отражать падающий свет, так как процент отражения поверхностей такой же, как у мелованных бумаг. Образцы бумаги имеют белизну порядка 90 % и нет оттенка, так как разница между максимальным и минимальным значениями коэффициентов отражения на белой стопе не больше 10 %. Исследуемые образцы бумаги можно без ограничений рекомендовать для двусторонней печати, так как показатель светонепроницаемости больше 92 %.

Ключевые слова: бумага, карбонат кальция, гладкость, шероховатость, глянец, белизна, светонепроницаемость бумаги

Для цитирования. Поверхностные и оптические свойства бумаги, содержащей карбонат кальция / И. И. Исмаилов [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 472–479. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-472-479

I. I. Ismailov, Kh. A. Babakhanova, A. A. Sadriddinov, M. A.Babahanova, D. Sh. Saidova

Tashkent Institute of Textile and Light Industry, Tashkent, Uzbekistan

SURFACE AND OPTICAL PROPERTIES OF CALCIUM CARBONATE PAPER

Abstract. The article investigates the surface and optical properties of calcium carbonate paper obtained at the Uzbek-Chinese enterprise Fergana stone paper company (Uzbekistan), in order to identify the possibility of their use at printing enterprises for printing multicolor products using traditional printing methods. According to the results of a quantitative assessment of the surface quality by the indirect Beck method, we can say that paper sample 1 has a smoothness like coated paper (750–1500 s), paper samples 2 and 3 – like calendered paper, so that these paper samples can be recommended for prints with increased quality requirements. Smaller values of roughness Ra and small depressions, expressed by darkening in the topographic AFM images, characterized sufficient homogeneity and density of the structure. It was also revealed that the surface of the paper samples has a high ability to specularly reflect the incident light, since the percentage of surface reflection is similar to that of coated papers. Samples of paper have a whiteness of about 90 % and do not have a tint, since the difference between the maximum and minimum values of the reflection coefficients on a white stack is not more than 10 %. The tested paper samples can be recommended without restrictions for double-sided printing, since the opacity index is more than 92 %.

Keywords: paper, calcium carbonate, smoothness, roughness, gloss, protection, opacity of paper

For citation. Ismailov I. I., Babakhanova Kh. A., Sadriddinov A. A., Babahanova M. A., Saidova D. Sh. Surface and optical properties of calcium carbonate paper. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 472–479 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-472-479

Введение. Качество воспроизведения изображения на оттисках зависит от полноты контакта поверхности бумаги и печатной формы при традиционных способах печати. Из-за неровностей рельефа поверхности бумаги нарушается контакт с формой, в результате не пропечатываются или пропечатываются не полностью отдельные печатные элементы изображения [1]. Для обеспечения полного контакта и повышения контрастности и четкости изображения необходимо использование бумаги с ровной и микрошероховатой поверхностью.

Одним из наиболее распространенных и повсеместно применяемых косвенных методов для количественной оценки качества поверхности является метод определения гладкости по Беку (ГОСТ 12795-89 (ИСО 5627-84)). Этот метод основан на измерении расхода воздуха между измерительным элементом прибора и поверхностью анализируемого материала, в результате получаем усредненную (брутто) характеристику состояния поверхности исследуемого материала.

К прямым методам количественного анализа поверхности материалов можно отнести метод сканирующей электронной микроскопии [2, 3] и конфокальной оптической микроскопии [4, 5]. Преимуществом этих методов является высокоточное отображение параметров шероховатости в нанометровом диапазоне, а недостатком – дороговизна исследований и необходимость в высококвалифицированных специально подготовленных кадрах. Использование доступного и простого сканирующего зондового микроскопа (СЗМ) Solver HV исключает недостатки вышеперечисленных прямых методов.

Материалы и методы. В данной работе использовали косвенный метод определения гладкости по Беку и прямой с применением метода атомно-силовой микроскопии, достаточно универсальный и дающий объективную характеристику рельефу поверхности с высоким разрешением. Объект исследования – поверхностные и оптические свойства бумаги из карбоната кальция.

Известно, что с 1970-х годов природный и химически осажденный карбонат кальция (PCC) стали применять в бумажной промышленности в качестве наполнителя и отбеливателя, заменяя каолин [6]. Увеличение процента использования карбоната кальция в бумажном производстве обеспечивает снижение потребления дефицитной древесной целлюлозы и оптических отбеливателей и направлено на решение экологической проблемы [7].

В конце 1990-х годов тайваньская компания Taiwan Lung Meng Technology Co (TLM) впервые разработала технологию производства бумаги из карбоната кальция [8, 9]. В Японии «каменную» бумагу производят под брендом Limex компания TBM [10]. Среди стран СНГ производство «каменной» бумаги только осваивается и первопроходцем стал Узбекистан.

В 2020 г. в Ферганской области Республики Узбекистан создано Узбекско-Китайское предприятие Fergana stone paper company, которое специализируется по производстве бумаги из карбоната кальция в сочетании с нетоксичным полимером HDPE, мощностью 9 тыс. т в год [11, 12].

Для выявления и подтверждения возможности использования бумаги из карбоната кальция на полиграфических предприятиях с целью получения многокрасочных оттисков с высокой графической точностью как при традиционных, так и при современных цифровых технологиях печати возникает научный и практический интерес к комплексному изучению ее поверхностных и оптических свойств.

Экспериментальная часть. В работе исследовали поверхностные и оптические свойства образцов бумаги, в состав которых входит 80 % карбоната кальция и 20 % HDPE, массой 100 г/м^2 и два образца массой 90 г/м^2, полученной в условиях Узбекско-Китайского предприятия Fergana stone paper company.

Для оценки качества поверхности исследуемой бумаги определили ее гладкость при использовании пневматического прибора Бека. Давление воздуха при измерении равно 1 атм, давление прижима поверхности бумаги к полированному кольцу площадью 10 см^2 – 1 кгс/см^2. Время выдерживания бумаги до начала испытания под этой нагрузкой – 1 мин. За показатель гладкости принято время прохождения 10 мл воздуха, которое является переменной величиной, зависящей не только от гладкости поверхности, но и от изменения во время испытания. Полученные значения гладкости отражены в табл. 1.

Для получения объективной оценки поверхности бумаги из карбоната кальция в нанометровом диапазоне использовали метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) [13–17]. При помощи

Таблица 1. **Показатели гладкости бумаги из карбоната кальция**

Table 1. **Smoothness factors of calcium carbonate paper**

Показатель	Образец № 1=100 г/м^2	Образец № 2=90 г/м^2	Образец № 3=90 г/м^2
Гладкость, с (лицевая сторона)	1126	230	165
Гладкость, с (сеточная сторона)	733	138	84

сканирующего зондового микроскопа Solver HV (ЗАО NT-MDT, Зеленоград, Россия) получили параметры шероховатости *Ra* и высокоточное отображение профиля перепадов высот рельефа поверхности бумаги (табл. 2, рис. 2–4).

Качество печатной продукции, а именно контрастность изображения, точность цветопередачи, при многокрасочной печати зависит от оптических свойств, к которым можно отнести глянец, белизну бумаги и светонепроницаемость. Для их определения использовали существующие стандартные методики [18]. Полученные результаты сравнивали с нормативными данными ГОСТ 9094-89 «Бумага для печати офсетная» для выявления возможности использования бумаги на полиграфических предприятиях для печатания [19, 20].

Обсуждение результатов. На основе полученных данных исследуемых образцов бумаги (табл. 1) сделаны следующие выводы: гладкость с лицевой стороны больше, в отличие от сеточной, что наблюдается у всех образцов бумаги. Данные образцы бумаги можно рекомендовать для изданий с повышенными требованиями к качеству, так как показатели гладкости образца бумаги № 1, как у мелованной бумаги (750–1500 с), у образцов бумаги № 2 и 3 – как у бумаг каландрированных. На рис. 1 показаны фотографии поверхностей каждого из образцов бумаги,

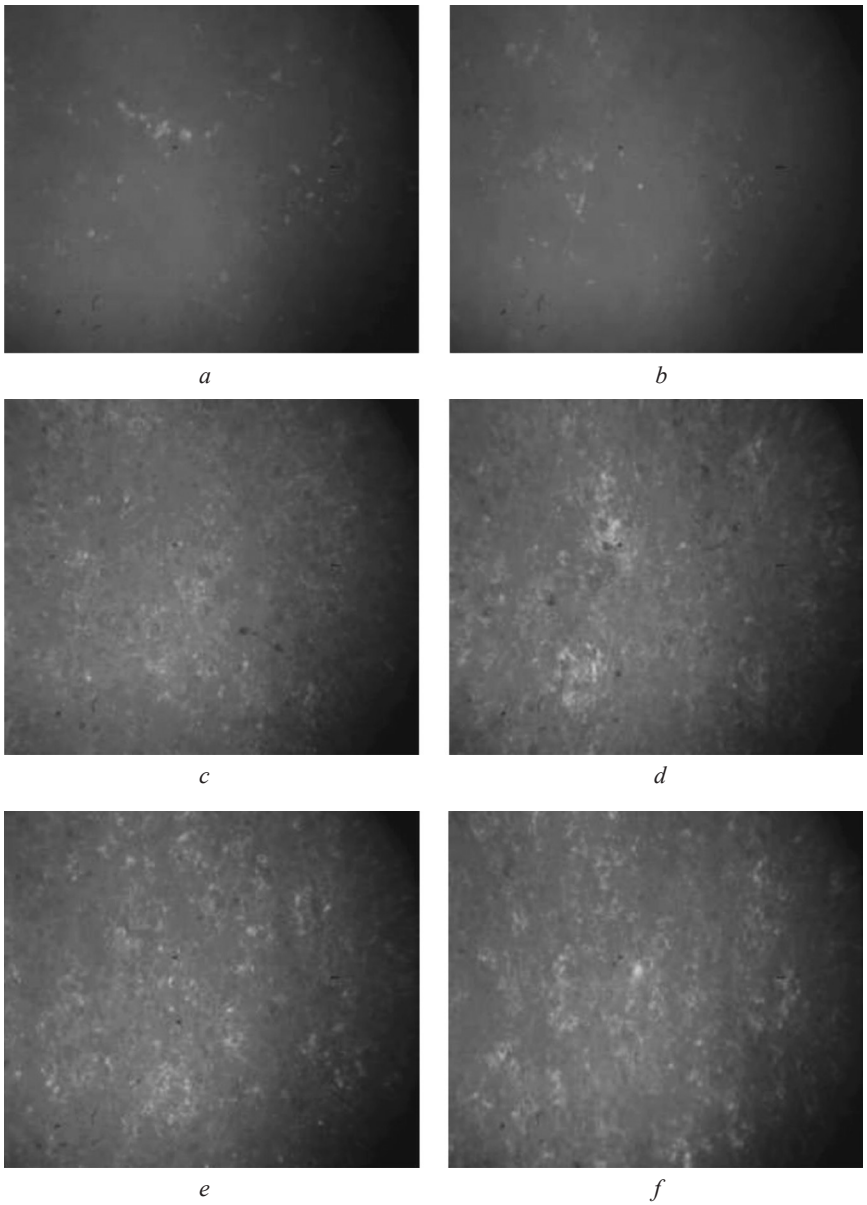


Рис. 1. Поверхность бумаги под микроскопом: *a*, *b* – образец № 1; *c*, *d* – образец № 2; *e*, *f* – образец № 3

Fig. 1. Paper surface under the microscope: *a*, *b* – sample № 1; *c*, *d* – sample № 2; *e*, *f* – sample № 3

полученных на электронном микроскопе под увеличением, где хорошо видно значительное отличие поверхностей образцов, что обуславливает различие в показателях гладкости, определенных косвенным методом на приборе Бека.

При использовании прямого метода исследования поверхности на сканирующем зондовом микроскопе Solver HV рельеф поверхности образца измеряли при размере диаметра 450 мкм и диапазоне от 100 00 до 4 мкм^2. При взаимодействии кантилевера производства ЗАО NT-MDT (Зеленоград, Россия) с поверхностью бумаги действует сила, которая меняется в зависимости от различия в высоте рельефа. Изменение силы, действующей на кантилевер, влияет на величину изгиба, которая фиксируется с помощью лазера, в результате профилируется прямое изображение микрогеометрии поверхности в масштабе 3D.

Для расчета параметров шероховатости по диагонали кадра проводили разрез (рис. 2–4, *a*). Полученные с помощью метода АСМ данные обработаны с помощью специальной встроенной программы и рассчитаны параметры шероховатости *Ra,* согласно требованиям ГОСТ 2789-73, значения которых приведены в табл. 2.

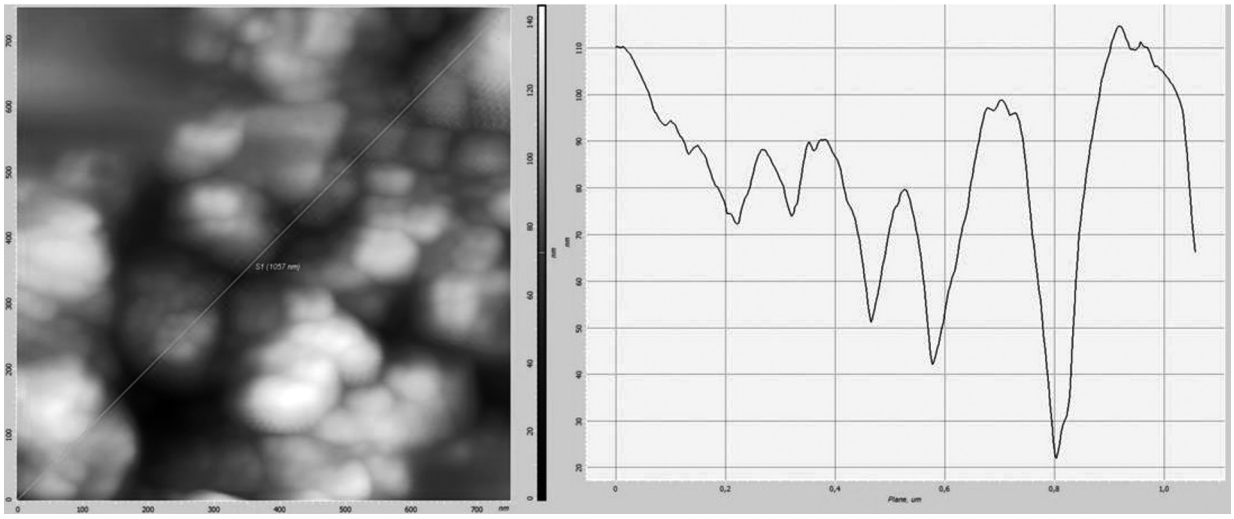
Таблица 2. **Параметры шероховатости образцов бумаги по данным АСМ**

Table 2. **Roughness parameters of paper samples according to AFM data**

Образец бумаги	Размер шероховатости *Ra* образцов для кадров, нм		
	750 нм	1500 нм	3500 нм
Образец № 1 (лицевая сторона)	15,75	35,95	61,19
Образец № 2 (лицевая сторона)	19,34	40,23	67,11
Образец № 3 (лицевая сторона)	25,12	44,05	73,22

Прямое изображение профиля поверхности на топографических изображениях взяты при использовании трех кадров: 750, 1500 и 3500 нм. Как видно из табл. 2, на разных кадрах даны отличные друг от друга значения шероховатости. Объясняется это тем, что если кадр попал на одно волокно, то значения низкие, если же на сплетение нескольких волокон, то параметр шероховатости выше. Расхождения между параметрами будут меньше при условии, если кадр попадает на фибрилированное волокно с большей удельной поверхностью.

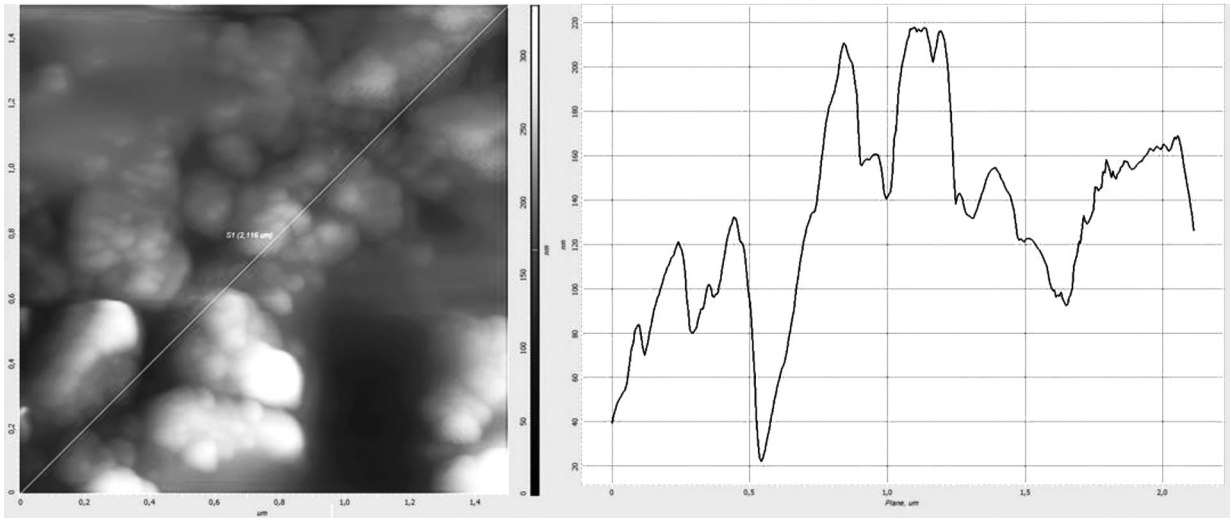
Прямое изображение профиля поверхности на топографических изображениях получены в режиме постоянной амплитуды (рис. 2–4, *b*), где высота профиля передана цветом: чем выше находится



a *b*

Рис. 2. Поверхность образца бумаги № 1 (при кадре 750 нм): *a* – топографическое АСМ-изображение; *b* – профиль рельефа выделенной линии поверхности

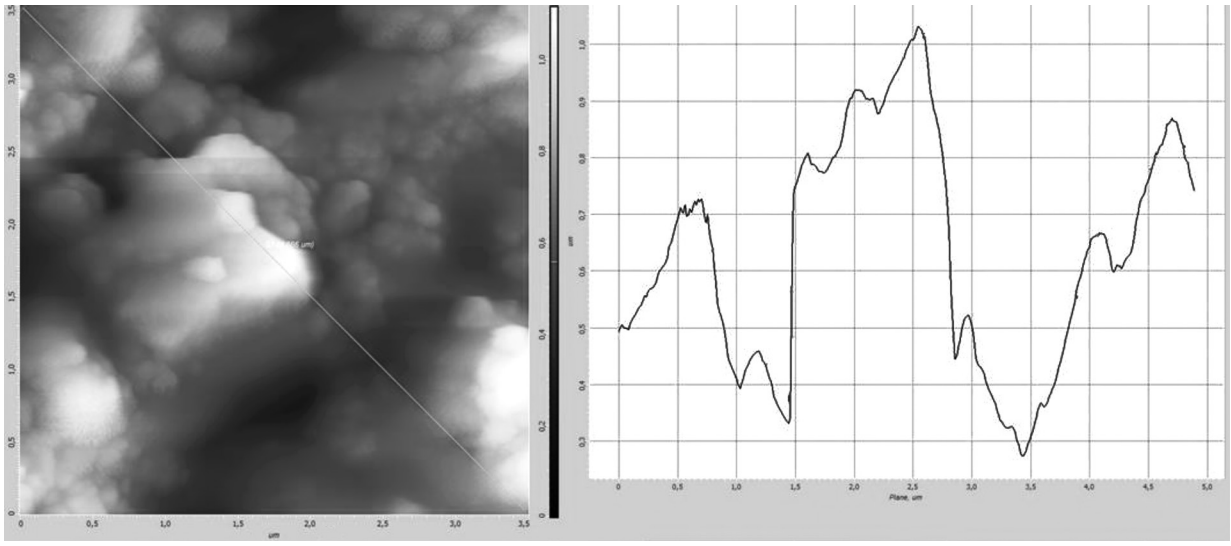
Fig. 2. Surface of paper sample № 1 (at a frame of 750 nm): *a* – topographic AFM image; *b* – relief profile of the selected surface line



a *b*

Рис. 3. Поверхность образца бумаги № 1 (при кадре 1500 нм): *a* – топографическое АСМ-изображение; *b* – профиль рельефа выделенной линии поверхности

Fig. 3. Surface of paper sample № 1 (at a frame of 1500 nm): *a* – topographic AFM image; *b* – relief profile of the selected surface line



a *b*

Рис. 4. Поверхность образца бумаги № 1 (при кадре 3500 нм): *a* – топографическое АСМ-изображение; *b* – профиль рельефа выделенной линии поверхности

Fig. 4. Surface of paper sample № 1 (at a frame of 3500 nm): *a* – topographic AFM image; *b* – relief profile of the selected surface line

деталь рельефа, тем она светлее. Небольшие углубления, выраженные затемнением на топографических АСМ-изображениях (рис. 2–4, *a*), характеризовали достаточную однородность и плотность структуры, образец бумаги № 1 обладает меньшими значениями шероховатости *Ra*.

Один из оптических свойств – лоск (глянец) (ГОСТ 12921-80) бумаги контролировали фотоэлектрическим фотометром, оптическая система осветителя которого освещала испытуемый образец параллельным пучком света под углом (45,0 ± 0,5)°. В качестве эталона поверхности, зеркально отражающей лучи, использовали черное полированное стекло, цвет которого исключает рассеянное отражение, а полированная поверхность обеспечивала зеркальное, принятое за 100 %-ное, отражение. Замеры глянца проводили в нескольких точках на каждой из сторон, затем рассчитывали среднее значение, результаты которого приведены в табл. 3.

Таблица 3. **Показатели глянца образцов бумаги из карбоната кальция**

Table 3. **Gloss parameters of calcium carbonate paper samples**

Показатель	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3
Глянец (лицевая сторона)	0,93	0,57	0,67
Глянец (сеточная сторона)	0,8	0,53	0,6

Сравнивая полученные значения глянца с нормативными данными, можно сказать, что поверхность образца бумаги № 1 обладает высокой способностью зеркально отражать падающий свет, процент отражения поверхностей образцов бумаги № 2 и 3, как у мелованной (40–70 %).

Способность материала отражать падающий свет равномерно и рассеянно по всей области видимого спектра (380–720 нм) характеризуется белизной бумаги. Материал считают белым, если он отражает более 50 % падающего света. Белизна определена с помощью фотоэлектрического метода, основанного на измерении в синей области спектра при эффективной длине волны 457 нм. Количественно белизна определена в качестве коэффициента отражения на белой стопе за синим светофильтром (табл. 4) [18].

