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

ВЕСЦІ
НАЦЫЯНАЛЬНАЙ АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ ХІМІЧНЫХ НАВУК. 2026. Т. 62, № 4

ИЗВЕСТИЯ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ ХИМИЧЕСКИХ НАУК. 2026. Т. 62, № 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

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

Алексей Валентинович Труханов –
Президиум Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

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
Н. И. Минич (ведущий редактор журнала) – Издательский дом «Беларуская навука», Минск, Беларусь
В. Е. Агабеков – Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
М. В. Артемьев – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

М. А. Богдасаров – Брестский государственный университет имени А. С. Пушкина, Брест, Беларусь
А. И. Иванец – Министр образования Республики Беларусь, Минск, Беларусь
С. В. Какарека – Институт природопользования Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
Е. Н. Калиниченко – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
А. И. Кулак – Институт общей и неорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. Г. Левашкевич – Отделение химии и наук о Земле Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
И. А. Левицкий – Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь
В. И. Поткин – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
Д. В. Свиридов – Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
С. А. Усанов – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. А. Хрипач – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
В. В. Шманай – Институт физико-органической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
А. В. Янцевич – Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

Редакционный совет

Ахмад Хоссейни-Бандегхараи – Семнанский университет, Семнан, Исламская Республика Иран
Мика Силланпаа – Йоханнесбургский университет, Йоханнесбург, Южно-Африканская Республика
В. Н. Пармон – Сибирское отделение Российской академии наук, Россия
В. Я. Прушак – общество с ограниченной ответственностью «Машиностроительная корпорация» – управляющая компания Холдинга ИПР, 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. 2026. Т. 62, № 4.
Выходит на русском, белорусском и английском языках

Редактор *Н. И. Минич*
Компьютерная верстка *Н. И. Кашуба*

Подписано в печать 09.11.2026. Выход в свет 27.11.2026. Формат 60×84 $^1/_8$. Бумага офсетная.
Печать цифровая. Усл. печ. л. 10,23. Уч.-изд. л. 11,3. Тираж 42 экз. Заказ 214.
Цена: индивидуальная подписка – 16,33 руб., ведомственная подписка – 36,06 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, 220084, г. Минск, Республика Беларусь

© РУП «Издательский дом «Беларуская навука»,
Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук, 2026

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

PROCEEDINGS
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

CHEMICAL SERIES, 2026, vol. 62, 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

Aleksey V. Trukhanov – Department of Chemistry and Earth Science 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
Natallia I. Minich (Lead Editor) – Publishing House "Belaruskaya Navuka", Minsk, Belarus
Vladimir E. Agabekov – Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Mikhail V. Artemyev – Belarusian State University, Minsk, Belarus
Maksim A. Bogdasarov – Brest State A. S. Pushkin University, Brest, Belarus
Andrei I. Ivanets – Ministry of Education of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus
Sergey V. Kakareka – Institute of Nature Management 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
Vladimir A. Khripach – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Anatoly I. Kulak – Institute of General and Inorganic 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 A. Levitsky – Belarusian State University of Technology, 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
Sergey A. Usanov – Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Vadim V. Shmanai – Institute of Physical Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
Aleksey V. Yantsevich – Institute of Bioorganic 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

Ahmad Hosseini-Bandegharaei – Semnan University, Semnan, Islamic Republic of Iran
Mika Sillanpää – University of Johannesburg, Johannesburg, Republic of South Africa
Valentin N. Parmon – Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Russian Federation
Victor Ya. Prushak – Machine-Building Corporation LLC – the management company of the IPR Holding, 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, 2026, vol. 62, no. 4.
Printed in Russian, Belarusian and English languages

Editor *N. I. Minich*
Computer imposition *N. I. Kashuba*

It is sent of the press 09.11.2026. Appearance 27.11.2026. Format 60×84 1/8. Offset paper.
The press digital. Printed pages 10,23. Publisher`s signatures 11,3. Circulation 42 copies. Order 214.
Price: individual subscription – 16,33 byn., departmental subscription – 36,06 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, 220084, Minsk, Republic of Belarus.

© RUE "Publishing House "Belaruskaya Navuka",
Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series, 2026

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

Уважаемые читатели журнала
«Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук»!

В настоящем номере в рубрике «Біяарганічная хімія» публикуются статьи участников IX Международной конференции «Химия, структура и функция биомолекул». Программа конференции охватывала широкий спектр тем, связанных с биологическими веществами, низкомолекулярными соединениями и биополимерами: выделение из природных источников и установление их структуры; химический синтез и биосинтез; исследования биологической активности; практическое применение биорегуляторов; биоинженерия и биоинформатика.

Представленные материалы посвящены решению актуальных задач современной биоорганической химии: получение и исследование свойств белков CYP7A1, CYP2J2, ANGPT1, VEGF165, поиск ингибиторов белка Grp94, анализ структурных особенностей VHH-домена антител, предсказание фотохимических свойств родопсинов.

Выражаем глубокую признательность редакционной коллегии журнала за предоставленную возможность ознакомить широкую научную общественность с развернутыми результатами данных исследований.

Организационный комитет конференции CSFB2026

ЗМЕСТ

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

Боборико Н. Е., Семынин А. А., Диченко Я. В., Усанов С. А. Фотохимически индуцированное восстановление железа гема в составе человеческого фермента CYP7A1, иммобилизованного на поверхности наночастиц диоксида титана 271

Будевич В. А., Сущевич Ю. А., Зураев А. В. Оценка биологической активности мезоионных тетразолий-5-аминидов А-типа против некоторых возбудителей болезней сельскохозяйственных растений 284

Дворянева Е. Н. Виртуальный скрининг базы данных DrugBank с применением методов молекулярного докинга для поиска потенциальных ингибиторов человеческого белка Grp94 292

Саченко А. Б., Попичева Е. А., Янцевич А. В. Экспрессия в клетках *Escherichia coli* и очистка регуляторов ангиогенеза человека VEGF165 и ANGPT1 300

Хорн П. А., Федотов Д. А., Хныкин А. Н., Анучина А. А., Малышева Е. В., Ильинский Н. С., Охрименко И. С., Павлов А. В., Павлов В. В., Колесник М. В., Демкина А. О., Рубинштейн И. Д., Талдаев А. Х., Мишин А. В., Борщевский В. И. Предсказание фотохимических свойств новых природных родопсинов для поиска потенциальных оптогенетических инструментов 309

Хюппенен Е. Д., Савич А. С., Кисель М. С., Свирид А. В. Получение рекомбинантного белка в клетках *Escherichia coli*, функциональная оценка и *in silico* картирование интерактома CYP2J2 человека 323

Шапіра М. А., Мігуцкая А. Д., Бахір В. П., Дармешкін Д. А. Карэляцыйны аналіз фізіка-хімічных уласцівасцей, які выяўляе схаваныя структурныя сувязі ў каркасных рэгіёнах нанацел 333

ТЭХНІЧНАЯ ХІМІЯ І ХІМІЧНАЯ ТЭХНАЛОГІЯ

Василевич С. В., Стойко С. О., Юхневич С. Д. Термическое разложение гексафторсиликата натрия в псевдоожиженном слое 344

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

Dear readers of the journal
"Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series"!

This issue features articles in the «Bioorganic Chemistry» section contributed by participants of the 9th International Conference «Chemistry, Structure, and Function of Biomolecules.» The conference program covered a wide range of topics related to biological substances, low-molecular-weight compounds, and biopolymers, including isolation from natural sources and structural elucidation; chemical synthesis and biosynthesis; studies of biological activity; practical applications of bioregulators; and bioengineering and bioinformatics.

The presented materials address key challenges in modern bioorganic chemistry: the production and characterization of CYP7A1, CYP2J2, ANGPT1, and VEGF165 proteins; the search for inhibitors of the Grp94 protein; the analysis of the structural features of antibody VHH domains; and the prediction of the photochemical properties of rhodopsins.

We express our deep gratitude to the journal's editorial board for the opportunity to present the detailed results of this research to the broader scientific community.

Organizing Committee of the CSFB2026 Conference

CONTENTS

BIOORGANIC CHEMISTRY

Boboriko N. E., Semynin A. A., Dzichenka Ya. U., Usanov S. A. Photochemically driven heme iron reduction of human CYP7A1 immobilized on the surface of titanium dioxide nanoparticles 271

Budevich V. A., Sushchevich Yu. A., Zuraev A. V. Assessment of the biological activity of mesoionic A-type tetrazolium-5-aminides against certain agricultural plant pathogens 284

Dvaraneva L. N. Virtual screening of the DrugBank database using molecular docking methods to identify potential inhibitors of the human Grp94 protein 292

Sachanka A. B., Popicheva E. A., Yantsevich A. V. *Escherichia coli* expression and purification of human angiogenesis regulators VEGF165 and ANGPT1 300

Khorn A. P., Fedotov D. A., Khnykin A. N., Anuchina A. A., Malysheva E. V., Ilyinsky N. S., Okhrimenko I. S., Pavlov A. V., Pavlov V. V., Kolesnik M. V., Demkina A. O., Rubinshteyn I. D., Taldaev A., Mishin A. V., Borshchevskiy V. I. Predicting rhodopsin photochemistry to bioprospect new optogenetic tools 309

Khyuppenen Y. D., Savich A. S., Kisel M. S., Svirid A. V. Recombinant production in *Escherichia coli*, functional assessment and *in silico* interactome mapping of human CYP2J2 323

Shapira M. A., Miguckaya A. D., Bakhir V. P., Dormeshkin D. O. Correlation analysis of physicochemical properties reveals hidden structural relationships in nanobodies framework regions 333

TECHNICAL CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING

Vasilevich S. V., Stoiko S. O., Yukhnevich S. D. Thermal decomposition of sodium hexafluorosilicate in a fluidized bed 344

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

БІЯАРГАНІЧНАЯ ХІМІЯ

BIOORGANIC CHEMISTRY

УДК 577.112
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-271-283

Поступила в редакцию 11.08.2026
Received 11.08.2026

Н. Е. Боборико[1, 2], А. А. Семынин[2], Я. В. Диченко[3], С. А. Усанов[3]

[1]Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
[3]Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

ФОТОХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖЕЛЕЗА ГЕМА В СОСТАВЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА CYP7A1, ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ДИОКСИДА ТИТАНА

Аннотация. Разработана и изучена биокаталитическая система на основе цитохрома Р450 человека (изоформа CYP7A1), иммобилизованного на поверхности наноразмерного диоксида титана. Целью исследования являлось создание эффективной системы – донора восстановительных эквивалентов, использующей фотогенерированные электроны TiO_2 в качестве альтернативы кофактору НАДФН. Наноразмерный диоксид титана был синтезирован золь-гель методом с использованием тетраизопропоксида титана (IV) в качестве прекурсора с варьированием температуры термообработки гидратированного оксида $TiO_2 \cdot nH_2O$ в интервале 400–700 °С. В качестве добавок, модифицирующих фазовый состав TiO_2 и морфологию его частиц, на стадии синтеза применялись щавелевая и лимонная кислоты и фторид аммония. Изучено фотовосстановление иона железа гема цитохрома Р450 7А1, адсорбированного на диоксиде титана различного фазового состава и морфологии. Установлено, что формирование анатазной модификации TiO_2 и использование щавелевой кислоты в качестве модифицирующей добавки в количестве $n(H_2C_2O_4) : n(TiO_2) = 4 : 1$ обеспечивает значительное увеличение фотокаталитической активности системы. Методом молекулярной динамики (100,0 нс) проанализирован процесс адсорбции CYP7A1 на поверхности анатаза. Установлен механизм изменения нативной структуры, приводящей к денатурации CYP7A1, при иммобилизации его на поверхности TiO_2 через смещение I-спирали.

Ключевые слова: цитохром Р450, диоксид титана, анатаз, рутил, золь-гель синтез, фотокатализ, молекулярная динамика, CYP7A1, щавелевая кислота

Для цитирования. Фотохимически индуцированное восстановление железа гема в составе человеческого фермента CYP7A1, иммобилизованного на поверхности наночастиц диоксида титана / Н. Е. Боборико, А. А. Семынин, Я. В. Диченко, С. А. Усанов // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2026. – Т. 62, № 4. – С. 271–283. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-271-283

N. E. Boborіko[1, 2], A. A. Semynin[2], Ya. U. Dzichenka[3], S. A. Usanov[3]

PHOTOCHEMICALLY DRIVEN HEME IRON REDUCTION OF HUMAN CYP7A1 IMMOBILIZED ON THE SURFACE OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES

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

Abstract. This work focuses on the development and investigation of a biocatalytic system based on human cytochrome P450 (isoform CYP7A1) immobilized on the surface of nanoscale titanium dioxide. The aim of the study was to create an efficient system for supplying reducing equivalents that utilizes photogenerated electrons from TiO_2 as an alternative to the NADPH cofactor. The nanoscale titanium dioxide was synthesized via the sol-gel method using titanium (IV) tetraisopropoxide as a precursor, with the heat treatment of the hydrated oxide ($TiO_2 \cdot nH_2O$) carried out in the range of 400–700 °C. Oxalic acid, citric acid, and ammonium fluoride were used as additives during the synthetic stage to modify the TiO_2 phase composition and particle morphology. The photoreduction of the heme iron of cytochrome P450 7A1 adsorbed on titanium dioxide samples with different phase compositions and morphologies was investigated. It was found that the formation of anatase the TiO_2 modification and the use of oxalic acid as a modifying additive at a molar ratio of $n(H_2C_2O_4) : n(TiO_2) = 4 : 1$ result in a signi-

ficant increase in the photocatalytic activity of the system. The adsorption of CYP7A1 on the anatase surface was analyzed using molecular dynamics (100 ns). The mechanism underlying the alteration of the native structure, which leads to CYP7A1 denaturation, upon immobilization on the TiO_2 surface was identified. The mechanism involves the displacement of the I-helix.

Keywords: cytochrome P450, titanium dioxide, anatase, rutile, sol-gel synthesis, photocatalysis, molecular dynamics, CYP7A1, oxalic acid

For citation. Boboriko N. E., Semynin A. A., Dzichenka Ya. U., Usanov S. A. Photochemically driven heme iron reduction of human CYP7A1 immobilized on the surface of titanium dioxide nanoparticles. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2026, vol. 62, no. 4, pp. 271–283 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-271-283

Введение. Цитохромы P450 (CYP) представляют собой обширное суперсемейство гемсодержащих монооксигеназ, ответственных за метаболизм широкого спектра эндогенных соединений – стероидов, желчных кислот, витаминов, а также за детоксикацию ксенобиотиков [1–4]. Уникальность этих ферментов заключается в их способности катализировать регио- и стереоселективное окисление неактивированных связей C–H, что крайне затруднительно в классическом органическом синтезе [2]. Функционирование CYP описывается достаточно сложным каталитическим циклом, включающим стадии связывания субстрата в активном центре за счет координации с ионом Fe^{3+} гема с последующим восстановлением Fe^{3+} до Fe^{2+} под действием НАДФН через НАДФН-Р450-зависимую редуктазу с образованием промежуточных высоко реакционноспособных окси- и гидропероксо-соединений железа. Завершается каталитический цикл высвобождением гидроксилированного субстрата и возвращением фермента в исходное координационное и функциональное состояние [1, 2].

В искусственно создаваемых биокаталитических системах целесообразна замена НАДФН альтернативными донорами электронов. Полупроводники, обладающие фотокаталитической активностью, в частности TiO_2, способны напрямую инжектировать электроны в активный центр фермента, имитируя действие белковых редуктаз [5–7]. Следовательно, запуск каталитического цикла и реакции гидроксилирования субстрата может регулироваться облучением системы излучением с длиной волны, соответствующей собственному поглощению полупроводника (для диоксида титана, ширина запрещенной зоны которого в зависимости от кристаллической модификации составляет 3,0–3,2 эВ, длина волны собственного поглощения лежит в ультрафиолетовой области). Известно, что фотокаталитическая активность диоксида титана зависит от его фазового состава, морфологии поверхности, размера и формы частиц [8–10]. Введение на стадии золь-гель синтеза модифицирующих добавок позволяет контролировать структурные особенности получаемого оксидного материала [10–14]. Сущность такого влияния во многом определяется способностью добавляемого вещества эффективно и/или селективно связываться с определенными сайтами на поверхности формируемых оксидных наночастиц и тем самым регламентировать дальнейшее структурообразование оксидного материала. Исходя из этого перспективными модификаторами являются органические кислоты, способные выступать в качестве полидентатных лигандов для иона титана в процессе гидролиза изопропоксида титана, а также фториды, поскольку в литературе широко известна склонность фторид-ионов селективно адсорбироваться на определенных кристаллографических гранях диоксида титана за счет энергетического выигрыша процесса такой адсорбции [15–17].

Эффективное функционирование биокаталитической системы на основе цитохромов Р450 человека и диоксида титана во многом определяется адсорбцией фермента на поверхность оксидного материала: с одной стороны, адсорбция должна обеспечивать результативный перенос фотогенерированных электронов к активному центру фермента и минимизировать процессы рекомбинации фотогенерированных носителей заряда, а с другой – необходимо максимальное сохранение нативной структуры белка в адсорбированном состоянии для обеспечения его собственной каталитической активности. В данной работе процесс адсорбции CYP7A1 цитохрома Р450 человека на поверхность анатаза был изучен методом молекулярного моделирования.

Таким образом, целью исследования являлось создание эффективной системы – донора восстановительных эквивалентов, использующей фотогенерированные электроны TiO_2 в качестве альтернативы кофактору НАДФН, а также изучение влияния фазового состава и морфологии диоксида титана на фотокаталитические свойства системы.

Материалы и методы исследования. *Синтез наноразмерного диоксида титана.* Изопропоксид титана (IV) при постоянном перемешивании и нагревании системы до 40 °С по каплям растворяли в равном объеме 96%-го этанола. К полученной смеси по каплям в течение 1 ч при постоянном интенсивном перемешивании добавляли смесь этанола с водой, поддерживая температуру смеси 70–80 °С. Конечное объемное соотношение компонентов изопропоксид : вода : этанол в системе составляло 1 : 65 : 1. После завершения смешения всех реагентов смесь 2 ч выдерживали при постоянном интенсивном перемешивании при 70–80 °С.

Полученную коллоидную систему выдерживали 24 ч при комнатной температуре для самопептизации, после чего полученный золь высушивали 8 ч при 80 °С. Образовавшийся ксерогель подвергали температурной обработке при 400, 550 и 700 °С в течение 2 ч.

Для исследования влияния лимонной, щавелевой кислот и фторида аммония на структурные характеристики и фотокаталитическую активность диоксида титана на стадии синтеза в систему вводилось необходимое количество соответствующей добавки. Синтез проводили следующим образом. Изопропоксид титана (IV) и изопропиловый спирт в мольном соотношении 1 : 2 при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин. Затем к смеси добавляли требуемое количество соответственно лимонной, щавелевой кислот или фторида аммония в количестве 4,0 моль к 1,0 моль изопропоксида титана, добавляя при этом дополнительно 2,0 моль изопропилового спирта, и в течение 1 ч при комнатной температуре. Полученную коллоидную систему выдерживали 24 ч при комнатной температуре для самопептизации, после чего высушивали при 80 °С в течение 8 ч. Образовавшийся ксерогель 2 ч подвергали температурной обработке на воздухе при 400, 550 и 700 °С. Исследовались также системы с мольным соотношением фторида аммония и изопропоксида титана 1 : 1 и 0,5 : 1, щавелевой кислоты и изопропоксида титана 3 : 1, 2 : 1 и 1 : 1. При этом изменялось только количество вводимой добавки, иные параметры синтеза оставались неизменными.

Изучение фотокаталитической активности диоксида титана. В работе использовали рекомбинантный фермент CYP7A1 человека, полученный в лаборатории белковой инженерии согласно имеющейся методике [18]. Для измерения фотокаталитической активности полученных образцов диоксида титана определяли интенсивность пиков в спектре поглощения цитохрома P450 в восстановленной форме, связанного с CO. Первоначально была приготовлена система поглощения кислорода на основе ферментов каталазы и глюкозооксидазы. 15 мг каталазы растворяли в буферном растворе (40,0 мМ Трис, 140,0 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА, pH 7,5) для получения раствора с концентрацией фермента 108,5 мг/мл. 13,0 мг глюкозооксидазы растворяли в буфере такого же состава для получения раствора с концентрацией фермента 113,0 мг/мл. Затем к 4,0 мл буферного раствора (50,0 мМ Трис, pH 7,5) добавляли 26,7 мг глюкозы и по 20,0 мкл раствора каталазы и глюкозооксидазы. Систему инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее в систему добавляли раствор CYP7A1 и 4 мкл водной суспензии порошка синтезированного диоксида титана, предварительно обработанной ультразвуком. Помимо суспензии порошка также исследовали золь гидрата диоксида титана в эквивалентном количестве, полученный по описанной выше методике без введения модифицирующих добавок до его высушивания при 80 °С в течение 8 ч. Синтезированный золь характеризуется агрегативной и седиментационной устойчивостью, концентрация TiO_2 в золе, определенная гравиметрическим методом, составляет $7{,}7 \cdot 10^{-2}$ М. Финальная концентрация цитохрома P450 в исследуемом растворе составляла 1,0 мкМ. Полученную систему разделяли поровну на две кюветы и записывали спектр поглощения в диапазоне 400–500 нм. Далее раствор в анализируемой кювете барботировали CO и записывали новый спектр. После этого кюветы вынимали из спектрометра и облучали УФ-лампой (длина волны 254 нм) в течение 20 с, записывали по три спектра после каждого облучения. Эксперимент проводили до суммарного времени облучения не менее 120 с.

Измерение среднего размера частиц в золе гидратированного диоксида титана, полученного по описанной выше методике без введения модифицирующих добавок и разбавленного дистиллированной водой в 5 000 раз, проводилось методом динамического рассеяния света на приборе DynaPro NanoStar.

Исследование фазового состава синтезированного диоксида титана осуществлялось методом рентгенофазового анализа порошков оксидных материалов, полученных после температурной обработки, при котором выполнялась запись дифрактограмм на приборе HZG 4M с использованием излучения Cu K_α. Фазы идентифицировались по стандартной методике по набору межплоскостных расстояний.

Изучение морфологии и размера частиц диоксида титана проводилось методом сканирующей электронной микроскопии с помощью электронного микроскопа LEO 1420.

Изучение адсорбции CYP7A1 на поверхность анатаза методом молекулярного моделирования. Моделирование взаимодействия цитохрома с немодифицированной (не содержащей функциональных групп) поверхностью анатаза в водной среде выполнялось методом молекулярной динамики с использованием набора программ Amber (Assisted Model Building with Energy Refinement). В работе применяли классическую схему расчетов, включающую следующие стадии: минимизация, нагрев в течение 1,0 нс (*NVT*-ансамбль), уравновешивание – 5,0 нс (*NPT*-ансамбль) и моделирование динамики свободной системы – 100,0 нс (*NPT*-ансамбль). На всех стадиях накладывали ограничения на атомы неорганического материала с помощью параметра restraint = 500,0 либо 1 000,0 (ккал/моль · Å^2).

Для системы, содержащей CYP7A1, была создана кубическая расчетная ячейка с размерами 118,7 × 117,6 × 218,9 Å. Поверхности с более пространственно доступными атомами титана (в сравнении с кислородом) были ориентированы к молекуле белка, расстояние между поверхностями анатаза составляло 161,9 Å. Использованная модель воды – TIP3P. Для сохранения электронейтральности в систему был добавлен ион Cl^- с помощью утилиты из пакета Amber tleap.

Траектории молекулярной динамики анализировали с применением функционала программы Chimera v. 1.16.