Таблица 4. **Оптические показатели бумаги из карбоната кальция**

Table 4. **Optical parameters of calcium carbonate paper**

Показатель	Образец № 1			Образец № 2			Образец № 3		
	светофильтр			светофильтр			светофильтр		
	синий	зеленый	красный	синий	зеленый	красный	синий	зеленый	красный
Оптическая плотность	0,05	0,04	0,04	0,053	0,047	0,04	0,031	0,047	0,043
Коэффициент отражения, %	89,13	91,21	91,20	88,44	89,81	91,21	89,13	89,81	91,20

По данным табл. 4 можно сделать вывод, что каждый из образцов бумаги имеет белизну порядка 90 %. Для определения наличия оттенка бумаги рассчитывали разницу между максимальным и минимальным значениями коэффициентов отражения на белой стопе. Если разница между этими значениями больше 10 %, то бумага имеет оттенок. Табл. 4 демонстрирует, что для каждого из образцов бумаги такого отличия в коэффициентах отражения за различными зонами не наблюдается – это значит, что образцы полученных бумаг не имеют оттенка. Все это будет способствовать цветопередаче без искажений при воспроизведении многокрасочного изображения.

Способность материала пропускать свет – светонепроницаемость определяли как отношение коэффициента отражения на черной стопе бумаги за синим светофильтром к коэффициенту отражения на белой стопе за синим светофильтром, переведенный в проценты по следующей формуле:

$$H = \frac{\rho_c^{\text{чер}}}{\rho_c^{\text{бел}}} \times 100\ \%.$$

Результаты, полученные денситометрическим методом по светонепроницаемости, представлены в табл. 5.

Таблица 5. **Светонепроницаемость образцов бумаги**

Table 5. **Opacity of paper samples**

Наименование показателей	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3
Оптическая плотность синей зоны на черной подложке	0,05	0,06	0,053
Коэффициент отражения, %	89,12	87,09	88,44
Светонепроницаемость, %	100	98,48	99,24

Как видно из табл. 5, исследуемые образцы бумаги можно без ограничений рекомендовать для двусторонней печати, так как показатель светонепроницаемости $H \geq 92$ %. Для тонких бумаг данный показатель снижают до 88 %.

Выводы. Данные образцы бумаги из карбоната кальция можно рекомендовать для изданий с повышенными требованиями к качеству, так как показатели гладкости образца бумаги № 1, как у мелованной бумаги (750–1500 с), у образцов бумаги № 2 и 3 – как у бумаг каландрированных. Меньшие значения шероховатости *Ra* и небольшие углубления, выраженные затемнением на топографических АСМ-изображениях, характеризовали достаточную однородность и плотность структуры бумаги.

Поверхность образцов бумаги обладает высокой способностью зеркально отражать падающий свет; процент отражения поверхностей, как у мелованных бумаг. Образцы бумаги имеют белизну порядка 90 % и нет оттенка, так как разница между максимальным и минимальным значениями коэффициентов отражения на белой стопе не больше 10 %. Исследуемые образцы бумаги можно без ограничений рекомендовать для двусторонней печати, так как показатель светонепроницаемости больше 92 %.

Список использованных источников

1. Шахкельдян, Б. Н. Полиграфические материалы / Б. Н. Шахкельдян, Л. А. Загаринская. Бумага и переплетные материалы. – М.: Мир книги, 2001. – Ч. 1. – 104 с.

2. Chinga, G. Structural studies of LWC paper coating layers using SEM and image analysis techniques: Thesis submitted in partial fulfilment of the doktor ingeniør degree [Electronic Resource]: Doctoral thesis / G. Chinga. – February 2002. – Mode of access: https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/248044. – Date of access: 06.07.2020.

3. Investigation of the porous structure of cellulosic substrates through confocal laser scanning microscopy / D. Yang [et al.] // Biotechnology and Bioengineering. – 2013. – Vol. 110, N 11. – P. 2836–2845. https://doi.org/10.1002/bit.24958

4. Breuninger, S. White Paper: A high-quality Raman microscope can be recognized by these 5 criteria [Electronic Resource]. – Mode of access: https://www.researchgate.net/publication/329184103_White_Paper_A_high-quality_Raman_microscope_can_be_recognized_by_these_5_criteria. – Date of access: 06.07.2020.

5. AFM Observation of Coated Paper and Printed Surface [Electronic Resource] // Shimadzu. – Mode of access: http://www.shimadzu.com/an/surface/spm/data/appli/paper.html. – Date of access: 06.07.2020.

6. Микронизированный порошок карбоната кальция [Электронный ресурс] // АРТИН ПУДР ПАРС. Режим доступа: https://www.artincarb.com/products/micronized-calcium-carbonate-powders/?lang=ru

7. Пузырев, С. С. Развитие технологии для производства бумаги и картона [Электронный ресурс] / С. С. Пузырев // ЛеспромИнформ. – 2006. – № 2. – Режим доступа: https://lesprominform.ru/jarticles.html?id=1526

8. Юань Мин Чао. Тайваньская компания производит бумагу из мраморной крошки [Электронный ресурс] / Юань Мин Чао // Коммерсантъ. – 2006. Режим доступа: https://www.kommersant.ru/doc/3020213

9. Бумага из камня и вторсырья: технологии будущего? [Электронный ресурс] // It World. – 2020. – Режим доступа: https://www.it-world.ru/news-company/releases/151142.html

10. Бумага из известняка // Гелиос. – Режим доступа: https://heliosnsk.ru/raznoe/bumaga-iz-izvestnyaka.html

11. В Узбекистане нацелены на производство «каменной" бумаги [Электронный ресурс] // Народное слово. – 2019. – Режим доступа: https://xs.uz/ru/post/v-uzbekistane-natseleny-na-proizvodstvo-kamennoj-bumagi

12. В Фергане начнут выпускать бумагу из камня [Электронный ресурс] // ХДР. – 2019. – Режим доступа: https://podrobno.uz/cat/uzbekistan-i-kitay-klyuchi-ot-budushchego/v-fergane-sozdano-uzbeksko-kitayskoe-predpriyatie-/

13. Жуков, М. В. Контроль структуры различных видов бумаги методом атомно-силовой микроскопии / М. В. Жуков // Науч.-техн. вестн. информац. технологий, механики и оптики. – 2014. – № 1 (89). – С. 44–49.

14. Прямой метод контроля качества поверхности мелованных видов бумаги / А. А. Кирсанкин [и др.] // Химия раст. сырья. – 2016. – № 4. – С. 157–161. https://doi.org/10.14258/jcprm.2016041415

15. Изучение топографии материалов на целлюлозной основе методом атомно-силовой микроскопии / А. А. Кирсанкин [и др.] // Лесной вестник. – 2018. – Т. 22, № 1. – С. 84–93. https://doi.org/10.18698/2542-1468-2018-1-88-93

16. Paper – based planar reaction arrays for printed diagnostics / A. Maattanen [et al.] // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2011. – Vol. 160, N 1. – P. 1404–1412. https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.09.086

17. Исследование шероховатости бумаги из вторичного сырья методом атомно-силовой микроскопии / Х. А. Бабаханова [и др.] // Науч.-техн. вестн. информац. технологий, механики и оптики. – 2020. – Т. 20, № 5. – С. 661–666. https://doi.org/10.17586/2226-1494-2020-20-5-661-666

18. Бумага и картон. Метод определения белизны: ГОСТ 30113-94 (ИСО 2470-77). – Минск: Издательство стандартов, 1996. – 11 с.

19. Бумага для печати офсетная: ГОСТ 9094-89. – Минск: Издательство стандартов, 1989. – 12 с.

20. Тягунов, А. Г. Материаловедение: лаб. практикум / А. Г. Тягунов, С. А. Воробьев, С. П. Арапова. – Екатеринбург, 2009. – 49 с.

References

1. Shakhkeldyan B. N., Zagarinskaya L. A. *Polygraphic materials: Paper and binding materials*. Part 1. Moscow, Mir knigi Publ., 2001. 104 p. (in Russian).

2. Chinga G. *Structural studies of LWC paper coating layers using SEM and image analysis techniques: Doctoral thesis*. February 2002. Available at: https://ntnuopen.ntnu.no/ntnu-xmlui/handle/11250/248044 (accessed 06 July 2020).

3. Yang D., Moran-Mirabal J. M., Parlange J., Walker L. P. Investigation of the porous structure of cellulosic substrates through confocal laser scanning microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, vol. 110, no. 11, pp. 2836–2845. https://doi.org/10.1002/bit.24958

4. Breuninger S. *White Paper: A high-quality Raman microscope can be recognized by these 5 criteria*. Available at: https://www.researchgate.net/publication/329184103_White_Paper_A_high-quality_Raman_microscope_can_be_recognized_by_these_5_criteria. (accessed 06 July 2020).

5. AFM Observation of Coated Paper and Printed Surface. *Shimadzu*. Available at: http://www.shimadzu.com/an/surface/spm/data/appli/paper.html (accessed 06 July 2020).

6. Micronized calcium carbonate powder. *ARTIN PUDR PARS*. Available at: https://www.artincarb.com/products/micronized-calcium-carbonate-powders/?lang=ru (in Russian).

7. Puzyrev S. S. Development of technology for the production of paper and cardboard. *LespromInform*, 2006, no. 2. Available at: https://lesprominform.ru/jarticles.html?id=1526 (in Russian).

8. Yuan Ming Chao. Taiwanese company produces paper from marble chips. *Kommersant.ru*. 2006. Available at: https://www.kommersant.ru/doc/3020213 (in Russian).

9. Paper made of stone and recycled materials: technologies of the future? *It World*. 2020. Available at: https://www.it-world.ru/news-company/releases/151142.html (in Russian).

10. Limestone paper. *Gelios*. Available at: https://heliosnsk.ru/raznoe/bumaga-iz-izvestnyaka.html (in Russian).

11. In Uzbekistan, the focus is on the production of stone paper. *Narodnoe slovo*. 2019. Available at: https://xs.uz/ru/post/v-uzbekistane-natseleny-na-proizvodstvo-kamennoj-bumagi (in Russian).

12. Fergana to start producing paper from stone. *KhDR*. 2019. Available at: https://podrobno.uz/cat/uzbekistan-i-kitay-klyuchi-ot-budushchego/v-fergane-sozdano-uzbeksko-kitayskoe-predpriyatie-/ (in Russian).

13. Zhukov M. V. Structure control for different types of paper by atomic force microscopy. *Nauchno-tekhnicheskii vestnik informatsionnykh tekhnologii, mekhaniki i optiki = Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2014, no. 1 (89), pp. 44–49 (in Russian).

14. Kirsankin A. A., Mikhaleva M. G., Nikolsky S. N., Musokhrapova A. V., Stovbun S. V. Direct method of surface quality control of coated types of paper. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja* = Chemistry of plant raw material, 2016, no. 4, pp. 157–161 (in Russian). https://doi.org/10.14258/jcprm.2016041415

15. Kirsankin A. A., Mikhaleva M. G., Politenkova G. G., Nikolsky S. N., Stovbun S. V. Studying the topography of materials on cellulose basis using atomic force microscopy. Lesnoi vestnik = Forestry Bulletin, 2018, vol. 22, no. 1, pp. 84–93 (in Russian). https://doi.org/10.18698/2542-1468-2018-1-88-93

16. Maattanen A., Fors D., Wand S., Valtakari D., Ihlainen P. Paper – lased planar reaction arrays for printed diagnostics. *Sensors and Actuators B: Chemical,* 2011, vol. 160, no. 1, pp. 1404–1412. https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.09.086

17. Babakhanova H. A., Galimova Z. K., Abdunazarov M. M., Ismoilov I. I. Roughness study of paper made from secondary raw materials by atomic force microscopy. *Nauchno-tekhnicheskii vestnik informatsionnykh tekhnologii, mekhaniki i optiki = Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*, 2020, vol. 20, no. 5, pp. 661–666 (in Russian). https://doi.org/10.17586/2226-1494-2020-20-5-661-666

18. State Standard 30113-94 (ISO 2470-77). *Paper and cardboard. Method for determining whiteness*. Minsk, Publishing house of standards, 1996. 11 p. (in Russian).

19. State Standard 9094-89. *Offset printing paper*. Minsk, Publishing house of standards, 1989. 12 p. (in Russian).

20. Tyagunov A. G., Vorobiev S. A., Arapova S. P. *Materials science: laboratory practice*. Yekaterinburg, 2009. 49 p. (in Russian).

Информация об авторах

Исмаилов Икромжон Иброхим угли – докторант. Наманганский технологический институт (ул. Касансай, 7, 160115, Наманган, Республика Узбекистан). E-mail: ikromzhon.ismailov@bk.ru

Бабаханова Халима Абишевна – д-р техн. наук, профессор. Ташкентский институт текстильной и легкой промышленности (ул. Шохжахон, 5, 100100, Ташкент, Республика Узбекистан). E-mail: halima300@inbox.ru

Садриддинов Акмал Абдулло угли – докторант. Ташкентский институт текстильной и легкой промышленности (ул. Шохжахон, 5, 100100, Ташкент, Республика Узбекистан). E-mail: sadriddinovakmal0777@mail.ru

Бабаханова Мадина Авазовна – д-р хим. наук. Ташкентский институт текстильной и легкой промышленности (ул. Шохжахон, 5, 100100, Ташкент, Республика Узбекистан). E-mail: madina89@mail.ru

Саидова Дилдора Шасабировна – ст. преподаватель. Ташкентский химико-технологический институт (пр-т Навои, 32, 100011, Ташкент, Республика Узбекистан). E-mail: saidova1972@mail.ru

Information about the authors

Ikromjon Ib. Ismailov – Doctoral Student. Namangan Technological Institute (7, Kasansay str., 160115, Namangan, Republic of Uzbekistan). E-mail: ikromzhon.ismailov@bk.ru

Khalima Ab. Babakhanova – D. Sc. (Engineering), Professor. Tashkent Institute of Textile and Light Industry (5, Shokhjakhon str., 100100, Tashkent, Republic of Uzbekistan). E-mail: halima300@inbox.ru

Akmal Ab. Sadriddinov – Doctoral Student. Tashkent Institute of Textile and Light Industry (5, Shokhjakhon str., 100100, Tashkent, Republic of Uzbekistan). E-mail: sadriddinovakmal0777@mail.ru

Madina Av. Babakhanova – Ph. D. (Chemistry), Tashkent Institute of Textile and Light Industry (5, Shokhjakhon str., 100100, Tashkent, Republic of Uzbekistan). E-mail: madina89@mail.ru

Dildora Sh. Saidova – Doctoral Student. Tashkent Chemical-Technological Institute (32, Navoi str., 100011, Tashkent, Republic of Uzbekistan). E-mail: saidova1972@mail.ru

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 547-32:544.72.05
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-480-487

Поступила в редакцию 05.10.2021
Received 05.10.2021

В. М. Акулова[1], А. Е. Соломянский[1], Г. Б. Мельникова[2], Д. А. Некрашевич[1], Ю. В. Синькевич[3], И. Г. Чишанков[1], В. Е. Агабеков[1]

[1]Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
[3]Белорусский национальный технический университет, Минск, Беларусь

ЗАЩИТНЫЕ ПОКРЫТИЯ ЛЕНГМЮРА–БЛОДЖЕТТ НА ОСНОВЕ ВЫСШИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Аннотация. Исследованы морфология и трибологические свойства моно- и мультислойных пленок Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ) на основе нервоновой (НК), церотиновой (ЦК) и монтановой кислот (МК). Установлено, что ЛБ монослой МК на поверхности кремния в 11 и 1,3 раза стабильнее мономолекулярных ЛБ пленок НК и ЦК соответственно. Мультислойное покрытие МК, состоящее из 140 слоев, в 35 раз увеличивает износоустойчивость стальной поверхности.

Ключевые слова: защитное покрытие, технология Ленгмюра–Блоджетт, метод горизонтального осаждения, жирная кислота, монтановая кислота, триботехнические свойства

Для цитирования. Защитные покрытия Ленгмюра–Блоджетт на основе высших жирных кислот / В. М. Акулова [и др.] // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 480–487. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-480-487

V. M. Akulova[1], A. E. Salamianski[1], G. B. Melnikova[2], D. A. Nekrashevich[1], Yu. V. Sinkevich[3], I. G. Chishankov[1], V. E. Agabekov[1]

[1]Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2]A.V. Luikov Heat and Mass Transfer Institute of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[3]Belarusian National Technical University, Minsk, Belarus

PROTECTIVE LANGMUIR-BLODGETT COATINGS BASED ON LONG-CHAIN FATTY ACIDS

Abstract. The morphology and tribotechnical properties of Langmuir–Blodgett (LB) monolayers and multilayers of some fatty acids, such as nervonic (NA), cerotic (CA) and montanic acids (OCA), was investigated. It was established that the wear resistance of silicon surface coated by LB monolayer of OCA is greater by 11 and 1.3 times in comparison with the LB monomolecular films of NA and CA, respectively. The multilayer of OCA, formed by 140 layers, increases the stability of steel surface by 35 times.

Keywords: protective coating, Langmuir–Blodgett technique, horizontal presipitation method, fatty acid, montanic acid, tribological properties

For citation. Akulova V. M., Salamianski A. E., Melnikova G. B., Nekrashevich D. A., Sinkevich Yu. V., Chishankov I. G., Agabekov V. E. Protective Langmuir–Blodgett coatings based on long-chain fatty acids. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 480–487 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-480-487

Введение. Минимизация трения и изнашивания деталей устройств в прецизионных узлах трения повышает срок их эксплуатации [1, 2]. В частности, защита от трения и изнашивания необходима микроэлектромеханическим устройствам (МЭМС), являющихся частью гироскопов, сенсоров и систем обработки сигналов миниатюрных устройств [3]. Низкая технологичность таких систем обусловлена невысокой прочностью материала их контактирующих поверхностей, которым чаще всего является кремний [4].

Надежность и стабильность МЭМС возможно повысить за счет модификации их прецизионных узлов трения смазочными материалами, включая органосиланы, например октадецилтрихлорсилан, жирные кислоты, полибензоксазин, графен и его оксид [5, 6]. Преимущество использования жирных кислот в качестве материала защитного покрытия состоит в возможности следования принципам «Зеленой трибологии». Смазки на основе жирных кислот – более экологически чистые и менее токсичные для окружающей среды по сравнению с синтетическими аналогами [1, 2].

К примеру, важнейшим источником стеариновой кислоты (СК) являются какао и масло ши; бегеновую кислоту (БК) выделяют из растительных масел (рапсового, подсолнечного) и природных жиров (свиного и говяжьего); церотиновая кислота (ЦК) содержится в пчелином и пальмовом воске, а монтановая кислота (МК) – в пчелином и монтановом воске, получаемом из бурого угля; нервоновая кислота (НК) входит в состав масел семян *Cardamine graeca L.*, *Malania oleifera* и *Tropaeolum speciosum* [7–10].

Существуют разные способы формирования защитных покрытий – метод самоорганизации, осаждение из газовой фазы, центрифугирование, электрофоретическое осаждение и т. д., однако для работы с жирными кислотами наиболее перспективна технология Ленгмюра–Блоджетт (ЛБ) [5, 11]. С ее помощью можно получать защитные мономолекулярные покрытия, при этом нет необходимости использовать вакуум и термическую обработку [11]. В процессе эксплуатации устройств молекулы защитного покрытия ЛБ, адсорбированные на поверхности за счет сил Ван-дер-Ваальса, переносятся между контактирующими поверхностями, замедляя их износ [12].

Технология ЛБ может быть реализована различными способами [12–14]. Существуют методы горизонтального (ГО) и традиционного вертикального осаждения (ВО) [13, 14]. Традиционным способом получают как монослои насыщенных – пальмитиновой [14], стеариновой [15], арахиновой [16], так и ненасыщенных – олеиновой [17], эруковой [18] и других высших жирных кислот [14, 18]. Методом ВО также формируют мультислойные покрытия на основе миристиновой, стеариновой, бегеновой и арахиновой кислот, в основном используя субфазу, содержащую ионы металлов [19, 20]. Применяемый в данной работе метод ГО по сравнению с традиционным подходом имеет преимущества: возможность отказаться от использования растворов солей в качестве субфазы и бездефектность структуры сформированных пленок [13]. Следует отметить, что трибологические свойства монослоев высших жирных кислот, особенно ненасыщенных, мало изучены [21, 22].

Цель настоящей работы – получить защитные моно- и мультислойные покрытия Ленгмюра–Блоджетт для МЭМС и прецизионных узлов трения на основе нервоновой, церотиновой и монтановой кислот, изучить их износоустойчивость и сопоставить ее со стабильностью монослоев стеариновой и бегеновой кислот.

Материалы и методы исследования. Для получения ЛБ покрытий использовали насыщенные жирные кислоты (Sigma-Aldrich) со степенью чистоты СК ($C_{17}H_{35}COOH$), БК ($C_{21}H_{43}COOH$) ≥ 99 %, ЦК ($C_{25}H_{51}COOH$) ≥ 90 %, МК ($C_{27}H_{55}COOH$) ≥ 98 % и ненасыщенную (Cayman Chemical) НК ($CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_{13}COOH$) ≥ 90 %. Ленгмюровские слои жирных кислот формировали из их растворов в хлороформе с концентрацией 0,1 мг/мл. Монослои жирных кислот получали на пластинах из стали марки 12Х17 и кремния прямоугольной формы площадью 1,5 $см^2$ методом ГО на установке LT–201 (ОДО «Микротестмашины», Республика Беларусь). Пластины кремния предварительно подвергали гидрофилизации в растворе «пираньи» (H_2O_2 и H_2SO_4 в соотношении 1:2,5 по объему) в течение 45 мин при температуре 50,0 °С. Условия получения монослоев методом ГО: субфаза – дистиллированная вода температурой 25,0 °С, линейная скорость сжатия барьеров – 0,2 мм/с; поверхностное давление формирования монослоев ЦК – 16 мН/м, НК – 20 мН/м, СК, БК и МК – 30 мН/м.

Мультислойные покрытия МК получали методом ВО при условиях, как и для их монослоев: скорость перемещения подложки – 0,024 мм/с, количество слоев в мультислоях МК – 60 и 140, тип выделения – Y.

Морфологию и шероховатость образцов, сформированных на кремнии, исследовали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) на микроскопе Nanoscope IIID (Veeco Instrument, США). Условия сканирования: скорость – 3–5 Гц; стандартный кремниевый кантилевер с жесткостью 0,12 Н/м. Разрешение получаемых изображений составляло 512 × 512 точек. Толщину монослоев жирных кислот оценивали через дефект в их структуре, искусственно созданный кантилевером микроскопа. Шероховатость исходной стали марки 12Х17 и модифицированной моно- и мультислойными покрытиями МК определяли, используя профилометр М2 (Mahr, Германия).

Краевой угол смачивания (КУС) покрытий жирных кислот на кремниевых и стальных поверхностях измеряли методом «неподвижной» капли дистиллированной воды объемом 3 мкл на приборе DSA100E (Kruss, Германия).

Износоустойчивость покрытий изучали на трибометре возвратно-поступательного типа (Институт механики металлополимерных систем им. В. А. Белого НАН Беларуси). Условия трибоиспытаний: приложенная нагрузка – 1,0 Н, индентор – стальной шарик диаметром 3,0 мм (сталь 95Х18), длина хода индентора – 3,0 мм, его линейная скорость – 4,0 мм/с. Тестирование образцов прекращали при достижении значений коэффициента трения (k_f) ~0,4 для кремниевых поверхностей [11] и ~0,5 для стальных [6].

Результаты и их обсуждение. Значения минимальной площади на молекулу ленгмюровских слоев насыщенных высших жирных кислот в фазовом состоянии «твердая пленка» (A_0) для СК, БК и МК составляет 0,19 нм^2; ЦК – 0,20 нм^2 (рис. 1).

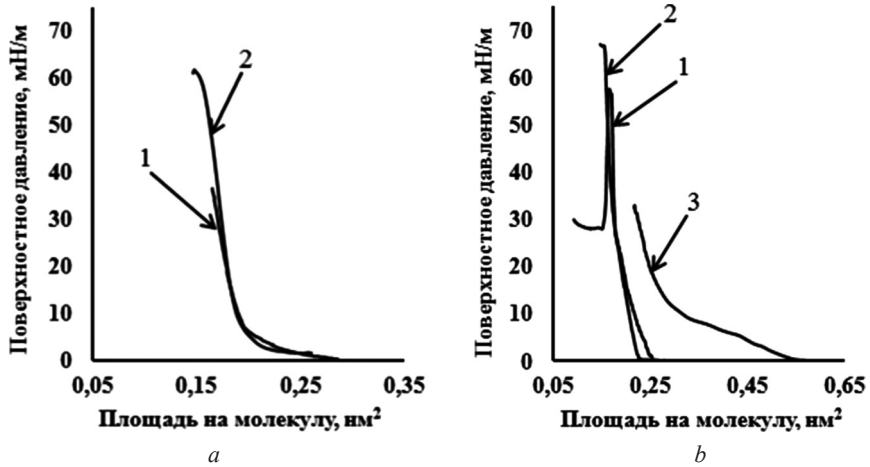
Коллапс ленгмюровских слоев СК, БК и МК наблюдается при π >55 мН/м, в случае слоя ЦК – 36 мН/м. Для ЦК значение A_0 незначительно больше по сравнению с другими насыщенными жирными кислотами, это свидетельствует о том, что молекулы ЦК образуют на водной поверхности высокоупорядоченный плотный монослой [23].

Для ленгмюровского слоя НК в фазовом состоянии «твердая пленка» A_0 составляет 0,30 нм^2, а его разрушение наблюдается при поверхностном давлении 33 мН/м (рис. 1, *b*). Наличие двойной связи в молекулах НК уменьшает плотность упаковки образуемых ими монослоев по сравнению с ленгмюровскими слоями насыщенных жирных кислот [23].

Монослои ЛБ насыщенных жирных кислот содержат в своей структуре точечные углубления – дефекты (рис. 2), так называемые «пинхолы» [24]. Шероховатость монослоев СК, БК, МК, ЦК и НК, сформированных на кремнии, свидетельствует об их однородности (табл. 1).

Мономолекулярные пленки жирных кислот, полученные методом ГО, различаются своей толщиной: СК – 2,2 нм [25], БК – 2,7 нм [12], ЦК – 2,9 нм (рис. 2, *a*), МК – 3,2 нм (рис. 2, *b*), а НК – 2,4 нм (рис. 2, *c*). Таким образом, длина неполярной части молекул изученных жирных кислот влияет на толщину формируемого монослоя. При этом углеводородные хвосты молекул СК, БК, ЦК, МК и НК незначительно отклонены от вертикального положения в их монослоях ЛБ [12, 25].

Значения КУС кремниевой поверхности ~5° [5]. Для покрытия МК, полученного на кремнии, установлен наибольший КУС водой среди рассматриваемых жирных кислот – 64,3° ± 1,6° (рис. 3, *a*), который превосходит КУС для монослоя НК – 45,3 ± 0,9° (рис. 3, *b*). Это с свидетельствует о том, что покрытие из ненасыщенной НК проявляет более гидрофильные свойства по сравнению с монослоем МК вследствие меньшей плотности упаковки молекул в монослое НК, что подтверждается изотермами сжатия ленгмюровских слоев жирных кислот. При нанесении капли воды на кремний, модифицированный монослоем ЛБ насыщенной жирной кислоты, вода проникает в «пинхол» дефекты, что приводит к реорганизации ЛБ покрытия и ее контакту с гидрофильной кремниевой поверхностью [24, 26].



a *b*

Рис. 1. Зависимость поверхностного давления (π) от площади на молекулу (*A*) на водной поверхности для ленгмюровских слоев: *a* – *1* – ЦК, *2* – МК; *b* – *1* – СК, *2* – БК, *3* – НК

Fig. 1. The surface pressure–area per molecule (π –*A*) isotherms for Langmuir layers of fatty acids on aqueous subphase: *a* – *1* – CA, *2* – OCA; *b* – *1* – SA, *2* – BA, *3* – NA

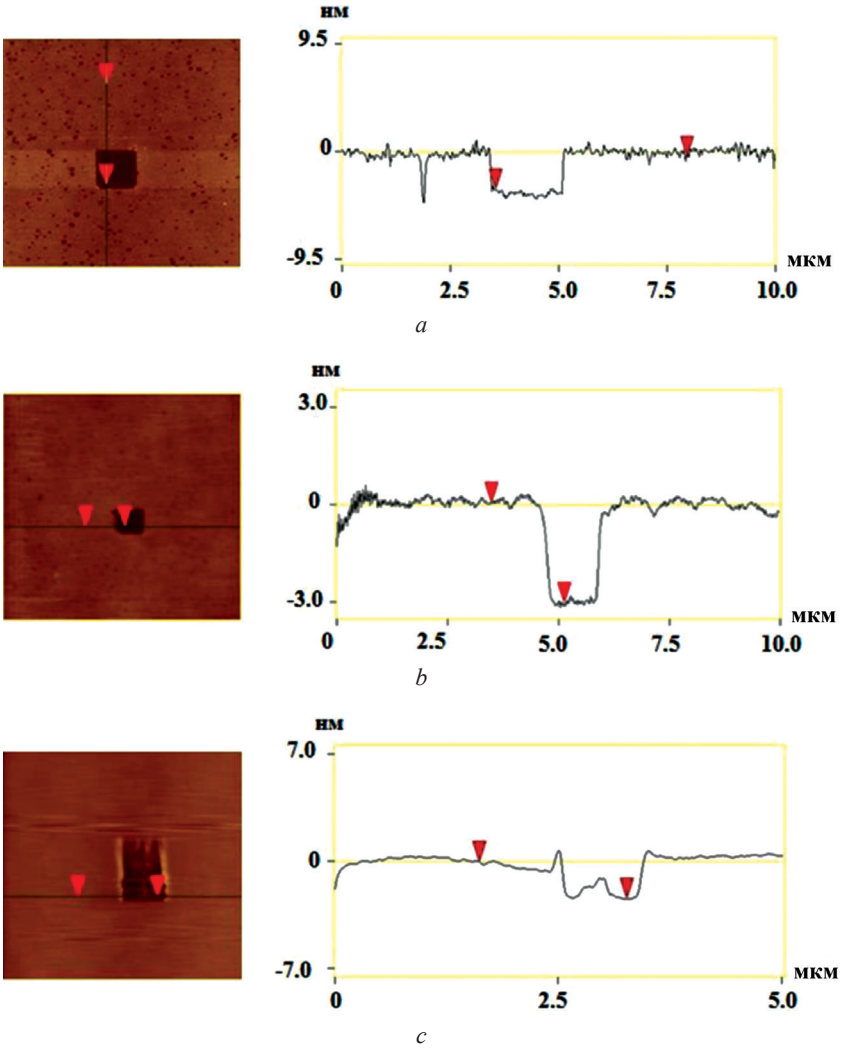


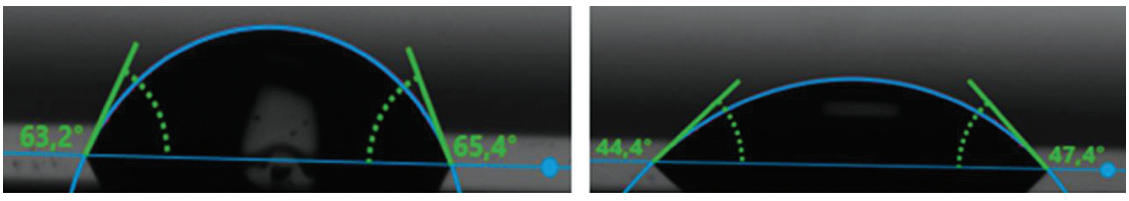
Рис. 2. АСМ-изображение искусственного дефекта в монослое и профиль его поперечного сечения: *a* – ЦК, *b* – МК, *c* – НК

Fig. 2. AFM-image of an artificial defect in monolayer and profile of its cross-section profile: *a* – CA, *b* – OCA, *c* – NA

Таблица 1. **Значения шероховатости монослоев высших жирных кислот**

Table 1. **The roughness of monolayers of long-chain fatty acids**

Монослой	СК	БК	ЦК	МК	НК
R_a, нм	0,26	0,26	0,58	0,35	0,37
R_z, нм	0,85	0,81	0,85	0,57	0,87



a *b*

Рис. 3. Краевой угол смачивания водой кремниевых поверхностей, модифицированных мономолекулярными ЛБ пленками жирных кислот: *a* – МК, *b* – НК

Fig. 3. Water contact angle of the silicon surface modified by monomolecular LB films of fatty acids: *a* – OCA, *b* – NA

Кремний при нагрузке 1,0 Н разрушается в течение одного цикла скольжения, при этом коэффициент трения материала возрастает от 0,25 до 0,70. Кремниевые поверхности, модифицированные монослоями СК, БК, ЦК, МК и НК, выдерживают 106,0 ± 25,0, 340,0 ± 25,0, 625,0 ± 60,0, 780,0 ± 15,0 и 70,0 ± 9,0 циклов скольжения (рис. 4). Значения k_f для насыщенных жирных кислот не превышает ~0,07, а для покрытия НК k_f равен ~0,08. Износостойкость пленок МК выше по сравнению с СК, БК и ЦК в 7,5, 2,3, 1,3 раза соответственно, поскольку у МК больше длина молекул [27].

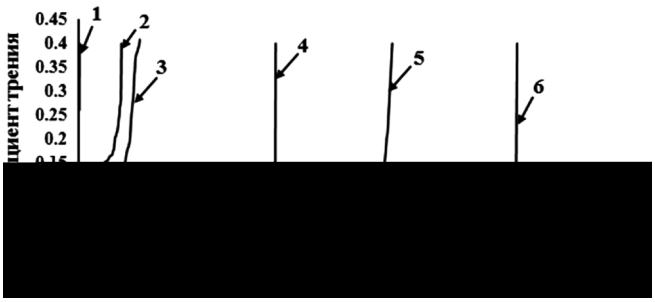


Рис. 4. Зависимость коэффициента трения от числа циклов скольжения для покрытий, полученных на кремнии: *1* – немодифицированная кремниевая поверхность, монослои: *2* – НК, *3* – СК, *4* – БК, *5* – ЦК, *6* – МК

Fig. 4. The friction coefficient as a function of the number of sliding cycles for coatings formed on silicon: *1* – unmodified silicon surface, monolayers: *2* – NA, *3* – SA, *4* – BA, *5* – CA, *6* – OCA

Следует отметить, что покрытия СК, БК и МК стабильнее монослоя НК в 1,5, 5 и 11 раз соответственно. Низкая износоустойчивость покрытия НК по сравнению с монослоями насыщенных высших жирных кислот объясняется не длиной молекул НК, а меньшей плотностью упаковки молекул в монослое НК, что также подтверждается его значением КУС водой.

Покрытие МК обладает наибольшим КУС водой и износоустойчивостью на кремнии среди рассматриваемых жирных кислот, по этой причине изучены поверхностные и трибологические свойства моно- и мультислоев МК, сформированных на поверхности стали 12Х17. Монослой МК не оказывает влияние на шероховатость стальной поверхности (табл. 2). Увеличение толщины покрытий МК за счет наращивания количества слоев нарушает их однородность и упорядоченность, что приводит к незначительному ухудшению гидрофобных свойств модифицированной стальной поверхности [4].

Таблица 2. **Значения шероховатости и КУС моно- и мультислоев МК, сформированных на стали 12Х17**

Table 2. **Roughness and water contact angle of OCA mono- and multilayers formed on steel AISI 430**

Количество слоев на стали 12Х17	R_a, мкм	R_z, мкм	КУС водой, град.
0	0,025	0,19	82,0 ± 0,2
1	0,025	0,20	104,0 ± 0,1
60	0,031	0,23	99,5 ± 0,5
140	0,035	0,28	101,7 ± 0,1

Исходная сталь 12Х17 выдерживает 4 цикла скольжения стального шарика (k_f ~ 0,2), а покрытая монослойным покрытием МК – 40,0 ± 4,0 циклов (k_f ~ 0,1) (рис. 5).

Поверхность стали, покрытая 60 и 140 слоями МК, изнашивается в течение 85,0 ± 20,0 и 138,0 ± 20,0 циклов скольжения соответственно. При этом для испытываемых поверхностей значения k_f не превышают ~ 0,04. Таким образом, присутствие на стальной поверхности мультислойного покрытия МК, содержащего 140 слоев, увеличивает в 3,5 и 35 раз ее износоустойчивость по сравнению с монослоем МК и немодифицированной сталью, что обусловлено увеличением количества МК в узле трения [2].

Модифицированные кремниевые поверхности в 19,5 раза стабильнее стальных подложек, хотя их КУС водой не превышает 70°. Существенное различие в износоустойчивости и смачиваемости модифицированных кремниевых и стальных подложек, по-видимому, связано с тем, что шероховатость стали R_a ~ 25,0 нм больше, чем

Рис. 5. Зависимость коэффициента трения от числа циклов скольжения на стали: *1* – немодифицированная стальная поверхность, *2* – монослой МК, *3* – 60 слоев МК, *4* – 140 слоев МК

Fig. 5. The friction coefficient as a function of the number of sliding cycles on steel: *1* – unmodified steel surface, *2* – LB monomolecular film of OCA, *3* – 60 layers of OCA, *4* – 140 layers of OCA

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)

АГЛЯДЫ
REVIEWS

УДК 577.152.33+577.152.16
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-488-501

Поступила в редакцию 15.08.2021
Received 15.08.2021

Н. М. Литвинко

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

СОПРЯЖЕНИЕ ФОСФОЛИПОЛИЗА И МОНООКСИГЕНАЗНОГО КАТАЛИЗА

Аннотация. Представлен обзор основных экспериментальных результатов в области исследования взаимодействия *in vivo* и *in vitro* ферментных систем, ответственных за метаболизм арахидоновой кислоты. Обсуждаются возможные взаимосвязи на пути ее высвобождения из фосфолипидов (фосфолипазы A_2) до превращения (цитохромы Р450) в важнейшие внутриклеточные мессенджеры передачи внешнего сигнала на внутренний «язык клетки».

Ключевые слова: фосфолипазы A_2, цитохромы Р450, монооксигеназы, гидролиз фосфолипидов

Для цитирования. Литвинко, Н. М. Сопряжение фосфолиполиза и монооксигеназного катализа / Н. М. Литвинко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 488–501. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-488-501

N. M. Litvinko

Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

INTERCONNECTION OF PHOSPHOLIPOLYSIS AND MONOOXYGENASE CATALYSIS

Abstract. A review of the main experimental results in the field of studying the interaction *in vivo* and *in vitro* of enzyme systems responsible for the metabolism of arachidonic acid is presented. Metabolic events from its release from phospholipids (phospholipase A_2) to its transformation (cytochromes P450) into the most important intracellular messengers of external signal transmission to the internal "language of the cell" are discussed.

Keywords: phospholipases A_2, cytochromes P450, monooxygenases, hydrolysis of phospholipids

For citation. Litvinko N. M. Interconnection of phospholipolysis and monooxygenase catalysis. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 488–501 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-488-501

Введение. Фосфолиполиз – один из ключевых процессов метаболизма при обновлении фосфолипидов в организме, происходит под действием гидролитических ферментов семейства фосфолипаз. Они классифицируются в зависимости от расщепляемой связи в молекуле фосфоглицеридов: A_1 ($ФЛА_1$, КФ 3.1.1.4) и A_2 ($ФЛА_2$, КФ 3.1.1.4) – сложноэфирные связи в положениях 1 и 2 глицеринового скелета, B (лизофосфолипаза, КФ 3.1.1.5) – сложноэфирные связи, сохранившиеся после действия $ФЛА_1$ или $ФЛА_2$, C (ФЛС, КФ 3.1.4.3) и D (ФЛD, КФ 3.1.4.4) – фосфоэфирные связи в фосфорилированном остатке аминоспирта [1, 2]. В результате монооксигеназного катализа, осуществляемого ферментами семейства цитохрома Р450 (КФ 1.14.14.1, CYP), обеспечивается превращение *in vivo* широкого спектра соединений как эндогенного, так и экзогенного происхождения, в том числе стероидов, простагландинов, лейкотриенов, витаминов группы D, жирных кислот, эйкозаноидов и других липидных метаболитов, а также ретиноидов, цитокинов, проканцерогенов, антиоксидантов, пестицидов, анестетиков и др. [2, 3]. CYP является мембранносвязанным белком подобно рецепторам G-белка и тирозин киназы, через взаимодействие с которыми опосредуется участие фосфолипаз в функционировании передачи внешнего сигнала на внутренний

© Литвинко Н. М., 2021

ствием фосфолипаз, приводит к инактивации ряда мембранносвязанных ферментов, в частности цитохрома Р450 [7]. Поскольку одна из основных функций $ФЛА_2$ в организме связана с высвобождением из фосфолипидов арахидоновой кислоты, в превращении которой в биологически важные метаболиты (эпоксиэйкозатриеновые и гидроксиэйкозатетраеновые кислоты) инициирующую роль играет монооксигеназная функция CYP (RH (субстрат) + O_2 + НАДФН + H^+ → ROH (продукт) + H_2O + $НАДФ^+$), установление сопряжения фосфолиполиза с монооксигеназным катализом представляет особый интерес.

Роль фосфолипазы A_2 в клеточной гибели. Суперсемейство $ФЛА_2$, которое в настоящее время наиболее исследовано, включает набор вне- и внутриклеточных ферментов 16 таксономических групп [8–11]. Внеклеточные (секреторные) $ФЛА_2$ ($сФЛА_2$) имеют низкие молекулярные массы (13–18 кДа), при функционировании требуют миллимолярных концентраций кальция для каталитической активности и не проявляют значительной избирательности по отщепляемым жирным кислотам *in vitro*. В клетках млекопитающих существует до шести различных групп с $ФЛА_2$: группы IB, IIA, IIC – F, III, V, X и XII [8, 11]. Внутриклеточные $ФЛА_2$ на основании необходимости Ca^{2+} для проявления активности подразделяются на $цФЛА_2$ (цитозольную кальций-зависимую, группа IV) и $iФЛА_2$ (цитозольную кальций-независимую, группа VI). $цФЛА_2$ требует Ca^{2+} в микромолярной концентрации для транслокации через мембрану, но не для катализа, предпочтительнее фосфолипидов, содержащих арахидоновую кислоту (АК), и имеет высокую молекулярную массу (> 60 кДа). $iФЛА_2$ не проявляет субстратной специфичности к АК-содержащим фосфолипидам, не требует Ca^{2+} для активности и имеет высокую молекулярную массу (около 85 кДа) [9]. Существует также класс $ФЛА_2$, называемых ацетилгидролазами фактора активации тромбоцитов (ФАТ), их основным субстратом является ФАТ, из которого они высвобождают ацетильную группу, присутствующую в положении *sn*-2.

Гидролитическая реакция, катализируемая $ФЛА_2$, – это основной путь, через который АК высвобождается из фосфолипидов (рис. 2) [12].

Активация $ФЛА_2$ приводит к разрушению мембранных фосфолипидов и накоплению ненасыщенных свободных жирных кислот и лизофосфолипидов. Лизофосфолипиды могут нарушать гомеостаз мембран за счет увеличения их текучести и проницаемости [13]. Арахидоновая кислота может напрямую влиять на ионные каналы [14, 15], увеличивать время открытия поры перехода в процессе обеспечения проницаемости митохондрий [16] и активировать внеклеточную регулируемую внешними сигналами киназу 1 и 2 (ERK1/2), c-Jun N-терминальную киназу (JNK) и p38 MAPKs [17]. Однако большинство биологических эффектов арахидоновой кислоты обусловлено ее метаболизмом, главным образом с участием трех различных групп ферментов: циклооксигеназ, липоксигеназ и цитохромов Р450.

Метаболизм АК после отщепления $ФЛА_2$ при гидролизе фосфолипидов происходит под действием циклооксигеназ (ЦОГ-1, молекулярной массы 67 кДа и ЦОГ-2, молекулярной массы 72 кДа) и приводит к образованию простагландинов, простациклина и тромбоксанов, играющих важную роль во многих физиологических и патофизиологических процессах, таких как расширение и сужение сосудов, воспаление, тромбоз, овуляция, митогенез, функция почек и т. д. [18].

Метаболизм свободной арахидоновой кислоты с помощью 5-липоксигеназы приводит к образованию лейкотриенов, которые играют важную роль в качестве медиаторов различных воспалительных и аллергических реакций (рис. 2). В отличие от простагландинов, лейкотриены производятся преимущественно воспалительными клетками, такими как полиморфно-ядерные лейкоциты, макрофаги и тучные клетки [18].