Результаты и их обсуждение. Типичный спектр поглощения цитохрома P450, восстановленного диоксидом титана различного фазового состава и морфологии, а также устойчивым золем гидратированного диоксида титана, представлен на рис. 1 на примере фотовосстановления CYP7A1 золем диоксида титана. Увеличение времени УФ-облучения приводит к росту интенсивности максимумов поглощения CYP450-Fe^{II}-CO при 450 нм (соответствует нативной каталитически активной форме фермента) и 420 нм (соответствует конформации фермента с измененным пространственным строением железосодержащего активного центра, часто не проявляющей

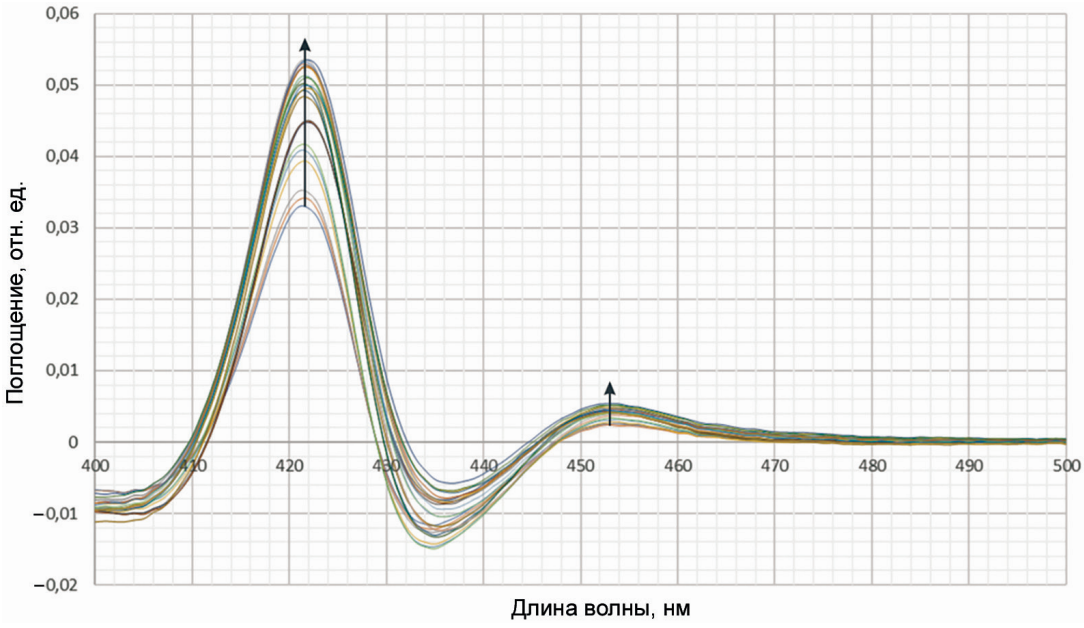


Рис. 1. Спектр поглощения CYP7A1, фотокаталитически восстановленного золем диоксида титана, после УФ-облучения в течение 20–160 с

Fig. 1. Absorption spectrum of CYP7A1 that was photocatalytically reduced by a titanium dioxide sol during UV irradiation for 20–160 s

каталитической активности), что указывает на увеличение количества CYP450 в восстановленной форме. Использование различных образцов диоксида титана в фотокаталитической системе не изменяет общего вида спектра и положения максимумов, однако определяет их интенсивности в процессе облучения.

Для сравнения фотокаталитической активности различных образцов диоксида титана были построены диаграммы значений максимумов поглощения системы CYP7A1-Fe^{II}-CO–диоксид титана при 420 нм и при 450 нм при разном времени облучения (рис. 2). Следует обратить внимание, что наиболее перспективны фотокаталитические системы, в которых увеличивается либо остается высокой интенсивность максимума поглощения при 450 нм, поскольку при этом подразумевается существование белка в системе в активной каталитической форме, т. е. способной в дальнейшем катализировать процессы гидроксилирования субстрата.

Из анализа эффективности фотовосстановления CYP7A1 следует, что наибольшую фотокаталитическую активность в сформированной биокаталитической системе проявляет золь гидрата диоксида титана. Это можно связать с тем, что средний размер частиц TiO_2 в золе значительно меньше, чем в порошках, прошедших температурную обработку, и составляет по результатам динамического рассеяния света 7–12 нм. Прогрев диоксида титана ожидаемо приводит к увеличению среднего размера частиц за счет их агломерации, что подтверждается результатами электронной микроскопии. Помимо этого поверхность частиц диоксида титана в золе максимально гидратирована в сравнении с частицами TiO_2 в порошках, прошедших термическую обработку, что определяет протекание процессов адсорбции молекул белка на поверхность TiO_2 и может обеспечивать более эффективный перенос фотогенерированных электронов к активному центру цитохрома P450. Введение модифицирующих добавок на стадии синтеза изменяет фотокаталитическую активность диоксида титана.

Наибольшее положительное влияние на фотокаталитические свойства диоксида титана оказывает его модификация щавелевой кислотой – наблюдается интенсивное фотовосстановление цитохрома в каталитически активной форме (рост интенсивности максимума поглощения при 450 нм). Лучшие фотовосстановительные свойства среди всех исследованных образцов проявляет диоксид титана, модифицированный щавелевой кислотой в мольном соотношении кислоты к диоксиду титана 4 : 1 и прогретый при 550 °C в течение 2 ч. Максимальная высота пика поглощения при 450 нм составляет приблизительно 70 % от таковой для золя диоксида титана. Модификация диоксида титана фторид-ионами эффективно обеспечивает процесс фотовосстановления, однако слабо выраженный рост пика восстановленной формы CYP7A1 при 450 нм в таких биокаталитических системах указывает на интенсивную утрату нативной конформации фермента. Из анализа экспериментальных результатов следует, что фторид аммония способствует денатурации фермента в биокаталитической системе в большей степени, чем щавелевая и лимонная кислоты. Понижение активности фермента в присутствии фторид-ионов в целом может быть связано с их координацией и связыванием с ионом железа активного центра цитохрома P450 или разрушением лигандсвязывающего кармана, как это наблюдается при ферментативном окислении некоторых фторсодержащих соединений.

Из анализа экспериментальных данных очевидно, что различные образцы диоксида титана характеризуются различной фотокаталитической активностью. Изменение условий синтеза, в частности введение модифицирующих добавок и варьирование условий термообработки оксидного материала, определяет фазовый состав и структурные особенности получаемого диоксида титана. В таблице представлены данные о зависимости фазового состава TiO_2, установленного с помощью рентгенофазового анализа, от условий синтеза.

Как следует из результатов рентгенофазового анализа, термообработка при 700 °C в течение 2 ч диоксида титана без введения на стадии синтеза добавок приводит к фазовому переходу кристаллической фазы анатаза в более термодинамически устойчивую кристаллическую фазу рутила. Однако присутствие фторида аммония при получении оксидного материала позволяет полностью подавить данный фазовый переход и сохранить анатазную модификацию TiO_2 и после прогрева при 700 °C даже при наименьшем из изученного диапазона количестве вводимого NH_4F ($n(NH_4F) : n(TiO_2) = 0{,}5 : 1$). При этом на рентгенограммах образцов, полученных с добавлением

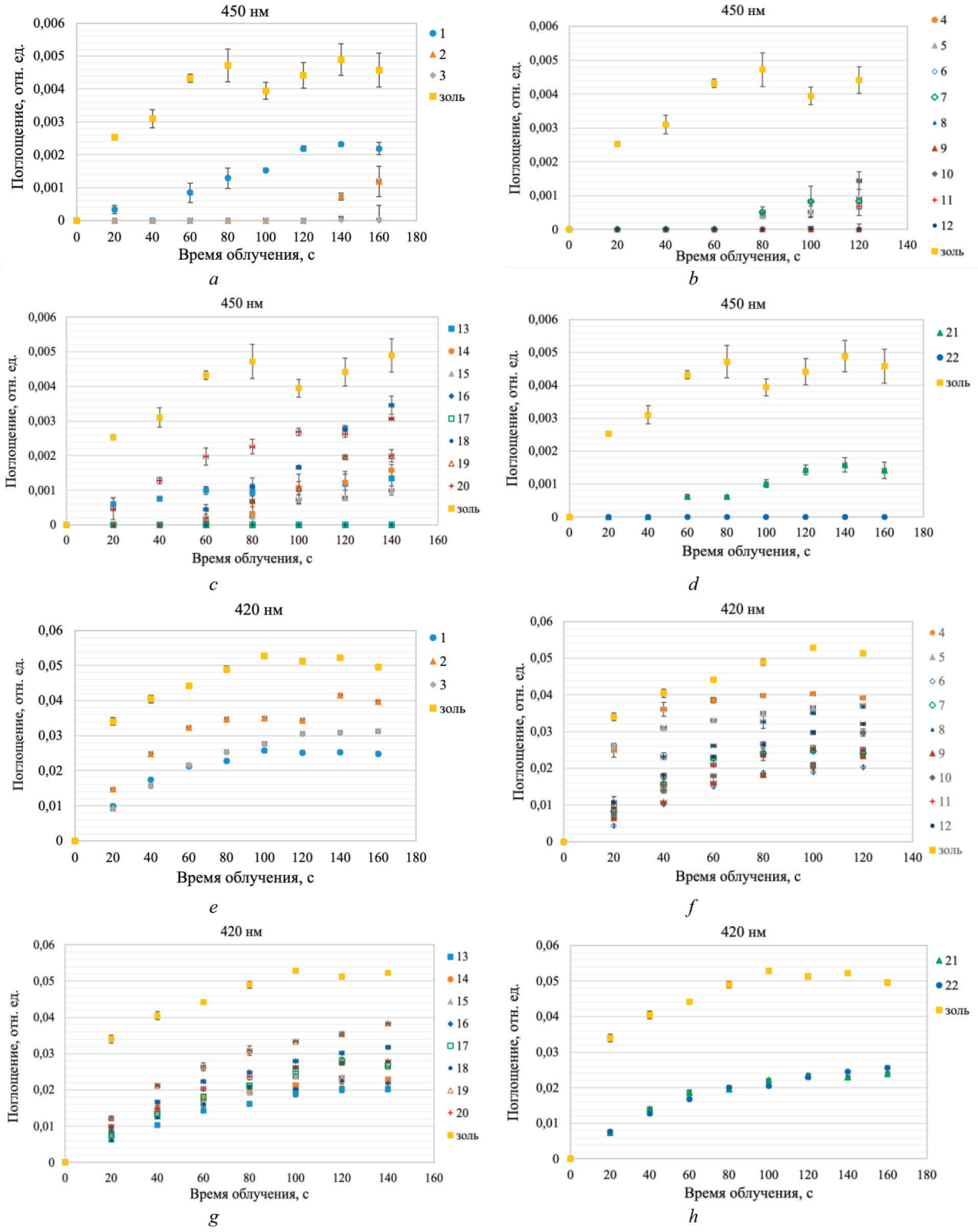


Рис. 2. Сравнительные диаграммы максимумов поглощения при 450 нм (*a*–*d*) и 420 нм (*e*–*h*) системы CYP7A1-Fe^{II}-CO–диоксид титана при различном времени УФ-облучения: *a*, *e* – TiO_2 без добавок; *b*, *f* – TiO_2 с NH_4F; *c*, *g* – TiO_2 с $C_2H_2O_4$; *d*, *h* – TiO_2 с $C_6H_8O_7$ (номера образцов TiO_2 на диаграммах соответствуют табл. 1)

Fig. 2. Comparative charts of absorption maxima at 450 nm (*a*–*d*) and 420 nm (*e*–*h*) of the CYP7A1-Fe^{II}-CO–titanium dioxide system at different times of UV irradiation: *a*, *e* – TiO_2 without additives; *b*, *f* – TiO_2 with NH_4F; *c*, *g* – TiO_2 with $C_2H_2O_4$; *d*, *h* – TiO_2 with $C_6H_8O_7$ (TiO_2 sample numbers correspond to Table 1)

Фазовый состав TiO_2 в зависимости от условий синтеза

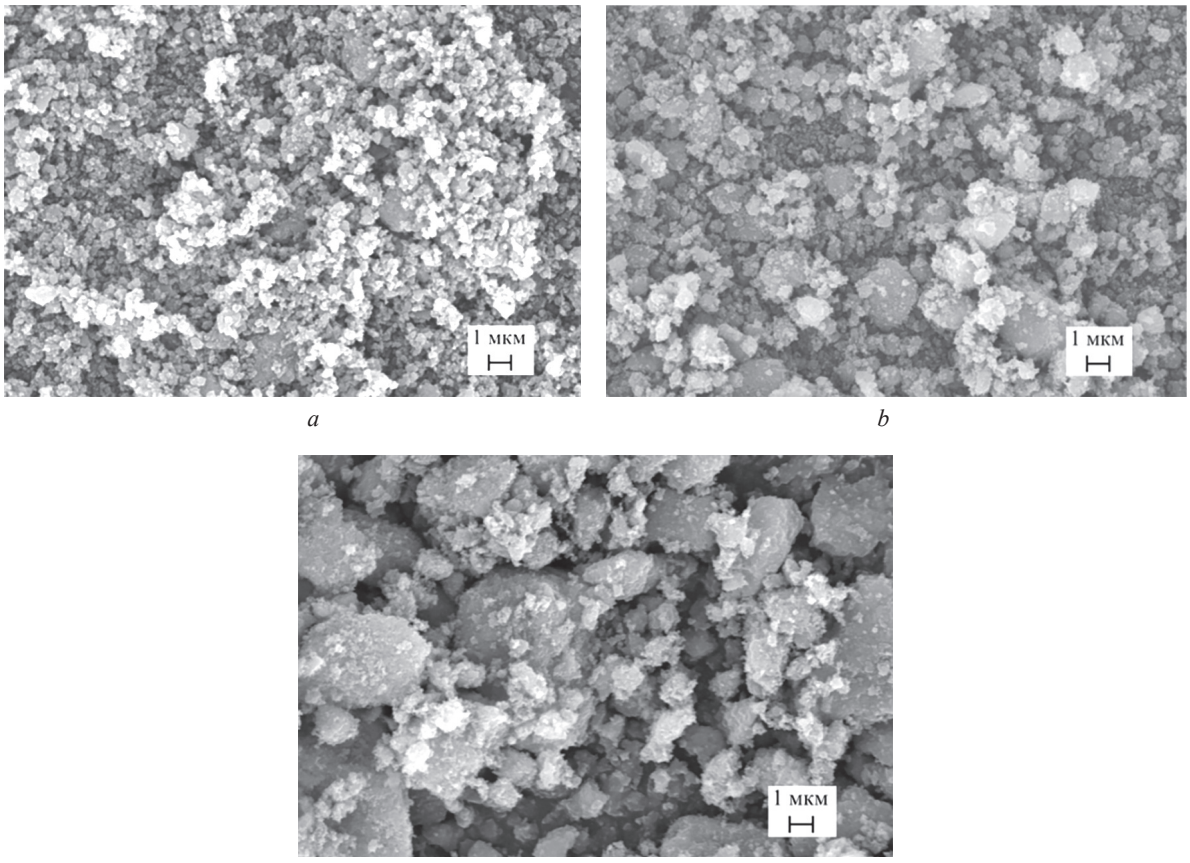
TiO_2 phase composition depending on synthetis conditions

Образец	Модифицирующая добавка	Количество добавки, n(добавки) : $n(TiO_2)$	Температура прогрева в синтезе, °C	Фазовый состав
1	–	–	400	Анатаз (91 %), брукит (9 %)
2		–	550	Анатаз (93 %), брукит (7 %)
3		–	700	Рутил (91 %), анатаз (9 %)
4	Фторид аммония NH_4F	4 : 1	400	Анатаз (8 %), $(NH_4)_2TiF_6$ (31 %), $(NH_4)_{0,8}TiOF_{2,8}$ (61 %)
5		4 : 1	550	Анатаз
6		4 : 1	700	Анатаз
7		1 : 1	400	Анатаз
8		1 : 1	550	Анатаз
9		1 : 1	700	Анатаз
10		0,5 : 1	400	Анатаз
11		0,5 : 1	550	Анатаз
12		0,5 : 1	700	Анатаз
13	Щавелевая кислота $C_2H_2O_4$	1 : 1	550	Анатаз (96 %), рутил (4 %)
14		2 : 1	550	Анатаз
15		3 : 1	550	Анатаз (93 %), рутил (7 %)
16		4 : 1	550	Анатаз
17		1 : 1	700	Рутил (78 %), анатаз (22 %)
18		2 : 1	700	Анатаз (73 %), рутил (27 %)
19		3 : 1	700	Рутил (69 %), анатаз (31 %)
20		4 : 1	700	Анатаз (76 %), рутил (24 %)
21	Лимонная кислота $C_6H_8O_7$	4 : 1	500	Анатаз (61 %), рутил (39 %)
22		4 : 1	650	Рутил

фторида аммония, рефлексы, соответствующие кристаллической фазе рутила, отсутствуют даже в следовых количествах. Использование щавелевой кислоты в качестве модифицирующей добавки подавляет фазовый переход анатаза в рутил частично и позволяет получить оксидные материалы, содержащие как фазу анатаза, так и фазу рутила, причем количественное соотношение этих двух фаз в материале определяется мольным соотношением щавелевой кислоты, вводимой на стадии синтеза, к количеству изопропоксида титана.

Анализ фотовосстановительных свойств синтезированных образцов диоксида титана указывает на то, что с точки зрения фазового состава наилучшими фотокаталитическими свойствами характеризуется диоксид титана, модифицированный щавелевой кислотой в мольном соотношении кислоты к диоксиду титана 4 : 1 и представляющий собой анатазную модификацию TiO_2 либо смесь двух кристаллических модификаций – анатаза и рутила со значительным преобладанием фазы анатаза. Стоит отметить, что диоксид титана в чистой рутильной кристаллической модификации либо в виде смеси анатаза и рутила со значительным преобладанием рутильной модификации почти не обладает фотовосстановительной активностью по отношению к железу гема цитохрома в активной форме.

Фотокаталитическая активность диоксида титана также определяется морфологией частиц TiO_2. На рис. 3 представлены результаты исследования морфологии поверхности оксидных материалов, полученных с использованием щавелевой, лимонной кислот и фторида аммония в качестве модифицирующих добавок. Очевидно, что введение щавелевой кислоты на стадии синтеза позволяет получить оксидные материалы с наиболее развитой поверхностью и наименьшим средним размером частиц. Как следует из анализа фотокаталитических свойств материалов, такая морфология материала коррелирует с высокой фотовосстановительной активностью. Высокая развитость поверхности и низкий размер частиц при использовании щавелевой кислоты достигается за счет ее разложения при высокой температуре прокаливания материала с образованием углекислого газа, который разрыхляет оксидный материал.



a *b*

c

Рис. 3. СЭМ-микрофотографии образцов 20 (*a*), 22 (*b*), 12 (*c*) (номера образцов соответствуют табл. 1)

Fig. 3. SEM micrographs of samples 20 (*a*), 22 (*b*), 12 (*c*) (sample numbers correspond to Table 1)

Адсорбция CYP7A1 на поверхность анатаза осуществляется за счет электростатического взаимодействия между аминокислотными остатками фермента с сайтами адсорбции на поверхности анатаза, а также с молекулами растворителя. Возможные взаимодействия в процессе адсорбции были изучены с использованием метода молекулярной динамики. Установление предпочтительных контактов между молекулой белка и поверхностью анатаза может указать на пути перспективного модифицирования поверхности диоксида титана для более эффективной адсорбции CYP7A1 с сохранением его каталитически активной конформации.

Установлено, что во взаимодействии с поверхностью TiO_2 участвует множество аминокислотных остатков фермента. Во-первых, в адсорбции играют роль Glu454, Gln456 и Lys458: за время моделирования (production, 100,0 нс) между Glu454 и поверхностью анатаза трижды формировался контакт с межатомными расстояниями в диапазоне 4,4–4,9 Å, данные связи были крайне нестабильны, карбоксилатная группа глутамата часто удалялась от поверхности на расстояние более 5,0 Å. Однако стоит отметить, что карбоксилатная группа Glu454 была достаточно жестко ориентирована в направлении поверхности, но не смогла приблизиться к ней из-за своего расположения в структуре белка. Между аминогруппой Gln456 и диоксидом титана контакты возникали значительно чаще и были значительно стабильнее. Межатомные расстояния колебались в основном в диапазоне 3,5–4,2 Å, минимальное расстояние до поверхности составило 3,00 ± 0,05 Å. В случае Lys458 наблюдается иное поведение: на протяжении большей части времени моделирования его аминогруппа была отвернута от поверхности анатаза и ориентирована в сторону остальной части белка. Контакт с диоксидом титана возникал лишь в единичных случаях и был наименее стабильным среди всех аминокислот этого участка цитохрома. Ближайшим окружением Lys458 являются остатки Pro460 и 461, а также Cys459. По-видимому, они конкурировали с поверхностью анатаза за связывание с лизином за счет электростатических взаимодействий. Такое поведение может также

объясняться электростатическим отталкиванием протонированной аминогруппы Lys458 от положительно заряженных атомов титана поверхности, в то время как анализированный ранее Gln456 содержит непротонированную аминогруппу. Все рассмотренные контакты боковых групп CYP7A1 с поверхностью анатаза можно отнести к Ван-дер-Ваальсовым взаимодействиям. Стоит также отметить, что приблизительно на 38,7–39,6 нс процесса адсорбции произошла локальная смена конформации белка, которая привела к удалению всех перечисленных аминокислотных остатков от поверхности, после чего контактов с ней на данном участке цитохрома P450 не возникало.

Второй участок CYP7A1, взаимодействовавший с поверхностью анатаза, – N-концевой фрагмент. На протяжении почти всего смоделированного процесса аминокислотные остатки этой области находились на значительном расстоянии от поверхности и никак с ней не взаимодействовали. Однако за счет высокой подвижности N-концевого фрагмента цитохрома P450 в некоторые моменты возникали контакты с поверхностью, в первую очередь с участием Met1. При максимальном сближении расстояние между парой атомов S–Ti составило 3,4 Å. Данный контакт формировался дважды с небольшим интервалом, после чего N-концевой фрагмент снова удалился от поверхности на расстояние более 10,0 Å. Контакты метионина с поверхностными атомами титана можно охарактеризовать значительной прочностью и стабильностью межатомного расстояния. Lys3 участвует в адсорбции слабо, по-видимому, из-за электростатического отталкивания, как и в случае Lys458. Наблюдается лишь один подобный контакт, межатомное расстояние колебалось около величины 4,2 Å.

В процессе адсорбции принимали участие остатки аминокислот одной из α-спиралей: Arg44 и Lys45. Данный участок белка не подвергался заметным конформационным измерениям на уровне вторичной структуры и взаимодействовал с поверхностью анатаза на протяжении почти всего смоделированного процесса. Между гуанидиновой группой Arg44 и несколькими поверхностными атомами титана и кислорода формировалось множество Ван-дер-Ваальсовых связей с межатомными расстояниями в диапазоне 3,3–5,0 Å, причем для более коротких связей колебания длин происходили в более узком диапазоне. В случае Lys45 связи являлись значительно менее прочными, хотя межатомное расстояние при максимальном сближении лизина с поверхностью было меньше, чем для соседнего аргинина (3,2 и 3,3 Å соответственно). Контакты Lys45 оказались наиболее стабильными среди всех контактов с участием остатков лизина CYP7A1, смоделированных в данной работе.

В адсорбции также играли роль аминокислотные остатки Tyr407 и Asn409. Контакты между кислородом OH-группы Tyr407 и одним из поверхностных атомов титана оказались весьма прочными, а межатомное расстояние большую часть времени находилось в диапазоне 3,4–3,8 Å, максимальное сближение – до 3,1 Å. Asn409 участвовал в образовании водородных связей на протяжении по меньшей мере 6,5 нс, расстояние между амидной группой аспарагина и одним из атомов кислорода анатаза при этом находилось в пределах 2,5–3,0 Å. Стоит отметить, что участок CYP7A1, содержащий Tyr407 и Asn409, также претерпел локальные изменения конформации, которые происходили синхронно с таковыми для участка с Glu454, Gln456 и Lys458. В результате этих конформаций Tyr407 и Asn409 сближались с поверхностью анатаза, а Glu454, Gln456 и Lys458, как было отмечено ранее, отдалялись. На рис. 4 представлена RMSD карта для трех участков CYP7A1, наиболее долго участвовавших в процессе адсорбции белка на поверхности диоксида титана: петли, несущего Glu454, Gln456 и Lys458, α-спирали с Arg44 и Lys45 и петли, содержащей Tyr407 и Asn409.

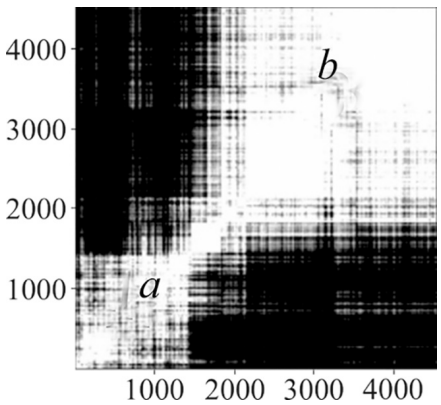


Рис. 4. Диаграмма парного RMSD для аминокислотных остатков CYP7A1, адсорбированного на поверхность анатаза; *a* и *b* – два сравнительно устойчивых состояния фермента

Fig. 4. Pairwise RMSD plot for the amino acid residues of CYP7A1 adsorbed on the anatase surface; *a* and *b* represent two relatively stable states of the

Показанный на рис. 4 участок *a* соответствует адсорбции CYP7A1 через петлю, несущую Glu454, Gln456 и Lys458, а также боковые группы указанной α-спирали. Участок *b* совпадает с адсорбцией цитохрома P450 через петлю, содержа-

щую Tyr407 и Asn409 и, по-прежнему, боковые группы α-спирали. Небольшой участок между *a* и *b* показывает фреймы, на протяжении которых петля с Tyr407 и Asn409 мигрировала от несвязанной с поверхностью анатаза области фермента.

Таким образом, большинство контактов между CYP7A1 и поверхностью анатаза возникают с участием основных аминокислот, однако протонированные остатки лизина образуют стабильные связи редко. Локальная конформационная перестройка вызвана неустойчивостью связей, возникших на участке *a* приведенной RMSD-карты, в результате чего Tyr407 и Asn409 становится возможным подойти к поверхности достаточно близко. Большинство контактов, наблюдаемых в данной модели, можно отнести к Ван-дер-Ваальсовым связям разной степени устойчивости. К водородным связям однозначно можно причислить только контакты с участием Asn409. Стоит отметить, что устойчивых водно-опосредованных контактов не обнаружено: подходящие к поверхности боковые группы аминокислотных остатков крайне быстро вытесняют молекулы воды и располагаются, как правило, на расстоянии 3,0–4,5 Å от поверхности диоксида титана. Вероятно, значительный вклад в адсорбцию вносит электростатическое притяжение белковой молекулы в целом.

При более детальном анализе изменений, которые претерпевает структура CYP7A1 в ходе моделируемой адсорбции, становится видно, что смена конформаций не ограничивается отдельными локальными перестройками. Так, хорошо заметно смещение I-спирали относительно гема, в результате чего данный участок перемещается в сторону от активного центра. Важно отметить, что указанная перегруппировка активного центра фермента происходит синхронно с отходом Glu454, Gln456 и Lys458 от поверхности анатаза и сближением с ней Tyr407 и Asn409. Аминокислотные остатки I-спирали у CYP450 ответственны за транспорт протонов в активный центр, образование комплекса железа гема с кислородом, а также за правильную ориентацию молекулы субстрата. При реализации подобной перестройки фермента можно говорить о вероятной утрате каталитической активности цитохрома P450 и, таким образом, переход из состояния *a* в состояние *b* на построенной RMSD-карте соответствует денатурации фермента.

Подобные изменения в структуре фермента могут быть причиной образования формы CYP7A1, отвечающей максимуму поглощения при 420 нм, что наблюдалось в эксперименте с фотовосстановлением.

Заключение. Создана эффективная система – донор восстановительных эквивалентов, использующая фотогенерированные электроны TiO_2 в качестве альтернативы кофактору НАДФН для восстановления железа гема цитохрома P450 человека (изоформа CYP7A1). Установлено, что фотокаталитическая активность используемого в системе диоксида титана зависит от его фазового состава и морфологии. Наилучшими фотокаталитическими свойствами характеризуется диоксид титана, представляющий собой анатазную модификацию TiO_2 либо смесь двух кристаллических модификаций – анатаза и рутила с преобладанием фазы анатаза. Диоксид титана в чистой рутильной кристаллической модификации либо в виде смеси рутила и анатаза со значительным преобладанием рутильной модификации почти не обладает фотовосстановительной активностью по отношению к железу гема цитохрома P450 в активной форме.

Показано, что контролировать фазовый состав, структурные особенности и, следовательно, фотокаталитическую активность TiO_2 можно варьируя химическую природу и количество модифицирующей добавки, вводимой на стадии синтеза, а также условий термообработки оксидного материала. Присутствие фторида аммония при получении оксидного материала позволяет полностью подавить фазовый переход анатаза в рутил и сохранить чистую анатазную модификацию TiO_2 и после прогрева материала при 700 °C. Использование щавелевой кислоты в качестве модифицирующей добавки подавляет фазовый переход анатаза в рутил частично и позволяет получить оксидные материалы, содержащие как фазу анатаза, так и фазу рутила, причем количественное соотношение этих двух фаз в материале определяется мольным соотношением щавелевой кислоты и изопропоксида титана. Применение щавелевой кислоты позволяет получить оксидные материалы с наиболее развитой поверхностью и наименьшим средним размером частиц.

Результаты, полученные при молекулярном моделировании адсорбции CYP7A1 на поверхности анатаза, позволяют предположить механизм молекулярной перестройки фермента вблизи поверхности анатаза. Происходящая перестройка переводит фермент в форму, характеризующуюся максимумом поглощения системы CYP7A1-Fe^{II}-CO при 420 нм. Данная перегруппировка сопровождается смещением I-спирали относительно гема, в результате чего этот участок перемещается в сторону от активного центра с синхронным отходом Glu454, Gln456 и Lys458 от поверхности анатаза и сближением с ней Tyr407 и Asn409.

Полученные в работе значения показывают перспективность использования наноразмерного диоксида титана в искусственно создаваемых биокаталитических системах. Запуск каталитического цикла фермента в таких системах может регулироваться УФ-облучением системы, вследствие чего фотогенерированные электроны оксидного полупроводника способны напрямую инжектироваться в активный центр фермента, имитируя действие белковых редуктаз.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Х22У-009).

Acknowledgments. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant X22U-009).

Список использованных источников

1. Cytochromes P450 in biosensing and biosynthesis applications: Recent progress and future perspectives / L. Mi, Z. Wang, W. Yang [et al.] // Trends in Analytical Chemistry. – 2023. – Vol. 158. – Art. 116791. https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116791

2. Exploring the Potential of Cytochrome P450 CYP109B1 Catalyzed Regio- and Stereoselective Steroid Hydroxylation / X. Zhang, Y. Hu, W. Peng [et al.] // Frontiers in Chemistry. – 2021. – Vol. 9. – Art. 649000. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.649000

3. Enhanced Enzymatic Reactivity for Electrochemically Driven Drug Metabolism by Confining Cytochrome P450 Enzyme in TiO_2 Nanotube Arrays / J. Lu, H. Li, D. Cui [et al.] // Analytical Chemistry. – 2014. – Vol. 86, № 15. – P. 8003–8009. https://doi.org/10.1021/ac502234x

4. Awad, G. Immobilization of P450 BM3 monooxygenase on hollow nanosphere composite: Application for degradation of organic gases pollutants under solar radiation lamp / G. Awad, E. F. Mohamed // Applied Catalysis B: Environment and Energy. – 2019. – Vol. 253. – P. 88–95. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.04.045

5. Turner, J. G. How Do Proteins Associate with Nanoscale Metal–Organic Framework Surfaces? / J. G. Turner, C. G. Murphy // Langmuir. – 2021. – Vol. 37, № 32. – P. 9910–9919. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c01664

6. Carravetta, V. Peptide−TiO_2 Surface Interaction in Solution by Ab Initio and Molecular Dynamics Simulations / V. Carravetta, S. Monti // The Journal of Physical Chemistry B. – 2006. – Vol. 110, № 12. – P. 6160–6169. https://doi.org/10.1021/jp056760j

7. Brandt, E. G. Molecular Dynamics Simulations of Adsorption of Amino Acid Side Chain Analogues and a Titanium Binding Peptide on the TiO_2 (100) Surface / E. G. Brandt, A. P. Lyubartsev // The Journal of Physical Chemistry C. – 2015. – Vol. 119. – P. 18126−18139. https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b02670

8. Tailored synthesis of anatase-brookite heterojunction photocatalysts for degradation of cylindrospermopsin under UV-Vis light / S. M. El-Sheikh, T. M. Khedr, V. Vogiazi [et al.] // Chemical Engineering Journal. –2017. – Vol. 310, № 23. – P. 428–436. https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.05.007

9. Investigation of the effect of sol-gel synthesis variables on structural and photocatalytic properties of TiO_2 nanoparticles / M. A. Behnajady, H. Eskandarloo, N. Modirshahla, M. Shokri // Desalination. – 2011. – Vol. 278. – P. 10–17. https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.04.019

10. Bessekhouad, Y. Synthesis of photocatalytic TiO_2 nanoparticles: optimization of the preparation conditions / Y. Bessekhouad, D. Robert, J. V. Weber // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2003. – Vol. 157, № 1. – P. 47–53. https://doi.org/10.1016/S1010-6030(03)00077-7

11. New insight in the role of modifying ligands in the sol-gel processing of metal alkoxide precursors: A possibility to approach new classes of materials / V. G. Kessler, G. I. Spijksma, G. A. Seisenbaeva [et al.] // Journal of Sol-Gel Science and Technology. – 2006. – Vol. 40. – P. 163–179. https://doi.org/10.1007/s10971-006-9209-6

12. Hanaor, D. A. H. Review of the anatase to rutile phase transformation / D. A. H. Hanaor, C. C. Sorrell // Journal of Materials Science – 2010. – Vol. 46 – P. 855–874. https://doi.org/10.1007/s10853-010-5113-0

13. Ding, X. Z. Correlation between Anatase-to-Rutile Transformation and Grain Growth in Nanocrystalline Titania Powders / X. Z. Ding, X. H. Liu // Journal of Materials Research. – 1998. – Vol. 13. – P. 2556–2559. https://doi.org/10.1557/JMR.1998.0356

14. Chen, X. Synthesis of Titanium Dioxide (TiO_2) Nanomaterials / X. Chen, S. S. Mao // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2006. – Vol. 6, № 4. – P. 906–925. https://doi.org/10.1166/jnn.2006.160

15. Synthesis of TiO_2 nanoparticles out of fluoride solutions / D. Sofronov, M. Rucki, A. Doroshenko [et al.] // Journal of Materials Research and Technology. – 2022. – № 17. – P. 2267–2279. https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.02.002

16. Effect of fluoride ions on the structure and electrocatalytic properties of titanium dioxide nanotubes / H. M. Maltanava, S. K. Poznyak, N. Scharnagl [et al.] // Journal of the Belarusian State University. Chemistry. – 2017. – № 1. – P. 3–9.

17. Fluorine ions-mediated morphology control of anatase TiO_2 with enhanced photocatalytic activity / Kangle Lv, Bei Cheng, Jiaguo Yu, Gang Liu // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2012. – Vol. 14, № 16. – P. 5349–5362. https://doi.org/10.1039/c2cp23461k

18. Discovery of the potential of cholesterol-lowering human CYP7 enzymes as biocatalysts for the production of C7 hydroxylated steroids / Y. Dzichenka, M. Shapira, A. Sachanka [et al.] // Biophysical Chemistry. – 2025. – Vol. 319. – Art. 107393. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2025.107393

References

1. Li Mi, Ziteng Wang, Wenge Yang, Chaofeng Huang, Bin Zhou, Yonghong Hu, Songqin Liu. Cytochromes P450 in biosensing and biosynthesis applications: Recent progress and future perspectives. *Trends in Analytical Chemistry*, 2023, vol. 158, art. 116791. https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116791

2. Zhang X., Hu Y., Peng W., Gao C., Xing Q., Wang B., Li A. Exploring the Potential of Cytochrome P450 CYP109B1 Catalyzed Regio- and Stereoselective Steroid Hydroxylation. *Frontiers in Chemistry*, 2021, vol. 9, art. 649000. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.649000

3. Lu, Li H., Cui D., Zhang Y., Liu S. Enhanced Enzymatic Reactivity for Electrochemically Driven Drug Metabolism by Confining Cytochrome P450 Enzyme in TiO_2 Nanotube Arrays. *Analytical Chemistry*, 2014, vol. 86, iss. 15, pp. 8003–8009. https://doi.org/10.1021/ac502234x

4. Awad G., Mohamed E. F. Immobilization of P450 BM3 monooxygenase on hollow nanosphere composite: Application for degradation of organic gases pollutants under solar radiation lamp. *Applied Catalysis B: Environment and Energy*, 2019, vol. 253, pp. 88–95. https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2019.04.045

5. Turner J. G., Murphy C. G. How Do Proteins Associate with Nanoscale Metal–Organic Framework Surfaces? *Langmuir*, 2021, vol. 37, iss. 32, pp. 9910–9919. https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c01664

6. Carravetta V., Monti. S. Peptide−TiO_2 Surface Interaction in Solution by Ab Initio and Molecular Dynamics Simulations. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2006, vol. 110, no. 12, pp. 6160–6169. https://doi.org/10.1021/jp056760j

7. Brandt E. G. Lyubartsev A. P. Molecular Dynamics Simulations of Adsorption of Amino Acid Side Chain Analogues and a Titanium Binding Peptide on the TiO_2 (100) Surface. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2015, vol. 119, pp. 18126−18139. https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b02670

8. El-Sheikh S. M., Khedr T. M., Vogiazi V., Ismail A. A., Konstantinou I. K., Hiskia A., Dionysiou D. D. Tailored synthesis of anatase-brookite heterojunction photocatalysts for degradation of cylindrospermopsin under UV-Vis light. *Chemical Engineering Journal*, 2017, vol. 310, no. 23, pp. 428–436. https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.05.007

9. Behnajady M. A., Eskandarloo H., Modirshahla N., Shokri M. Investigation of the effect of sol-gel synthesis variables on structural and photocatalytic properties of TiO_2 nanoparticles. *Desalination*, 2011, vol. 278, pp. 10–17. https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.04.019

10. Bessekhouad Y., Robert D., Weber J. V. Synthesis of photocatalytic TiO_2 nanoparticles: optimization of the preparation conditions. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 2003, vol. 157, no. 1, pp. 47–53. https://doi.org/10.1016/S1010-6030(03)00077-7

11. Kessler V. G., Spijksma G. I., Seisenbaeva G. A., Håkansson S., Blank D. H. A. New insight in the role of modifying ligands in the sol-gel processing of metal alkoxide precursors: A possibility to approach new classes of materials. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 2006, vol. 40, pp. 163–179. https://doi.org/10.1007/s10971-006-9209-6

12. Hanaor D. A. H., Sorrell C. C. Review of the anatase to rutile phase transformation. *Journal of Materials Science*, 2010, vol. 46, pp. 855–874. https://doi.org/10.1007/s10853-010-5113-0

13. Ding, X. Z., Liu X. H. Correlation between Anatase-to-Rutile Transformation and Grain Growth in Nanocrystalline Titania Powders. *Journal of Materials Research*, 1998, vol. 13, pp. 2556–2559. https://doi.org/10.1557/JMR.1998.0356

14. Chen X., Mao S. S. Synthesis of Titanium Dioxide (TiO_2) Nanomaterials. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2006, vol. 6, no. 4, pp. 906–925. https://doi.org/10.1166/jnn.2006.160

15. Sofronov D., Rucki M., Doroshenko A., Shaposhnyk A., Kapustnik O., Mateychenko P., Baumer V., Zurowski W. Synthesis of TiO_2 nanoparticles out of fluoride solutions. *Journal of Materials Research and Technology*, 2022, vol. 17, pp. 2267–2279. https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2022.02.002

16. Maltanava H. M., Poznyak S. K., Scharnagl N., Ivanovskaya M. I., Gaevskaya T. V. Effect of fluoride ions on the structure and electrocatalytic properties of titanium dioxide nanotubes. *Journal of the Belarusian State University. Chemistry*, 2017, no. 1, pp. 3–9.

17. Kangle Lv, Bei Cheng, Jiaguo Yu, Gang Liu. Fluorine ions-mediated morphology control of anatase TiO_2 with enhanced photocatalytic activity. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2012, vol. 14, no. 16, pp. 5349–5362. https://doi.org/10.1039/c2cp23461k

18. Dzichenka Y., Shapira M., Sachanka A., Cherkesova T., Shchur V., Grbović L., Pavlović K., Vasiljević B., Savić M., Nikolić A., Oklješa A., Ajduković J., Kuzminac I., Yantsevich A., Usanov S., Jovanović-Šanta S. Discovery of the potential of cholesterol-lowering human CYP7 enzymes as biocatalysts for the production of C7 hydroxylated steroids. *Biophysical Chemistry*, 2025, vol. 319, art. 107393. https://doi.org/10.1016/j.bpc.2025.107393

Информация об авторах

Боборико Наталья Евгеньевна – кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220084, Минск, Республика Беларусь); доцент кафедры. БГУ (пр-т Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: boboriko@ichnm.by

Семынин Артём Александрович – студент. БГУ (пр-т Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: che.semyninAA@bsu.by

Диченко Ярослав Владимирович – кандидат химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: dichenko@iboch.by

Усанов Сергей Александрович – член-корреспондент, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: usanov@iboch.by

Information about the authors

Boboriko Natalia E. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Scorina Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus); Associate Professor. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: boboriko@ichnm.by

Semynin Artsiom A. – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: che.semyninAA@bsu.by

Dzichenka Yaraslau U. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: dichenko@iboch.by

Usanov Sergei A. – Corresponding Member, Dr. Sci. (Chemistry), Professor, Chief Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: usanov@iboch.by

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 547.79+632.952
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-284-291

Поступила в редакцию 11.08.2026
Received 11.08.2026

В. А. Будевич[1], Ю. А. Сущевич[2], А. В. Зураев[3]

[1]Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
[2]Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по земледелию, Жодино, Беларусь
[3]Институт химии новых материалов Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕЗОИОННЫХ ТЕТРАЗОЛИЙ-5-АМИНИДОВ А-ТИПА ПРОТИВ НЕКОТОРЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БОЛЕЗНЕЙ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ

Аннотация. Проведена оценка биологической активности пяти мезоионных тетразолий-5-аминидов (**3–7**) А-типа против возбудителей болезней сельскохозяйственных растений, таких как *Fusarium avenaceum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum lupini*. Исследования выполняли в лабораторных условиях на картофельно-глюкозном агаре с добавлением указанных соединений непосредственно в питательную среду в концентрации 0,3 мг/мл. Учет площади колоний, морфологии мицелия и интенсивности спороношения проводили на 4-е и 7-е сутки культивирования. Установлено, что на 4-е сутки воздействие соединений сократило площадь колоний патогенов на 9,2–83,5 % относительно контрольного образца (за исключением *N*-тозил-3-*трет*-бутил-1-метилтетразолий-5-аминида (**5**) против *F. avenaceum*, который не показал наличия фунгицидной активности). Наибольшее ингибирующее действие проявили *N*-бензоил-1,3-ди-*трет*-бутилтетразолий-5-аминид (**3**) и *N*-(*N′*-фенилтиокарбамил)-1,3-ди-*трет*-бутилтетразолий-5-аминид (**6**). К 7-м суткам высокий угнетающий эффект у соединения **3** сохранился (площадь колоний снизилась до 20,5–48,1 % от контрольного образца). Соединение **6** вызвало полное подавление спороношения у *F. avenaceum* и *B. sorokiniana*, стимулируя вегетативный рост в ущерб размножению. В отношении *A. alternata* соединение **6** спровоцировало стрессовое гиперспороношение, что может быть использовано для наработки инфекционного материала в научных целях. Полученные данные подтверждают перспективность дальнейшего изучения тетразолий-5-аминидов А-типа для создания на их основе новых средств защиты растений.

Ключевые слова: мезоионные тетразолий-5-аминиды, биологическая активность, фитопатогены, фунгицидный эффект, спороношение, *Fusarium avenaceum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum lupini*

Для цитирования. Будевич, В. А. Оценка биологической активности мезоионных тетразолий-5-аминидов А-типа против некоторых возбудителей болезней сельскохозяйственных растений / В. А. Будевич, Ю. А. Сущевич, А. В. Зураев // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2026. – Т. 62, № 4. – С. 284–291. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-284-291

V. A. Budevich[1], Yu. A. Sushchevich[2], A. V. Zuraev[3]

[1]Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2]Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Agriculture, Zhodino, Belarus
[3]Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

ASSESSMENT OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF MESOIONIC A-TYPE TETRAZOLIUM-5-AMINIDES AGAINST CERTAIN AGRICULTURAL PLANT PATHOGENS

Abstract. The biological activity of five mesoionic A-type tetrazolium-5-aminides was evaluated against the causative agents of agricultural plant diseases, including *Fusarium avenaceum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, and *Colletotrichum lupini*. The studies were carried out under laboratory conditions on potato dextrose agar with the test compounds added directly to the culture medium at a concentration of 0.3 mg/mL. Colony area, mycelial morphology, and sporulation intensity were assessed on days 4 and 7 of cultivation. On day 4, the test compounds reduced the colony area of the pathogens by 9.2–83.5 % relative to the control (with the exception of *N*-tosyl-3-*tert*-butyl-1-methyltetrazolium-5-aminide (**5**) against *F. avenaceum*, which showed no fungicidal activity). The most pronounced inhibitory effect was exerted by *N*-benzoyl-1,3-di-*tert*-butyltetrazolium-5-aminide (**3**) and *N*-(*N′*-phenylthiocarbamoyl)-1,3-di-*tert*-butyltetrazolium-5-aminide (**6**). By day 7, the strong suppressive effect of compound **3** persisted (colony area decreased to 20.5–48.1 % of the control). Compound **6** caused complete inhibition of sporulation in *F. avenaceum* and *B. sorokiniana*, stimulating vegetative growth at the expense of reproduction. In *A. alternata*, compound **6** induced stress-induced hypersporulation, which can be utilized for the production of infectious material for scientific purposes. The obtained data confirm the promise of further investigation of A-type tetrazolium-5-aminides as a basis for the development of new plant protection agents.

© Будевич В. А., Сущевич Ю. А., Зураев А. В., 2026

Keywords: mesoionic tetrazolium-5-aminides, biological activity, phytopathogens, fungicidal effect, sporulation, *Fusarium avenaceum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum lupini*

For citation. Budevich V. A., Sushchevich Yu. A., Zuraev A. V. Assessment of the biological activity of mesoionic A-type tetrazolium-5-aminides against certain agricultural plant pathogens. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2026, vol. 62, no. 4, pp. 284–291 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-284-291

Введение. Болезни растений являются одной из основных причин снижения продуктивности сельскохозяйственных культур. К наиболее распространенным относятся заболевания, вызванные фитопатогенными грибами. Патогенный комплекс этих возбудителей представлен различными видами, паразитирующими на растении-хозяине на протяжении всего онтогенеза и поражающими разные части растения. Высокой вредоносностью отличаются патогены, повреждающие корневую систему и вызывающие корневую гниль, которые ведут к ее преждевременному разрушению, что полностью блокирует поступление в растение воды и питательных веществ. Огромное количество патогенных грибов поражают листья, стебли и репродуктивные части растений, что приводит к снижению фотосинтеза и нарушению их метаболизма. Следует отметить, что отдельные грибы, возбудители болезней, способные развиваться на всех органах растения-хозяина, поражают корневую систему (корневые гнили), листья (листовые пятнистости), репродуктивные части и семена. В технологиях возделывания сельскохозяйственных культур большое внимание уделяется защитным мероприятиям в борьбе с болезнями, таким как агротехнические, биологические и химические [1–3].

В комплексе защиты от болезней наибольшее значение имеют химические средства (фунгициды), эффективно подавляющие грибную инфекцию. Особое место занимают серосодержащие препараты, поскольку многие из них подавляют не только грибную инфекцию, но и сдерживают развитие клещей (акарициды). Отметим, что в отличие от современных препаратов соединения, содержащие в своем составе серу, могут уступать по технологичности применения. Несмотря на то что в настоящее время зарегистрировано и разрешено к использованию на территории республики много высокоэффективных препаратов, продолжаются исследования по созданию и изучению новых биологически активных веществ [4]. Объяснением такого разнообразия применяемых фунгицидов служит биологическая особенность возбудителей болезней. Исследования показывают, что благодаря огромной репродуктивной способности патогены быстро адаптируются к изменениям и становятся малоуязвимы к широко используемым препаратам [5–7].

Азольные фунгицидные препараты остаются ключевым классом веществ, применяемых для защиты сельскохозяйственных культур, составляя около 20–25 % мирового рынка фунгицидов [5]. Одними из основных мишеней являются стерол-14α-деметилаза (CYP51), β-тубулины и другие клеточные компоненты. В первом случае происходит остановка окислительного деметилирования ланостерина путем блокировки биосинтеза эргостерина – важнейшего компонента клеточных мембран грибов, во втором случае фунгициды воздействуют на тубулины, нарушая образование веретена и влияя на митоз [6, 7]. Важным достижением является создание мефентрифлуконазола – первого представителя инновационной подгруппы изопропанол-азолов. Благодаря конформационной гибкости он прочно связывается даже с мутантными формами фермента CYP51, успешно преодолевая резистентность фитопатогенов к другим азолам (тебуконазол, эпоксиконазол) [8]. Современные исследования сфокусированы на синтезе молекул, сочетающих азольный цикл с другими фармакофорными группами: аминокислотными, карбоксамидными, оксадиазольными или тиадиазольными фрагментами. Азолы часто обладают плохой растворимостью в воде и высокой токсичностью для водной фауны. Нано- и микрокапсулирование (например, гексаконазол в оболочке из хитозана или прохлораз в мезопористых наночастицах диоксида кремния) обеспечивает pH- и термочувствительное контролируемое высвобождение, повышая фотостабильность и значительно снижая экологическую нагрузку на окружающую среду [7, 9–11].