$ФЛА_2$ играют важную роль в гибели клеток, которая происходит через некроз или апоптоз. Несколько обзоров посвящены специфической роли фосфолипазы A_2 в гибели клеток [19–21]. При некрозе происходит набухание клеток и органелл, истощение АТФ, наблюдается повышенная проницаемость плазматической мембраны с высвобождением макромолекул. Во время некроза активность $ФЛА_2$ увеличивается, вызывая ускоренный гидролиз мембранных фосфолипидов, что в свою очередь увеличивает проницаемость плазматической мембраны и лизис клеток [20]. Апоптоз характеризуется фрагментированными ядрами с конденсированным хроматином, сморщенной цитоплазмой внутри почти неповрежденной плазматической мембраны и активацией

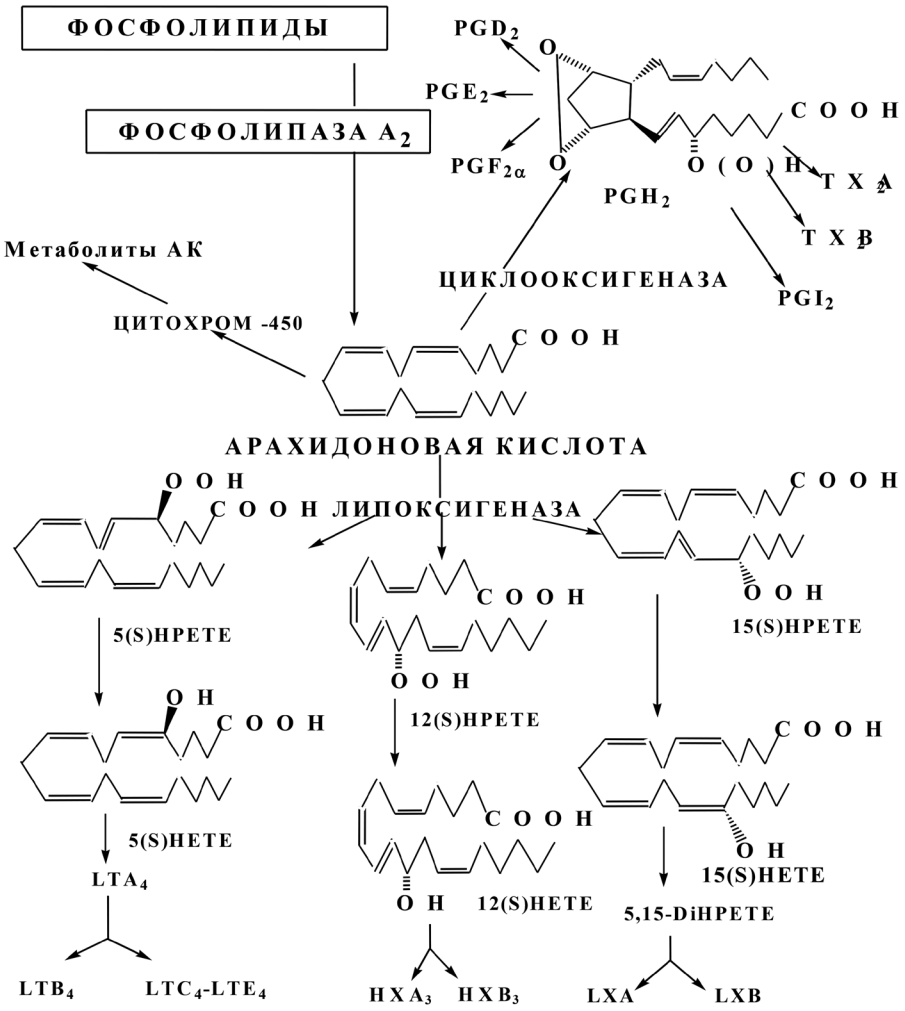


Рис. 2. Схема метаболизма АК

Fig. 2. Scheme of AA metabolism

каспазы без истощения АТФ [22]. Роль $ФЛА_2$ в апоптозе зависит от стимула и типа клетки. Например, $цФЛА_2$ необходима для TNF-альфа-индуцированного апоптоза в некоторых типах клеток [21]. Напротив, $цФЛА_2$ не требуется для Fas-индуцированного апоптоза и в этом случае $цФЛА_2$ расщепляется каспазой 3 [23].

Метаболизм арахидоновой кислоты цитохромом Р450. В результате основных путей метаболизма арахидоновой кислоты, катализируемых цитохромом Р450, образуются метаболиты, которые подразделяются на две группы: 1) эпоксиэйкозатриеновые кислоты (EET; включая 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET и 14,15-EET), образованные CYP-эпоксигеназами, в первую очередь изоформами CYP2C и CYP2J у людей; 2) гидроксиэйкозатетраеновые кислоты (HETE; в основном 20-HETE и 19-HETE), производные арахидоновой кислоты, которые гидроксилируются на N-конце или рядом с ним CYP – N-оксидазами, в первую очередь CYP4A и CYP4F у человека (рис. 2) [24].

Липооксигеназоподобные продукты АК (аллиловые спирты, содержащие цис-транс-конъюгированную диенольную функциональность), как правило, являются второстепенными продуктами метаболизма АК под действием цитохрома Р450 [25]. Кроме того, при автоокислении АК активными формами кислорода (АФК), производенными с участием цитохрома Р450, образуются гидропероксиды липидов в качестве первичных продуктов окисления (рис. 3) [26, 27]. Образование АФК может значительно варьировать в зависимости от Р450, отсутствия или присутствия субстрата, природы субстрата и действия цитохрома b5 [28]. Анализ четырех цитохромов Р450 человека показал, что их относительные способности генерировать АФК были CYP3A4 > CYP1A1 > CYP1A2 = CYP2B6 [29].

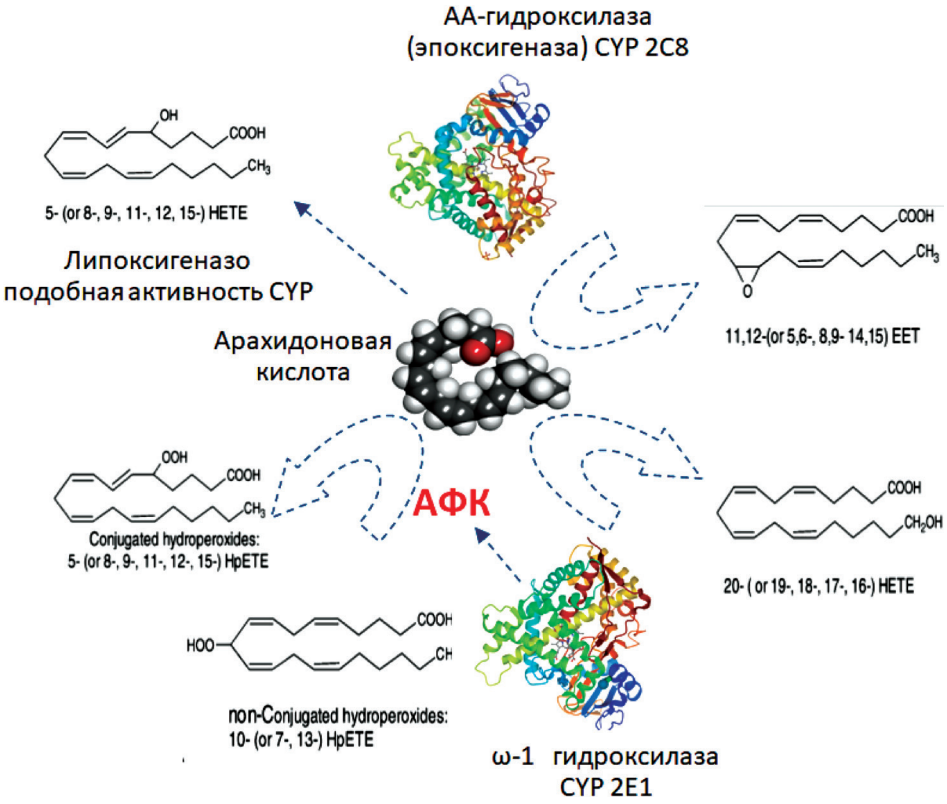


Рис. 3. Схема путей метаболизма арахидоновой кислоты (АК) с участием цитохрома Р450 и производимых цитохромом Р450 активных форм кислорода (АФК), включая продукты действия АК-эпоксигеназы (PDB, код 1PQ2) и АК-ω-1 гидроксилазы (PDB, код 3T3Z), липооксигеназоподобной активности CYP, а также продукты первичного свободнорадикального окисления. Арахидоновая кислота сокращенно обозначается ETE (эйкозатетраеновая кислота) и, следовательно, HETE – гидроксиэйкозатетраеновая, HpETE – гидропероксиэйкозатетраеновая, EET – эпоксиэйкозатетраеновая кислота

Fig. 3. Scheme of the metabolic pathways of arachidonic acid (AA) with the participation of cytochrome P450 and cytochrome P450-produced reactive oxygen species (ROS), including the products of action of AA-epoxygenase (PDB, code 1PQ2) and AK-ω-1 hydroxylase (PDB, code 3T3Z), lipoxygenase-like activity of CYP, as well as products of primary free radical oxidation. Arachidonic acid is abbreviated as ETE (eicosatetraenoic acid) and therefore HETE stands for hydroxyeicosatetraenoic acid, HpETE stands for hydroperoxyeicosatetraenoic acid and EET stands for epoxyeicosatetraenoic acid

Активность цитохрома Р450 представляет собой значительный источник метаболитов, производных арахидоновой кислоты, и реактивно способных веществ, которые оказывают значительное влияние на клеточную функцию. Было продемонстрировано, что EET гиперполяризует и расслабляет гладкомышечные клетки сосудов за счет активации кальций-чувствительных калиевых каналов. Напротив, 20-HETE является сосудосуживающим средством, вызывающим блокаду этих каналов [30].

В дополнение к этим эффектам на мембранный потенциал и тонус сосудов произведенные Р450 метаболиты АК могут активировать внутриклеточные системы вторичных мессенджеров, которые участвуют в регуляции воспаления, миграции клеток, апоптоза и агрегации тромбоцитов [25, 31]. EET активируют сигнальные пути тирозинкиназы, ERK1/2, p38 MAP и PI3 киназы в эндотелиальных и эпителиальных клетках [31]. Гидропероксиды липидов могут оказывать негативное действие из-за нарушения структуры и функции мембраны и в результате участия в окислительно-восстановительных реакциях, таких как катализируемое железом перекисное окисление цепи, опосредованное свободными радикалами [32].

Цитохром Р450 и цитотоксическое действие, опосредованное ФЛА$_2$ и АК. Очищенный CYP2E1, изоформа цитохрома Р450, индуцируемая в печени при диабете, голодании и употреблении алкоголя, превращает АК в основном в гидроксилированные метаболиты N-1 и N-2 (19- и 18-гидроксиэйкозатетраеновая кислота, 78 %, и EET, 18 %) [33]. CYP2E1 является важным

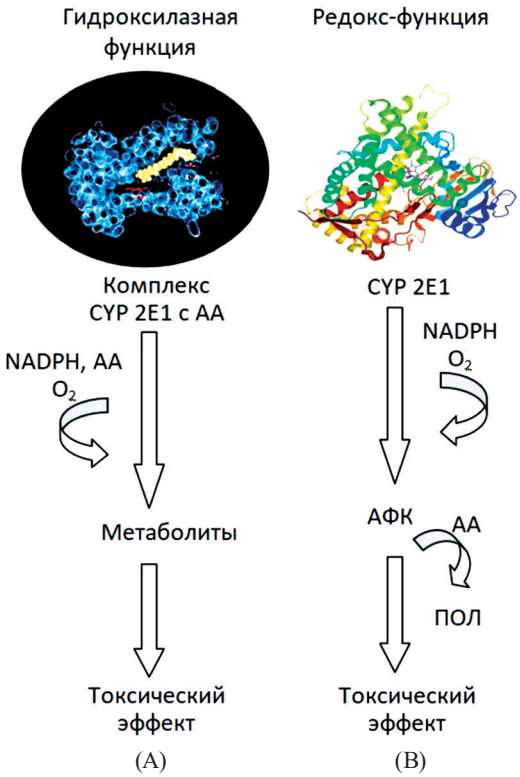


Рис. 4. Возможная роль CYP2E1 [3] как промотора токсичности арахидоновой кислоты. (A) CYP2E1 человека (PDB, код 3T3Z) может напрямую окислять арахидоновую кислоту до реакционноспособных метаболитов, которые вызывают цитотоксический эффект. (B) Активные формы кислорода, генерируемые CYP2E1, могут реагировать с арахидоновой кислотой до осуществления токсичности через перекисное окисление липидов

Fig. 4. Possible role of CYP2E1 [3] as a promoter of arachidonic acid toxicity. (A) Human CYP2E1 (PDB, code 3T3Z) can directly oxidize arachidonic acid to reactive metabolites that cause cytotoxic effects. (B) Reactive oxygen species generated by CYP2E1 can react with arachidonic acid prior to lipid peroxidation toxicity

источником микросомальных АФК, которые могут участвовать в неферментативном окислении АК (рис. 4). Микросомы, выделенные из животных, предварительно обработанные индукторами CYP2E1 или CYP2B4 [34] или CYP2B4 [35], демонстрируют намного большую скорость окисления NADPH или анилина соответственно, чем микросомы неиндуцированных животных [34, 35]. Повышенная оксидазная активность приводит к росту продукции АФК и это проявляется в увеличении скорости перекисного окисления липидов (ПОЛ) микросомами или липосомами, обогащенными CYP2E1 [34, 36]. Антитела против CYP2E1 частично ингибируют продукцию пероксида микросомами и в то же время почти полностью ингибируя НАДФН-зависимое ПОЛ [34, 35].

Клетки HepG2, экспрессирующие CYP2E1, в отсутствие ингибиторов этой изоформы CYP показали увеличение внутриклеточной продукции активных форм кислорода на 40–50 %, что было оценено по окислению диацетата дихлорфлуоресцеина в интактных клетках [37] и увеличению ПОЛ по сравнению с контролем [38]. АК индуцировала зависящую от концентрации и времени цитотоксичность в клетках HepG2, экспрессирующих CYP2E1, тогда как в контрольных клетках HepG2 была обнаружена значительно меньшая токсичность или ее отсутствие. Токсичность была связана с повышенным перекисным окислением клеточных липидов, а экзогенное воздействие антиоксидантов подавляло как ПОЛ, так и токсичность [39]. Инкубация клеток, экспрессирующих CYP2E1, с АК показала особенности, характерные для апоптоза, такие как лэддеринг ДНК [39] и повышенную активность цитохрома С и каспазы 3 [40], а также увеличивала раннее поглощение трипанового синего, что указывает на изменение проницаемости плазматической мембраны, как признака некроза [41].

Воздействие АК в присутствии Fe на клетки, сверхэкспрессирующие CYP2E1, вызывает ранние повреждения митохондрий (т. е. до начала гибели клеток), которые предотвращаются антиоксидантами, указывая на связь окислительного стресса с деградацией митохондрий [42]. Тот факт,

что сверхэкспрессия митохондриальной каталазы защищает клетки с избыточной экспрессией CYP2E1 от АК-зависимой токсичности, предполагает, что митохондрии являются важной мишенью для CYP2E1-зависимого окислительного стресса [40].

Ряд исследований показал, что АФК в клеточных системах могут активировать $ФЛА_2$, измеряемую как повышенное высвобождение радиоактивной АК в предварительно меченых клетках [43, 44]. Эти результаты предполагают, что высвобождение накопленного кальция с помощью комплекса (АК + Fe) в клетках, экспрессирующих CYP2E1, индуцированное ПОЛ, может первоначально активировать $ФЛА_2$, что имеет решающее значение для последующего увеличения притока внеклеточного Ca^{2+}. Установлено *in vivo*, что сочетание повышенной активности $ФЛА_2$, внутриклеточного кальция и окислительного стресса вызывает повреждение митохондрий (рис. 5).

Активация $ФЛА_2$, связанная с окислительным стрессом, в этих моделях была предложена как критический фактор цитотоксичности [3]. Активация $ФЛА_2$ *in vitro* по отношению к УФ-окисленным фосфолипидам наблюдалась независимо от их структурной организации (мицеллы с детергентом или липосомы) и от специфичности фермента ($ФЛА_2$ яда змеи – к нейтральным липидам, $ФЛА_2$ панкреаса – к «кислым» липидам) [45, 46].

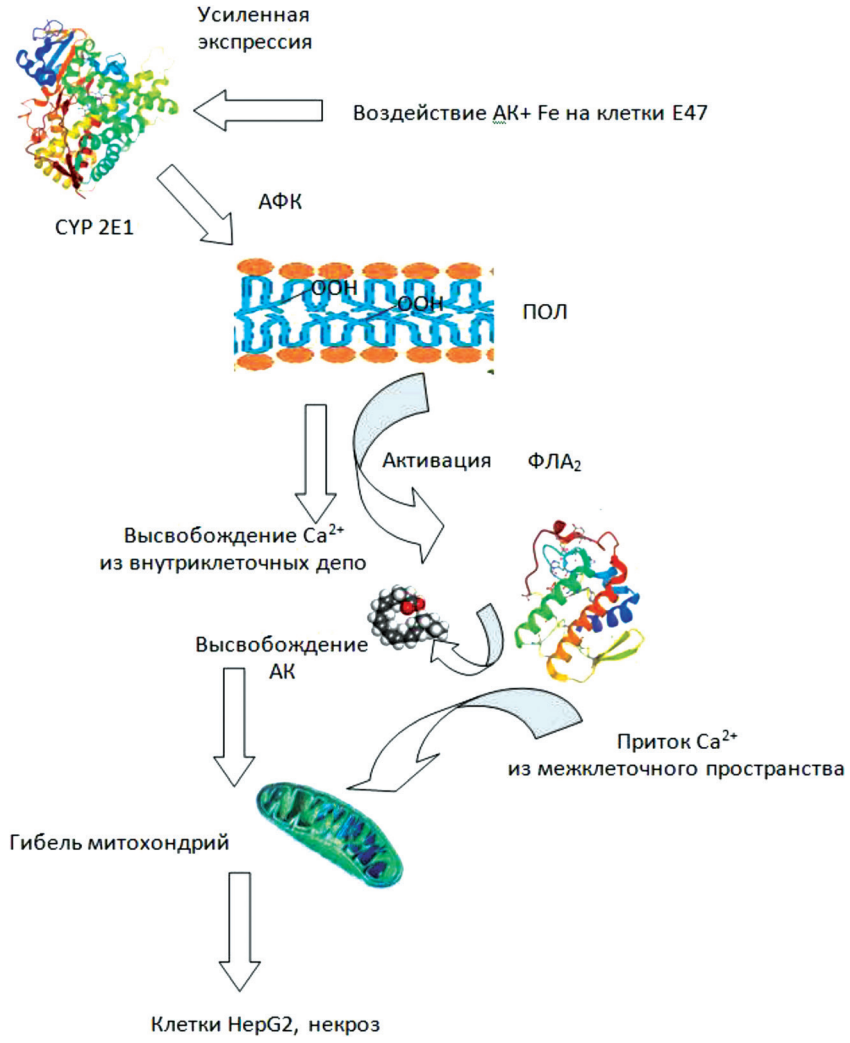


Рис. 5. Предлагаемый механизм [3] зависимой от перекисного окисления липидов активации $ФЛА_2$ (PDB, код 3U8D – участвует в метаболизме АК), высвобождение АК и апоптоз клеток HepG2, усиленно экспрессирующих CYP2E1 (клетки E47) (PDB, код 3LC4, показан в комплексе с производным жирной кислоты – омега-имидазоил-додекановой кислотой)

Fig. 5. The proposed mechanism [3] of lipid peroxidation-dependent activation of PLA_2 (PDB, code 3U8D – participates in AA metabolism), release of AA and apoptosis of HepG2 cells, strongly expressing CYP2E1 (E47 cells) (PDB, code 3LC4, shown in the complex with a fatty acid derivative – omega-imidazoyl-dodecanoic acid)

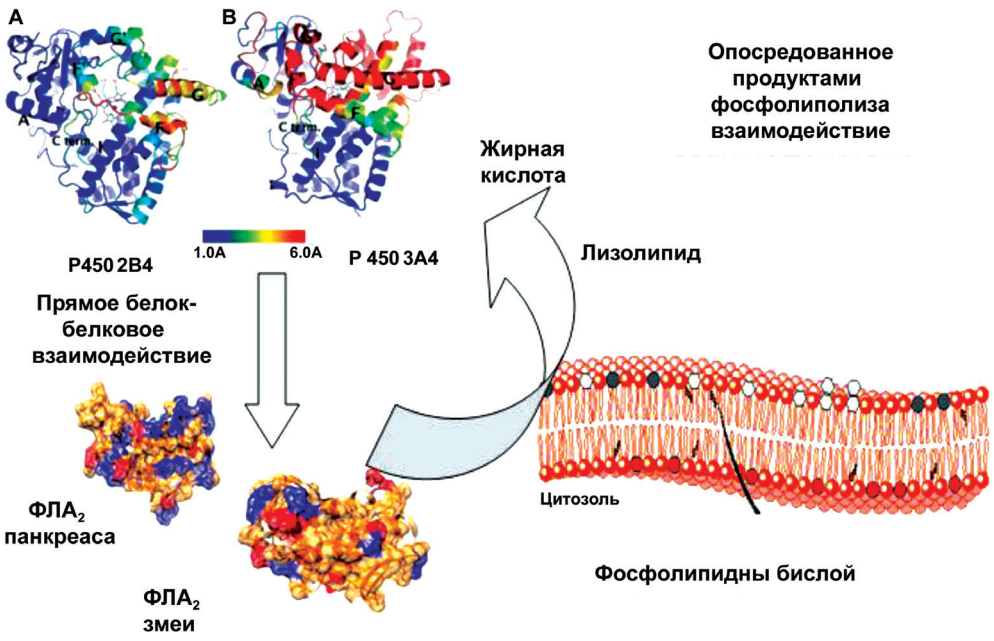


Рис. 6. Предполагаемые механизмы взаимодействия $ФЛА_2$ и CYP. Структуры белков взяты из Базы данных белков (PDB): $ФЛА_2$ панкреаса свиньи, код 4g5i, яда кобры – Imh7; CYP2B4 – 1SUO, CYP3A4 – 1TQN

Fig. 6. Proposed mechanisms of interaction between PLA_2 and CYP. Protein structures are taken from the Protein Database (PDB): PLA2 of the porcine pancreas, code 4g5i, cobra venom – Imh7; CYP2B4 – 1SUO, CYP3A4 – 1TQN

Сопряжение увеличения активности $ФЛА_2$ и усиленного функционирования изоформ цитохрома Р450 на фоне повышения ПОЛ при окислительном стрессе являются критическими патогенными явлениями при алкогольном поражении печени ($iФЛА_2$ и CYP2C9), поздней кожной порфирии ($цФЛА_2$ и Р450-зависимый метаболизм АК), повреждения миокарда после ишемии ($iФЛА_2$ и CYP2C9) и инсульте головного мозга ($сФЛА_2$ и CYP2C11), а также других болезнях, угрожающих здоровью человека [3], в том числе при инфицировании SARS-CoV-2 [47].

Таким образом, активность цитохрома Р450 усугубляет $ФЛА_2$- и АК-зависимое повреждение в основном за счет продукции АФК, которые способствуют перекисному окислению липидов или продукции метаболитов, изменяющих гомеостаз Ca^{2+}. Напротив, в других ситуациях действие продуктов превращения АК цитохромом Р450 является защитным в основном за счет снижения уровней неэтерифицированных АК и продукции метаболитов, которые активируют антиапоптотические пути, связанные с действием PI3 /AKT и p42 /p44 MAPK киназ. Например, кардиомиоцит-специфическая сверхэкспрессия CYP2J2 у трансгенных мышей обеспечивает защиту от ишемии [3].

Сопоставление схем участия $ФЛА_2$ в цитохром Р450-зависимом метаболизме арахидоновой кислоты (рис. 2) и с учетом того, что метаболиты арахидоновой кислоты (12-HETE и 15-HETE) являются ингибиторами $ФЛА_2$, указывает на возможность существования прямой и опосредованной взаимосвязи между функционированием $ФЛА_2$ и CYP [48] (рис. 6).

Опосредованный структурой фосфолипидного матрикса механизм взаимодействия CYP и $ФЛА_2$. В ответ на введение ксенобиотиков в печени животных активируется биосинтез ряда изоэнзимов CYP, специфичных к индуктору. Так, у кроликов, индуцированных фенобарбиталом (ФБ), образуется изофермент цитохрома Р450, известный как форма CYP2B4, который представляет собой интегральный мембранный белок, состоящий из восьми полипептидных цепей, полностью пронизывающих липидный бислой [5]. Поскольку при введении фенобарбитала экспериментальным животным в микросомах печени обнаружено наряду с индукцией CYP2B4 увеличение активности $ФЛА_2$ [35], а влияние каких-либо эффекторов на активность цитохрома Р450 *in vitro* в полной ферментной системе сложно оценивать из-за ее мультикомпонентности и трудностей интерпретации полученных результатов, изучена взаимосвязь фосфолиполиза с монооксигеназным катализом в модельных системах.