В соответствии с современными представлениями мезоионные тетразолий-5-аминиды А-типа, также являющиеся азолами, относятся к подклассу сопряженных мезомерных гетероциклических бетаинов [12]. Для мезоионных соединений характерно проявление различных видов

биологической активности, включая такие, как антибактериальная, инсектицидная, фунгицидная и др. [13]. Среди производных тетразола известны соединения, обладающие антигипертензивной, антибактериальной, противогрибковой, противовирусной, противовоспалительной, противораковой и др. биологической активностью [14, 15]. Несмотря на то что мезоионные производные тетразолий-5-аминидов А-типа были впервые получены более 70 лет назад, исследованию их фунгицидной активности до настоящего времени должного внимания не уделялось [16].

Задачей нашего исследования является оценка эффективности пяти новых мезоионных тетразолий-5-аминидов А-типа против возбудителей корневой гнили, пятнистостей листьев, стебля, репродуктивных органов и семян зерновых культур и люпина.

Методика проведения исследования. В работе использовали чистые культуры патогенов возбудителей корневых гнилей и других болезней зерновых культур: *Fusarium avenaceum*, *Bipolaris sorokiniana*, *Alternaria alternata*, а также возбудитель антракноза люпина *Colletotrichum lupini*. Исследования проводили в лабораторных условиях на картофельно-глюкозном агаре (КГА). Состав питательной среды: картофель (отвар) – 200 г, глюкоза – 20 г, агар – 20 г, дистиллированная вода – до 1 000 мл.

Картофель измельчали и кипятили в воде в течение 40 мин, после чего отвар процеживали через марлю, добавляли необходимое количество глюкозы (20 г/л), агар (15–20 г/л) и воду, разливали в стеклянные колбы объемом 150–200 мл и автоклавировали 20 мин при 1 атм. Согласно схеме перед посевом грибов в питательную среду добавляли исследуемые вещества (предварительно растворенные в ацетоне в расчете 0,03 г на 1 мл ацетона) в количестве 1 мл раствора в ацетоне на 100 мл питательной среды, тщательно перемешивали, разливали по чашкам Петри, а после остывания осуществляли посев возбудителей. В качестве контроля использовали питательные среды, полученные из расчета 1 мл ацетона на 100 мл питательной среды. Чашки Петри помещали в термостат при температуре 24 °С, измерение и описание колоний проводили на 4-е и 7-е сутки. Наличие или отсутствие спороношения определяли под микроскопом МБИ-6 при увеличении ×350. Следует отметить, что скорость роста колоний зависела от вида возбудителя: быстрее разрастались фузариозные колонии (*F. avenaceum*). Некоторые колонии не имели четкого радиального роста, поэтому проводили три замера их диаметра и вычисляли среднюю величину. Площадь колоний рассчитывали по формуле:

$$S = \pi r^2,$$

где r – радиус колонии.

Исследуемые соединения **3–7** получали по опубликованным ранее методикам [17, 18] из 1,3-ди-*трет*-бутилтетразолий-5-аминида (**1**) и из 3-*трет*-бутил-1-метилтетразолий-5-аминида (**2**) путем их взаимодействия с соответствующими электрофильными агентами в условиях реакции Шоттена–Баумана (рис. 1).

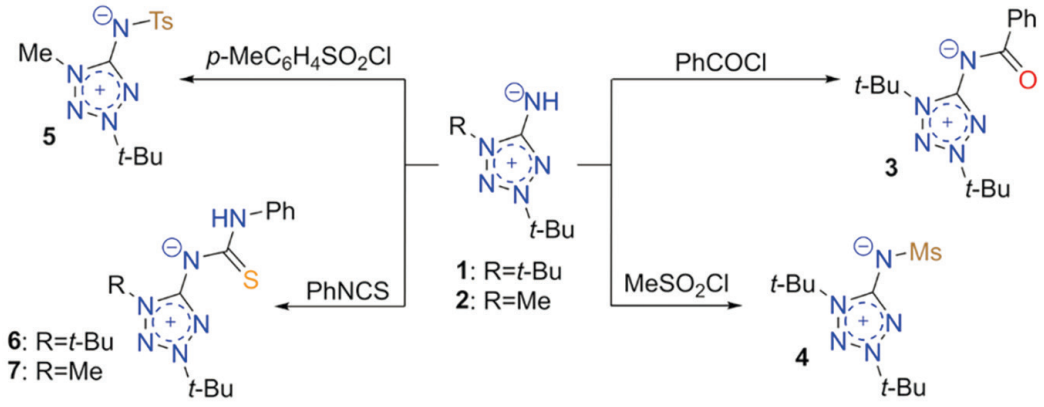


Рис. 1. Схема синтеза исследуемых соединений **3–7**

Fig. 1. Synthesis scheme for compounds **3–7**

Результаты и их обсуждение. Исследование показывает, что на 4-е сутки стало заметно действие изучаемых соединений **3–7**. За исключением одного варианта, где использовалось соединение **5** с посевом *F. avenaceum*, площадь колоний уменьшилась на 9,2–83,5 % по отношению к контрольному образцу. Особенно сильное ингибирующее действие выявлено у соединений **3** и **6**: от 38,7 до 83,5 %. Следует отметить неоднозначную реакцию на эти вещества возбудителей болезней. Так, более сильно реагировал возбудитель альтернариоза, где колонии были угнетены на 78,0 и 83,5 %, в меньшей степени – возбудитель антракноза (38,7 и 59,7 % соответственно) (табл. 1).

Таблица 1. **Влияние химических соединений на рост колоний возбудителей болезней растений (4-е сутки)**

Table 1. **The effect of chemical compounds on the colony growth of plant pathogens (day 4)**

Вариант	*F. avenaceum*		*B. sorokiniana*		*C. lupini*		*A. alternata*	
	Площадь колонии, см^2	К контролю, %	Площадь колонии, см^2	К контролю, %	Площадь колонии, см^2	К контролю, %	Площадь колонии, см^2	К контролю, %
КГА (контроль)	15,2	100,0	5,3	100,0	6,2	100,0	9,1	100,0
КГА + ацетон	13,8	90,8	3,1	58,5	6,2	100,0	7,1	78,0
КГА + **3**	4,5	29,6	1,5	28,3	3,8	61,3	2,0	22,0
КГА + **4**	12,6	82,9	3,1	58,5	5,3	85,5	7,1	78,0
КГА + **5**	15,2	100,0	4,5	84,9	5,3	85,5	8,0	87,9
КГА + **6**	6,2	40,8	2,0	37,7	2,5	40,3	1,5	16,5
КГА + **7**	13,8	90,8	2,5	47,2	4,5	72,6	5,3	58,2

На 7-е сутки повторное определение площади колоний грибов показало, что действие соединений **3** и **6** сохранилось, однако ингибирующий эффект в большей степени проявился у вещества **3**, где уменьшение колоний составило 51,9–79,5 % к контрольному варианту. Сильнее всех на соединения **3** и **6** отреагировал возбудитель альтернариоза: на 79,5 и 69,9 % ниже контрольного образца; на одном уровне по отношению к веществам **3** и **6** оказался размер площади колоний у возбудителя антракноза: 48,1 % относительно контрольного образца. В то же время площадь колонии возбудителя гельминтоспориоза (*B. sorokiniana*) при использовании соединения **6** увеличилась на 28,2 % (табл. 2).

Таблица 2. **Влияние химических соединений на рост колоний возбудителей болезней растений (7-е сутки)**

Table 2. **The effect of chemical compounds on colony growth of plant pathogens (day 7)**

Вариант	*F. avenaceum*		*B. sorokiniana*		*C. lupini*		*A. alternata*	
	Площадь колонии, см^2	К контролю, %	Площадь колонии, см^2	К контролю, %	Площадь колонии, см^2	К контролю, %	Площадь колонии, см^2	К контролю, %
КГА (контроль)	58,5	100,0	7,1	100,0	21,2	100,0	30,2	100,0
КГА + ацетон	55,4	94,7	5,3	74,6	19,6	92,5	22,9	75,8
КГА + **3**	13,8	23,6	2,5	35,2	10,2	48,1	6,2	20,5
КГА + **4**	50,2	85,8	6,2	87,3	16,6	78,3	22,9	75,8
КГА + **5**	52,8	90,3	7,1	100,0	16,6	78,3	26,4	87,4
КГА + **6**	21,2	36,2	9,1	128,2	10,2	48,1	9,1	30,1
КГА + **7**	55,4	94,7	6,2	87,3	15,2	71,7	21,2	70,2

Как показал дальнейший анализ, исследуемые соединения оказали действие и на интенсивность спороношения грибов. В табл. 3 представлены интенсивность спороношения и описание морфологии колоний возбудителя, которое показывает, что возбудители болезней отреагировали на препараты как размером колоний, так и образованием спор и структурой мицелия. Гриб *F. avenaceum* на питательной среде с использованием соединения **3** образовал очень небольшое количество спор, всего от 2 до 5 в поле зрения микроскопа, а вещество **6** вовсе подавило развитие спор, наблюдалось их полное отсутствие. Отсутствие спороношения означает отсутствие вос-

производства возбудителя, хотя гетеротрофные патогены могут размножаться мицелием, а мицелий имеет большее значение в сохранении и возобновлении организма. От интенсивности спороношения зависит его распространение, а также патогенность и агрессивность. В контрольном и других вариантах опыта наблюдалось обильное спороношение без какой-либо деформации спор. Отмечены некоторые изменения в морфологии мицелия: в отличие от контрольного образца колонии возбудителя имели снежно-белый окрас, с более плотной структурой (войлочной), строма слабо окрашенная (в норме – темно-малиновый цвет). Использование вещества **6** привело к полному отсутствию спороношения у колоний *B. sorokiniana*, при этом если в контрольном варианте колонии этого возбудителя имеют почти черный окрас и черную строму, плотную колонию и обильное спороношение, то на среде с этим препаратом окрас светло-серый, колония воздушная, строма также светлая. Отсутствие спороношения привело к интенсивному вегетативному росту в ущерб спороношению и возобновлению роста и распространения гриба. Микроскопическое исследование выявило угнетение спороношения данного возбудителя под действием всех применяемых химических соединений.

Меньше других возбудителей отреагировал на анализируемые соединения антракноз люпина (*C. lupini*). Количество спор в поле зрения микроскопа снизилось всего почти в два раза в чашках с соединениями **3**, **5** и **6** (больше с веществом **6**), при этом мицелий и строма приобрели более светлый окрас и рыхлую структуру мицелия.

Несколько другая реакция наблюдалась при посеве чистой культуры возбудителя альтернариоза (*A. alternata*). В отличие от других возбудителей колонии альтернарии на 7-е сутки слабо спороносили, в варианте с ацетоном спороношение вовсе отсутствовало, при этом в варианте с соединением **6** наблюдалось интенсивное спороношение, мицелий не просматривался, каждая его клетка образовала спору, по внешнему виду несколько деформированную. Однако при последующем пересеве в стандартную среду КГА наблюдался нормальный мицелиальный рост. Можно предположить, что возбудитель от примененного препарата получил сильный стресс, а защитная реакция проявилась в усилении образования спор в целях сохранения вида. Такие явления нередки в природе, когда стрессовые ситуации провоцируют ускорение цветения и плодообразование у растений. В данном случае соединение **6** можно рассматривать как обладающее положительным свойством, стимулирующим спороношение (например, при ускоренной наработке инфекции для научных исследований, создании некоторых биологических препаратов, применяемых в целях защиты растений от вредителей и болезней).

Таблица 3. **Влияние химических соединений на интенсивность спороношения, окрас и типы колоний возбудителей болезней растений в лабораторных условиях**

Table 3. **Influence of chemical compounds on the sporulation intensity, pigmentation, and morphological types of pathogen colonies in laboratory settings**

Вариант	Интенсивность спороношения	Окрас колонии и стромы	Структура мицелия
Fusarium avenaceum			
КГА (контроль)	Обильное, более 100 спор в поле зрения микроскопа	Белая колония, строма темно-малиновая	Мицелий белый паутинистый, с многочисленными пионотами
КГА + ацетон	Обильное, более 100 спор в поле зрения микроскопа	Белая колония, строма темно-малиновая	Мицелий белый паутинистый, с многочисленными пионотами
КГА + **3**	Слабое, 2–5 споры в поле зрения микроскопа	Колония белая, строма малиновая	Мицелий плотный, войлочный
КГА + **4**	Обильное, более 100 спор в поле зрения микроскопа	Колония белая, строма темно-малиновая	Мицелий паутинистый, с многочисленными пионотами
КГА + **5**	Обильное, более 100 спор в поле зрения микроскопа	Колония белая, строма темно-малиновая	Мицелий паутинистый, с многочисленными пионотами
КГА + **6**	Отсутствует	Колония снежно-белая, строма бледно-розовая	Мицелий плотный, войлочный
КГА + **7**	Обильное, более 100 спор в поле зрения микроскопа	Колония белая, строма бледно-розовая	Мицелий рыхлый, паутинистый

Окончание табл. 3

Вариант	Интенсивность спороношения	Окрас колонии и стромы	Структура мицелия
Bipolaris sorokiniana			
КГА (контроль)	Обильное, более 100 спор в поле зрения микроскопа	Колония почти черная, строма черная	Мицелий плотный, бархатистый
КГА + ацетон	Обильное, более 100 спор в поле зрения микроскопа	Колония почти черная, строма черная	Мицелий плотный, бархатистый
КГА + **3**	Невысокое, 20–30 спор в поле зрения микроскопа	Колония почти черная, строма черная	Мицелий плотный, бархатистый
КГА + **4**	Невысокое, 30–20 спор в поле зрения микроскопа	Колония почти черная, строма черная	Мицелий плотный, бархатистый
КГА + **5**	Слабое, 10–20 спор в поле зрения микроскопа	Колония почти черная, строма черная	Мицелий плотный, бархатистый
КГА + **6**	Отсутствует	Колония светло-серая, строма светлая	Мицелий воздушный, рыхлый
КГА + **7**	Очень слабое, 2–3 споры в поле зрения микроскопа	Колония серая, строма темно-серая	Мицелий воздушный, рыхлый
Colletotrichum lupini			
КГА (контроль)	Среднее, более 50 спор в поле зрения микроскопа	Колония серая, строма черная	Мицелий воздушный, очень рыхлый
КГА + ацетон	Среднее 40–45 спор в поле зрения микроскопа	Колония серая, строма черная	Мицелий стелющийся, слегка воздушный
КГА + **3**	Ниже среднего, 20–30 спор в поле зрения микроскопа	Колония светло-серая, строма светло-серая	Мицелий стелющийся, слабо воздушный
КГА + **4**	Среднее, более 50 спор в поле зрения микроскопа	Колония серая, строма черная	Мицелий воздушный, очень рыхлый
КГА + **5**	Ниже среднего, более 20–30 спор в поле зрения микроскопа	Колония серая, строма черная	Мицелий стелющийся, слабо воздушный
КГА + **6**	Ниже среднего, 10–20 спор в поле зрения микроскопа	Колония светлая, почти белая, строма светлая	Мицелий воздушный, рыхлый
КГА + **7**	Среднее, 30–40 спор в поле зрения микроскопа	Колония серая, строма черная	Мицелий воздушный, рыхлый
*Alternaria alternat*a			
КГА (контроль)	Слабое, 1–2 споры в поле зрения микроскопа	Колония серая, строма черная	Мицелий плотный, слабо пушистый
КГА + ацетон	Отсутствует	Колония серая, строма серая	Мицелий плотный, слегка пушистый
КГА + **3**	Слабое 1–3 споры в поле зрения микроскопа	Колония светло-серая, строма светло-серая	Мицелий плотный, слегка пушистый
КГА + **4**	Слабое, 1–3 споры в поле зрения микроскопа	Колония серая, строма черная	Мицелий плотный, слабо пушистый
КГА + **5**	Слабое, 2–6 спор в поле зрения микроскопа	Колония серая, строма черная	Мицелий плотный, слабо пушистый
КГА + **6**	Обильное, споры нетипичные, более 300 спор в поле зрения микроскопа	Колония темно-оливковая, бархатистая, строма черная	Мицелий не просматривается, масса спор
КГА + **7**	Отсутствует	Колония серая, строма черная	Мицелий плотный, слабо пушистый

Заключение. Таким образом, проведена оценка фунгицидной активности пяти новых производных 1,3-дизамещенных тетразолий-5-аминидов А-типа по отношению к таким возбудителям болезней сельскохозяйственных растений, как *F. avenaceum*, *B. sorokiniana*, *A. alternata* и *C. lupini*. Наиболее эффективными оказались *N*-бензоил-1,3-ди-*трет*-бутилтетразолий-5-аминид (**3**) и *N*-(*N′*-фенилтиокарбамил)-1,3-ди-*трет*-бутилтетразолий 5-аминид (**6**), что может быть связано со структурным сходством данных соединений с препаратами «Биксафен», «Диафентиурон» и «Тиофанат-Метил». Полученные данные подтверждают перспективность дальнейшего изучения тетразолий-5-аминидов А-типа для создания на их основе новых средств защиты растений.

Список использованных источников

1. Миренков, Ю. А. Химические средства защиты растений : справочник / Ю. А. Миренков, П. А. Саскевич, С. В. Сорока. – 2-е изд., перераб. и доп. – Несвиж : Несвиж. укрупн. тип. им. С. Будного. – 2011. – 394 с.

2. Пересыпкин, В. Ф. Сельскохозяйственная фитопатология / В. Ф. Пересыпкин. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Колос, 1974. – 560 с.

3. Подготовка к посеву семян зерновых культур (рекомендации) / Ф. И. Привалов, И. Г. Бруй, Г. В. Будевич [и др.] ; М-во сел. хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь, НПЦ НАН Беларуси по земледелию. – Жодино, 2008. – 101 с.

4. Государственный реестр средств защиты растений и удобрений, разрешенных к применению на территории Республики Беларусь : справ. изд. / сост. : А. В. Пискун, О. А. Хвалей, С. А. Яблонская [и др.]. – Мн. : Промкомплекс, 2020. – 742 с.

5. Jorgensen, L. N. Azole Use in Agriculture, Horticulture, and Wood Preservation – Is It Indispensable? / L. N. Jorgensen, T. M. Heick // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2021. – Vol. 11. – P. 730297. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.730297

6. Green Pesticide Research and Development Integrating Molecular Targets, Mechanisms, Resistance, and Innovation in Theory and Technology / C. Wang, X. Luo, Y. Zhang [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2025. – Vol. 73. – P. 32460–32489. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c11544

7. Recent advances and remaining barriers to producing novel formulations of fungicides for safe and sustainable agriculture / A. B. Tleuova, E. Wielogorskab, V. S. S. L. P. Talluria [et al.] // Journal of Controlled Release. – 2020. – Vol. 326. – P. 468–481. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.035

8. Mefentrifluconazole sensitivity amongst European Zymoseptoria tritici populations and potential implications for its field efficacy / S. Kildea, P. Hellin, T. M. Heick [et al.] // Pest Management Science. – 2023. – Vol. 80, № 2. – P. 533–543. https://doi.org/10.1002/ps.7795

9. Synthesis and Biological Evaluation of Novel 1,2,4-Triazole Derivatives Containing Amino Acid Fragments / H. Shi, M. Li, Zh. Zhou [et al.] // Molecules. – 2025. – Vol. 30, № 8. – P. 1692. https://doi.org/10.3390/molecules30081692

10. Wang, J. Design, Synthesis, and Antifungal/Anti-Oomycete Activities of Novel 1,2,4-Triazole Derivatives Containing Carboxamide Fragments / J. Wang, H. Shi, A. Lu // Journal of Fungi. – 2024. – Vol. 10, № 2. – P. 160. https://doi.org/10.3390/jof10020160

11. Разработка и синтез соединений с фунгицидной активностью в подавлении роста грибов / Ф. Д. Дахаева, С. Бахман, М. С. Гинс, М. Баят // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство.– 2023. – Т. 18, № 4. – С. 475–484. https://doi.org/10.22363/2312-797X-2023-18-4-475-484

12. Ramsden, C. A. Chapter Three – Type A mesoionic compounds (1980–2020) / C. A. Ramsden, F. Dumitrascu // Advances in Heterocyclic Chemistry : Heterocyclic Mesomeric Betaines and Mesoionic Compounds / ed. C. A. Ramsden. – Academic Press, 2022. – Vol. 137. – P. 71–189. https://doi.org/10.1016/bs.aihch.2021.09.003

13. Kawase, M. The Chemistry of Bioactive Mesoionic Heterocycles / M. Kawase, H. Sakagami, N. Motohashi // Bioactive Heterocycles VII: Flavonoids and Anthocyanins in Plants, and Latest Bioactive Heterocycles II : Topics in Heterocyclic Chemistry / ed. N. Motohashi. – Berlin, Heidelberg : Springer, 2009. – P. 135–152. https://doi.org/10.1007/7081_2007_096

14. Ostrovskii, V. A. Tetrazoles / V. A. Ostrovskii, E. A. Popova, R. E. Trifonov // Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV / eds. D. S. Black, J. Cossy, C. V. Stevens. – Oxford : Elsevier, 2022. – P. 182–232. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818655-8.00131-1

15. Ostrovskii, V. A. Medicinal chemistry of tetrazoles / V. A. Ostrovskii, R. E. Trifonov, E. A. Popova // Russian Chemical Bulletin. – 2012. – Vol. 61, № 4. – P. 768–780. https://doi.org/10.1007/s11172-012-0108-4

16. Мызников, Л. В. Тетразолсодержащие биологически активные соединения и лекарственные препараты / Л. В. Мызников, С. В. Ворона, Ю. Э. Зевацкий // Химия гетероциклических соединений. – 2021. – Т. 57, № 3. – С. 224–233.

17. Endo- and exocyclic *N*-alkylation of 1- and 5-aminotetrazoles with *t*-BuOH–$HClO_4$: synthesis of mono-, di-, and tri-*tert*-butyl substituted aminotetrazolium salts / S. V. Voitekhovich, P. N. Gaponik, A. S. Lyakhov, O. A. Ivashkevich [et al.] // Tetrahedron. – 2008. – Vol. 64, № 37. – P. 8721–8725. https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.06.095

18. *N*-Functionalization of 1,3-dialkyltetrazolium-5-aminides under Schotten-Baumann reaction conditions / V. A. Budevich, A. V. Zuraev, O. S. Sherbakova [et al.] // Tetrahedron Letters. – 2026. – Vol. 184. – P. 156232. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2026.156232

References

1. Mirenkov Yu. A., Saskevich P. A., Soroka S. V.. *Chemical plant protection products.* 2nd ed., rev. and enl. Nesvizh : Nesvizh. Ukrpn. Tipogr. Im. S. Budnogo, 2011. 394 p. (in Russian).

2. Peresypkin V. F. *Agricultural phytopathology.* 2nd ed., rev. and enl. Moscow, Kolos Publ., 1974. 560 p. (in Russian).

3. Privalov F. I., Bruy I. G., Budevich G. V., Belyavskaya L. I., Kabashnikova L. F., Derevinskaya A. A. Preparation for sowing seeds of grain crops. Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus, RUE «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Agriculture». Zhodino, 2008, 101 p. (in Russian).

4. Piskun A. V., Khvalei O. A., Yablonskaya S. A., Kazakevich N. V., Globazh O. G. A., Nikolaeva T. G., Pesterev S. A. State register of plant protection products and fertilizers permitted for use in the Republic of Belarus : ref. ed. Minsk : Promkompleks, 2020, 742 p. (in Russian).

5. Jorgensen L. N., Heick T. M. Azole Use in Agriculture, Horticulture, and Wood Preservation – Is It Indispensable? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, vol. 11, pp. 730297. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.730297

6. Wang C., Luo X., ZhangY., Pu X., Liu J., Zhang Sh., Ye M., Li X. Green Pesticide Research and Development Integrating Molecular Targets, Mechanisms, Resistance, and Innovation in Theory and Technology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2025, vol. 73, pp. 32460–32489. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5c11544

7. Tleuova A. B., Wielogorskab E., Talluria V. S. S. L. P., Štěpáneka F., Elliottd C. T., Grigoriev D. O. Recent advances and remaining barriers to producing novel formulations of fungicides for safe and sustainable agriculture. *Journal of Controlled Release*, 2020, vol. 326, pp. 468–481. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.035

8. Kildea S., Hellin P., Heick T. M., Byrnea S., Hutton F. Mefentrifluconazole sensitivity amongst European Zymoseptoria tritici populations and potential implications for its field efficacy. *Pest Management Science*, 2023, vol. 80, no. 2, pp. 533–543. https://doi.org/10.1002/ps.7795

9. Shi H., Li M., Zhou Zh., Lu A., Wang Z. Synthesis and Biological Evaluation of Novel 1,2,4-Triazole Derivatives Containing Amino Acid Fragments. *Molecules*, 2025, vol. 30, no. 8, pp. 1692. https://doi.org/10.3390/molecules30081692

10. Wang J., Shi H., Lu A. Design, Synthesis, and Antifungal/Anti-Oomycete Activities of Novel 1,2,4-Triazole Derivatives Containing Carboxamide Fragments. *Journal of Fungi*, 2024, vol. 10, iss. 2, pp. 160. HTTPS://DOI.ORG/10.3390/jof10020160

11. Dakhaeva F. D., Bachman S., Gins M. S., Bayat M. Development and synthesis of compounds with fungicidal activity in suppressing fungal growth. *Vestnik Rossiyskogo universiteta druzhby narodov. Seriya: Agronomiya I zhivotnovodstvo = Bulletin of the Peoples' Friendship University of Russia. Series: Agronomy and Animal Husbandry*, 2023, vol. 18, no. 4, pp. 475–484 (in Russian). https://doi.org/10.22363/2312-797X-2023-18-4-475-484

12. Ramsden C. A., Dumitrascu F. Chapter Three – Type A mesoionic compounds (1980–2020). *Advances in Heterocyclic Chemistry : Heterocyclic Mesomeric Betaines and Mesoionic Compounds* / ed. C. A. Ramsden. Academic Press, 2022, vol. 137, pp. 71–189. https://doi.org/10.1016/bs.aihch.2021.09.003.

13. Kawase M., Sakagami H., Motohashi N. The Chemistry of Bioactive Mesoionic Heterocycles. *Bioactive Heterocycles VII: Flavonoids and Anthocyanins in Plants, and Latest Bioactive Heterocycles II : Topics in Heterocyclic Chemistry* / ed. N. Motohashi. Berlin, Heidelberg : Springer, 2009, pp. 135–152. https://doi.org/10.1007/7081_2007_096

14. Ostrovskii V. A., Popova E. A., Trifonov R. E. Tetrazoles. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV* / eds. D. S. Black, J. Cossy, C. V. Stevens. Oxford : Elsevier, 2022, pp. 182–232. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818655-8.00131-1

15. Ostrovskii V. A., Trifonov R. E., Popova E. A. Medicinal chemistry of tetrazoles *Russian Chemical Bulletin*, 2012, vol. 61, no. 4, pp. 768–780. https://doi.org/10.1007/s11172-012-0108-4

16. Myznikov L. V., Vorona S. V., Zevatskii Yu. E. Tetrazole-containing biologically active compounds and drugs. *Khimiya geterotsiklicheskikh soedinenii = Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 2021, vol. 57, no. 3, pp. 224–233 (in Russian).

17. Voitekhovich S. V., Gaponik P. N., Lyakhov A. S., Ivashkevich O. A. Endo- and exocyclic *N*-alkylation of 1- and 5-aminotetrazoles with *t*-BuOH–$HClO_4$: synthesis of mono-, di-, and tri-*tert*-butyl substituted aminotetrazolium salts. *Tetrahedron*, 2008, vol. 64, no. 37, pp. 8721–8725. https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.06.095

18. Budevich V. A., Zuraev A. V., Sherbakova O. S., Ivashkevich L. S., Voitekhovich S. V., Ivashkevich O. A. *N*-Functionalization of 1,3-dialkyltetrazolium-5-aminides under Schotten-Baumann reaction conditions. *Tetrahedron Letters*, 2026, vol. 184, pp. 156232. https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2026.156232

Информация об авторах

Будевич Владислав Александрович – магистр биологических наук, научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: vl.budevich@gmail.com

Сущевич Юлия Александровна – кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией. Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию (ул. Тимирязева, 1, 222160, Жодино, Минская обл., Республика Беларусь). E-mail: immunitet@izis.by

Зураев Александр Викторович – кандидат химических наук, доцент, заместитель директора. Институт химии новых материалов НАН Беларуси (ул. Ф. Скорины, 36, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: alex.zuraev@gmail.com

Information about the authors

Budevich Vladislav A. – M. Sc. (Biology), Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Akademika Kuprevicha Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vl.budevich@gmail.com

Sushchevich Yulia A. – Ph. D. (Agriculture). Head of the Laboratory. Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Agriculture (1, Timiryazeva Str., 222160, Zhodino, Minsk Region, Republic of Belarus). E-mail: immunitet@izis. By

Zuraev Alexander V. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Deputy Director. Institute of Chemistry of New Materials of the National Academy of Sciences of Belarus (36, F. Skoriny Str., 220084, Republic of Belarus, Minsk). E-mail: alex.zuraev@gmail.com

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 51-76:615.277.3:004.94
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-292-299

Поступила в редакцию 11.08.2026
Received 11.08.2026

L. N. Dvaraneva

Belarusian State University, Minsk, Belarus

VIRTUAL SCREENING OF THE DRUGBANK DATABASE USING MOLECULAR DOCKING METHODS TO IDENTIFY POTENTIAL INHIBITORS OF THE HUMAN Grp94 PROTEIN

Abstract. The endoplasmic reticulum chaperone Grp94 is a promising therapeutic target for anticancer drug development due to its essential role in maintaining the stability of multiple proteins involved in tumor growth, survival, and metastasis. A total of 11 992 DrugBank compounds were docked using AutoDock Vina. The obtained docking results were subsequently re-evaluated with the machine learning-based scoring functions PLANET and OnionNet-2. A pairwise correlation analysis was performed to assess the agreement between the prediction methods, and an exponential consensus ranking (ECR) was applied to identify the most promising candidates. The consensus analysis identified the top 100 candidate compounds with the highest predicted affinity toward Grp94. Among them, DB12323 demonstrated the most consistent performance, being the only compound ranked within the top 100 by all three scoring methods and the highest-ranked compound according to the ECR. In addition, DB12983, DB20856, and DB14214 were identified as promising candidates based on the highest affinity predictions obtained with AutoDock Vina, OnionNet-2, and PLANET, respectively. The obtained results demonstrate that the combined application of multiple scoring functions and the consensus ranking improve the reliability of virtual screening and facilitate the identification of compounds with consistently high predicted affinity toward Grp94. The selected candidates represent promising targets for further molecular dynamics simulations and subsequent experimental validation.

Keywords: virtual screening, Grp94, breast cancer, small molecule inhibitors, Radotinib, Phthalocyanine, Mazokalim, Rose bengal lactone, molecular docking, AutoDock Vina, PLANET, OnionNet-2

For citation. Dvaraneva L. N. Virtual screening of the DrugBank database using molecular docking methods to identify potential inhibitors of the human Grp94 protein. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2026, vol. 62, no. 4, pp. 292–299 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-292-299

Е. Н. Дворянева

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

ВИРТУАЛЬНЫЙ СКРИНИНГ БАЗЫ ДАННЫХ DRUGBANK С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО ДОКИНГА ДЛЯ ПОИСКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИНГИБИТОРОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО БЕЛКА Grp94

Аннотация. Шаперон эндоплазматического ретикулума Grp94 является перспективной терапевтической мишенью для разработки противоопухолевых препаратов благодаря его ключевой роли в поддержании стабильности множества белков, участвующих в росте, выживании и метастазировании опухолей. В общей сложности 11 992 соединения из базы данных DrugBank были подвергнуты молекулярному докингу с использованием программы AutoDock Vina. Полученные результаты докинга были затем переоценены с помощью оценочных функций PLANET и OnionNet-2, основанных на методах машинного обучения. Для оценки согласованности различных методов прогнозирования был проведен попарный корреляционный анализ, а для выявления наиболее перспективных соединений применено экспоненциальное консенсусное ранжирование (exponential consensus ranking, ECR). Консенсусный анализ позволил определить 100 соединений с наивысшей прогнозируемой аффинностью к Grp94. Среди них соединение DB12323 продемонстрировало наиболее стабильные результаты, оказавшись единственным соединением, вошедшим в первую сотню по всем трем методам оценки, а также занявшим первое место по результатам ECR. Кроме того, соединения DB12983, DB20856 и DB14214 были идентифицированы как наиболее перспективные кандидаты на основании наивысших прогнозируемых значений аффинности, выявленных с помощью методов AutoDock Vina, OnionNet-2 и PLANET соответственно. Полученные результаты демонстрируют, что совместное применение нескольких оценочных функций и консенсусного ранжирования повышает надежность виртуального скрининга и способствует выявлению соединений с устойчиво высокой прогнозируемой аффинностью к Grp94. Отобранные соединения представляют собой перспективные объекты для дальнейшего исследования с использованием молекулярной динамики и последующей экспериментальной валидации.

Ключевые слова: виртуальный скрининг, Grp94, рак молочной железы, низкомолекулярные ингибиторы, Radotinib, Phtalocyanine, Mazokalim, Rose bengal lactone, молекулярный докинг, AutoDock Vina, PLANET, OnionNet-2

Для цитирования. Дворянева, Е. Н. Виртуальный скрининг базы данных DrugBank с применением методов молекулярного докинга для поиска потенциальных ингибиторов человеческого белка Grp94 / Е. Н. Дворянева // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2026. – Т. 62, № 4. – С. 292–299. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-292-299

© Дворянева Е. Н., 2026

Introduction. *Cancer as a global public health issue.* Cancer remains one of the leading causes of death worldwide and represents one of the most significant medical and social challenges of our time. Despite significant progress in diagnosis and the development of new treatment methods, the incidence of many types of cancer continues to rise due to an aging population, environmental factors and changes in lifestyle. According to the American Cancer Society, by early 2026, approximately 2.1 million new cases of cancer had been recorded worldwide, along with nearly 630,000 deaths related to malignant tumors [1]. The global number of new cases continues to rise, highlighting the need to identify new therapeutic approaches and molecular targets for anti-tumor therapy.

Breast cancer occupies a special place among malignant diseases; it is the most commonly diagnosed malignant tumor in women and remains one of the leading causes of cancer-related mortality according to SEER, which is an authoritative source for cancer statistics in the United States (https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html). Despite the availability of surgical, radiotherapy, hormonal and targeted treatments, the development of drug resistance and the high molecular heterogeneity of tumors significantly limit the effectiveness of existing therapies. Consequently, an active search is ongoing for new molecular targets involved in maintaining the viability of tumor cells.

Heat shock proteins as promising therapeutic targets. Heat shock proteins (HSPs), which constitute a family of molecular chaperones, are one of the most important systems for maintaining cellular homeostasis. Their main function is to ensure the correct folding of proteins, prevent their aggregation, stabilize their spatial structure and participate in the degradation of damaged proteins [2]. In normal cells, HSP expression increases significantly in response to various types of cellular stress, including hypoxia, oxidative stress, exposure to toxic substances and elevated temperature [3].

Tumor cells are subject to constant physiological stress caused by a high rate of proliferation, the accumulation of mutations, metabolic disturbances and hypoxia. To maintain viability, they significantly increase the expression of genes encoding proteins that ensure the stability of a large number of oncoproteins involved in tumor growth, survival, and invasion [4]. Elevated expression of members of the HSP family has been detected in various types of malignant tumors and often correlates with a poor prognosis [5]. Owing to their ability to simultaneously regulate multiple signaling pathways, heat shock proteins are regarded as promising targets for modern anticancer therapy.

Grp94 – an endoplasmic reticulum member of the Hsp90 family. Of particular interest is the Grp94 protein (Glucose-Regulated Protein 94, Hsp90B1, gp96), a member of the Hsp90 family of molecular chaperones. Unlike the cytosolic isoforms of Hsp90, Grp94 is located in the lumen of the endoplasmic reticulum and performs specialized functions to ensure the correct maturation of secreted and membrane proteins [6].

Grp94 is involved in the folding and stabilization of a wide range of proteins, including integrins, Toll-like receptors, HER family receptors, insulin-like growth factor receptors, Wnt-signaling pathway proteins, immune receptors and other proteins essential for normal cellular function [7, 8]. Consequently, Grp94 plays a key role in maintaining cell proliferation, migration, angiogenesis and the regulation of the immune response.

Numerous studies have shown that Grp94 expression is significantly elevated in various types of malignant tumors, including breast, lung, liver, stomach, colon and prostate cancers, as well as melanoma [9, 10]. Grp94 interacts with the HER2 receptor and promotes its dimerization [11]. This dimerization is a critical step in the activation of the signaling pathway that triggers tumor cell proliferation and survival. The expression of gp96 on the surface of tumor cells correlates with the level of HER2 phosphorylation and proliferative activity. High levels of this protein's expression are often associated with increased tumor aggressiveness, the development of metastases, resistance to chemotherapy and reduced overall patient survival.

Inhibition of Grp94 as a promising strategy for anti-tumor therapy. Given the central role of Grp94 in maintaining the viability of tumor cells, the inhibition of this protein is regarded as a promising avenue for the development of new anti-tumor drugs. Unlike the inhibition of all members of the Hsp90 family, selective targeting of Grp94 has the potential to reduce the severity of side effects caused by the suppression of the functions of cytosolic Hsp90 isoforms.

In recent years, various classes of Grp94 inhibitors have been developed, most of which bind to the protein's ATP-binding domain. The best-known representatives are derivatives of purine, resorcinol, and

benzamide, as well as a number of experimental compounds that have demonstrated high selectivity for Grp94 [12, 13]. The following compounds may be used as potential experimental inhibitors of this protein: geldanamycin, radicicol (RDC), radamide (RDA) and its analogues [14]. However, most known inhibitors are currently still at the preclinical stage of research, and the challenge of identifying compounds with high efficacy, selectivity and favorable pharmacokinetic properties remains a pressing issue.

Virtual screening as a tool for discovering new inhibitors. One of the most effective modern approaches to discovering new drug compounds is virtual screening, which makes it possible to significantly reduce the scope of costly experimental research. One of the key stages of virtual screening is molecular docking, which simulates the interaction of a ligand with a protein's active site and enables the estimated binding affinity to be assessed [15], as well as allowing certain candidate compounds to be ranked and thus prioritized for further investigation using molecular dynamics and *in vitro* methods.

It should be noted that the accuracy of the prediction depends significantly on the scoring function used. Different algorithms may evaluate the contribution of individual types of intermolecular interactions differently, as a result of which the ranking of compounds may vary considerably. For this reason, modern research increasingly involves re-evaluating docking results using several independent scoring functions, which helps to improve the reliability of selecting the most promising candidates for further investigation [16].

Materials and methods. In this work, the DrugBank database (DrugBank Release Version 5.1.15: https://go.drugbank.com/releases) was screened using molecular docking methods to identify novel potential inhibitors of the human Grp94 protein.

Molecular docking. The preparation of the crystal structure of Grp94 (PDB ID: 6AOL; https://www.rcsb.org/) for molecular docking included the following steps: (i) the addition of the missing hydrogen atoms to the PDB Grp94 structure by PyMOL 3.1.6 (https://www.pymol.org), (ii) the selection of the required protein chain, and (iii) the conversion of the protein structure into a PDBQT file via AutoDock Tools 1.5.6 (https://ccsb.scripps.edu).

For the preparation of the ligand dataset, all ligand files in the DrugBank database were converted from the SDF format into PDB structures using the Python library RDKit (https://www.rdkit.org), followed by conversion into .pdbqt using MGLTools 1.5.6 (https://ccsb.scripps.edu/mgltools/1-5-6/).

At the final stage, molecular docking was carried out using AutoDock Vina 1.2.7 (https://vina.scripps.edu) with the following grid box parameters: ΔX = 20 Å, ΔY = 20 Å, ΔZ = 19 Å centered at x = –119 Å, y = 131 Å, z = 60 Å. The value of exhaustiveness parameter defining the number of individual sample runs was set to 100. The required exhaustiveness depends on the size of the docking box [17]. Moreover, highly flexible ligands require a high exhaustiveness value [18]. Consequently, the exhaustiveness value was set to 100.

A comparison of molecular docking results and affinity prediction models. Despite the widespread use of molecular docking in virtual screening, the docking score does not always accurately reflect the experimental binding affinity. This is because the built-in scoring functions of docking software use simplified physicochemical models of interactions and are primarily designed to identify the most likely ligand conformation. In this regard, a promising approach is the additional evaluation of complexes using modern machine learning models trained on experimental data regarding protein–ligand interactions. Such models are capable of more accurately predicting binding affinity, expressed in terms of pK_d. The PLANET [19] and OnionNet-2 [20] scoring functions were used to re-evaluate the results obtained using AutoDock Vina.

The energy values obtained from AutoDock Vina were converted to pK_d values to enable further valid comparisons using the following equation:

$$pK_d = -\frac{\Delta G}{RT \ln 10},$$

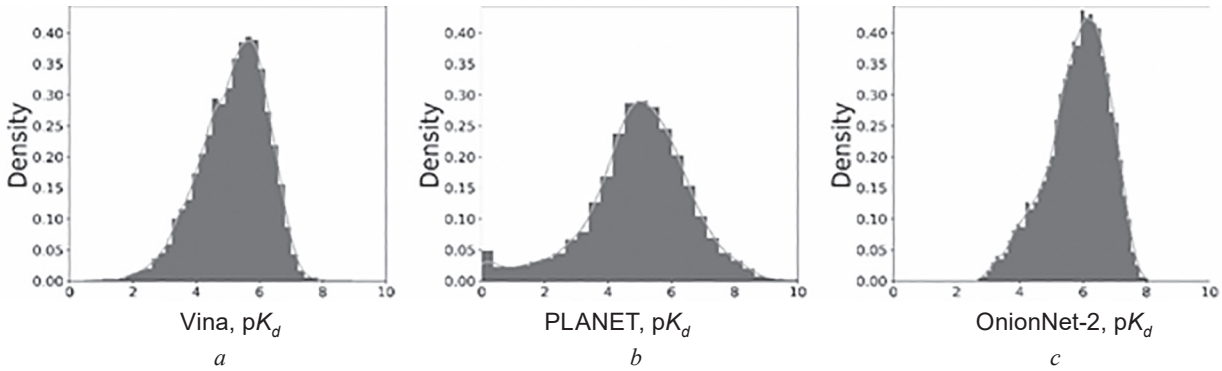
where ΔG is the Gibbs free energy, R is the gas constant (R = 0.001987 kcal/(mol·K)) and T is the temperature in Kelvin (T = 298.5 K).

Results and discussion. *Distribution of affinity and binding energy values for complexes.* During the virtual screening, 12,133 compounds from the DrugBank database were analyzed. For each compound, the binding energy was determined using molecular docking via AutoDock Vina, after which the resulting 'ligand–target' complexes were further evaluated using the deep learning models PLANET and OnionNet-2 to predict the binding affinity. A further 141 compounds were excluded from the subsequent statistical analysis as their predicted pK_d values were found to be invalid. pK_d values of 8–9 indicate a high affinity of the compound according to the method used. The main descriptive statistics parameters are shown in Table 1.

Table 1. **Descriptive statistics of the predicted pK_d values obtained using AutoDock Vina, PLANET, and OnionNet-2**

Metrics, pK_d	Vina	PLANET	OnionNet-2
Mean value	5.167	4.929	5.821
Standard deviation	1.059	1.657	0.973
Min value	0.049	0.000	2.677
Max value	8.909	15.026	8.056

The histograms of the values show a distribution that approximates a normal distribution, and are shown in Figure 1. The graphs of the distributions of the Vina pK_d and PLANET pK_d values are shifted closer to the origin of the coordinate axes, and the latter also exhibits a peak in the region where pK_d = 0.



a *b* *c*

Fig. 1. Distribution of predicted binding affinities (pK_d) estimated by AutoDock Vina, PLANET and OnionNet-2

Correlation analysis of the values obtained from molecular docking and the performance of the evaluation functionsTo carry out the correlation analysis, Pearson's and Spearman's statistical correlation coefficients were calculated. Correlation coefficients are provided in Table 2.

Table 2. **Correlation coefficients between the predicted pK_d values obtained using AutoDock Vina, PLANET, and OnionNet-2**

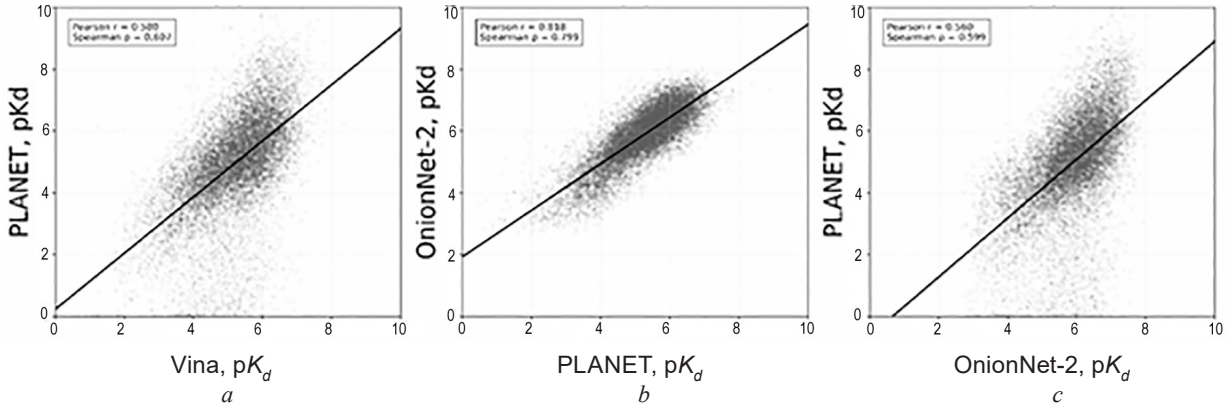
Pairs of Scoring Functions	Pearson's *r*	Spearman's ρ
Vina & PLANET	0.580	0.607
Vina & OnionNet-2	0.818	0.799
PLANET & OnionNet-2	0.560	0.599

Correlation analysis revealed a moderate positive relationship between AutoDock Vina pK_d values and pK_d values predicted by PLANET (Pearson's r = 0.580, Spearman's ρ = 0.607). A stronger positive correlation was observed between Vina scores and OnionNet-2 predictions (Pearson's r = 0.818, Spearman's ρ = 0.799), indicating greater agreement between these two approaches. Predicted pK_d values obtained using PLANET and OnionNet-2 showed a moderate positive correlation (Pearson's r = 0.560, Spearman's ρ = 0.599), suggesting that although both deep learning models identify similar trends, which is shown in Figure 2, their affinity predictions are not identical.

OnionNet-2 demonstrated a stronger agreement with docking-based ranking than PLANET.

Identification of the best compounds. To select the most promising candidates, a consensus ranking of compounds was carried out based on the ranks obtained from the binding affinity assessments performed using the AutoDock Vina, PLANET, and OnionNet-2 scoring functions. The use of a consensus approach reduces the influence of the limitations of individual scoring functions and improves the reliability of selecting compounds that demonstrate consistently high scores when assessed using several independent methods.

The final consensus rank was calculated using the exponential consensus ranking (ECR) method, which is based on an exponential transformation of the ranks of the compounds under investigation [21]. The higher the ECR value, the more promising the compound is considered to be. The general rank was calculated using the function 'rankdata' with ranking method 'average' from the Python library SciPy (https://docs.scipy.org/).



a *b* *c*

Fig. 2. Scatter plots comparing the predicted pK_d values obtained using AutoDock Vina, PLANET, and OnionNet-2. Solid lines represent linear regression fits. Pearson's (r) and Spearman's (ρ) correlation coefficients are shown for each pair of scoring functions

Table 3. **Top-10 candidate compounds selected using exponential consensus ranking (ECR)**

Generic Name	DB ID	pK_d			Rank			ECR
		Vina	Onion Net-2	PLANET	Vina	Onion Net-2	PLANET	
Radotinib	DB12323	7.3	7.9	8.6	48.5	10.0	76.0	0.002409
Nilotinib	DB04868	7.5	7.9	8.2	31.0	9.0	181.0	0.002356
Zandelisib	DB18245	7.1	7.6	9.2	143.0	75.0	30.0	0.002335
Gemnelatinib	DB21513	7.0	7.7	9.1	223.5	50.0	31.0	0.002303
Phthalocyanine	DB12983	8.9	7.4	10.1	1.0	312.0	8.0	0.002303
Adagrasib	DB15568	7.4	7.5	8.2	42.0	140.0	182.0	0.002262
Rebastinib	DB13005	7.3	7.4	8.4	51.0	199.0	119.0	0.002259
Risvodetinib	DB21602	6.9	7.7	8.6	332.0	45.0	79.0	0.002215
Umbralisib	DB14989	6.9	8.0	8.1	245.0	5.0	209.0	0.002209
L-756423	DB02009	7.2	7.6	8.0	76.0	97.0	285.0	0.002208

Despite moderate and strong correlations between the individual methods, an analysis of the overlap among the top candidates, which are presented in Table 3, revealed significant differences in their ranking. When comparing the top 100 compounds selected by each method, only one compound – Radotinib (DB12323) – appeared on all three lists simultaneously. Notably, this same compound ranked first in the consensus ranking based on the average rank from AutoDock Vina, PLANET and OnionNet-2. This result demonstrates a high degree of agreement in the evaluations of this compound by different computational approaches and allows it to be considered the most promising candidate for further experimental validation. DB12323 – the small molecule Radotinib – is a tyrosine kinase receptor inhibitor classified as 'investigational'. The compound is being investigated as a treatment for various types of cancer, in particular leukemia. Figure 3 shows the Radotinib molecule in the Grp94 protein binding site.