Так, биохимическое моделирование процесса липолиза с использованием протеолипосом с включением CYP2B4 показало увеличение гидролиза липидной фракции до 85–90 и 50–55 % в случае ФХ- и ФГ-содержащих протеолипосом по сравнению с 25–30 и 18–20 % соответственно в контрольных липосомах [49]. Сравнение хода гидролиза фосфолипидов в протеолипосомах показывает, что в присутствии цитохрома Р450 также возрастает скорость ферментативного расщепления фосфатидилглицерина (ФГ), фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и фосфатидилинозита (ФИ) [50]. Включение цитохрома Р450 в липосомы из ФХ и ФГ приводит к появлению двух фосфолипидных пулов, отличающихся своей организацией во временной шкале диффузионно-контролируемого процесса эксимиризации пирена. В протеолипосомах, содержащих интегральный белок цитохром Р450, в состав прибелкового слоя фосфолипидов входит около 85 молекул ФХ и 650 молекул ФГ на одну молекулу цитохрома Р450 [49]. Поэтому для объяснения высокой степени гидролиза ФХ $ФЛА_2$, достигающей 85–90 % в случае мольного соотношения липид/цитохром Р450 200:1, представляется целесообразным допустить возможность быстрого обмена продуктов реакции гидролиза с основной массой липидов.

В процессе гидролиза ФХ в составе протеолипосом с включением CYP3A4 также наблюдалась активация панкреатической $ФЛА_2$ с максимумом при молярном соотношении CYP/ФХ в промежутке 1:500–1:1000 [51].

С другой стороны, в результате обработки $ФЛА_2$ микросом печени крыс как после введения животным фенобарбитала (ФБ-животные), так и без него в течение 30 мин происходит значительное снижение активности цитохрома Р450 (до 60 % от исходной) в модельной системе при реакции окисления анилина гидропереоксидом кумола [48]. Вместе с тем в отсутствие БСА в начальный период времени (до 5 мин) наблюдаемая разность в активности цитохрома Р450 ФБ- и контрольных животных в 3,5–4,0 раза выше и проявляется во всем временном интервале фосфолипазной реакции. Это косвенное доказательство того, что продукты липолиза мембран под действием $ФЛА_2$, которые специфически связываются БСА, могут существенно влиять на активность изоформы цитохрома Р450, окисляющей анилин [48].

Действительно, максимальный активирующий эффект от присутствия обоих продуктов реакции проявляется при соотношении липид/цитохрома Р450, равном 10, а ингибирование наблюдается при соотношении, равном 50. Лизолецитин увеличивает вдвое активность цитохрома Р450 при соотношении лизолецитин/ЦР450, равном 30. При соотношении большем, чем 100 происходит угнетение активности цитохрома Р450 [48].

Следовательно, при введении ФБ в организм $ФЛА_2$ играют существенную роль в активации гидроксилирующей системы в микросомах печени. Действие фосфолипаз приводит к образованию лизолецитина, который в начальный период времени оказывает активирующее воздействие на активность цитохрома Р450. Кроме того, накопление лизофосфолипидов и жирных кислот модифицирует физическое состояние липидного матрикса микросомальной мембраны, что в свою очередь сказывается на активности мембранносвязанной монооксигсназной системы. Усиление окисления субстратов цитохромом Р450 также может обеспечиваться за счет синергизма непосредственно белок-белкового взаимодействия с $ФЛА_2$.

Белок-белковое взаимодействие цитохромов Р450 и фосфолипаз A_2 *in vitro*. Имеются данные о проникновении секреторных $ФЛА_2$, к которым относятся изоферменты поджелудочной железы и яда кобры, в кровяное русло при патологиях или воздействии яда змей [52], что предполагает *in vivo* возможность непосредственного контакта со встроенными в мембрану цитохромами Р450 и дальнейшего взаимного влияния на их функционирование.

Функциональная активность цитохрома Р450, как и $ФЛА_2$, связана с поверхностью раздела фаз липид–вода. Проведено сравнительное исследование с использованием КД-спектроскопии (в диапазоне 190–250 нм) белок-белкового взаимодействия двух $ФЛА_2$ – яда змеи (активна в виде димера) и поджелудочной железы свиньи (активна в виде мономера), обладающих разными по степени гидрофобности специфическими участками для распознавания поверхности раздела липид–вода, необходимыми при связывании с субстратом или соответственно с CYP 2B4 и CYP 3A4. Обнаружены разнонаправленные эффекты в изменении спектров КД смеси $ФЛА_2$ яда змеи/CYP2B4 (соотношение 1:4 моль/моль) и смеси $ФЛА_2$ поджелудочной железы свиньи/CYP3A4 человека (соотно-

шение 1:20 моль/моль) в сравнении со спектрами КД индивидуальных белков соответственно, что свидетельствует о прямом белок-белковом взаимодействии $ФЛА_2$ и CYP. При этом результирующий спектр КД в первом случае характеризуется увеличением в 2,5 раза значений молярной эллиптичности смеси белков по отношению к молярной эллиптичности цитохрома P450, а во втором – существенным уменьшением этого показателя, что отражает значительные изменения в конформации этих биополимеров при взаимодействии. Полагают, что для модуляции конформационных изменений вторичной структуры в процессе белок-белкового взаимодействия цитохрома P450 и $ФЛА_2$ более важны гидрофобные контакты, чем электростатические [53].

Установлено, что белок-белковое взаимодействие между панкреатической $ФЛА_2$ и CYP3A4 приводит к повышению каталитической активности $ФЛА_2$ по отношению к ФХ в составе липосом более чем в 1,4 раза. Показано смещение в коротковолновую область максимума поглощения в электронных спектрах CYP3A4 в отсутствие и присутствии $ФЛА_2$, что доказывает связывание $ФЛА_2$ с CYP3A4 и предполагает, что $ФЛА_2$ может выступать инициатором перехода гемопротеида в высокоспиновое состояние подобно природным донорам электронов.

Дальнейшее изучение каталитической активности CYP2B4 и CYP3A4 по отношению к субстратам разного типа в присутствии $ФЛА_2$ различной специфичности позволят выяснить более детальный механизм взаимодействия этих биополимеров между собой и их роль в монооксигеназном катализе.

Заключение. Реакция $ФЛА_2$ является основным путем высвобождения АК из фосфолипидов. АК метаболизируется цитохромом P450 в основном до EET и 19- и 20-HETE. В результате реакции, катализируемой цитохромом P450, происходит утечка супероксида и перекиси водорода, которые могут образовывать сильные окислители, воздействующие на ненасыщенные связи арахидоновой кислоты в составе липидной фазы с образованием гидропероксидов липидов (цитотоксическое действие). Каждый из P450-зависимых метаболитов АК имеет мощное влияние на клеточную деятельность. Таким образом, влияние P450 на $ФЛА_2$- и АК-зависимую токсичность является сложным. В случае несильно связанных изоформ P450, таких как CYP2E1 и CYP2C9, экспрессия этих изоформ может усиливать окислительный стресс и перекисное окисление липидов в присутствии АК и быть пагубным из-за активации $ФЛА_2$. Это может происходить в результате прямого перекисного окисления липидов, активации p38 MAPK, нарушения гомеостаза Ca^{2+} и / или митохондриальной недостаточности. Напротив, в случае наиболее крепко связанных изоформ, таких как изоформы CYP2J или бактериальные мутантные изоформы этой эпоксигеназы, метаболизм АК в метаболиты, активирующие антиапоптотические пути, такие как киназа PI3 / AKT и p42 / p44 MAPK, могут опосредовать P450-зависимые защитные эффекты.

Анализ представленных выше данных позволяет выдвинуть следующие возможные механизмы сопряжения фосфолиполиза $ФЛА_2$ с монооксигеназным катализом:

а) опосредованное взаимодействие через фосфолипидный матрикс (изменение конформации фосфолипидов, их гидропероксидирование под действием АФК; увеличение скорости «флип-флопа»; повышение доступности субстрата и образование продуктов фосфолипазного гидролиза);

б) взаимное изменение активности ферментов непосредственно за счет синергизма прямого белок-белкового взаимодействия CYP с $цФЛА_2$ и с $ФЛА_2$ (при патологии). Очевидно, что эти процессы при опосредованном механизме могут контролироваться степенью организации фосфолипидов в прибелковом слое, что может быть одной из форм регуляции активности $ФЛА_2$ на уровне модификации поверхности раздела липид–вода. Преимущественная реализация того или иного механизма зависит от индивидуальных особенностей взаимодействующих белков.

Список использованных источников

1. Брокерхоф, Х. Липолитические ферменты / Х. Брокерхоф, Р. Дженсен; пер. с англ. – М.: Мир,1978. – 396 с.

2. Литвинко, Н. М. Эндогенные фосфолипазы $А_2$. Структура и функция / Н. М. Литвинко, М. А. Кисель. – Минск: Навука і тэхніка, 1991. – 270 с.

3. Caro, A. A. Role of cytochrome P450 in phospholipase A_2- and arachidonic acidmediated cytotoxicity / A. A. Caro, A. I. Cederbaum // Free Radical Biology & Medicine. – 2006. – Vol. 40, no. 3. – P. 364–375. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.044

4. Lewis D. F. V. Guide to Cytochromes P450: Structure and Function / D. F. V. Lewis. – Second Edition. – London: CRC Press, 2001. – 189 p. https://doi.org/10.1201/9780367800956

5. Cytochrome P-450 / eds. K. Ruckpaul, H. Rein. – Berlin: Akademie–Verlag, 1984. – 405 p.

6. Hrycay, E. G. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Reaction Mechanisms of Cytochrome P450 Enzymes / E. G. Hrycay, S. M. Bandiera // Adv. Exp. Med. and Biol. – Springer, Cham, 2015. – Vol. 851. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2_1

7. Eling, B. T. E. A role for phospholipids in the binding and metabolism of drugs by hepatic microsomes. Use of the fluorescent hydrophobic probe 1-anilinonaphthalene-8-sulphonate / B. T. E. Eling, R. P. Diaugustine // Biochem. J. – 1971. – Vol. 123, N 4. – P. 539–549. https://doi.org/10.1042/bj1230539

8. Mouchlis, V. D. Phospholipase A_2 catalysis and lipid mediator lipidomics / V. D. Mouchlis, E. A. Dennis // BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2018. – Vol. 1864, N. 6. – P. 766–771. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.010

9. Kita, Y. Cytosolic phospholipase A_2 and lysophospholipid acyltransferases / Y. Kita, H. Shindou, T. Shimizu // BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2018. – Vol. 1864, N. 6. – P. 838-845. https://doi.org/10.1016 bbalip.2018.08.006

10. Kono, N. Platelet-activating factor acetylhydrolases: An overview and update / N. Kono, H. Arai // BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2018. – Vol. 1864, N. 6. – P. 922-931. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.006

11. Group IID, IIE, IIF and III secreted phospholipase A_2s / M. Murakami [et al.] // BBA – Molecular and Cell Biology of Lipids. – 2018. – Vol. 1864, N. 6. – P. 803-818. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.014

12. Balsinde, J. Phospholipase A_2 regulation of arachidonic acid mobilization / J. Balsinde, M. V. Winstead, E. A. Dennis // FEBS Lett. – 2002. – Vol. 531, N 1. – P. 2–6. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03413-0

13. Group specific assays that distinguish between the two major types of mammalian phospholipase A_2 / H. C. Yang [et al.] // Anal. Biochem. – 1999. – Vol. 269, N 2. – P. 278– 288. https://doi.org/10.1006/abio.1999.4053

14. Arachidonic acid inhibits activity of cloned renal K+ channel, ROMK1. / C. M. Macica [et al.] // Am. J. Physiol. – 1996. – Vol. 271, N 3. – P. F588–F594. https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.271.3.f588

15. Arachidonic acid activation of a new family of K+ channels in cultured rat neuronal cells / D. Kim [et al.] // J. Physiol. – 1995. – Vol. 484, N 3. – P. 643–660. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020693

16. Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition: implications for tumor necrosis factor-a apoptotic signaling / L. Scorrano [et al.] // J. Biol. Chem. – 2001.– Vol. 276, N 15. – P. 12035–12040. https://doi.org/10.1074/jbc.m010603200

17. Arachidonic acid directly activates members of the mitogen-activated protein kinase superfamily in rabbit proximal tubule cells / L. D. Alexander [et al.] // Kidney Int. – 2001. – Vol. 59, N 6. – P. 2039–2053. https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590062039.x

18. Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology / C. D. Funk // Science. – 2001. – Vol. 294, N. 5548 – P. 1871–1875. https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1871

19. Chakraborti, S. Phospholipase A_2 isoforms: a perspective / S. Chakraborti // Cell. Signalling. – 2003. – Vol. 15. – P. 637–665. https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00144-4

20. Cummings, B. S. Phospholipase A_{2s} in cell injury and death / B. S. Cummings, J. Mchowat, R. G. Schnellmann // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2000. – Vol. 294. – P. 793–799.

21. Taketo, M. Phospholipase A_2 and apoptosis / M. Taketo, M. Sonoshita // Biochim. Biophys. Acta. – 2002. – Vol. 1585. – P. 72–76. https://doi.org/10.1016/s1388-1981(02)00326-8

22. Ono, K. Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death / K. Ono, S. O. Kim, J. Han // Mol. Cell. Biol . – 2003. – Vol. 23, N 2. – P. 665–676. https://doi.org/10.1128/mcb.23.2.665-676.2003

23. Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca^{2+}- independent phospholipase A_2 but not cytosolic phospholipase A_2, which undergoes proteolytic inactivation / G. Atsumi [et al.] // J. Biol. Chem. – 1998. – Vol. 273, N 22. – P. 13870–13877. https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13870

24. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function / A. A. Spector [et al.] // Prog. Lipid Res. – 2004. – Vol. 43, N 1. – P. 55–90. https://doi.org/10.1016/s0163-7827(03)00049-3

25. Capdevila, J. H. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase / J. H. Capdevila, J. R. Falck, R. C. Harris // J. Lipid Res. – 2000. – Vol. 41, N 2. – P. 163–181. https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)32049-6

26. Yin, H. New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids / H. Yin, N. A. Porter // Antioxid. Redox Signaling. – 2005. – Vol. 7, no. 1-2. – P. 170–184. https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.170

27. Pratt, D. A. Theoretical calculations of carbon–oxygen bond dissociation enthalpies of peroxyl radicals formed in the autoxidation of lipids / D. A. Pratt, J. H. Mills, N. A. Porter // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – Vol. 125, N 19. – P. 580–591. https://doi.org/10.1021/ja034182j

28. Zangar, R. C. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450 / R. C. Zangar, D. R. Davydov, S. Verma // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2004. – Vol. 199, N 3. – P. 316–331. https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.018

29. Puntarulo, S. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes / S. Puntarulo, A. I. Cederbaum // Free Radical Biol. Med. – 1998. – Vol. 24, N. 7-8. – P. 1324–1330. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00463-2

30. Sacerdoti, D. Role of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites in liver physiology and pathophysiology / D. Sacerdoti, A. Gatta, J. C. McGiff // Prostaglandins Other Lipid Mediat. – 2003. – Vol. 72, N 1-2. – P. 51–71. https://doi.org/10.1016/s1098-8823(03)00077-7

31. Potente, M. 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid-induced inhibition of FOXO factors promotes endothelial proliferation by down-regulating p27KIP1 / M. Potente, B. Fisslthaler, R. Busse, I. Fleming // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, N 32. – P. 29619–29625. https://doi.org/10.1074/jbc.m305385200

32. Girotti, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems / A. W. Girotti // J. Lipid Res. – 1998. – Vol. 39, N 8. – P. 1529–1542. https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)32182-9

33. Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1 / R. M. Laethem [et al.] // J. Biol. Chem. – 1993. – Vol. 268, N 17. – P. 12912–12918. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)31472-8

34. Ekstrom, G. Rat liver microsomal NADPH supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanolinducible cytochrome P450 (P-450IIE1) / G. Ekstrom, M. Ingelman-Sundberg // Biochem. Pharmacol. – 1989. – Vol. 38, N 8. – P. 1313–1319. https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90338-9

35. Литвинко, Н. М. Влияние фенобарбитала на активность эндогенной растворимой фосфолипазы А в печени. Взаимосвязь с микросомальной гидроксилирующей системой / Н. М. Литвинко, М. А. Кисель // Хим.-фарм. журн. – 1995. – Т. 29, № 6. – С. 19–22.

36. Krikun, G. Effect of chronic ethanol consumption on microsomal lipid peroxidation: role of iron and comparison between controls / G. Krikun, A. I. Cederbaum // FEBS Lett. – 1986. – Vol. 208, N 2. – P. 292–296. https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81035-3

37. Mari, M. CYP2E1 overexpression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of glutamylcysteine synthetase / M. Mari, A. I. Cederbaum // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, N 20. – P. 15563–15571. https://doi.org/10.1074/jbc.m907022199

38. Chen, Q. Cytotoxicity and apoptosis produced by cytochrome P450 2E1 in HepG2 cells / Q. Chen, A. I. Cederbaum // Mol. Pharmacol. – 1998. – Vol. 53, no. 4. – P. 638–648. https://doi.org/10.1124/mol.53.4.638

39. Chen, Q. Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in HepG2 cells overexpressing human cytochrome P4502E1 / Q. Chen, M. Galleano, A. I. Cederbaum // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, no. 3. – P. 14532–14541. https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14532

40. Wu, D. Cyclosporine A protects against arachidonic acid toxicity in rat hepatocytes: role of CYP2E1 and mitochondria / D. Wu, A. I. Cederbaum // Hepatology. – 2002. – Vol. 35, N 6. – P. 1420–1430. https://doi.org/10.1053/jhep.2002.33639

41. Wu, D. Sodium salicylate increases CYP2E1 levels and enhances arachidonic acid toxicity in HepG2 cells and cultured rat hepatocytes / D. Wu, A. I. Cederbaum // Mol. Pharmacol. – 2001. – Vol. 59, N 4. – P. 795– 805. https://doi.org/10.1124/mol.59.4.795

42. Perez, M. J. Spin trapping agents (TEMPOL and POBN) protect HepG2 cells overexpressing CYP2E1 against arachidonic acid toxicity / M. J. Perez, A. I. Cederbaum // Free Radic. Biol. Med. – 2001. – Vol. 30, no. 7. – P. 734–746. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00461-0

43. Martinez, J. Role of Ca^{2+}-independent phospholipase A_2 on arachidonic acid release induced by reactive oxygen species / J. Martinez, J. J. Moreno // Arch. Biochem. Biophys. – 2001. – Vol. 392, N 2. – P. 257–262. https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2439

44. Rao, G. N. Hydrogen peroxide activation of cytosolic phospholipase A_2 in vascular smooth muscle cells / G. N. Rao, M. S. Runge, R. W. Alexander // Biochim. Biophys. Acta. – 1995. – Vol. 1265, N 1. – P. 67–72. https://doi.org/10.1016/0167-4889(95)91997-z

45. Litvinko, N. M. The interaction of phospholipase A_2 with oxidized phospholipids at the lipid-water surface with different structural organization / N. M. Litvinko, L. A. Skorostetskaya, D. O. Gerlovsky // Chem. Phys. Lipids. – 2018. – Vol. 211. – P. 44–51. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip

46. Литвинко, Н. М. Гидролиз УФ-индуцированного перекисно-окисленного фосфатидилхолина фосфолипазами разной субстратной специфичности / Н. М. Литвинко // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер.хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 2. – С. 195–205. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-195-205

47. Potential benefits and risks of omega-3 fatty acids supplementation to patients with COVID-19 / M. M Rogero [et al.] // Free Radical Biol. Med. – 2020. – Vol. 156. – P. 190–199. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.005

48. Литвинко, Н. М. Активность фосфолипаз A_2 и С при биохимическом моделировании / Н. М. Литвинко. – Минск: Технопринт, 2003. – 350 с.

49. The comparative study of the phospholipase A_2 -catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol in the presence of cytochrome P-450 / N. M. Litvinko [et al.] // Synth. Natural Products Biotechnol. – 1985. – Sophia. – Vol. 4. – P. 158–162.

50. Роль цитохрома Р450 в активации гидролиза фосфатидилхолина фосфолипазой A_2 / А. А. Ахрем [и др.] // Докл. Акад. наук СССР. – 1986. – Т. 286, № 2. – С. 458–461.

51. Герловский, Д. О. Исследование действия цитохрома Р450 3А4 человека на фосфолиполиз в модельной системе / Д. О. Герловский, Н. М. Литвинко, А. В. Янцевич // Химия, структура и функция биомолекул: тез. докл. IV Междунар. конф., Минск, 17–19 октяб. 2012 г. – Минск, 2012. – С. 197.

52. Tappia, P. S. Phospholipases in Health and Disease / P. S. Tappia, N. S. Dhalla. – New York: Springer, 2014. – 410 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0464-8

53. Особенности взаимодействия цитохрома Р450 и фосфолипаз A_2 разной специфичности, обнаруживаемые КД-спектроскопией / Н. М. Литвинко [и др.] // Докл. Нац. акад. наук Беларуси. – 2016. – Т. 60, № 6. – С. 64–71.

References

1. Brokerhof H**.,** Jensen R. *Lipolytic enzymes.* Academic Press, 1974. 330 p. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-134550-1.X5001-1

2. Litvinko N. M., Kisel'M. A. *Endogenous phospholipases A_2. Structure and function*. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1991. 290 p. (in Russian).