The second most significant candidate is the compound Phthalocyanine (DB12983) (Figure 4). It has the highest pK_d value according to Vina, and also has a high pK_d value according to PLANET. However, the pK_d value calculated using OnionNet-2 does not feature among the top 100 compounds. This discrepancy highlights differences in affinity assessment between various predictive models and points to the need for a comprehensive interpretation of results obtained using several independent scoring functions. Nevertheless, this compound can be considered as one of the potential Grp94 inhibitors. Phthalocyanine is classified in the 'investigational' group. The mechanism of action of the compound involves the inhibition of amyloid-beta precursor proteins, which are involved in the regulation of transcription and various signaling pathways necessary for cell differentiation and proliferation. It is being considered as a therapeutic compound for photodynamic therapy in patients with keratosis and skin cancer.

Two other compounds worthy of note are Mazokalim (DB20856) and Rose Bengal lactone (DB14214), which are the top-ranked compounds by pK_d, as calculated by OnionNet-2 and PLANET respectively. Mazokalim is a potassium channel activator and belongs to the group of experimental drugs, most likely classified as antihypertensive drugs according to the WHO International Nonproprietary

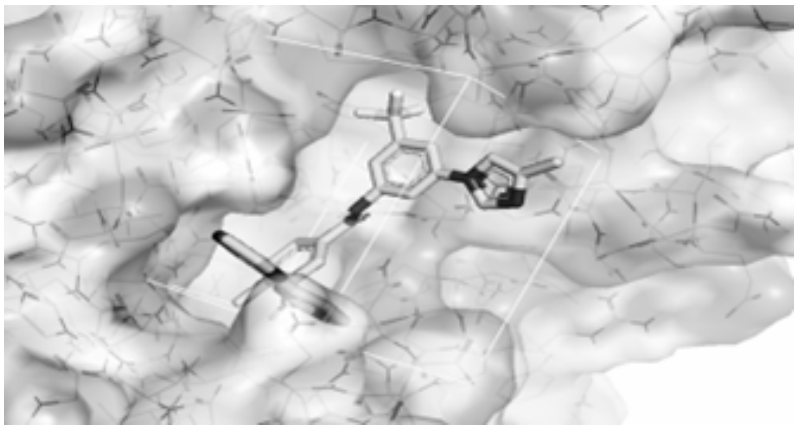


Fig. 3. Structure of the Grp94 protein with Radotinib (DB12323) in the binding site. The docking grid box is shown

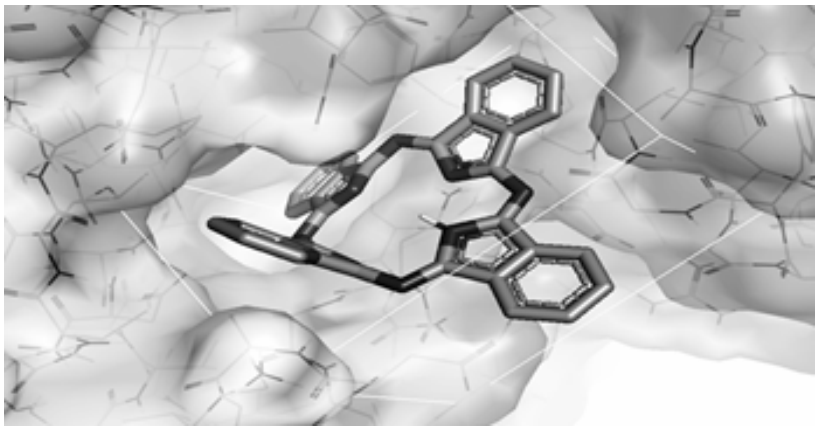


Fig. 4. Structure of the Grp94 protein with ligand DB12983 in the binding site. The docking grid box is shown

Names (INN). Rose Bengal lactone inhibits the kinesin-1 molecule and belongs to the group of experimental drug compounds. The former ranks in the top 20 by pK_d according to PLANET and OnionNet-2, but has a low rank according to Vina. The latter, in turn, has very low ranks according to both Vina and OnionNet-2. Such discrepancies between the results of different methods indicate a lack of consistent evidence for the high affinity of these compounds for Grp94. Consequently, their potential as inhibitors appears less convincing compared with compounds that have received high ratings from several independent methods simultaneously.

It should be noted that the results obtained at this stage are considered preliminary and are intended for the approximate identification of potential candidate compounds for further *in silico* investigation. The aim of this study was not to provide a definitive ranking of candidates for *in vitro* studies but to show which of the compounds can be studied in further experiments and additional computational approaches.

Conclusion. Thus, during a virtual screening of the DrugBank database of medicinal compounds, affinity values were predicted for 11,992 compounds using the AutoDock Vina, PLANET and OnionNet-2 functions. A statistical analysis of the results was carried out to identify the most likely potential inhibitors. The use of consensus ranking enabled the selection of the top 100 candidates, among which Radotinib stands out. This compound is the only one to feature in the top 100 for each affinity predicted by the functions, and is also ranked number one according to the consensus ranking. On this basis, this compound can be considered as one of the most promising inhibitors for Grp94.

In addition to this compound, Phthalocyanine, Mazokalim and Rose Bengal lactone are also candidates for further validation. All three are ranked as top-1 by pK_d values as estimated by AutoDock Vina, OnionNet-2 and PLANET, respectively.

The next stage of the research involves conducting molecular dynamics simulations to confirm the stability of the interaction between the ligands of interest and the target protein.

Acknowledgements. The author sincerely thanks Professor A. V. Tuzikov, Dr. Sci. (Physics and Mathematics), Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, and Professor A. M. Andrianov, Dr. Sci. (Chemistry), for their valuable consultations and insightful discussions of the research findings. The author also expresses her gratitude to K.V. Furs, S. V. Braginets and D. A. Varabyeu for their technical assistance during the experimental stage of the study.

Благодарности. Автор выражает искреннюю признательность доктору физико-математических наук, члену-корреспонденту НАН Беларуси профессору А. В. Тузикову и доктору химических наук профессору А. М. Андрианову за ценные консультации и содержательное обсуждение результатов исследования. Автор также благодарит К. В. Фурса, С. В. Брагинца и Д. А. Воробьева за техническую помощь на этапе проведения экспериментальных исследований.

References

1. Siegel R. L., Kratzer T. B., Wagle N. S. Cancer statistics, 2026. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2026, vol. 76, no. 1, pp. 1–34. https://doi.org/10.3322/caac.70043

2. Hu C., Yang J., Qi Z., Wu H., Wang B., Zou F., Mei H., Liu J., Wang W., Liu Q. Heat shock proteins: Biological functions, pathological roles, and therapeutic opportunities. *MedComm*, 2022, vol. 3, no. 3, pp. 1–39. https://doi.org/10.1002/mco2.161

3. Schopf F. H., Biebl M. M., Buchner J. The HSP90 chaperone machinery. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017, vol. 18, no. 6, pp. 345–360. https://doi.org/10.1038/nrm.2017.20

4. Larrea Murillo L., Green M., Mahon N., Saiani A., Tsigkou O. Modelling Cancer Pathophysiology: Mechanisms and Changes in the Extracellular Matrix During Cancer Initiation and Early Tumor Growth. *Cancers*, 2025, vol. 17, no. 10, art. 1675. https://doi.org/10.3390/cancers17101675

5. Calderwood S. K., Gong J. Heat Shock Proteins Promote Cancer: It's a Protection Racket. *Trends in Biochemical Sciences*, 2016, vol. 41, no. 4, pp. 311–323. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.003

6. Marzec M., Eletto D., Argon Y. GRP94: an HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, vol. 1823, iss. 3, pp. 774–787. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.10.013

7. Marzec M., Hawkes C. P., Eletto D., Boyle S., Rosenfeld R., Hwa V., Wit J. M., van Duyvenvoorde H. A., Oostdijk W., Losekoot M., Pedersen O., Yeap B. B., Flicker L., Barzilai N., Atzmon G., Grimberg A., Argon Y. A human variant of glucose-regulated protein 94 that inefficiently supports IGF production. *Endocrinology*, 2016, vol. 157, no. 5, pp. 1914–1928. https://doi.org/10.1210/en.2015-2058

8. Ostrovsky O., Eletto D., Makarewich C., Barton E. R., Argon Y. Glucose-regulated protein 94 is required for muscle differentiation through its control of the autocrine production of insulin-like growth factors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2010, vol. 1803, no. 2, pp. 333–341. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.11.005

9. Duan X., Iwanowycz S., Ngoi S., Hill M., Zhao Q., Liu B. Molecular chaperone GRP94/gp96 in cancers: Oncogenesis and therapeutic target. *Frontiers in Oncology*, 2021, vol. 11, pp. 1–11. https://doi.org/10.3389/fonc.2021.629846

10. Wu B. X., Hong F., Zhang Y., Ansa-Addo E., Li Z. GRP94/gp96 in cancer: Biology, structure, immunology, and drug development. *Advances in Cancer Research*, 2016, vol. 129, pp. 165–190. https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.09.001

11. Li X., Sun L., Hou J., Gui M., Ying J., Zhao H., Lv N., Meng S. Cell membrane gp96 facilitates HER2 dimerization and serves as a novel target in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 2015, vol. 137, no. 3, pp. 512–524. https://doi.org/10.1002/ijc.29405

12. Patel P. D., Yan P., Seidler P. M., Patel H. J., Sun W., Yang C., Que N. S., Taldone T., Finotti P., Stephani R. A., Gewirth D. T., Chiosis G. Cell membrane gp96 facilitates HER2 dimerization and serves as a novel target in breast cancer. *Nature Chemical Biology*, 2013, vol. 9, pp. 677–684. https://doi.org/10.1038/nchembio.1335

13. Crowley V. M., Khandelwal A., Mishra S., Stothert A. R., Huard D. J. E., Zhao J., Muth A., Duerfeldt A. S., Kizziah J. L., Lieberman R. L., Dickey C. A., Blagg B. S. J. Development of glucose-regulated protein 94-selective inhibitors based on the BnIm and Radamide scaffold. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2016, vol. 59, no. 7, pp. 3471–3488. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00085

14. Pugh K. W., Alnaed M., Brackett C. M., Blagg B. S. J. The biology and inhibition of Grp94/gp96. *Medicinal Research Reviews*, 2022, vol. 42, iss. 6, pp. 2007–2024. https://doi.org/10.1002/med.21915

15. Pagadala N. S., Syed K., Tuszynski J. Software for molecular docking: A review. *Biophysical Reviews*, 2017, vol. 9, pp. 91–102. https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1

16. Wang Z., Sun H., Yao X., Li D., Xu L., Li Y., Tian S., Hou T. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: The prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2016, vol. 18, no. 18, pp. 12964–12975. https://doi.org/10.1039/c6cp01555g

17. Agarwal R., Smith J. C. Speed vs Accuracy: Effect on Ligand Pose Accuracy of Varying Box Size and Exhaustiveness in AutoDock Vina. *Molecular Informatics*, 2022, vol. 42, iss. 2, pp. 2205–2220. https://doi.org/10.1002/minf.202200188

18. Rentzsch R., Renard B. Y. Docking small peptides remains a great challenge: an assessment using AutoDock Vina. *Brieflings in Bioinformatics*, 2015, vol. 16, iss. 6, pp. 1045–1056. https://doi.org/10.1093/bib/bbv008

19. Zhang X., Gao H., Wang H., Chen Z., Zhang Z., Chen X., Li Y., Qi Y., Wang R. PLANET: A multi-objective graph neural network model for protein–ligand binding affinity prediction. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2024, vol. 64, no. 7, pp. 2205–2220. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.3c00253

20. Wang Z., Zheng L., Liu Y., Qu Y., Li Y.-Q., Zhao M., Mu Y., Li W. OnionNet-2: A convolutional neural network model for predicting protein–ligand binding affinity based on residue-atom contacting shells. *Frontiers in Chemistry*, 2021, vol. 9, pp. 1–11. https://doi.org/10.3389/fchem.2021.753002

21. Palacio-Rodríguez K., Lans I., Cavasotto C. N., Cossio P. Exponential consensus ranking improves the outcome in docking and receptor ensemble docking. *Scientific Reports*, 2019, vol. 9, art. 5142. https://doi.org/10.1038/s41598-019-41594-3

Информация об авторе

Дворянева Елизавета Николаевна – студент. Белорусский государственный университет (пр-т Независимости, 4, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: e.dvoryaneva@gmail.com

Information about the author

Dvaraneva Lizaveta N. – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: e.dvoryaneva@gmail.com

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 577.151; 577.112
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-300-308

Поступила в редакцию 11.08.2026
Received 11.08.2026

A. B. Sachanka, E. A. Popicheva, A. V. Yantsevich

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

ESCHERICHIA COLI EXPRESSION AND PURIFICATION OF HUMAN ANGIOGENESIS REGULATORS VEGF165 AND ANGPT1

Abstract. Human vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165) and angiopoietin-1 (ANGPT1) are key regulators of angiogenesis and both play a central role in gene therapeutic strategies for treating critical limb ischemia. The low yield and high production cost of VEGF165 and ANGPT1 limit their application and investigation as potential therapeutic agents. To overcome folding limitations and avoid modifying native sequences with large solubility tags, expression plasmids were constructed using the pET-20b(+) vector with an N-terminal His-tag, and expression parameters (temperature, time) were optimized alongside co-expression with the pGro12 chaperone system. Small-scale optimization revealed that moderate cultivation temperatures (22–26 °C) combined with pGro12 co-expression dramatically reduced inclusion body accumulation and increased the soluble fraction for both proteins. Optimal parameters were established as 48 h at 26 °C for VEGF165 and 72 h at 22 °C for ANGPT1. This study establishes a highly effective expression and purification strategy for yielding soluble VEGF165 and ANGPT1.

Keywords: VEGF165, ANGPT1, angiogenesis, bacterial expression system, protein expression, *E. coli*

For citation. Sachanka A. B., Popicheva E. A., Yantsevich A. V. *Escherichia coli* expression and purification of human angiogenesis regulators VEGF165 and ANGPT1. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2026, vol. 62, no. 4, pp. 300–308 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-300-308

А. Б. Саченко, Е. А. Попичева, А. В. Янцевич

Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* И ОЧИСТКА РЕГУЛЯТОРОВ АНГИОГЕНЕЗА ЧЕЛОВЕКА VEGF165 И ANGPT1

Аннотация. Изоформы фактора роста эндотелия сосудов VEGF165 и ангиопоэтина-1 (ANGPT) человека являются ключевыми регуляторами ангиогенеза и играют центральную роль в геннотерапевтических стратегиях лечения критической ишемии конечностей. Низкий выход и высокая стоимость получения VEGF165 и ANGPT1 ограничивают их применение в качестве потенциальных терапевтических средств. Для преодоления проблем, связанных с фолдингом белков, и исключения необходимости модификации нативных последовательностей крупными растворяющими метками были сконструированы экспрессионные плазмиды на основе вектора pET-20b(+) с N-концевой His-меткой, а также были оптимизированы параметры экспрессии (температура, время) и отработана методика совместной экспрессии с системой шаперонов pGro12. Оптимизация процесса в малом масштабе показала, что умеренные температуры культивирования (22–26 °C) в сочетании с совместной экспрессией pGro12 позволяют существенно снизить образование телец включения и увеличить долю растворимой формы обоих белков. Были определены оптимальные условия экспрессии: 48 ч при 26 °C для VEGF165 и 72 ч при 22 °C для ANGPT1. Разработана высокоэффективная стратегия экспрессии и очистки, обеспечивающая получение растворимых форм VEGF165 и ANGPT1.

Ключевые слова: VEGF165, ANGPT1, ангиогенез, бактериальная экспрессионная система, экспрессия белка, *E. coli*

Для цитирования. Саченко, А. Б. Экспрессия в клетках *Escherichia coli* и очистка регуляторов ангиогенеза человека VEGF165 и ANGPT1 / А. Б. Саченко, Е. А. Попичева, А. В. Янцевич // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2026. – Т. 62, № 4. – С. 300–308. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-300-308

Introduction. Human vascular endothelial growth factor (VEGF) is a key regulator of angiogenesis and promotes the growth of new blood vessels *in vivo*. VEGF consists of two identical polypeptide subunits that form a homodimeric glycoprotein stabilized by disulfide bonds [1]. It is a member of a family of structurally related proteins that act as ligands for the VEGF receptor (VEGFR) family. Ligand-receptor binding initiates an intracellular signaling cascade that drives endothelial cell growth, survival,

© Саченко А. Б., Попичева Е. А., Янцевич А. В., 2026

and proliferation, ultimately promoting angiogenesis [2]. Four VEGF homologs have been identified in humans: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, and VEGF-D [3]. Among these, VEGF-A has been the primary focus of angiogenesis research for more than three decades, making it the best-characterized molecule within the VEGF family [4]. Multiple protein isoforms of VEGF-A differ in their bioavailability. VEGF121 is freely secreted, whereas VEGF189 and VEGF206 are secreted but remain largely bound to heparan sulfate proteoglycans on cell surfaces. VEGF145 and VEGF165 exhibit intermediate properties, existing in both bound and soluble forms [5]. Among these, VEGF165 is the most abundant, the most extensively studied, and the predominantly active VEGF-A isoform, existing primarily as a homodimer with a molecular weight of ~40 kDa [6].

VEGF165 is a homodimeric growth factor characterized by a cysteine-knot motif and a single glycosylation site. Each monomer comprises an N-terminal receptor-binding domain (amino acids 1-110) that participates in disulfide-linked dimer formation, and a C-terminal heparin-binding domain (amino acids 111–165) that mediates interaction with heparan sulfate proteoglycans on cell surfaces. The N-terminal region is primarily responsible for VEGFR engagement, whereas the C-terminal region determines extracellular matrix association and modulates isoform bioavailability [7]. VEGF165 binds to the FMS-like tyrosine kinase 1 (Flt-1) and kinase insert domain receptor (KDR), which are localized on the endothelial cell surface of developing and mature blood vessels [8]. It also interacts with Flt-4, a receptor primarily associated with lymphangiogenesis [9]. Activation of these receptors initiates intracellular signaling cascades, including post-translational modifications, that lead to the formation of new blood vessels.

VEGF165 plays a central role in gene-therapeutic strategies aimed at treating critical limb ischemia [10] and wound healing [11]. Therapy with VEGF-overexpressing mesenchymal stem cell sheets significantly improved cardiac function, reduced fibrosis, and enhanced myocardial neo-angiogenesis and cell proliferation, and may be used in the period after transplantation to shorten recovery time [12]. Moreover, aberrant angiogenesis resulting from overexpression of VEGF165 under stress conditions (hypoxia, chemotherapy, radiotherapy) [13], contributes to diseases such as rheumatoid arthritis, atherosclerotic plaque formation, visual loss in diabetic retinopathy, and tumor angiogenesis [14]. Inhibition of VEGF165 has therefore emerged as a therapeutic strategy for several metastatic tumors [15].

VEGF165 has been reported to be expressed in various systems, such as *Kluyveromyces lactis* GG799 cells at ~5.7 mg/L [16], *Saccharomyces cerevisiae* at ~4.0 mg/L [17], and overproduced in Chinese hamster ovary (CHO) cells at ~20.0 mg/L [18]. Attempts to express VEGF165 in conventional prokaryotic systems typically yield low amounts of soluble protein and are frequently accompanied by misfolding and aggregation into inclusion bodies, which severely compromise recovery of functional protein [19]. Although soluble VEGF165 has been produced in *E. coli* as fusion constructs, process-scale limitations (including low volumetric productivity, proteolytic instability, inefficient tag removal, and challenges in downstream refolding and purification) impede industrial-scale implementation [20]. Optimization of bacterial fermentation media and control parameters to increase production of insoluble VEGF165 and related isoforms has been described, with final purified yields reported in the range of 5–40 mg/L [21] and soluble-fraction yields of ~0.5–1.0 mg/L [19, 22, 23]. Bacterial expression of soluble VEGF165 can shorten fermentation durations and improve scalability, thereby increasing the economic viability and applicability of the protein [24].

Angiopoietin-1 (ANGPT1) promotes the maturation and stabilization of blood vessels during the later stages of vascular development [25]. ANGPT1 is a secreted ligand for the endothelial tyrosine-kinase receptor Tie2, acting as a key regulator of vascular maturation and stability and modulating both physiological angiogenesis and pathological vascular remodeling [26]. Transgenic overexpression of ANGPT1 protects the adult vasculature from plasma leakage, attenuates VEGF-induced adverse effects, and synergistically promotes vessel formation by enhancing endothelial cell survival following injurious stimuli [27]. As demonstrated previously [28], combined administration of VEGF165 and ANGPT1 is a promising strategy for treating conditions such as critical limb ischemia and for enhancing wound regeneration.

ANGPT1 comprises a short N-terminal domain that assembles into ring-like structures to supercluster oligomers into variably sized multimers, a central coiled-coil domain that mediates and stabilizes

oligomerization, and a C-terminal fibrinogen-like domain that primarily mediates binding to the Tie2 receptor [27, 29]. Because of its structural properties, ANGPT1 is prone to aggregation and insolubility, which likely complicates high-level expression. Recombinant expression of ANGPT1 has been reported in mammalian systems including COS cells [27] and HEK293 cells [30], in CHO cells [31] and in insect cells (Sf9) using a baculovirus [32].

In this study, we present an improved strategy for the overexpression and purification of soluble VEGF165 and ANGPT1, achieved through optimized expression conditions and co-expression of molecular chaperones. For the first time, we demonstrate the expression and isolation of ANGPT1 in *E. coli*. Recombinant proteins were purified from the cells by metal-affinity chromatography (via an N-terminal His-tag) followed by size-exclusion chromatography. The isolated proteins are suitable for functional studies.

Materials and methods. Reagents used in this study included: BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit and BigDye Xterminator Purification Kit (Applied Biosystems, USA); Q5 Hot Start High-Fidelity DNA polymerase; competent *E. coli* DH5α cells; Gel Loading Dye, Purple (6X) with SDS; restriction enzymes NdeI HF and HindIII HF; recombinant shrimp alkaline phosphatase (rSAP); 1 kb Plus DNA Ladder (NEB, UK); T4 DNA ligase; RNase A; dNTPs; PageRuler Plus protein marker, nitrocellulose membrane (Thermo Scientific, USA); silica gel (Serva, Germany); sodium hydroxide and sodium chloride (Five Oceans, Belarus); ethidium bromide, agarose, acetonitrile, and methanol (Sigma, USA); ampicillin (Sintez, Russia); glycerol, ethanol, guanidine thiocyanate, and sodium dodecyl sulfate (SDS) (Acros Organics, Germany); LB and TB media (Conda, Spain); EDTA (PanReac AppliChem, Germany); isopropanol, hydrochloric acid, and acetic acid (Base No.1 chemical reagents, Russia), isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), the pET-20b(+) expression vector, N,N,N′,N′-tetramethylethylenediamine (TEMED), ammonium persulfate (USB, USA); imidazole and β-mercaptoethanol (Glentham Life Sciences, UK); Tris (tris(hydroxymethyl)aminomethane) (Melford, USA); peptone and tryptone (Conda, Spain); rabbit polyclonal anti-His IgG, goat anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody, and Excellent Chemiluminescent Substrate for western blot detection (Elabscience, USA); PCR products were purified from agarose gels using the NucleoSpin Gel kit (Macherey-Nagel, USA).