3. Caro A. A., Cederbaum A. I. Role of cytochrome P450 in phospholipase A_2- and arachidonic acidmediated cytotoxicity. *Free Radical Biology & Medicine*, 2006, vol. 40, no. 3, pp. 364–375. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.044

4. Lewis D. F. V. *Guide to Cytochromes P450: Structure and Function.* Second Edition. London, CRC Press, 2001. 189 p. https://doi.org/10.1201/9780367800956

5. Ruckpaul K., Rein H. (ed.) *Cytochrome P-450.* Berlin, Akademie–Verlag, 1984. 405 p.

6. Hrycay E. G., Bandiera S. M. Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Reaction Mechanisms of Cytochrome P450 Enzymes. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer, Cham, 2015, vol. 851. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16009-2_1

7. Eling B. T. E., Diaugustine R. P. A role for phospholipids in the binding and metabolism of drugs by hepatic microsomes. Use of the fluorescent hydrophobic probe 1-anilinonaphthalene-8-sulphonate. *Biochemical Journal*, 1971, vol. 123, no. 4, pp. 539–549. https://doi.org/10.1042/bj1230539

8. Mouchlis V. D., Dennis E. A. Phospholipase A_2 catalysis and lipid mediator lipidomics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids,* 2018, vol. 1864, no. 6, pp. 766–771. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.010

9. Kita Y., Shindou H., Shimizu T. Cytosolic phospholipase A_2 and lysophospholipid acyltransferases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids,* 2018, vol. 1864, no. 6, pp. 838–845. https://doi.org/10.1016 bbalip.2018.08.006

10. Kono N., Arai H. Platelet-activating factor acetylhydrolases: An overview and update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids,* 2018, vol. 1864, no. 6, pp. 922–931. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.006

11. Murakami M., Miki Y., Sato H., Murase R., Taketomi Y., Yamamoto K. Group IID, IIE, IIF and III secreted phospholipase A_2s. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2018, vol. 1864, no. 6, pp. 803–818. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.08.014

12. Balsinde J., Winstead M. V., Dennis E. A., Balsinde J. Phospholipase A_2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Letters*, 2002, vol. 531, no. 1, pp. 2–6. https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03413-0

13. Yang H. C., Mosior M., Johnson C. A., Chen Y., Dennis E. A. Group specific assays that distinguish between the two major types of mammalian phospholipase A_2. *Analytical Biochemistry*, 1999, vol. 269, no. 2, pp. 278–288. https://doi.org/10.1006/abio.1999.4053

14. Macica C. M., Yang Y., Hebert S. C., Wang W. H. Arachidonic acid inhibits activity of cloned renal K^+ channel, ROMK1. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 1996, vol. 271, no. 3, pp. F588– F594. https://doi.org/10.1152/ajprenal.1996.271.3.f588

15. Kim D., Sladek C. D., Aguado-Velasco C., Mathiasen J. R. Arachidonic acid activation of a new family of K^+ channels in cultured rat neuronal cells. *The Journal of Physiology*, 1995, vol. 484, no. 3, pp. 643–660. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1995.sp020693

16. Scorrano L., Penzo D., Petronilli V., Pagano F., Bernardi P. Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition: implications for tumor necrosis factor-a apoptotic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, no. 15, pp.12035–12040. https://doi.org/10.1074/jbc.m010603200

17. Alexander, L. D., Cui X. L., Falck J. R., Douglas J. G., Alexander L. D. Arachidonic acid directly activates members of the mitogen-activated protein kinase superfamily in rabbit proximal tubule cells. *Kidney International*, 2001, vol. 59, no. 6, pp. 2039–2053. https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.0590062039.x

18. Funk C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science,* 2001, vol. 294, no. 5548, pp. 1871–1875. https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1871

19. Chakraborti S. Phospholipase A_2 isoforms: a perspective. *Cellular Signalling*, 2003, vol. 15, pp. 637–665. https://doi.org/10.1016/s0898-6568(02)00144-4

20. Cummings B. S., Mchowat J., Schnellmann R. G. Phospholipase A_{2s} in cell injury and death. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000, vol. 294, pp. 793–799.

21. Taketo M., Sonoshita M. Phospholipase A_2 and apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2002, vol. 1585, no. 2-3, pp. 72–76. https://doi.org/10.1016/s1388-1981(02)00326-8

22. Ono K., Kim S. O., HanJ. Susceptibility of lysosomes to rupture is a determinant for plasma membrane disruption in tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, vol. 23, no. 2, pp. 665–676. https://doi.org/10.1128/mcb.23.2.665-676.2003

23. Atsumi G., Tajima M., Hadano A., Nakatani Y., Murakami M., Kudo I. Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca^{2+}- independent phospholipase A_2 but not cytosolic phospholipase A_2, which undergoes proteolytic inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no. 22, pp. 13870–13877. https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.13870

24. Spector A. A., Fang X., Snyder G. D., Weintraub N. L. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. *Progress in Lipid Research*, 2004, vol. 43, no. 1, pp. 55–90. https://doi.org/10.1016/s0163-7827(03)00049-3

25. Capdevila J. H., Falck J. R., Harris R. C. Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular and functional properties of the arachidonate monooxygenase. *Journal of Lipid Research*, 2000, vol. 41, no. 2, pp. 163–181. https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)32049-6

26. Yin H., Porter N. A. New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2005, vol. 7, no. 1-2, pp. 170–184. https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.170

27. Pratt D. A., Mills J. H., Porter N. A. Theoretical calculations of carbon– oxygen bond dissociation enthalpies of peroxyl radicals formed in the autoxidation of lipids. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, vol. 125, no. 19, pp. 5801–5810. https://doi.org/10.1021/ja034182j

28. Zangar R. C., Davydov D. R., Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, vol. 199, no. 3, pp. 316–331. https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.01.018

29. Puntarulo S., Cederbaum A. I. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radical Biology and Medicine*, 1998, vol. 24, no. 7-8, pp. 1324–1330. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(97)00463-2

30. Sacerdoti D., Gatta A., McGiff J. C. Role of cytochrome P450-dependent arachidonic acid metabolites in liver physiology and pathophysiology. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 2003, vol. 72, no. 1-2, pp. 51–71. https://doi.org/10.1016/s1098-8823(03)00077-7

31. Potente M., Fisslthaler B., Busse R., Fleming I. 11,12-Epoxyeicosatrienoic acid-induced inhibition of FOXO factors promotes endothelial proliferation by down-regulating p27KIP1. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 32, pp. 29619–29625. https://doi.org/10.1074/jbc.m305385200

32. Girotti A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *Journal of Lipid Research*, 1998, vol. 39, no. 8, pp. 1529–1542. https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)32182-9

33. Laethem R. M., Balazy M., Falck J. R., Laethem C. L., Koop D. R. Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, vol. 268, no. 17, pp. 12912–12918. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)31472-8

34. Ekstrom G., Ingelman-Sundberg M. Rat liver microsomal NADPH supported oxidase activity and lipid peroxidation dependent on ethanolinducible cytochrome P450 (P-450IIE1). *Biochemical Pharmacology*, 1989, vol. 38, no. 8, pp. 1313–1319. https://doi.org/10.1016/0006-2952(89)90338-9

35. Kisel' M. A., Litvinko N. M. Phenobarbital influence on the activity of endogenous soluble phospholipase A in the liver. Interrelation with the microsomal hydroxylated system. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal* [Pharmaceutical Chemistry Journal], 1995, no. 6, pp. 19–22 (in Russian).

36. Krikun G., Cederbaum A. I. Effect of chronic ethanol consumption on microsomal lipid peroxidation: role of iron and comparison between controls. *FEBS Letters*, 1986, vol. 208, no. 2, pp. 292–296. https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81035-3

37. Mari M., Cederbaum A. I. CYP2E1 overexpression in HepG2 cells induces glutathione synthesis by transcriptional activation of glutamylcysteine synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, vol. 275, no. 20, pp. 15563–15571. https://doi.org/10.1074/jbc.m907022199

38. Chen Q., Cederbaum A. I. Cytotoxicity and apoptosis produced by cytochrome P450 2E1 in HepG2 cells. *Molecular Pharmacology*, 1998, vol. 53, no. 4, pp. 638–648. https://doi.org/10.1124/mol.53.4.638

39. Chen Q., Galleano M., Cederbaum A. I. Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in HepG2 cells overexpressing human cytochrome P4502E1. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, vol. 272, no. 23, pp. 14532–14541. https://doi.org/10.1074/jbc.272.23.14532

40. Wu D., Cederbaum A. I. Cyclosporine A protects against arachidonic acid toxicity in rat hepatocytes: role of CYP2E1 and mitochondria. *Hepatology*, 2002, vol. 35, no. 6, pp. 1420–1430. https://doi.org/10.1053/jhep.2002.33639

41. Wu D., Cederbaum A. I. Sodium salicylate increases CYP2E1 levels and enhances arachidonic acid toxicity in HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. *Molecular Pharmacology*, 2001, vol. 59, no. 4, pp. 795–805. https://doi.org/10.1124/mol.59.4.795

42. Perez M. J., Cederbaum A. I. Spin trapping agents (TEMPOL and POBN) protect HepG2 cells overexpressing CYP2E1 against arachidonic acid toxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001, vol. 30, no. 7, pp. 734–746. https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00461-0

43. Martinez J., Moreno J. J. Role of Ca^{2+}-independent phospholipase A_2 on arachidonic acid release induced by reactive oxygen species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2001, vol. 392, no. 2, pp. 257–262. https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2439

44. Rao G. N., Runge M. S., Alexander R. W. Hydrogen peroxide activation of cytosolic phospholipase A_2 in vascular smooth muscle cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1995, vol. 1265, no. 1, pp. 67–72. https://doi.org/10.1016/0167-4889(95)91997-z

45. Litvinko N. M., Skorostetskaya L. A., Gerlovsky D. O. The interaction of phospholipase A_2 with oxidized phospholipids at the lipid-water surface with different structural organization. *Chemistry and Physics of Lipids*, 2018, vol. 211, pp. 44–51. https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip

46. Litvinko N. M. Hydrolysis of UV-induced peroxidized phosphatidylcholine initiated by phospholipases of different substrate specificities. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 2, pp. 195–205 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-2-195-205

47. Rogero M. M., Leão M. C., Santana T. M., de M.B. Pimentel M. V., Carlini G. C.G., da Silveira T. F.F., Gonçalves R. C., Castro I. A. Potential benefits and risks of omega-3 fatty acids supplementation to patients with COVID-19. *Free Radical Biology and Medicine*, 2020, vol. 156, pp. 190–199. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.005

48. Litvinko N. M. *Activity of phospholipase A_2 and C during the biochemical modeling.* Minsk, Technoprint Publ., 2003. 350 p. (in Russian)

49. Litvinko N. M. [et al.] The comparative study of the phospholipase A_2 -catalyzed hydrolysis of phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol in the presence of cytochrome P-450. *Synthesis of Natural Products Biotechnology.* Sophia, 1985, vol. 4, pp. 158–162.

50. Akhrem A. A. [et al.] The role of cytochrome P450 in the activation of phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase A_2. *Doklady Akademii nauk SSSR* [Reports of the USSR Academy of Sciences], 1986, vol. 286, no. 2, pp. 458–461 (in Russian).

51. Gerlovskii D. O., Litvinko N. M., Yantsevich A. V. Study of the Action of Human P-450 3A4 Cytochrome on Phospholipases in the Model System. *Khimiia, struktura i funktsiia biomolekul: IV mezhdunarodnaia nauchnaia konferentsiia, posviashchennaia 100-letiiu so dnia rozhdeniia akademika A. A. Akhrema. Sbornik materialov* [Chemistry, Structure and Function of Biomolecules: the IVth International Scientific Conference Dedicated to the 100th Anniversary of Academician A. A. Akhrem: Collected Materials]. Minsk, 2012, pp. 197 (in Russian).

52. Tappia P. S., Dhalla N. S. *Phospholipases in Health and Disease*. NewYork: Springer, 2014. 410 p. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0464-8

53. Litvinko N. M., Antonchik G. N., Glushakova T. G., Gerlovsky D. O. Features of the protein-protein interaction of cytochrome P450 and PLA_2 of different nature revealed using circular dichroism spectroscopy. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2016, vol. 60, no. 6, pp. 64–71 (in Russian).

Информация об авторе

Литвинко Наталья Михайловна – д-р хим. наук, доцент, зав. лаб. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Купревича, 5/2, 220141, Минск, Республика Беларусь). E-mail: al_h@mail.ru

Information about the autor

Natalia M. Litvinko – D. Sc. (Chemistry), Associate Professor, Head of the laboratory. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Science of Belarus (5/2, Kuprevich Str., 220141, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: al_h@mail.ru

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 630.863
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-502-512

Поступила в редакцию 25.05.2021
Received 25.05.2021

В. С. Болтовский

Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ: СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Аннотация. Растительное сырье является практически неисчерпаемым, возобновляемым в процессе фотосинтеза растений природным ресурсом, что обусловливает перспективы его использования для промышленной переработки различными способами, в том числе гидролитическим. Основными по количественному содержанию биополимерными компонентами растительной биомассы являются полисахариды, гидролитическая переработка которых методами кислотного или ферментативного гидролиза приводит к образованию моносахаридов и получаемых из них разнообразных продуктов. Выполнен анализ теоретических представлений и современного состояния исследований по разработке, совершенствованию и перспективах применения процессов ферментативного гидролиза растительного сырья. Эффективность этого процесса и состав получаемых продуктов в существенной степени зависят от особенностей надмолекулярной структуры целлюлозы, содержания в сырье гемицеллюлоз и лигнина, сбалансированности и активности целлюлозного комплекса ферментов. Показано, что основными направлениями разработки и совершенствования процессов ферментативного гидролиза растительного сырья в настоящее время являются получение и применение более эффективных штаммов микроорганизмов, продуцирующих высокоактивные ферменты, направленное создание ферментов комплексного действия (гидролизующих не только целлюлозу, но и гемицеллюлозы, а также деструктирующих лигнин), разработка способов предварительной обработки сырья для повышения реакционной способности целлюлозы и удаления лигнина, совершенствования процессов ферментолиза.

Ключевые слова: растительное сырье, предварительная обработка, ферменты, гидролиз, биоконверсия, моносахариды

Для цитирования. Болтовский, В. С. Ферментативный гидролиз растительного сырья: состояние и перспективы / В. С. Болтовский // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2021. – Т. 57, № 4. – С. 502–512. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-502-512

V. S. Boltovsky

Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF PLANT RAW MATERIALS: STATE AND PROSPECTS

Abstract. Plant raw materials are practically an inexhaustible natural resource, since they are constantly renewed in the process of plant photosynthesis, which determines the prospects for their use for industrial processing in various ways, including hydrolytic. The main biopolymer components of plant biomass in terms of their quantitative content are polysaccharides, the hydrolytic processing of which by acidic or enzymatic hydrolysis leads to the formation of monosaccharides and various products obtained from them. This review of scientific literature analyzes theoretical concepts and the current state of research on the development, improvement and prospects for the use of enzymatic hydrolysis of plant raw materials. The efficiency of this process and the composition of the resulting products largely depend on the features of the supramolecular structure of cellulose, the content of hemicelluloses and lignin in the raw material, the balance and activity of the cellulase complex of enzymes. It is shown that the main directions of development and improvement of the processes of enzymatic hydrolysis of plant raw materials at present are the production and use of more effective strains of microorganisms that produce highly active enzymes, the directed creation of complex enzymes (hydrolyzing not only cellulose, but also hemicellulose, as well as destroying lignin), the development of methods for pretreatment of raw materials to increase the reactivity of cellulose and remove lignin and improve the processes of fermentolysis.

Keywords: vegetable raw materials, pre-treatment, enzymatic hydrolysis, bioconversion, monosaccharides

For citation. Boltovsky V. S. Enzymatic hydrolysis of plant raw materials: state and prospects. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series,* 2021, vol. 57, no. 4, pp. 502–512 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2021-57-4-502-512

Введение. Растительное сырье является практически неисчерпаемым природным ресурсом, так как постоянно возобновляется в процессе фотосинтеза растений, что обусловливает перспективы его использования для промышленной переработки различными способами, в том числе

© Болтовский В. С., 2021

гидролитическим. Основными по количественному содержанию биополимерными компонентами растительной биомассы являются полисахариды, гидролитическая переработка которых методами кислотного или ферментативного гидролиза приводит к образованию моносахаридов и получаемых из них разнообразных продуктов. В промышленных масштабах применяется гидролиз растительного сырья под действием кислотных катализаторов (так называемый кислотный гидролиз).

В настоящее время усилия исследователей различных стран в большей степени направлены на разработку способов ферментативного гидролиза. Сравнительный анализ основных параметров традиционного кислотного и ферментативного гидролиза вторичных непищевых источников растительной биомассы выполнен в работе [1].

Ферментативный гидролиз полисахаридов растительной биомассы, осуществляемый под действием комплекса ферментов, продуцируемых различными микроорганизмами или промышленно выпускаемыми на их основе ферментными препаратами, обладает по сравнению с кислотным существенными преимуществами: специфичностью действия (ферменты, обладающие целлюлазной, пектиназной, гемицеллюлазной активностью, обеспечивают превращение соответствующих полисахаридов – целлюлозы, пектина, гемицеллюлоз – в моносахариды), отсутствием характерных для химического гидролиза вторичных превращений моносахаридов (что обеспечивает их выход, близкий к теоретическому), возможностью проведения процесса при невысоких температурах (т. е. без значительных энергетических затрат).

Однако особенности строения и высокоупорядоченной надмолекулярной структуры целлюлозы (основного по количественному содержанию полисахарида растительной ткани) и связанная с этим трудность проникновения ферментов к ее макромолекулам, наличие лигнина, ферментативная деструкция которого осуществляется другими комплексами ферментов, обусловливают значительную продолжительность ферментативного гидролиза и необходимость предварительной обработки лигноцеллюлозных материалов для удаления лигнина и повышения реакционной способности целлюлозы.

В настоящее время, особенно в связи с разработкой способов получения так называемого биоэтанола из непищевого растительного сырья для использования в качестве автомобильного топлива или добавок к нему, а также белоксодержащих кормовых добавок его прямой биоконверсией, большое внимание уделяется исследованиям процессов ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных материалов.

Цель данного обзора – анализ теоретических представлений и современного состояния исследований по разработке, совершенствованию процессов ферментативного гидролиза растительного сырья и перспективах его промышленного применения.

Основная часть. Ферментативный гидролиз целлюлозы и гемицеллюлоз происходит под воздействием не отдельных ферментов, а полиферментных систем, вырабатываемых грибами (например, рода *Trichoderma, Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Phanerochaete, Chaetomium, Humicola* и др.) и бактериями (*Clostridium, Cellulomonas, Thermomonospora, Microbiospora, Streptomyces* и др.) [2–4].

Гидролиз целлюлозы осуществляется под воздействием синергически действующего комплекса целлюлаз, включающего: эндо-1,4-β-глюканазу (1,4-β-глюкан-глюкангидролазу, КФ 3.2.1.4), экзо-1,4-β-глюканазу (экзоцеллобиогидролазу или 1,4-β-D-глюкан-целлобиогидролазу, КФ 3.2.1.91), экзо-1,4-β-глюкозидазу (1,4-β-D-глюкан-гидролазу, КФ 3.2.1.74) и целлобиазу (β-глюкозидазу или β-D-глюкозид-глюкогидролазу, КФ 3.2.1.21), разрушающую целлобиозу до глюкозы [5, 6].

В настоящее время проводятся исследования по получению высокоэффективных, в том числе мутантных штаммов микроорганизмов – продуцентов комплекса ферментов, обладающих высокой активностью по отношению к целлюлозе и гемицеллюлозам.

При сравнении лабораторного ферментного препарата, выделенного из гриба *Penicillium verruculosum,* и коммерческого целлюлолитического препарата CellicCTec-2, полученного из грибов рода *Trichoderma*, по значениям удельной активности, pH- и температурного оптимума активности, стабильности, качественного и количественного составов, а также предельной степени конверсии при ферментативном гидролизе предобработанных паровым взрывом стеблей кукурузы и багассы, измельченной древесины сосны и осины показана [7] возможность использования препарат из *P. Verruculosum* для биоконверсии возобновляемого растительного сырья.

Получен ферментный препарат [8] на основе рекомбинантного штамма гриба *Penicillium verruculosum*, содержащий в своем составе полисахаридмонооксигеназу из *Myceliophora thermophila* с увеличенной гидролитической активностью к различным видам целлюлозосодержащего сырья (выход продуктов гидролиза из которых повышается на 40 %, а при гидролизе наиболее трудногидролизуемой микрокристаллической целлюлозы – на 60 %). Использование смесей мутантных форм целлюлаз *Penicillium verruculosum* позволило увеличить выход глюкозы при ферментативном гидролизе целлюлозосодержащих материалов (микрокристаллической целлюлозы и измельченной осиновой древесины) на ~ 30 % по сравнению с композициями исходных ферментов такого же состава [9].

Основы механизма ферментативного гидролиза кристаллической целлюлозы установлены Ризом [10, 11], которые впоследствии были трансформированы другими авторами [12–16]. По современным представлениям [3, 5, 17–20], ферментативный гидролиз целлюлозы осуществляется при совместном и одновременном синергическом действии комплекса целлюлолитических ферментов, что увеличивает скорость и глубину процесса гидролиза. Кроме того, важное значение при деструкции биополимеров растительного сырья (в том числе целлюлозы) имеет адсорбционное взаимодействие ферментов на поверхности субстратов [21].

Первыми атакуют целлюлозу слабосорбирующиеся эндоглюканазы (1,4-глюкозидаза и целлобиогидролаза), разрушающие ее аморфные участки, с образованием целлоолигосахаридов различной степени полимеризации (в том числе целлобиозы). Затем в образовавшихся микродефектах адсорбируются прочно сорбирующиеся эндоглюканазы и целлобиогидролазы, обеспечивающие дальнейший доступ ферментов к внутренним аморфным областям. Целлобиоза гидролизуется до глюкозы под действием целлобиазы, но может образовываться также в результате специфического воздействия экзоцеллобиогидролазы на олигосахариды или на исходный субстрат. Экзоглюкозидаза (а в некоторых случаях – целлобиогидролаза) и/или эндоглюканаза могут непосредственно превращать олигосахариды в глюкозу.

Механизм ферментативного гидролиза гемицеллюлоз, имеющих в отличие от целлюлозы разветвленную структуру, гемицеллюлазами менее изучен. Авторы [22] считают, что для их ферментолиза необходимо синергическое действие целлюлаз и высокоспецифичных эндо-1,4-β-D-ксиланаз, экзо-1,4-β-D-ксилозидаз, эндо-1,4-β-D-маннаназ, α-галактозидаз и других ферментов, состав которых зависит от содержания в растительном сырье соответствующих гемицеллюлоз.

Современные исследования о механизме и кинетике ферментативного гидролиза целлюлозы растительного сырья подтверждают и развивают ранее установленные закономерности. На примере ферментативного гидролиза древесных опилок и рисовой шелухи под действием ферментов Celluclast CCN 3000/85-4 b и Novozyme 188 разработана кинетическая модель процесса, который протекает в две стадии: на первой – фермент быстро адсорбируется на поверхности субстрата с образованием комплекса фермент–целлюлоза, а на второй – часть присоединенного к целлюлозе фермента выделяется в раствор с возрастанием числа неактивных и ингибирующих комплексов, что приводит к прекращению гидролиза [23].

Исследования микрофибриллярной структуры бактериальной целлюлозы при ферментативном гидролизе показали [24], что под действием очищенной целлобиогидролазы из *Trichoderma reesei* Cel7A (TRCel7A) происходит обширное фибрилирование целлюлозы с образованием фибрилл размером около 3 нм, утончение наиболее устойчивых фибрилл и обеспечивается степень гидролиза целлюлозы более 80 %.

При изучении эффективности процесса гидролиза различных видов биомассы под действием высокоэффективных ферментов [25] показано, что процессы гидролиза целлобиозы под действием очищенных β-глюкозидаз из штаммов *Aspergillus, Penicillium, Trichoderma* и *Chrisosporium* при определенных условиях сопровождаются трансгликозилированием с образованием ди-, три- и тетрасахаридов.