Plasmid construction. The coding sequences of VEGF165 and ANGPT1 were amplified from the pCDNA_VEGF165 and pCDNA_ANGPT1 plasmids (constructed previously) [33] by PCR using Q5 polymerase and primers 1–2 (VEGF165) and 3–4 (ANGPT1; presented in the Table), which generated HindIII and NdeI restriction sites. The PCR products were digested, gel-purified using the NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit, and ligated into the pET20b vector at the HindIII and NdeI sites using T4 DNA ligase, thereby introducing an N-terminal His-tag for affinity purification. Ligation products were transformed into *E. coli* DH5α, colonies with the correct insert were screened by PCR. Sequence identity of all constructs was confirmed by Sanger sequencing.

PCR primers

ID	Name	Sequence (5′→3′)
1	VEGF_F	gaggtcatatgATGAATTTTCTGCTCTCATGGGTACATTGGAGCTTG
2	VEGF_R	GTACCAAGCTTCCTCCGGGGCTTG
3	ANGPT_F	gaggtcatatgATGACCGTGTTTCTGAGCTTCGCCTTC
4	ANGPT_R	GTACCAAGCTTGAAATCCAGGGGCCGAATC

Optimization of protein expression. For protein expression two-plasmid *E. coli* strain BL21 (DE3) and Terrific Broth (TB) media supplemented with ampicillin and kanamycin were used. For optimization, culture tubes (5 mL TB) were incubated at 37 °C to an optical density of A_{600} = 0.6 and induced with IPTG (1 mM) and arabinose (4 mg/mL) when needed, then incubated at 22, 26, 30, or 37 °C for 24, 48, or 72 h post-induction. Cells were harvested by centrifugation (3000 x g, 4 °C, 20 min) and suspended in R1 buffer (50 mM sodium phosphate, pH 8.0; 0.3 M NaCl; 0.1 mM PMSF). Suspensions were lysed by sonication and clarified by centrifugation (19000 x g, 4°C, 30 min) to separate soluble protein from inclusion bodies. A 100 µL aliquot of the soluble fraction was desalted, precipitated by addition of EtOH

to 90 %, washed with 70 % EtOH, and pelleted by centrifugation (19 000 g, 4 °C, for 10 min). Pellets were resuspended in 50 μL SDS-loading buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 10 % glycerol; 2 % SDS; 5 % β-mercaptoethanol; 0.125 % bromophenol blue). Inclusion body pellets were washed with 70 % EtOH, centrifuged (19000 x g, 4°C, for 10 min), and solubilized in 100 μL SDS-loading buffer. Protein expression levels were assessed by western blot (WB) using an anti-His antibody.

For scale-up, cultures were grown in 1 L TB with high aeration at 37 °C to A_{600} = 0.6 and induced with 1 mM IPTG (and arabinose where applicable). Cells were harvested and processed as above, lysed using an Emulsiflex C5 homogenizer, and clarified by centrifugation (30000 x g, 4 °C, for 60 min). The resulting supernatant was used for immobilized metal affinity chromatography (IMAC).

Protein purification. VEGF165 and ANGPT1 were purified from the transparent supernatant using IMAC. The purification utilized a HisTrap HP 5 mL column (Cytiva), which was pre-equilibrated in R2 buffer (pH 8.0; 50 mM sodium phosphate, 0.3 M NaCl). Following equilibration, the column was washed with the same 50–75 mL buffer containing 15–75 mM imidazole and subsequently eluted using a gradient of 50–500 mM imidazole, collecting 2 mL fractions. Protein-containing fractions with > 80 % purity were pooled and concentrated using centrifugal concentrators. The resulting concentrated VEGF165 was then additionally purified by size exclusion chromatography (SEC) on Sephadex G75/100 (Cytiva). This step employed R2 buffer for both equilibration and elution, yielding 0.5 mL fractions. After pooling and concentration of the homogeneous fractions, all proteins were dialyzed against a storage buffer (pH 8.0; 50 mM sodium phosphate, 0.1 M NaCl; 50 % glycerol). Final purity and identity were confirmed by SDS-PAGE, WB, and MALDI-TOF mass spectrometry.

SDS-PAGE and blotting. SDS-PAGE and blotting were performed using the Hoefer SE250 vertical electrophoresis system and the Bio-Rad Trans-Blot Turbo Transfer system. Proteins were separated on a 12 % polyacrylamide gel under reducing conditions and transferred to a nitrocellulose membrane at 25 V and 1.3 A for 45 min. After blocking in 5 % skim milk in phosphate-buffered saline (PBS) and washing with PBS containing 0.05 % Tween-20, the membrane was incubated with an anti-His-tag rabbit polyclonal antibody (diluted 1 : 1 000), followed by a goat anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (diluted 1 : 2 500). Proteins were visualized using the Excellent Chemiluminescent Substrate (Elabscience) and imaged with an Azure c300 gel imaging system (Azure Biosystems). The amounts of soluble and pellet proteins were quantified using ImageLab software and compared across different conditions.

Results and discussion. *Optimization of VEGF165 and ANGPT1 expression.* As mentioned before, expression of VEGF165 in *E. coli* is limited by insolubility and aggregation into inclusion bodies [20, 34]. Previous reports describe similar challenges. At the same time, there are no prior reports of ANGPT1 expression in *E. coli*; studies in other expression systems likewise report aggregation and low yields of soluble protein [30, 31]. Low expression levels in *E. coli* frequently result in unfolded or misfolded proteins in the absence of eukaryotic post translational modifications (e.g., glycosylation), difficulties in forming correct disulfide bonds, and accumulation of insoluble protein in inclusion bodies when proteins are overexpressed [35].

To mitigate these limitations, several approaches are employed. Decreasing cultivation temperature and optimizing induction time reduce the rates of transcription, translation, and cell division, thereby providing more time for correct protein folding, decreasing aberrant protein–protein interactions and aggregation, and reducing protease activity [36]. Codon optimization (replacing rare codons with those preferred by the host) is used to improve translational efficiency and yield [35], without such optimization, translation can stall or produce truncated products [36]. Fusion to solubility-enhancing tags (e. g., maltose-binding protein, glutathione S-transferase) is applied to promote folding and increase soluble yield, noting that multiple tags often must be screened to identify the most effective construct [35]. Co-expression with binding partners or molecular chaperones is also employed. Chaperones bind exposed hydrophobic regions of nascent peptides, preventing aggregation and, through iterative ATP-driven conformational cycles, assist substrate folding and refolding [35, 36].

To obtain VEGF165 and ANGPT1 proteins, expression plasmids were constructed using the pET-20b(+) vector encoding each protein with an N-terminal His-tag for affinity purification. All constructs were verified by restriction analysis, PCR, and Sanger sequencing prior to expression testing. At the first stage

of the work, we verified that the expression system (plasmid, promoter, medium, and host strain), which can affect protein expression levels [36], functioned properly by testing expression at 26 °C for 24 h in 5 mL TB medium. Western blot analysis showed that most of the VEGF165 and ANGPT1 proteins were present in inclusion bodies, with only a small fraction soluble, although the total protein yield was high. Based on these results, we focused on optimizing expression conditions and on co-expression with chaperones to preserve the native protein sequences without significant modifications. For optimization, expression was tested at 22, 26, 30, and 37 °C for 24, 48, and 72 h. To increase the amount of soluble protein, we co-expressed the pGro12 (GroEL-GroES) chaperone system, which previously demonstrated promising results for expression of several cytochromes P450 [37, 38].

Under cultivation conditions without co-expression of pGro12 (Fig. 1), *E. coli* produced moderate amounts of soluble protein, with solubility increasing as the cultivation temperature was raised from 22 to 26 °C. Temperatures above 26 °C promoted protein misfolding and aggregation, resulting in pronounced inclusion body formation. Extending incubation from 24 to 72 h increased the soluble fraction only within the 22–26 °C range. At higher temperatures, prolonged incubation exacerbated aggregation and led to near-complete sequestration of the protein into inclusion bodies, as observed at 37 °C.

As shown in Fig. 1, co-expression of VEGF165 with the pGro12 chaperone system substantially increased the proportion of soluble protein and decreased accumulation in inclusion bodies. Raising the cultivation temperature from 22 to 26 °C produced approximately a twofold increase in VEGF165 yield at 24 and 48 h post-induction; however, prolonged expression (72 h) at 26 °C resulted in pronounced protein aggregation despite the high overall yield. By contrast, a 72 h incubation at 22 °C yielded a high proportion of soluble VEGF165, only slightly lower than the peak levels observed at 48 h and 26 °C. Under all tested conditions, co-expression with chaperones at ≥ 30 °C led to substantial insoluble material and poor solubility of the target protein. These results indicate that moderate temperatures (22–26 °C) combined with chaperone co-expression optimize soluble VEGF165 production, whereas higher temperatures and extended incubation promote aggregation and inclusion body formation [22, 23].

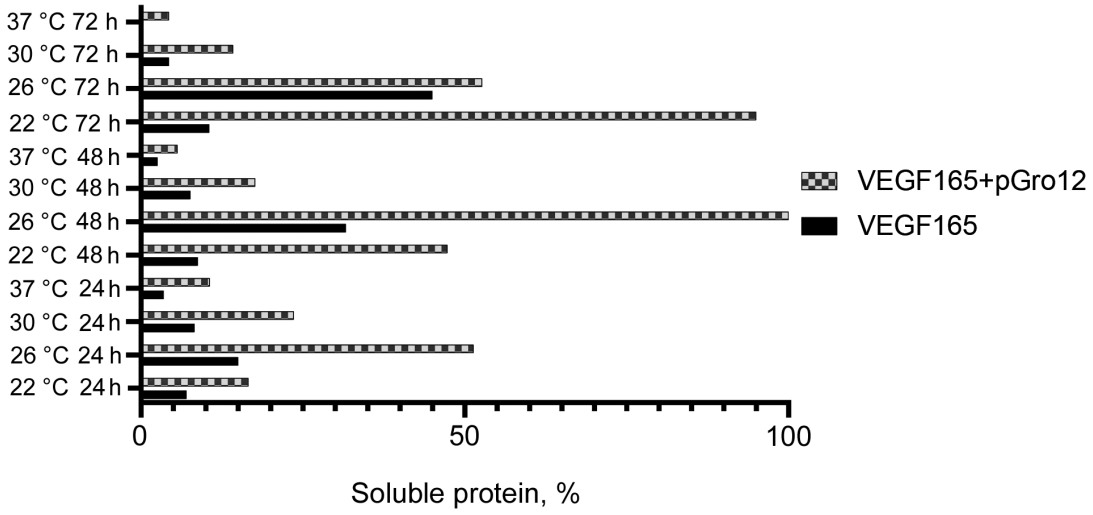


Fig. 1. Western blot analysis showing the percentage of the maximum amount of soluble VEGF165

Expression of ANGPT1 in the absence of chaperone co-expression (Fig. 2) revealed that raising the cultivation temperature from 22 to 30 °C increased the soluble fraction at 24 h, but prolonged incubation at 30 °C and above induced aggregation. Across all tested conditions without chaperones, substantial aggregation and inclusion body formation were observed, severely limiting recoverable soluble protein. Co-expression with the pGro12 chaperone system markedly increased the soluble fraction and reduced inclusion body accumulation. The overall response of soluble ANGPT1 to fermentation parameters paralleled that of VEGF165, with the notable exception that at 30 °C the soluble yield was only ~30 % lower than at 26 °C. The highest soluble yield for ANGPT1 was achieved at 22 °C after 72 h of cultivation.

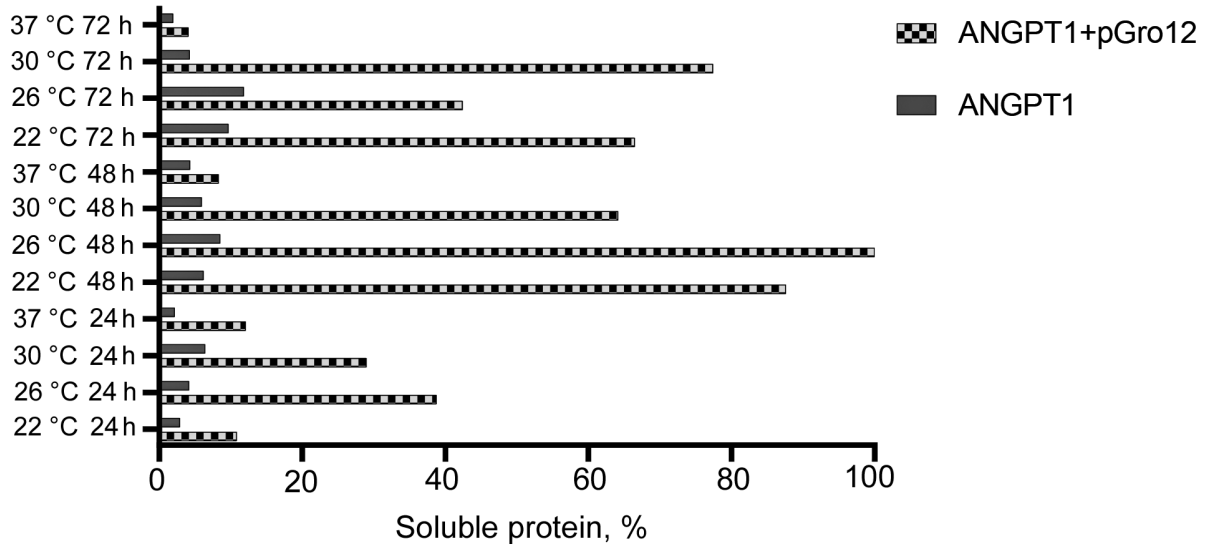


Fig. 2. Western blot analysis showing the percentage of the maximum amount of soluble ANGPT1

Optimal expression parameters were determined as 48 h at 26 °C for VEGF165 and 72 h at 22 °C for ANGPT1. Temperatures above these optima reduced the yield of soluble fraction for both proteins and promoted their partitioning into inclusion bodies, whereas substantially lower temperatures decreased overall expression rates and complicated downstream recovery. Co-expression with the pGro12 chaperone system markedly increased the soluble fraction of both ANGPT1 and VEGF165, consistent with enhanced folding efficiency and reduced aggregation, and therefore represents an effective strategy to improve recoverable yields of correctly folded recombinant protein.

Production of VEGF165 and ANGPT1 in 1 L cultures. Protein expression results obtained at small scale do not always translate directly to larger volumes. Indeed, proteins that are insoluble or poorly expressed on a microscale can sometimes be successfully produced in soluble form when scaled up [35]. To evaluate fermentation under optimized conditions and determine the effect of chaperone co-expression, ANGPT1 and VEGF165 were expressed in 1 L TB cultures. The experiments were conducted at two key conditions: 26 °C for 48 hours (with and without pGro12 co-expression) and 22 °C for 72 hours (with and without pGro12 co-expression). Subsequently, the cells were lysed and prepared for IMAC purification on a 5 mL HisTrap column under identical conditions.

The amounts of VEGF165 recovered after IMAC were 1 mg (26 °C, 48 h, without chaperones), 6 mg (26 °C, 48 h, with pGro12), and 5 mg (22 °C, 72 h with pGro12) from 1 L of culture TB with an estimated purity of ~80% by SDS-PAGE. These results demonstrate a six-fold improvement in the amount of purified VEGF165 achieved by minimizing protein accumulation in inclusion bodies through chaperone co-expression, while maintaining the same level of untargeted proteins. Variation of imidazole concentration (15–75 mM) and wash volume (50–75 mL) had minimal impact on VEGF165 purity or yield. According to the obtained results, the optimal imidazole concentration and wash buffer volume were 50 mM and 50 mL, respectively. Further purification by SEC on Sephadex G75/100 (to remove host cell contaminants of ~70–80 kDa) produced highly purified VEGF165, with a final yield of approximately 4 mg per liter of starting culture and an estimated purity of ~95 % as confirmed by SDS-PAGE and western blot (Fig. 3).

To our knowledge, this is the first report of isolating VEGF165 from *E. coli* with chaperone co-expression, which resulted in a marked increase in soluble protein yield. Previous studies have reported yields of approximately 0.5–1.0 mg of VEGF165 from the soluble fraction [19, 21, 22] and 1–40 mg from inclusion body per 1 L of culture [21, 34, 39]. The refolded protein preparations frequently fail to reproduce the native structure and activity of proteins produced in soluble form, rendering them unsuitable for many downstream applications. Refolding workflows also tend to be low yield: a large fraction of the material can be lost during solubilization, refolding, and subsequent purification steps [40].

ANGPT1 was purified by IMAC using the same protocol as for VEGF165. Yields of ANGPT1 after IMAC were 0.1 mg (26 °C, 48 h, without chaperones), 1.5 mg (26 °C, 48 h, with pGro12 co-expression), and 2 mg (22 °C, 72 h, with pGro12), with an estimated purity of ~95% by SDS-PAGE (Fig. 3). These results confirm that chaperone co-expression is necessary to improve ANGPT1, solubility, and scalable production. Reducing the imidazole concentration in the wash buffer from 50 mM to 35 mM or 25 mM increased co-elution of host proteins and produced only marginal improvements in ANGPT1 recovery, thereby decreasing the overall purity of the preparation. Crucially, increasing the imidazole concentration promoted premature elution of ANGPT1. ANGPT1 has previously been produced in COS, CHO, and Sf9 cells with reported yields ranging from ~0.2 to 200 ng per liter and generally low purity [27, 30–32]. Expression of ANGPT1 in high yield systems such as *E. coli* or yeast has not been described. The single step IMAC procedure reported here is simple, rapid, and bypasses the need for complex denaturation-refolding steps.

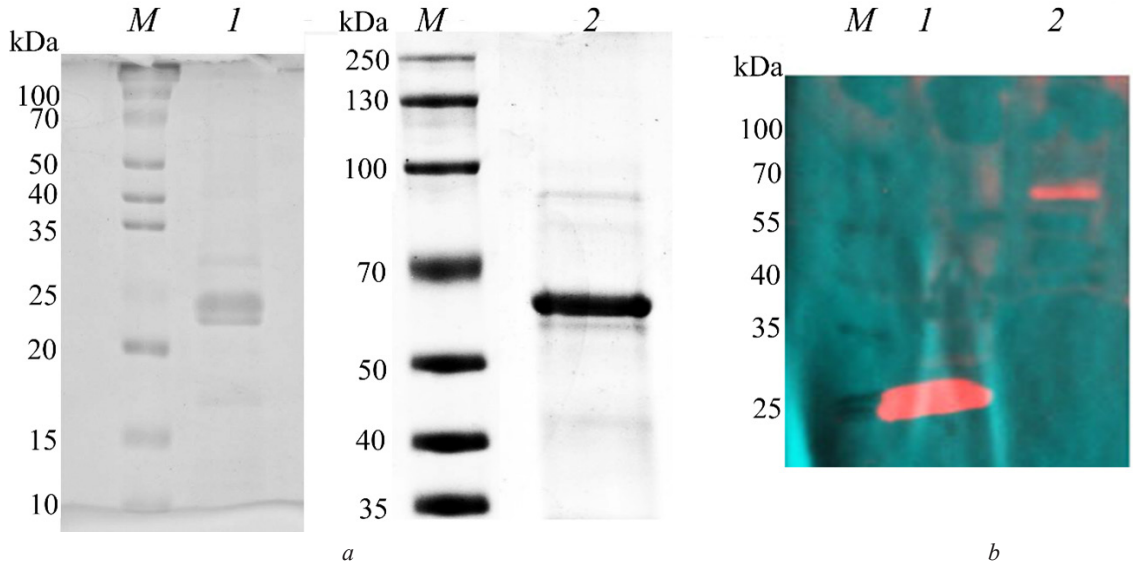


Fig. 3. SDS-PAGE (*a*) and Western blot (*b*) analyses of purified VEGF165 (*1*) and ANGPT1 (*2*). Lanes: M, prestained molecular mass marker

Conclusion. In summary, we developed an advanced expression system for the rapid and scalable production of VEGF165 and ANGPT1 in *E. coli*. This system utilizes co-expression of the pGro12 (GroEL-GroES) chaperone complex alongside a streamlined purification workflow to achieve high-purity protein. By combining lowered induction temperatures with chaperone co-expression, the optimized protocol maximizes soluble product yield and minimizes inclusion body formation, thereby facilitating efficient purification. The recombinant proteins produced using this approach are suitable for research reagents and preclinical applications, including studies of critical limb ischemia, tissue engineering, wound healing, and functional or gene-therapy investigations. However, further process validation (activity assays, endotoxin clearance, and scale-up optimization) is required to confirm suitability for therapeutic use.

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant X2025M-034).

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант X2025M-034).

References

1. Muller Y. A., Li B., Christinger H. W., Wells J. A., Cunningham B. C., de Vos A. M. Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1997, vol. 94, no. 14, pp. 7192–7197. https://doi.org/10.1073/pnas.94.14.7192

2. Kowanetz M., Ferrara N. Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clinical Cancer Research*, 2006, vol. 12, no. 17, pp. 5018–5022. https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-1520

3. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 2001, vol. 280, iss. 6, pp. C1358–C1366. https://doi.org/10.1038/s41580-023-00631-w

4. Pérez Gutiérrez L., Ferrara N. Biology and therapeutic targeting of vascular endothelial growth factor A. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, vol. 24, pp. 816–834. https://doi.org/10.1038/s41580-023-00631-w

5. Bao P., Kodra A., Tomic Canic M., Golinko M. S., Ehrlich H. P., Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *Journal of Surgical Research*, 2009, vol. 153, iss. 2, pp. 347–358. https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023

6. Jiang X., Couchman J. R. Perlecan and tumor angiogenesis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2003, vol. 51, iss. 11, pp. 1393–1410. https://doi.org/10.1177/002215540305101101

7. Keck R. G., Berleau L. T., Harris R. J., Keyt B. A. Disulfide structure of the heparin binding domain in vascular endothelial growth factor: characterization of posttranslational modifications in VEGF. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1997, vol. 344, no. 1, pp. 103–113. https://doi.org/10.1006/abbi.1997.0145

8. de Vries C., Escobedo J. A., Ueno H., Houck K., Ferrara N., Williams L. T. The fms like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science*, 1992, vol. 255, iss. 5047, pp. 989–991. https://doi.org/10.1126/science.1312256

9. Di Stasi R., De Rosa L., D'Andrea L. D. Structure based design of peptides targeting VEGF/VEGFRs. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, vol. 16, no. 6, art. 851. https://doi.org/10.3390/ph16060851

10. Skóra J. P., Antkiewicz M., Kupczyńska D., Kulikowska K., Strzelec B., Janczak D., Barć P. Local intramuscular administration of ANG1 and VEGF genes using plasmid vectors mobilizes CD34+ cells to peripheral tissues and promotes angiogenesis in an animal model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, vol. 143, p. 112186. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112186

11. Shams F., Moravvej H., Hosseinzadeh S., Mostafavi E., Bayat H., Kazemi B., Bandehpour M., Rostami E., Rahimpour A., Moosavian H. Overexpression of VEGF in dermal fibroblast cells accelerates angiogenesis and wound healing: *in vitro* and *in vivo* studies. *Scientific Reports*, 2022, vol. 12, art. 18529. https://doi.org/10.1038/s41598-022-23304-8

12. Augustin M., Mahar M. A. A., Lakkisto P., Tikkanen I., Vento A., Pätilä T., Harjula A. VEGF overexpression improves mesenchymal stem cell sheet transplantation therapy for acute myocardial infarction. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2013, vol. 7, pp. 742–750. https://doi.org/10.1002/term.1471

13. Riedel F., Götte K., Goessler U., Sadick H., Hörmann K. Targeting chemotherapy induced VEGF up regulation by VEGF antisense oligonucleotides in HNSCC cell lines. *Anticancer Research*, 2004, vol. 24, pp. 2179–2183.

14. Tammela T., Enholm B., Alitalo K., Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovascular Research*, 2005, vol. 65, iss. 3, pp. 550–563. https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.12.002

15. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgren E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R., Kabbinavar F. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*, 2004, vol. 350, no. 23, pp. 2335–2342. https://doi.org/10.1056/nejmoa032691

16. Kuduğ Ceylan H., Erden Tayhan S., Gökçe İ. Secretory expression of human vascular endothelial growth factor (VEGF165) in Kluyveromyces lactis and characterization of its biological activity. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 2021, vol. 27, no. 3, pp. 1989–2001. https://doi.org/10.1007/s10989-021-10227-7

17. Kang W. K., Lee M. H., Kim Y. H., Kim M. Y., Kim J. Y. Enhanced secretion of biologically active, non glycosylated VEGF from Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biotechnology*, 2013, vol. 164, no. 4, pp. 441–448. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.02.004

18. Lee G. Y., Jung W. W., Kang C. S., Bang I. S. Expression and characterization of human vascular endothelial growth factor (VEGF165) in insect cells. *Protein Expression and Purification*, 2006, vol. 46, no. 2, pp. 503–509. https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.09.023

19. Nguyen M. T., Krupa M., Koo B. K., Song J. A., Vu T. T. T., Do B. H., Nguyen A. N., Seo T., Yoo J., Jeong B., Jin J., Lee K. J., Oh H. B., Choe H. Prokaryotic soluble overexpression and purification of human VEGF165 by fusion to a maltose binding protein tag. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 5, art. e0156296. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156296

20. Arora N., Masood R., Zheng T., Cai J., Smith D. L., Gill P. S. Vascular endothelial growth factor chimeric toxin is highly active against endothelial cells. *Cancer Research*, 1999, vol. 59, pp. 183–188.