При исследовании ферментативного гидролиза целлюлозы с различной кристалличностью (микрокристаллической целлюлозы и фильтровальной бумаги) под действием целлобиогидролазы и эндоглюканазы с помощью методов эксклюзионной хроматографии и многоуровневого лазерного светорассеивания установлено [26], что при гидролизе микрокристаллической целлюлозы

под действием целлобиогидролазы процесс происходит послойно (это является причиной длительности процесса), а при действии эндоглюканазы степень полимеризации фильтровальной бумаги быстро снижается уже на начальной стадии, что указывает на разрыв цепей макромолекул целлюлозы и создание концевых групп для атаки целлобиогидролазы.

Известно, что на эффективность ферментативного гидролиза целлюлозы существенно влияют физико-химические и структурные факторы (величина удельной поверхности, доступной действию целлюлаз, и степень кристалличности – с увеличением степени кристалличности целлюлозы скорость процесса снижается) [27]. Кинетические расчеты показали [28], что скорость ферментативного гидролиза целлюлозы с высокой кристалличностью определяется диффузией молекул фермента в субстрат. С уменьшением степени кристалличности целлюлозы вклад диффузии снижается, в то время как кинетический вклад в суммарную скорость процесса гидролиза возрастает.

При изучении влияния различных кристаллических форм и структурных свойств целлюлозы на процесс ферментативного гидролиза целлюлазой *Trichoderma viride* установлено [29], что при этом снижается как степень полимеризации целлюлозы, так и ее степень кристалличности, а выход сахаров зависит от конкретной полиморфной структуры целлюлозы. Показана возможность осуществления ферментативного гидролиза полисахаридов лигноцеллюлоз в присутствии ионных жидкостей [30].

Скорость ферментативного гидролиза целлюлозы лигноцеллюлозных материалов существенно зависит от площади ее поверхности, степени кристалличности, содержания и физико-химических свойств лигнина, обусловленных способом их предварительной обработки, которая является необходимой перед биоконверсией лигноцеллюлозного сырья [31].

Таким образом, теоретические представления о механизме и кинетике ферментативного гидролиза целлюлозы свидетельствует о том, что эффективность этого процесса и состав получаемых продуктов в существенной степени зависят от особенностей структуры целлюлозы, сбалансированности и активности целлюлазного комплекса ферментов.

Особенности строения и высокоупорядоченной структуры целлюлозы, наличие гемицеллюлоз и лигнина диктуют необходимость обязательной предварительной обработки лигноцеллюлозных материалов для уменьшения степени кристалличности целлюлозы и повышения ее реакционной способности. Рассмотрение этих вопросов не входит в задачи данного обзора. Различные методы химической, физической, механической, биологической и комбинированной предварительной обработки растительного сырья достаточно хорошо систематизированы и изложены в литературе [27, 32–35]. Многообразие видов лигноцеллюлозных материалов, используемых для ферментативного гидролиза и применяемых комплексов ферментов, не позволяют однозначно выбрать наиболее эффективный и в то же время экономически целесообразный способ подготовки.

В настоящее время исследования по ферментативному гидролизу растительного сырья включают, помимо получения и применения более эффективных штаммов микроорганизмов, продуцирующих высокоактивные ферменты, направленного создания ферментов комплексного действия (гидролизующих не только целлюлозу, но и гемицеллюлозы, а также деструктирующих лигнин), разработку способов предварительной обработки сырья и совершенствования процессов ферментолиза.

Эффективность ферментативного гидролиза соломы рапса (*Brassica napus*) повышается двухстадийной предварительной обработкой для удаления лигнина и гемицеллюлоз сначала раствором NaOH (при этом растворяется 35,54 % лигнина, а содержание полисахаридов возрастает от 32,86 до 38,13 %). На второй стадии после обработки раствором серной кислоты растворяется 85,85 % лигнина и 91,56 % ксилана, маннана и галактана переходят в гидролизат. Такая обработка обеспечивает повышение эффективности ферментативного гидролиза соломы по сравнению с одностадийной кислотной обработкой на 23 %, несмотря на снижение количества фермента на 50 % [36].

Для селективного удаления лигнина из багассы (с исходным содержанием лигнина 22,8 %) использовали [37] обработку раствором хлорита натрия с уксусной кислотой в течение 4 ч, после которой содержание лигнина снизилось до 6,8 %, при этом содержание целлюлозы и гемицеллюлоз осталось без изменения. После делигнификации багассу подвергали ферментативному гидролизу под действием коммерческих целлюлаз. Показано, что багасса с низким содержанием лиг-

нина легче подвергается ферментативному гидролизу до глюкозы, а при добавлении к целлюлазе β-глюкозидазы делигнифицированная целлюлозная фракция в багассе полностью гидролизуется до глюкозы. При 60 %-ном удалении лигнина достигается 80 %-ная конверсия целлюлозы, а при удалении 70 % лигнина степень конверсии возрастает еще в большей степени.

Предобработка биомассы лигноцеллюлозных отходов (соломы, валежника, древесных опилок, хвои) водно-солевыми растворами, содержащими 5–20 % глицерина (температура – 121 °С, давление – 98 кПа, время – 1 ч), и последующая промывка растительных субстратов водой приводит к существенному стимулированию роста целлюлолитической культуры *Streptomyces* sp. К-7 при температуре 30 °С, увеличению выхода редуцирующих веществ и КМЦ-целюллазной активности культуральной жидкости [38].

Установлено, что технические целлюлозы, полученные из плодовых оболочек овса обработкой комбинированным способом (предгидролиз, щелочная делигнификация, обработка раствором азотной кислоты), обладают высокой реакционной способностью к ферментации при гидролизе смесью ферментных препаратов «Брюзайм BGX» и «Целлолюкс-А» [39].

Применение двухстадийной технологии, включающей сульфатную варку и последующий ферментативный гидролиз под действием эндо- и экзоцеллюлаз, позволяет получать гидролизат с высоким содержанием глюкозы. Так, при ферментативном гидролизе древесной сульфатной целлюлозы из древесины тополя с относительно низким содержание лигнина (15,4–24,2 ед. Каппа), древесной массы из древесины березы, бука и сосны (число Каппа 25,8–31,4) и целлюлозы из пшеничной соломы (число Каппа 29,5) при концентрации субстрата 1,3 % с использованием коммерческого фермента NS-22086, содержащего целлюлазы и ксиланазы, выход глюкозы при гидролизе древесной массы из тополя составил 80 % к сухой массе и 78 % при гидролизе целлюлозы из бука и пшеничной соломы [40].

Ферментативный гидролиз методом твердофазной ферментации предварительно обработанной грибами бело-красной гнили *Pleurotus florida*, *Coriolopsis caperata* RCK 2011 и *Ganoderma* sp. rckk-02 (каждой индивидуально) багассы с использованием неочищенной целлюлазы из коричнево-красной гнили *Fomitopsis* sp. RCK2010 позволил получить выход сахаров в 1,5–2,4 раза выше, чем из необработанной багассы [41].

Повышение эффективности ферментативного гидролиза стеблей кукурузы обеспечено предварительной водно-кислотной обработкой (при pH 2,3) и $FeCl_3$ (при концентрации 0,05 моль/л). Показано, что высокая кислотность и окисляющая способность раствора ускоряют и обеспечивают максимальный гидролиз гемицеллюлоз (93,04 %) и целлюлозы (92 % – за счет удаления основной массы гемицеллюлоз и повышения доступности и гидролизуемости целлюлозы) [42].

Для повышения гидролиза кенафа (Hibiscus cannabinus) при использовании комплекса ферментов проводили его предварительную обработку в 2 стадии: сначала 0,2 %-ным раствором $Ca(OH)_2$ (при соотношении жидкой и твердой фаз – гидромодуль – 8:1 при 50 °С в течение 1,5 ч), а на 2-й стадии – 20 %-ным раствором пероксусной кислоты (при 75 °С в течение 2 ч), что обеспечило удаление 59,25 % лигнина и сохранение 87,72 % гемицеллюлоз и 96,1 % целлюлозы [43].

Механическая активация лигноцеллюлозного сырья с содержанием лигнина 3–35 % в активаторах планетарного, роликового, вибрационного или виброцентробежного типов обеспечивает при последующем гидролизе ферментными препаратами с гидролизующей активностью по отношению к целлюлозе, гемицеллюлозам, крахмалу и белкам (при концентрации ферментных препаратов 0,5–10 % и концентрации твердой фазы 10–40 %) при температуре 50–65 °С в течение 1–6 сут) сокращение продолжительности осахаривания лигноцеллюлозных материалов без использования агрессивных, взрывопожароопасных и неэкологичных реагентов [44].

Для повышения микробиологической конверсии целлюлозы при получении этанола отходы волокон механической массы из эвкалипта после щелочной пероксидной обработки предварительно обрабатывали растворами ПАВ (Твин-80) и $FeCl_3$. Предварительная обработка массы раствором $FeCl_3$ улучшает ферментативный гидролиз волокон эвкалипта, но одновременно ингибирует активность фермента. Добавление Твин-80 в раствор $FeCl_3$ при предварительной обработке повышает активность фермента путем разбавления ионов Fe(III) на поверхности биомассы. При оптимальных условиях предварительной обработки (температура – 180 °С, гидромодуль – 8:1,

продолжительность – 30 мин, концентрация $FeCl_3$ и Твин-80 – 0,15 моль/л и 1 % соответственно) и начальной концентрации целлюлазы 20 ед./г субстрата выход глюкозы составил 34,8 г/100 г абсолютно сухой биомассы, а после 72 ч ферментативного гидролиза – 91,3 % [45].

Предварительная комбинированная обработка коры тополя 3 %-ным раствором H_2SO_4 с одновременным гамма-облучением (0–1000 кГр) повышает эффективность ферментативного гидролиза – выход редуцирующих сахаров при комбинированной обработке достигает 83,1 %, что объясняется изменением кристалличности целлюлозы, модификацией лигнина и удалением гемицеллюлоз [46].

Обработка паром лигноцеллюлозных нанофибрилл при температуре до 140 °С влияет на содержание гемицеллюлоз. При их ферментативном гидролизе целлюлазой *Acremonium* (многокомпонентный фермент, включающий гемицеллюлазы) установлено, что гемицеллюлозы локализуются вокруг микрофибрилл целлюлозы и быстро распадаются, что приводит к доступности поверхности целлюлозы после начальной стадии гидролиза, затем происходит ее основной гидролиз [47].

Показано [48], что при ферментативном гидролизе отходов переработки злаков (соломы и шелухи овса) наиболее эффективной является их последовательная обработка перед гидролизом раствором гидроксида натрия и пероксидом водорода, а ферментный препарат «Целлолюкс-А» обладает достаточно высокой активностью по отношению данным субстратам.

При гидролизе целлюлозы «Ватман № 1» и стеблей кукурузы, активированных измельчением в шаровых мельницах Spex 8 и АПФ-4, ферментным комплексным препаратом «Целлолюкс-А» (с целлюлазной активностью 2000 ед./г), установлено, что гидролизуются преимущественно аморфные участки целлюлозы, а в остатке после гидролиза происходит увеличение степени кристалличности целлюлозы [49].

Показана возможность осуществления ферментативного гидролиза лигноцеллюлозных фракций пшеничной соломы, стержней кукурузных початков, свекловичного жома и березовых опилок после отгонки из них фурфурола с использованием ферментного препарата CellicCTec 2 (температура – 45 °С, pH 5,0 при продолжительности 25–30 ч), обеспечивающего выход редуцирующих веществ 14–22 % от абсолютно сухого вещества [50].

Ферментативный гидролиз 20 %-ной суспензии багассы из гигантского тростника, предварительно обработанного паровым взрывом в присутствии кислотного катализатора или без него, ферментными препаратами Cellic^{TM}CTec 1 и Cellic^{TM}CTec 2 после 48 ч ферментации, обеспечивает концентрацию моносахаридов (глюкозы и ксилозы) в гидролизате 91 г/л [51].

Повышение эффективности ферментативного гидролиза полисахаридов древесины, обеспечивающего суммарный выход редуцирующих сахаров 11,5–18,7 %, достигается ее предварительным измельчением до образования ультрадисперсных частиц (от 2 до 200 нм) [52].

Технологически ферментативный гидролиз растительного сырья может осуществляться способами глубинной ферментации в виде суспензии нерастворимого субстрата в жидкой питательной среде и твердофазной ферментацией на поверхности и в массе субстрата. Сравнение этих способов, их достоинства и недостатки наиболее полно изложены в работах [53, 54].

Одним из существенных недостатков при осуществлении процесса глубинной ферментации является сравнительно невысокая концентрация нерастворимого субстрата в жидкой питательной среде, что требует применения аппаратов большого объема и сопровождается образованием значительного количества сточных вод. Но при этом в принципе возможно использование ферментаторов, применяемых, например, в производстве кормовых дрожжей из гидролизатов растительного сырья.

При реализации процесса твердофазной ферментации в большей степени возникают проблемы, связанные с массообменном – аэрацией всего объема субстрата и отводом физиологического тепла, что приводит к снижению эффективности процесса, увеличению его продолжительности, а также затрудняет контролирование и управление процессом [53].

Применяемые для этого аппараты (растильные камеры с горизонтально и вертикально расположенными кюветами, установки колонного и барабанного типов и др. конструкции) используются преимущественно для культивирования микроорганизмов на твердых питательных средах при получении посевного материала или малотоннажных продуктов микробиологического

синтеза и, как правило, не способны обеспечить достаточно высокую производительность по перерабатываемому сырью [53, 55].

В настоящее время разработаны различные аппараты для осуществления процесса ферментации растительного сырья, например [56–58], в том числе конструкция, обеспечивающая в процессе твердофазной ферментации увеличение производительности и эффективности ферментолиза лигноцеллюлозных субстратов по сравнению с известными [58]. Однако эти решения не доведены до стадии конструкторских разработок и их применение возможно после создания соответствующей технической документации, опытных образцов технических решений и апробации в опытно-промышленных условиях.

Заключение. Наличие постоянно возобновляемых запасов углеводсодержащего растительного сырья обусловливает необходимость разработки новых способов его переработки, в том числе методами ферментативного гидролиза под действием комплекса ферментов, продуцируемых различными микроорганизмами или промышленно выпускаемыми на их основе ферментными препаратами.

Основными направлениями разработки и совершенствования процессов ферментативного гидролиза растительного сырья в настоящее время являются получение и применение более эффективных штаммов микроорганизмов, продуцирующих высокоактивные ферменты, направленное создание ферментов комплексного действия (гидролизующих не только целлюлозу, но и гемицеллюлозы, а также деструктирующих лигнин), разработка способов предварительной обработки сырья и совершенствования процессов ферментолиза.

Список использованных источников

1. Болотникова, О. И. Кислотный и энзиматический гидролиз непищевых источников растительной биомассы: перспективы промышленной реализации / О. И. Болотникова, Н. П. Михайлова, А. И. Гинак // Известия Санкт-Петербургского государственного технологического института (технического университета). – 2017. – № 39. – С. 89–95. https://doi.org/10.15217/issn1998984-9.2017.88

2. Фенгел, Д. Древесина (химия, ультраструктура, реакции) / Д. Фенгел, Г. Вегенер. – М.: Лес. пром-сть, 1988. – 512 с.

3. Лобанок, А. Г. Микробный синтез на основе целлюлозы: белок и другие ценные продукты / А. Г. Лобанок, В. Г. Бабицкая, Ж. Н. Богдановская. – Минск: Наука и техника, 1988. – 261 с.

4. Cheng, H. Lygnocellulose steed stock biorefinery as petrorefinery substitules / H. Cheng, L. Wang // Biomass Now – Sustainable Growth and Use. – 2013. – P. 347–388. https://doi.org/10.5772/51491

5. Клесов, А. А. Кинетическая теория действия полиферментных целлюлазных систем: стационарная кинетика / А. А. Клесов, С. Ю. Григораш // Микробиология и биохимия разложения растительных материалов. – М.: Наука, 1988. – С. 109–146.

6. Рабинович, М. Л. Целлюлазы микроорганизмов / М. Л. Рабинович, М. С. Мельник, А. В. Болобова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2002. – Т. 38, № 4.– С. 355–373.

7. Ферментные препараты *Penicillium verruculosum* для биоконверсии растительного сырья – альтернатива коммерческим препаратам, полученным с помощью грибов *Trichoderma* / А. В. Чекушина [и др.] // Биотехнология. – 2013. – № 3. – С. 69–80.

8. Чекушина, А. В. Целлюлолитические ферментные препараты на основе грибов *Trichoderma, Penicillium* и *Myceliophora* с увеличенной гидролитической активностью: автореф. дис. ... канд. хим. наук: 03.01.04 / А. В. Чекушина. – М., 2013. – 23 с.

9. Ферментативный гидролиз целлюлозы смесями мутантных форм целлюлаз *Penicillium verruculosum* / А. С. Доценко [и др.] // Вестн. Моск. ун-та. Сер. Химия. – 2018. – Т. 59, № 2. – С. 138–143.

10. Reese, E. T. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis / E. T. Reese // J. Bacteriol. – 1950. – Vol. 59, N 4. – P. 485–497. https://doi.org/10.1128/jb.59.4.485-497.1950

11. Reese, E. T. Degradation of polymeric carbohydrates of microbial enzymes / E. T. Reese, F. Loewus, V. S. Runeckies // The structure, biosynthesis and degradation of wood. – 1977. – Vol. 11. – P. 311–367. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8873-3_8

12. Eriksson, K. E. Exstracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. 3. Purification and physicochemical characterization of an exo-1,4-glucanase / K. E. Eriksson, B. Petersson // European Journal of Biochemistry. – 1975. – Vol. 51, N 1. – P. 213–218. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb03921.x

13. Yalliwell, G. The nature and mode of action of the cellulolytic components C_1 of *Trichoderma koningii* on native cellulose / G. Yalliwell, M. Griffin // Biochemical Journal. – 1973. – Vol. 135, no. 4. – P. 587–594. https://doi.org/10.1042/bj1350587

14. Wood, T. M. The purification and properties of the C_1-component of *Trichoderma koningii* cellulose / T. M. Wood, S. J. Mc Grae // Biochem. J. – 1972. – Vol. 128, N 7. – P. 1183–1192. https://doi.org/10.1042/bj1281183

15. Wood, T. M. Enzymes and mechanism involved in the solubilization of native cellulose / T. M. Wood // Ciêns. biol. – 1980. – Vol. 5. – P. 27–33.

16. Wood, T. M. The isolation purification and properties of *Penicillium fungiculosum* cellulose / T. M. Wood, S. J. McGrae, C. C. MacFariane // Biochem. J. – 1980. – Vol. 189, N 1. – P. 51–65. https://doi.org/10.1042/bj1890051

17. Клесов, А. А. Ферментативный гидролиз целлюлозы / А. А. Клесов, М. Л. Рабинович // Биоорган. химия. – 1980. – Т. 6, № 8. – С. 1225–1242.

18. Клесов, А. А. Ферментативный гидролиз целлюлозы. III. Закономерности образования глюкозы и целлобиозы при действии полиферментных систем на нерастворимую (природную) целлюлозу / А. А. Клесов, С. Ю. Григораш // Биоорган. химия. – 1981. – Т. 7, № 10. – С. 1538–1552.

19. Клесов, А. А. Кинетическая теория действия полиферментных целлюлазных систем: нестационарная кинетика / А. А. Клесов, С. Ю. Григораш // Микробиология и биохимия разложения растительных материалов. – М.: Наука, 1988. – С. 147–180.

20. Макарова, Е. И. Биоконверсия непищевого целлюлозосодержащего сырья (Обзор). Ч. 2 / Е. И. Макарова, В. В. Будаева // Изв. вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – Т. 6, № 3. – С. 26–35. https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-3-26-35

21. Рабинович, М. Л. Механизм ферментативного гидролиза целлюлозы: роль адсорбции ферментов / М. Л. Рабинович // Микробиология и биохимия разложения растительных материалов. – М.: Наука, 1988. – С. 70–108.

22. Ферментативный гидролиз продуктов гидротермобарической обработки мискаунтуса и плодовых оболочек овса / В. В. Будаева [и др.] // Катализ в промышленности. – 2013. – № 3. – С. 60–66.

23. Morteza, S. Modeling the process of enzymatic hydrolysis of cellulosic waste materials to fermentable sugars in solid-liquid systems / S. Morteza, M. Kamyar // 18 International Congress of Chemical and Process Engineering, Prague, 24–28 Aug. 2008. – Prague, 2008. – P. 2114–2115.

24. Tina, J. Assessing cellulose microfibrillar structure changes due to cellulase action / J. Tina, S.-M. C. Monica, P. J. O'Dell // Carbohydrate Polymers. – 2013. – Vol. 97, N 2. – P. 581–586. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.027

25. Анализ продуктов ферментативного гидролиза растительной биомассы / И. Н. Зоров [и др.] // Физикохимия растительных полимеров: Материалы 5-й Междунар. конф., Архангельск, 8–11 июля, 2013. – Архангельск, 2013. – С. 71–73.

26. Enzymatic hydrolysis of cellulose with different crystallinities studied by means of SEG-MALLS / M. Zhang [et al.] // Chin. J. Chem. Eng. – 2011. – Vol. 19, N 5. – P. 773–778. https://doi.org/10.1016/s1004-9541(11)60055-4

27. Синицын, А. П. Влияние физико-химических и структурных факторов целлюлозы на эффективность ее ферментативного гидролиза / А. П. Синицын // Микробиология и биохимия разложения растительных материалов. – М.: Наука, 1988. – С. 3–29.

28. Иоелович, М. Я. Изучение кинетики ферментативго гидролиза целлюлозных материалов / М. Я. Иоелович // Химия раст. сырья. – 2014. – № 1. – С. 61–64. https://doi.org/10.14258/jcprm.1401061

29. Abdullah, R. Hydrolysis behavior of various crystalline celluloses treated by cellulase of Tricoderma viride / R. Abdullah, S. Saka // Cellulose. – 2014. – Т. 21, №. 6. – С. 4049–4058. https://doi.org/10.1007/s10570-014-0410-4

30. Wahlström, R. M. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic polysaccharides in the presence of ionic liquids / R. M. Wahlström, A. Suurnäkki // Green Chem. – 2015. – Vol. 17, N 2. – C. 694–714. https://doi.org/10.1039/c4gc01649a

31. Гусаков, А. В. Структурные особенности и физико-химические параметры лигноцеллюлозных материалов, определяющие их реакционную способность при ферментативной деградации / А. В. Гусаков, А. П. Синицын // Физикохимия растительных полимеров: Материалы 5-й Междунар. конф., Архангельск, 8–11 июля, 2013. – Архангельск, 2013. – С. 56–57.

32. Калунянц, К. А. Современные способы ферментативного гидролиза целлюлозосодержащих материалов / К. А. Калунянц, Е. Ф. Шаненко, Л. В. Зайцева // Итоги науки и техники. Сер. Химия и технология пищевых продуктов. – 1988. – Т. 1. – 185 с.

33. Синицын, А. П. Сравнительный анализ реакционной способности целлюлозосодержащего сырья по отношению к ферментативному гидролизу / А. П. Синицын, И. Л. Леонова, Б. Наджемин // Прикладная биохимия и микробиология. – 1986. – Т. 22, № 4. – С. 517–525.

34. Методы подготовки растительного сырья к биоконверсии в кормовые продукты и биоэтанол / В. И. Сушкова [и др.] // Химия раст. сырья. – 2016. – № 1. – С. 93–119. https://doi.org/10.14258/jcprm.201601841

35. Subhedar, P. B. Intensification of enzymatic hydrolysis of lignocellulose using ultrasound for efficient bioethanol production: a review (Review) / P. B. Subhedar, P. R. Gogate // Ind. and Eng. Chem. Res. – 2013. – Vol. 52, N 34. – P. 11816–11828. https://doi.org/10.1021/ie401286z

36. Improved enzyme efficiency of rapeseed straw through the two-stage fractionation process using sodium hydroxide and sulfuric acid / C. C. Ho [et al.] // Appl. Energy. – 2013. – Vol. 102. – P. 640–646. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.08.011

37. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite / S. Germano [et al.] // Appl. Energy. – 2013. –Vol. 102. – P. 399–402. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.029

38. Исследование влияния предобработки субстрата глицерином на гидролиз и ферментацию лигноцеллюлозных отходов с помощью *Streptomyces* sp. K-7 / Л. М. Султанова [и др.] // Башкир. хим. журн. – 2012. – Т. 19, № 3. – С. 127–129.

39. Макарова, Е. И. Ферментативный гидролиз целлюлоз из плодовых оболочек овса при различных концентрациях субстрата / Е. И. Макарова, В. В. Будаева, Е. А. Скиба // Химия раст. сырья. – 2013. – № 2. – С. 43–50. https://doi.org/10.14258/jcprm.1302043

40. Production of glucose-rich enzymatic hydrolysates from cellulosic pulps / K. Buzała [et al.] // Cellulose. – 2015. – Vol. 22, N 1. – P. 663–674. https://doi.org/10.1007/s10570-014-0522-x

41. Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars / D. Deepa [et al.] // Carbohydr. Polym.: Scientific and Technological Aspects of Industrially Important Polysaccharides. – 2014. – Vol. 99. – P. 264–269. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.045

42. Pretreatment of corn stover with acidic electrolyzed water and FeCl3 leads to enhanced enzymatic hydrolysis / S. Zhaobing [et al.] // Cellulose. – 2014. – Vol. 21, N 5. – P. 3383–3394. https://doi.org/10.1007/s10570-014-0353-9

43. Efficient removal of lignin with the maintenance of hemicellulose from kenaf by two-stage pretreatment process / A. N. Izyan Wan [et al.] // Carbohydr. Polym. : Scientific and Technological Aspects of Industrially Important Polysaccharides. – 2014. – Vol. 99. – P. 447–453. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.043

44. Способ ферментативного осахаривания лигноцеллюлозных материалов : пат. 2514408 РФ, МПКС13К 1/02 (2006.01) / А. Л. Бычков, О. И. Ломовский. – Опубл. 27.04.2014.

45. Chen, L. Enhanced cellulase hydrosysis of eucalyptus waste fibers from pulp mill by tween80-assisted ferric chloride pretreatment / L. Chen, S. Fu // J. Agr. and Food Chem. – 2013. – Vol. 61, N 13. – P. 3293–3300. https://doi.org/10.1021/jf400062e

46. Enhanced enzymatic hydrolysis of poplar bark by combined use of gamma ray and dilute acid for bioethanol production / C. B. Yeoup [et al.] // Radiat. Phys. and Chem. – 2012. – Vol. 81, N 8. – P. 1003–1007. https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.01.001

47. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of the enzymatic hydrolysis of steam-treated lignocellulosic nanofibrils / K. Akio [et al.] // Cellulose. – 2014. – Vol. 21, N 4. – P. 2433–2444. https://doi.org/10.1007/s10570-014-0312-5

48. Будаева, В. В. Исследование ферментативного гидролиза отходов переработки злаков / В. В. Будаева, Р. Ю. Митрофанов, В. Н. Золотухин // Ползуновский вестник. – 2008. – № 3. – С. 322–327.

49. Голязимова, О. В. Механическая активация ферментативного гидролиза целлюлозы / О. В. Голязимова, А. А. Политов, О. И. Ломовский // Химия раст. сырья. – 2009. – № 2. – С. 59–63.

50. Ферментолиз целлюлозосодержащих остатков производства фурфурола из отходов растительного сырья / А. А. Вазетдинова [и др.] // Башкир. хим. журн. – 2017. – Т. 24, № 1. – С. 27–31.

51. Hydrolysis of concentrated suspensions of steam pretreated Arundo donax / I. De Bari [et al.] // Appl. Energy. – 2013. – Vol. 102. – P. 179–189. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.05.051

52. Эффективность ферментативного гидролиза полисахаридов ультрадисперсных частиц лигноцеллюлозного сырья в зависимости от их размера / В. В. Шутова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48, № 3. – С. 346–352.

53. Головлев, Е. Л. Твердофазная ферментация растительного сырья / Е. Л. Головлев, Л. А. Головлева // Микробиология и биохимия разложения растительных материалов. – М.: Наука, 1988. – С. 301–333.

54. Смирнов, К. А. Особенности твердофазной ферментации / К. А. Смирнов, Ю. Д. Алашкевич, Н. С. Решетова // Химия раст. сырья. – 2009. – № 3. – С. 161–164.

55. Калунянц, К. А. Оборудование микробиологических производств / К. А. Калунянц, Л. И. Голгер, В. Е. Балашов. – М.: Агропромиздат, 1987. – 398 с.

56. Твердофазный ферментер и способ твердофазного культивирования: пат.2235767С2 РФ, МПК С12М 1/06, С12М 1/14, С12М 1/16 / П. Лют, У. Айбен, Ю. Д. Кузнецов. – Опубл. 30.11.2000.

57. Enzymatische Hydrolyse von Lignocellolose im Festbettreaktor / C. Kirsch [et al.] // Chem.-Ing.-Techn. – 2011. – Vol. 83, N 6. – P. 867–873. https://doi.org/10.1002/cite.201000204

58. Опыт масштабирования ферментативного гидролиза технических целлюлоз из мискантуса и плодовых оболочек овса / Г. В. Сакович [и др.] // Ползуновский вестник. – 2012. – № 4. – С. 173–177.

59. Аппарат для твердофазной ферментации: пат. 16946 Респ. Беларусь, МПК С 12 М 1/00, С 12 М 1/04 / В. Н. Павлечко, В. С. Болтовский. – Опубл. 30.04.2013.

References

1. Bolotnikova O. I., Mikhailova N. P., Ginak A. I. Acid and enzymatic hydrolysis of nonfood-based biomass sources: prospects for industrial implementation. Izvestiya Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo tekhnologicheskogo instituta (tekhnicheskogo universiteta) = Bulletin of the Saint Petersburg State Institute of Technology (Technical University), 2017, no. 39, pp. 89–95 (in Russian). https://doi.org/10.15217/issn1998984-9.2017.88

2. Fengel D., Wegener G. *Wood (chemistry, ultrastructure, reactions).* Moscow, Lesnaya promyshlennost' Publ., 1988. 512 p. (in Russian).

3. Lobanok, A. G., Babitskaya V. G., Bogdanovskaya Zh. N. *Microbial synthesis based on cellulose: protein and other valuable products*. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1988. 261 p. (in Russian).

4. Cheng H., Wang L. Lygnocellulose steed stock biorefinery as petrorefinery substitules. *Biomass Now – Sustainable Growth and Use*, 2013, pp. 347–388. https://doi.org/10.5772/51491

5. Klesov, A. A., Grigorash S. Yu. Kinetic theory of action of polyenzyme cellulase systems: stationary kinetics. *Microbiology and biochemistry of decomposition of plant materials.* Moscow, Nauka Publ., 1988, pp. 109–146 (in Russian).

6. Rabinovich M. L., Melnik M. S., Bolobova A. V. Cellulases of microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2002, vol. 38, no. 4, pp. 355–373. https://doi.org/10.1023/a:1016264219885

7. Chekushina A. V., Dotsenko G. S., Kondratieva E. G., Sinitsyn A. P. Enzyme preparations from*Penicillium verruculosum* for bioconversion of plant raw materials is an alternative to commercial preparations obtained using Trichoderma fungi species. *Biotekhnologiya = Biotechnology*, 2013, no. 3, pp. 69–80 (in Russian).

8. Chekushina A. V. *Cellulolytic enzyme preparations based on the fungi Trichoderma, Penicillium and Myceliophora with increased hydrolytic activity.* Moscow, 2013. 23 p. (in Russian).

9. Dotsenko A. S., Gusakov A. V., Rozhkova A. M., Volkov P. V., Korotkova O. G., Sinitsyn A. P. Enzymatic hydrolysis of cellulose using mixes of mutant forms of cellulases *from Penicillium verruculosum*. *Moscow University Chemistry Bulletin*, 2018, vol. 59, no. 2, pp. 138–143. https://doi.org/10.3103/s0027131418020037

10. Reese E. T. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *Journal of Bacteriology*, 1950, vol. 59, no. 4, pp. 485–497. https://doi.org/10.1128/jb.59.4.485-497.1950

11. Reese E. T., Loewus F., Runeckies V. S. Degradation of polymeric carbohydrates of microbial enzymes. *The structure, biosynthesis and degradation of wood.* 1977, vol. 11, pp. 311–367. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8873-3_8

12. Eriksson K. E., Petersson B. Exstracellular enzyme system utilized by the fungus *Sporotrichum pulverulentum* (*Chrysosporium lignorum*) for the breakdown of cellulose. Purification and physicochemical characterization of an exo-1,4-glucanase. *European Journal of Biochemistry*, 1975, vol. 51, no. 1, pp. 213–218. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1975.tb03921.x

13. Yalliwell G., Griffin M. The nature and mode of action of the cellulolytic components C_1 of *Trichoderma koningii* on native cellulose. *Biochemical Journal*, 1973, vol. 135, no. 4, pp. 587–594. https://doi.org/10.1042/bj1350587

14. Wood, T. M., McGrae S. J. The purification and properties of the C_1-component of *Trichoderma koningii* cellulose. *Biochemical Journal,* 1972, vol. 128, no. 7, pp. 1183–1192. https://doi.org/10.1042/bj1281183

15. Wood, T. M. Enzymes and mechanism involved in the solubilization of native cellulose. *Ciencia biologica,* 1980, vol. 5, pp. 27–33.

16. Wood, T. M., McGrae S. J., MacFariane C. C. The isolation purification and properties of *Penicillium fungiculosum* cellulose. *Biochemical Journal,* 1980, vol. 189, no. 1, pp. 51–65. https://doi.org/10.1042/bj1890051

17. Klesov A. A., Rabinovich M. L. Enzymatic hydrolysis of cellulose. *Bioorganicheskaya khimiya = Russian journal of bioorganic chemistry*, 1980, vol. 6, no. 8, pp. 1225–1242 (in Russian).

18. Klesov A. A., Grigorash S. Yu. Enzymatic hydrolysis of cellulose. III. Regularities of the formation of glucose and cellobiose under the action of polyenzyme systems on insoluble (natural) cellulose. *Bioorganicheskaya khimiya = Russian journal of bioorganic chemistry*, 1981, vol. 7, no. 10, pp. 1538–1552 (in Russian).

19. Klesov A. A., Grigorash S. Yu. Kinetic theory of action of polyenzyme cellulase systems: non-stationary kinetics. *Microbiology and biochemistry of decomposition of plant materials.* Moscow, Nauka Publ., 1988, pp. 147–180 (in Russian).

20. Makarova E. I., Budaeva V. V. Bioconversion of nonfood cellulosic biomass. Part 2. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotehnologiya = Proceedings of universities. Applied chemistry and biotechnology*, 2016, vol. 6, no. 3, pp. 26–35 (in Russian). https://doi.org/10.21285/2227-2925-2016-6-3-26-35

21. Rabinovich M. L. The mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulose: the role of adsorption of enzymes. *Microbiology and biochemistry of decomposition of plant materials*. Moscow, Nauka Publ., 1988, pp. 70–108 (in Russian).

22. Budaeva V. V., Makarova E. I., Skiba E. A., Sakovich G. V. Enzymatic hydrolysis of the products of hydrothermobaric treatment of miscanthus and oat fruit shells. *Catalysis in industry*, 2013, no. 3, pp. 60–66. https://doi.org/10.1134/s207005041304003x

23. Morteza S., Kamyar M. Modeling the process of enzymatic hydrolysis of cellulosic waste materials to fermentable sugars in solid-liquid systsems. *18 International Congress of Chemical and Process Engineering.* Prague, 24–28 Aug. 2008, pp. 2114–2115.

24. Jeoh T., Santa-Maria M. C., O'Dell P. J. Assessing cellulose microfibrillar structure changes due to cellulase action. *Carbohydrate Polymers*, 2013, vol. 97, no. 2, pp. 581–586. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.05.027

25. Zorov I. N., Bushina E. V., Proskurina O. V., Osipov D. O., Volkov P. V., Chekushina A. V., Rozhkova A. M., Sinitsyn A. P. Analysis of the products of enzymatic hydrolysis of plant biomass. *Fizikokhimiya rastitel'nyih polimerov: Materialyi 5 Mezhdunarodnoy konferentsii, Arkhangel'sk, 8–11 iyulya, 2013* [Physicochemistry of Plant Polymers: Proceedings of the 5th International Conference, Arkhangelsk, 8–11 Jul., 2013]. Arkhangelsk, 2013, pp. 71–73 (in Russian).

26. Zhang M., Su R., Qi W., Du R., He Z. Enzymatic hydrolysis of cellulose with different crystallinities studied by means of SEG-MALLS. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2011, vol. 19, no. 5, pp. 773–778. https://doi.org/10.1016/s1004-9541(11)60055-4

27. Sinitsyn A. P. Influence of physicochemical and structural factors of cellulose on the efficiency of its enzymatic hydrolysis. *Microbiology and biochemistry of decomposition of plant materials*. Moscow, Nauka Publ., 1988, pp. 3–29 (in Russian).

28. Ioelovich M. Ya. Study of the kinetics of enzymatic hydrolysis of cellulose materials. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*, 2014, no. 1, pp. 61–64 (in Russian). https://doi.org/10.14258/jcprm.1401061

29. Abdullah R., Saka S. Hydrolysis behavior of various crystalline celluloses treated by cellulase of Tricoderma viride. *Cellulose*, 2014, vol. 21, no. 6, 4049–4058. https://doi.org/10.1007/s10570-014-0410-4

30. Wahlström R. M., Suurnäkki A. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic polysaccharides in the presence of ionic liquids. *Green Chemistry*, 2015, vol. 17, no. 2, pp. 694–714. https://doi.org/10.1039/c4gc01649a

31. Gusakov A. V., Sinitsyn A. P. Structural features and physicochemical parameters of lignocellulosic materials that determine their reactivity during enzymatic degradation. *Fizikokhimiya rastitel'nyih polimerov: Materialyi 5 Mezhdunarodnoy konferentsii, Arkhangel'sk, 8–11 iyulya, 2013* [Physicochemistry of Plant Polymers: Proceedings of the 5th International Conference, Arkhangelsk, 8–11 Jul., 2013]. Arkhangelsk, 2013, pp. 56–57 (in Russian).

32. Kalunyants K. A., Shanenko E. F., Zaitseva L. V. Modern methods of enzymatic hydrolysis of cellulose-containing materials. *Itogi nauki i tekhniki. Ser. Khimiya i tekhnologiya pischevykh produktov* [Results of Science and Technology. Ser. Chemistry and technology of food products], 1988, vol. 1, 185 p. (in Russian).

33. Sinitsyn A. P., Leonova I. L., Nadzhemin B. Comparative analysis of the reactivity of cellulose-containing raw materials in relation to enzymatic hydrolysis. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 1986, vol. 22, no. 4, pp. 517–525 (in Russian).

34. Sushkova V. I., Ustyuzhaninova L. V., Berezina O. V., Yarotskiy S. V. Methods of preparation of plant raw materials for bioconversion into feed products and bioethanol. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*, 2016, no. 1, pp. 93–119 (in Russian). https://doi.org/10.14258/jcprm.201601841

35. Subhedar P. B., Gogate P. R. Intensification of enzymatic hydrolysis of lignocellulose using ultrasound for efficient bioethanol production: a review (Review). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, vol. 52, no. 34, pp. 11816–11828. https://doi.org/10.1021/ie401286z

36. Ho C. C., Hwan U. B., Soo K. Y., Keun O. K. Improved enzyme efficiency of rapeseed straw through the two-stage fractionation process using sodium hydroxide and sulfuric acid. *Applied Energy*, 2013, vol. 102, pp. 640–646. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.08.011

37. Germano S., Anikó V., André F., Milagres A. M. F. Enhancement of cellulose hydrolysis in sugarcane bagasse by the selective removal of lignin with sodium chlorite. *Applied Energy*, 2013, vol. 102, pp. 399–402. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.07.029

38. Sultanova L. M., Likhanova S. S., Petukhova N. I., Sharaeva A. A., Zorin V. V. Research of influence of substrate pretreatment by glycerol on the hydrolysis and digestion of lignocellulosic waste by *Streptomyces* sp. K-7. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal = Bashkir chemical journal*, 2012, vol. 19, no. 3, pp. 127–129 (in Russian).

39. Makarova E. I., Budaeva V. V., Skiba E. A. Enzymatic hydrolysis of celluloses from oat hulls at different substrate concentrations. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*, 2013, no. 2, pp. 43–50 (in Russian). https://doi.org/10.14258/jcprm.1302043

40. Buzała K., Przybysz P., Rosicka-Kaczmarek J., Kalinowska H. Production of glucose-rich enzymatic hydrolysates from cellulosic pulps. *Cellulose*, 2015, vol. 22, no. 1, pp. 663–674. https://doi.org/10.1007/s10570-014-0522-x

41. Deepa D., Rishi G., Preeti N., Chander R. K. Fungal pretreatment improves amenability of lignocellulosic material for its saccharification to sugars. *Carbohydrate Polymers,* 2014, vol. 99, pp. 264–269. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.045

42. Zhaobing S., Chaonan J., Haisheng P., Jiping S., Li L., Junshe S. Pretreatment of corn stover with acidic electrolyzed water and $FeCl_3$ leads to enhanced enzymatic hydrolysis. *Cellulose*, 2014, vol. 21, no. 5, pp. 3383–3394. https://doi.org/10.1007/s10570-014-0353-9

43. Izyan A. N. Wan, Jamaliah J. Md, Amir R., Munir M. A. Abdul, Diba B. F. Abu, Rosli I. Md. Efficient removal of lignin with the maintenance of hemicellulose from kenaf by two-stage pretreatment process. *Carbohydrate Polymers*, 2014, vol. 99, pp. 447–453. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.043

44. Bychkov A. L., Lomovskiy O. I. *Method for enzymatic saccharification of lignocellulosic materials.* Patent RU no. 2514408. 2014 (in Russian).

45. Chen L., Fu S. Enhanced cellulase hydrosysis of eucalyptus waste fibers from pulp mill by tween80-assisted ferric chloride pretreatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, vol. 61, no. 13, pp. 3293–3300. https://doi.org/10.1021/jf400062e

46. Yeoup C. B., Taek L. J., Hyoung-Woo B., Ung-Jin K., Hyeun-Jong B., Gon W. S., Jae-Young C. Enhanced enzymatic hydrolysis of poplar bark by combined use of gamma ray and dilute acid for bioethanol production. *Radiation Physics and Chemistry*, 2012, vol. 81, no. 8, pp. 1003–1007. https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.01.001

47. Akio K., Shinichiro I., Seung-Hwan L., Takashi E. Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of the enzymatic hydrolysis of steam-treated lignocellulosic nanofibrils. *Cellulose*, 2014, vol. 21, no. 4, pp. 2433–2444. https://doi.org/10.1007/s10570-014-0312-5

48. Budaeva V. V., Mitrofanov R. Yu., Zolotukhin V. N. Study of enzymatic hydrolysis of cereal processing waste. *Polzunovskiy vestnik*, 2008, no. 3, pp. 322–327 (in Russian).

49. Golyazimova O. V., Politov A. A., Lomovskiy O. I. Mechanical activation of enzymatic hydrolysis of cellulose. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*, 2009, no. 2, pp. 59–63 (in Russian).

50. Vazetdinova A. A., Kharina M. V., Loginova I. G., Kleschevnikov L. I. Enzymatic hydrolysis of cellulosic residuals of furfural production from vegetable raw materials. *Bashkirskii khimicheskii zhurnal = Bashkir chemical journal*, 2017, vol. 24, no. 1, pp. 27–31 (in Russian).

51. De Bari I., Liuzzi F., Villone A., Braccio G. Hydrolysis of concentrated suspensions of steam pretreated Arundo donax. *Applied Energy*, 2013, vol. 102, pp. 179–189. https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2012.05.051

52. Shutova V. V., Yusipovich A. I., Parshina E. Yu., Zakharkin D. O., Revin V. V. Effect of particle size on the enzymatic hydrolysis of polysaccharides from ultrafine lignocellulose particles. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya = Applied Biochemistry and Microbiology*, 2012, vol. 48, no. 3, pp. 346–352 (*i*n Russian).

53. Golovlev E. L., Golovleva L. A. Solid-phase fermentation of plant raw materials. *Microbiology and biochemistry of decomposition of plant materials.* Moscow, Nauka Publ., 1988, pp. 301–333 (in Russian).

54. Smirnov K. A., Alashkevich Yu. D., Reshetova N. S. Features of solid phase fermentation. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya = Chemistry of plant raw material*, 2009, no. 3, pp. 161–164 (in Russian).

55. Kalunyants K. A., Golger L. I., Balashov V. E. *Equipment for microbiological production*. Moscow, Agropromizdat Publ., 1987. 398 p. (in Russian).

56. Lyut P., Ayben U., Kuznetsov Yu. D. *Solid phase fermenter and solid phase culture method*. Patent RU no. 2235767C2. 2000 (in Russian).

57. Kirsch C., Wermeyer K., Zetzl C., Smirnova I. Enzymatische Hydrolyse von Lignocellolose im Festbettreaktor. *Chemie Ingenieur Technik*, 2011, vol. 83, no. 6, pp. 867–873. https://doi.org/10.1002/cite.201000204

58. Sakovich G. V., Budaeva V. V., Skiba E. A., Makarova E. I., Pavlov I. N., Kortusov A. N., Zolotukhin V. N. An experience of scaling up the enzymatic hydrolysis of technical celluloses from miscanthus and oat hulls. *Polzunovskiy vestnik*, 2012, no. 4, pp. 173–177 (in Russian).

59. Pavlechko V. N., Boltovsky V. S. *Apparatus for solid-phase fermentation*. Patent RB no. 16946. 2013 (in Russian).

Информация об авторе

Болтовский Валерий Станиславович – д-р техн. наук, профессор. Белорусский государственный технологический университет (ул. Свердлова, 13а, 220006, Минск, Республика Беларусь). E-mail: v-boltovsky@rambler.ru

Information ab out the authors

Valeriy S. Boltovskiy – D. Sc. (Engineering), Professor. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlov str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: v-boltovsky@rambler.ru