21. Pizarro S. A., Gunson J., Field M. J., Dinges R., Khoo S., Dalal M., Lee M., Kaleas K. A., Moiseff K., Garnick S., Reilly D. E., Laird M. W., Schmelzer C. H. High yield expression of human vascular endothelial growth factor VEGF165 in *Escherichia coli* and purification for therapeutic applications. *Protein Expression and Purification*, 2010, vol. 72, no. 2, pp. 184–193. https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.03.007

22. Kang W., Kim S., Lee S., Jeon E., Lee Y., Yun Y. R., Suh C. K., Kim H. W., Jang J. H. Characterization and optimization of vascular endothelial growth factor165 (rhVEGF165) expression in *Escherichia coli. Protein Expression and Purification*, 2013, vol. 87, no. 2, pp. 55–60. https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.10.004

23. Kim Y. S., Lee H.-J., Han M.-H., Yoon N.-K., Kim Y.-C., Ahn J. Effective production of human growth factors in *Escherichia coli* by fusing with small protein 6HFh8. *Microbial Cell Factories*, 2021, vol. 20, no. 1, p. 9. https://doi.org/10.1186/s12934-020-01502-1

24. Graumann K., Premstaller A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnology Journal*, 2006, vol. 1, no. 2, pp. 164–186. https://doi.org/10.1002/biot.200500051

25. Suri C., Jones P. F., Patan S., Bartunkova S., Maisonpierre P. C., Davis S., Sato T. N., Yancopoulos G. D. Requisite role of angiopoietin 1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 1996, vol. 87, no. 7, pp. 1171–1180. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81813-9

26. Davis S., Aldrich T. H., Jones P. F., Acheson A., Compton D. L., Jain V., Ryan T. E., Bruno J., Radziejewski C., Maisonpierre P. C., Yancopoulos G. D. Isolation of angiopoietin 1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion trap expression cloning. *Cell*, 1996, vol. 87, no. 7, pp. 1161–1169. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81812-7

27. Cho C. H., Kammerer R. A., Lee H. J., Steinmetz M. O., Ryu Y. S., Lee S. H., Yasunaga K., Kim K. T., Kim I., Choi H. H., Kim W., Kim S. H., Park S. K., Lee G. M., Koh G. Y. COMP Ang1: a designed angiopoietin 1 variant with nonleaky angiogenic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2004, vol. 101, no. 15, pp. 5547–5552. https://doi.org/10.1073/pnas.0307574101

28. Bogdan V. G., Doronkina A., Zhavoronok I. P., Lepeshko S. G., Mankovskaya S. V., Yushkevich A. V. Antinociceptive effectiveness of the combined VEGF165–ANG 1 plasmid construction in animals with experimental hind limb ischemia. *Surgery Eastern Europe*, 2024, vol. 13, no. 3, pp. 363–371. https://doi.org/10.34883/pi.2024.13.3.020

29. Brindle N. P., Saharinen P., Alitalo K. Signaling and functions of angiopoietin 1 in vascular protection. *Circulation Research*, 2006, vol. 98, no. 8, pp. 1014–1023. https://doi.org/10.1161/01.res.0000218275.54089.12

30. Kim K.-T., Choi H.-H., Steinmetz M. O., Maco B., Kammerer R. A., Ahn S. Y., Kim H.-Z., Lee G. M., Koh G. Y. Oligomerization and multimerization are critical for angiopoietin 1 to bind and phosphorylate Tie2. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no. 20, pp. 20126–20131. https://doi.org/10.1074/jbc.m500292200

31. Hwang S. J., Kim H. Z., Koh G. Y., Lee G. M. Expression and purification of recombinant human angiopoietin 1 produced in Chinese hamster ovary cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 2007, vol. 43, no. 5–6, pp. 162–167. https://doi.org/10.1007/s11626-007-9037-1

32. Fiedler U., Krissl T., Koidl S., Weiss C., Koblizek T., Deutsch U., Martiny Baron G., Marmé D., Augustin H. G. Angiopoietin 1 and angiopoietin 2 share the same binding domains in the Tie 2 receptor involving the first Ig like loop and the EGF like repeats. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 3, pp. 1721–1727. https://doi.org/10.1074/jbc.m208550200

33. Sachanka A. B., Popicheva E. A., Shchur V. V., Usanov S. A., Yantsevich A. V. Construction of a complex stimulator of angiogenesis based on the fusion protein ANGPT1_VEGF165. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2026, vol. 62, no. 1, pp. 57–70 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-1-57-70

34. Taktak Ben Amar A., Morjen M., Ben Mabrouk H., Abdelmaksoud Dammak R., Guerfali M., Fourati Masmoudi N., Marrakchi N., Gargouri A. Expression, purification and functionality of bioactive recombinant human vascular endothelial growth factor VEGF165 in *E. coli*. *AMB Express*, 2017, vol. 7, no. 1, art. 33. https://doi.org/10.1186/s13568-016-0300-2

35. Francis D. M., Page R. Strategies to optimize protein expression in *E. coli*. *Current Protocols in Protein Science*, 2010, vol. 61, pp. 5.24.1–5.24.29. https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0524s61

36. Khow O., Suntrarachun S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression systems. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2012, vol. 2, no. 2, pp. 159–162. https://doi.org/10.1016/s2221-1691(11)60213-x

37. Yantsevich A. V., Dichenko Y. V., MacKenzie F., Mukha D. V., Baranovsky A. V., Gilep A. A., Usanov S. A., Strushkevich N. V. Human steroid and oxysterol 7α hydroxylase CYP7B1: substrate specificity, azole binding and misfolding of clinically relevant mutants. *Biochemical Journal*, 2014, vol. 281, no. 6, pp. 1700–1713. https://doi.org/10.1111/febs.12733

38. Shaladonova M. I., Dzichenka Y. U., Shchur V. V., Sachanka A. B., Usanov S. A. Codon harmonization to improve heterologous expression of human aromatase (CYP19A1) in *E. coli* cells. *Protein Expression and Purification*, 2026, vol. 239, p. 106864. https://doi.org/10.1016/j.pep.2025.106864

39. Lee I. L., Li P.-S., Yu W.-L., Shen H.-H. Prokaryotic expression, refolding, and purification of functional human vascular endothelial growth factor isoform 165: purification procedures and refolding conditions revisited. *Protein Expression and Purification*, 2011, vol. 76, no. 1, pp. 54–58. https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.08.014

40. Chen Y., Leong S. S. Adsorptive refolding of a highly disulfide bonded inclusion body protein using anion exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216, no. 24, pp. 4877–4886. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.043

Информация об авторах

Саченко Антон Борисович – научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: antosuk@yandex.ru

Попичева Екатерина Александровна – аспирант. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: ekaterinapopicheva@mail.ru

Янцевич Алексей Викторович – кандидат химических наук, директор Института. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: aleks.yantsevich@gmail.com

Information about the authors

Sachanka Antos B. – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: antosuk@yandex.ru

Popicheva Ekaterina Aleksandrovna – Postgraduate Student. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ekaterinapopicheva@mail.ru

Yantsevich Aliaksei V. – Ph. D. (Chemistry), Director of the Institute. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: aleks.yantsevich@gmail.com

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 51-76:615.277.3:004.94
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-309-322

Поступила в редакцию 11.08.2026
Received 11.08.2026

П. А. Хорн[1], Д. А. Федотов[1], А. Н. Хныкин[1], А. А. Анучина[1], Е. В. Малышева[2], Н. С. Ильинский[1], И. С. Охрименко[1], А. В. Павлов[1], В. В. Павлов[1], М. В. Колесник[3], А. О. Демкина[3], И. Д. Рубинштейн[1], А. Х. Талдаев[1], А. В. Мишин[1], В. И. Борщевский[1]

[1]Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия
[2]Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия
[3]Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

ПРЕДСКАЗАНИЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВЫХ ПРИРОДНЫХ РОДОПСИНОВ ДЛЯ ПОИСКА ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ОПТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИНСТРУМЕНТОВ

Аннотация. Микробные родопсины представляют собой ретиналь-содержащие мембранные белки, преобразующие энергию света в ионный транспорт или внутриклеточные сигналы и применяемые в качестве инструментов оптогенетики. Поиск новых родопсинов в метагеномах природных образцах может расширить набор таких инструментов. Целью данной работы было выявить новые родопсины в метагеномах природных образцов из гиперсоленого оз. Эбейты (Омская обл., Россия) и оценить их предполагаемую принадлежность и спектральные свойства. После культивирования микроорганизмов провели полногеномное секвенирование, сборку и аннотацию метагеномов, поиск родопсиноподобных последовательностей и филогенетический анализ. Пространственные модели трех отобранных белков с ретиналем получили с помощью AlphaFold3. Для исследования ретиналь-связывающих карманов использовали полноатомную молекулярную динамику в мембранном окружении. Максимум поглощения одного из родопсинов оценивали методом QM/MM с учетом ближайших аминокислотных остатков и молекул воды. Три изучаемые белковые последовательности удалось отнести к сенсорным родопсинам I типа. Для одного белка расчетное положение максимума поглощения составило 576 нм; при рассмотрении различных ориентаций протонов карбоксильных групп получен диапазон 545–590 нм. Объединение метагеномного анализа, филогенетики, структурного моделирования, молекулярной динамики и QM/MM-расчетов позволило провести предварительную компьютерную характеристику новых родопсинов. Исследованные белки представляют собой перспективные кандидаты для последующей экспериментальной проверки и оценки их пригодности для оптогенетики.

Ключевые слова: квантово-механические расчеты, молекулярная динамика, новые природные родопсины, метагеномы, оптогенетика

Для цитирования. Предсказание фотохимических свойств новых природных родопсинов для поиска потенциальных оптогенетических инструментов / П. А. Хорн, Д. А. Федотов, А. Н. Хныкин [и др.] // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2026. – Т. 62, № 4. – С. 309–322. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-309-322

P. A. Khorn[1], D. A. Fedotov[1], A. N. Khnykin[1], A. A. Anuchina[1], E. V. Malysheva[2], N. S. Ilyinsky[1], I. S. Okhrimenko[1], A. V. Pavlov[1], V. V. Pavlov[1], M. V. Kolesnik[3], A. O. Demkina[3], I. D. Rubinshteyn[1], A. Taldaev[1], A. V. Mishin[1], V. I. Borshchevskiy[1]

[1]Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia
[2]I. M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russia
[3]Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

PREDICTING RHODOPSIN PHOTOCHEMISTRY TO BIOPROSPECT NEW OPTOGENETIC TOOLS

Abstract. Microbial rhodopsins are retinal-containing membrane proteins that convert light energy into ion transport or intracellular signals and are used as optogenetic tools. The discovery of novel rhodopsins in metagenomes derived from natural samples may expand the repertoire of such tools. The aim of this study was to identify novel rhodopsins in metagenomes obtained from natural samples collected from hypersaline Lake Ebeyty (Omsk Region, Russia) and to assess their predicted classification and spectral properties. Following microbial cultivation, we performed whole-genome sequencing, metagenome assembly and annotation, rhodopsin-like sequence screening, and phylogenetic analysis. Structural models of three selected proteins in complex with retinal were generated using AlphaFold3. All-atom molecular dynamics simulations in a membrane environment were used to investigate their retinal-binding pockets. The absorption maximum of one rhodopsin was estimated using a quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM) approach that accounted for the

nearest amino acid residues and water molecules. The three protein sequences were assigned to the sensory rhodopsin I group. For one protein, the predicted absorption maximum was 576 nm; when different proton orientations of the carboxyl groups were considered, the calculated values ranged from 545 to 590 nm. The integration of metagenomic analysis, phylogenetics, structural modeling, molecular dynamics simulations, and QM/MM calculations enabled the preliminary in silico characterization of novel rhodopsins. The proteins investigated represent promising candidates for subsequent experimental validation and assessment of their suitability for optogenetic applications.

Keywords: QM/MM, long-scale MM, new rhodopsins, bioprospecting, optogenetics

For citation. Khorn A. P., Fedotov D. A., Khnykin A. N., Anuchina A. A., Malysheva E. V., Ilyinsky N. S., Okhrimenko I. S., Pavlov A. V., Pavlov V. V., Kolesnik M. V., Demkina A. O., Rubinshteyn I. D., Taldaev A., Mishin A. V., Borshchevskiy V. I. Predicting rhodopsin photochemistry to bioprospect new optogenetic tools. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2026, vol. 62, no. 4, pp. 309–322 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-309-322

Введение. Оптогенетика представляет собой быстроразвивающуюся биотехнологическую область, развитие которой зависит от появления новых инструментов. К ним относятся микробные родопсины – мембранные белки, поглощающие свет с использованием кофактора ретиналя и преобразующие сигнал в ионные токи и другие клеточные ответы [1]. Родопсины применяются в оптогенетике для точного контроля активности нейронов и органелл.

Поиск новых оптогенетических инструментов может осуществляться по-разному: с помощью мутагенеза существующих родопсинов для придания им желаемых свойств (например, сдвиг спектров поглощения или изменение ионной селективности посредством сайт-направленного мутагенеза) или поиска природных потенциальных инструментов в метагеномных последовательностях [2]. Второй подход обладает преимуществами, однако достаточно трудоемкий и длительный. Для упрощения этого процесса на этапе оценки потенциальной значимости вновь выявленных структур применяют методы молекулярного моделирования и квантовые расчеты, с помощью которых предсказывают характерные спектры поглощения родопсинов.

Для предсказания положения максимума поглощения новых родопсинов использовался гибридный метод, который сочетает преимущества квантовой (QM) и молекулярной (MM) механики для изучения сложных молекулярных систем – QM/MM [3]. С помощью его дана оценка фотохимическим свойствам родопсинов. При этом высокоточная QM использовалась для описания состояния хромофора (ретиналя) и его непосредственного окружения (основание Шиффа, координирующие аминокислотные остатки в кармане связывания), а высокоэффективная MM – для описания состояния остальной части белка. В ходе междисциплинарного исследования трех новых родопсинов, обнаруженных в галофильных микроорганизмах, культивированных из проб, собранных в гиперсоленом оз. Эбейты (Омская обл., Россия), после этапов сбора проб и получения накопительной культуры на их основе выделена метагеномная ДНК и выполнено высокопроизводительное секвенирование. После сборки геномов из метагеномов были определены последовательности, кодирующие белки, гомологичные микробным родопсинам. Филогенетический анализ полученных последовательностей белков выявил наиболее дивергентные и относящиеся к сенсорным родопсинам I типа. С помощью инструментов AlphaFold3 и длительного молекулярного моделирования получены пространственные структуры исследуемых белков, содержащие кофактор и молекулы воды. На основе результатов моделирования проведена геометрическая оптимизация структур и вычислена энергия возбуждения ретиналя. Предполагается, что исследованные родопсины обладают потенциалом в качестве оптогенетических инструментов.

Материалы и методы исследования. *Отбор проб и обогащающее культивирование.* Природные образцы (вода и донные отложения) собирали на оз. Эбейты (Омская обл.) в августе 2024 г., транспортировали в лабораторию при комнатной температуре. Для приготовления накопительных культур объемом 50 мл 23 % MGM-среды инокулировали 0,5 мл отобранной воды и инкубировали при 42 °C в шейкере на протяжении 7 дней. Клетки осаждали центрифугированием (6 000 g, 4 °C) в течение 30 мин для последующего выделения ДНК.

Выделение ДНК и высокопроизводительное секвенирование. Выделение ДНК проводили с использованием набора Dneasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen) в соответствии с рекомендациями производителя. Библиотеки для полногеномного секвенирования (WGS) готовили из 500 нг высокомолекулярной ДНК с использованием набора MGI Easy PCR-Free Library Prep Set (MGI Tech). Ферментативную фрагментацию проводили в соответствии с протоколом производителя с после-

дующей селекцией фрагментов длиной 400–450 п. н. С помощью предоставленных в наборе магнитных частиц DNA Clean Beads. Концентрацию полученных библиотек измеряли с использованием системы Qubit Flex (Life Technologies) и набора dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen). Качество приготовленных библиотек оценивали с помощью системы 4200 TapeStation System с набором High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay (Agilent). Далее ДНК-библиотеки объединяли в пулы и секвенировали на платформе DNBSEQ-G400 в парноконцевом режиме 2 × 150 п. н. Файлы в формате FastQ получали с использованием программного обеспечения zebracallV2 (MGI Tech).

Сборка метагеномов, аннотация, поиск целевых последовательностей. Полученные данные (метагеномные библиотеки) в формате FastQ после контроля качества прочтений собирали с помощью metaSPAdes 4.2.0 [4]. Открытые рамки считывания (ORF) на собранных метагеномных скаффолдах аннотировали в Prokka 1.14.6 в метагеномном режиме (--metagenome) [5]. Предсказанные аминокислотные последовательности всех пяти сборок объединили в единый набор. Для схлопывания избыточных дубликатов репрезентативные белки кластеризовали Mmseqs2 (easy-cluster, пороги идентичности 0,8 и покрытия 0,9) [6]. По репрезентативным последовательностям кластеров проводили два независимых скрининга: BLAST (blastp, порог E-value 1×10^{-3}) против набора референсных последовательностей родопсинов, и HMMER3 (hmmsearch) [7] с профилями домена PF01036 (бактериородопсин-подобный белок) [8] и специализированными HMM-профилями (7TM, 8TM, HeR). Последовательности, прошедшие хотя бы один из критериев, рассматривали как кандидаты на микробные родопсины для последующего анализа.

Филогенетический анализ новых родопсинов. Учитывая среднюю длину домена микробных родопсинов – около 250 аминокислотных остатков – для дальнейшего анализа отбирали последовательности с длиной > 200 аминокислотных остатков. Финальный набор состоял из 33 аминокислотных последовательностей. Для составления референсного набора взяли 52 последовательности экспериментально охарактеризованных родопсинов с аннотированным доменом PF01036 (бактериородопсин-подобный белок) и/или полученной структурой. Последовательности доменов выделяли с помощью HMMER3. Полученные 40 последовательностей доменов были добавлены к набору из 33 целевых последовательностей. Множественное выравнивание выполняли в программе MUSCLE (v. 5.15.2). Филогенетическое дерево строили с помощью инструмента FastTree (v. 2.1), визуализацию проводили с помощью программы Figtree (v. 1.4.4).

Молекулярное моделирование воды в активный центр новых родопсинов. В качестве стартовых структур использовали модели трех исследуемых родопсинов в комплексе с ковалентно связанным ретиналем, предсказанные с использованием AlphaFold3 [9]. В каждой модели ретиналь располагался в ретиналь-связывающем кармане и был сцеплен с консервативным остатком лизина через протонированное основание Шиффа. Состояния протонирования ионизируемых аминокислотных остатков определяли с использованием PROPKA3 [10]. Эти белок-хромофорные комплексы использовали в качестве исходных структур для подготовки мембранных систем.

Сборку систем проводили с использованием CHARMM-GUI Membrane Builder [11]. Каждый родопсин встраивали в смешанный липидный бислой POPE/POPG, сольватировали водой модели TIP3P и нейтрализовали ионами Na^+/Cl^-. Для всех трех систем использовали расчетную ячейку одинакового размера, составляющую около $100 \times 100 \times 140$ Å^3. Для ретиналя адаптировали CHARMM-совместимые параметры протонированного ретиналевого основания Шиффа, опубликованные в работе S. Zhu, M. F. Brown, S. E. Feller [12].

Подготовленные системы минимизировали методом наискорейшего спуска, после чего проводили многостадийное уравновешивание с позиционными ограничениями на белок, ретиналь и липиды. В ходе уравновешивания ограничения постепенно ослабляли, обеспечивая релаксацию мембраны, растворителя и боковых цепей белка при сохранении исходной геометрии активного центра. Молекулярно-динамическое моделирование проводили в GROMACS [13] с использованием силового поля CHARMM36m [14] и периодических граничных условий. Температуру поддерживали на уровне 303,15 K с помощью термостата V-rescale, давление – на уровне 1 бар с использованием баростата C-rescale. Связь с давлением осуществляли в полуизотропном режиме: размеры расчетной ячейки в плоскости мембраны масштабировались совместно, а размер вдоль нормали к мембране изменялся независимо. Дальнодействующие электростатические вза-

имодействия рассчитывали методом PME, а связи с участием атомов водорода фиксировали алгоритмом LINCS. После уравновешивания для каждой системы проводили основной этап продуктивного МД-моделирования продолжительностью 500 нс с шагом интегрирования 2 фс.

Полученные траектории анализировали для определения положения молекул воды в ретиналь-связывающем кармане, в том числе вблизи протонированного основания Шиффа, ретиналя и полярных аминокислотных остатков активного центра.

QM/MM моделирование. Оценку максимума поглощения новых родопсинов проводили на основе последнего кадра из траектории молекулярной динамики родопсина 1. Структура белка была оптимизирована с использованием гибридного квантово-механического/молекулярно-механического метода (QM/MM). Все QM/MM расчеты проводили с использованием электростатической схемы [15, 16]. Оптимизацию геометрии выполняли с помощью алгоритма L-BFGS [17] в вычислительном пакете Orca v6.1.0 [18] в два этапа. На первом этапе QM-часть оптимизировали с помощью полуэмпирического метода GFN2-xTB [19]. На втором этапе QM-часть переоптимизировали с помощью метода B3LYP [21] с применением cc-pVDZ [20]. В обоих случаях учитывали дисперсионную поправку Гримме (D3BJ) [22]. На всех этапах структурной оптимизации применяли приближение разрешения тождества (RI) [23] со вспомогательным базисным набором, соответствующим атомному. MM-часть описывали с помощью силового поля AMBER FF14SB [24]. QM-часть включала: ретинальный хромофор (RET213), боковые цепи аминокислотных остатков Asp113, Asp83, Tyr59, Asp209, Tyr182, а также молекулы воды WAT670, WAT339, WAT598, WAT1282 и WAT863. Граница между QM- и MM-областями проходила по ковалентной связи Cε–Cδ для хромофора RET213 и по связям Cα–Cβ для аминокислот. MM-часть включала атомы белка и молекул воды, не входящие в QM-область, и подразделялась на подвижную и неподвижную части. Подвижная часть включала атомы белка, находящиеся в радиусе 5 Å от атомов QM-области. Оставшаяся часть белка оставалась неподвижной в процессе оптимизации. Полученные оптимизированные структуры использовали для расчета вертикальных энергий возбуждения. QM-часть была описана с помощью метода алгебраической диаграмматической схемы второго порядка (ADC(2)), в то время как точечные заряды MM-окружения генерировали с помощью силового поля AMBER FF14SB. Вычисления производили в пакете «Турбомоль» (Turbomole) [25]. При расчете возбужденных энергий применяли приближение замороженного ядра (Frozen Core Approximation) [26].

Результаты и их обсуждение. *Филогенетический анализ новых родопсинов.* Филогенетическое дерево родопсин-подобных белков представлено на рис. 1. Последовательности, полученные в результате секвенирования, кластеризуются с известными родопсинами каждой из шести групп: сенсорные родопсины I типа (SRI), сенсорные родопсины II типа (SRII), бактериородопсины (BR), галородопсины (HR), гелиородопсины (HeR), протеородопсины (PR). SRI и SRII формируют две отдельные клады на дереве с максимальной близостью к бактериородопсинам, что согласуется с литературными данными [27]. Три образца (1, 2, 3), расположенные в кластере сенсорных родопсинов I типа, были выбраны для дальнейшего анализа, так как представители этой группы наименее изучены и в настоящее время не имеют экспериментально полученных структур.

Пакет связывания ретиналя в родопсинах. Известно, что заряженные аминокислотные остатки вблизи основания Шиффа (консервативный остаток Lys), с которым ковалентно связан ретиналь, способны оказывать влияние на сдвиг спектра поглощения родопсина и опосредуют функцию, которую выполняет белок [28]. Для того чтобы выявить заряженные аминокислотные остатки, способные оказывать сдвиг спектра поглощения у отобранных в этом исследовании новых родопсинов (1, 2, 3), проанализированы карманы связывания ретиналя у различных клад родопсинов. Для этого использовали кристаллографические структуры с высоким разрешением, приведенные в PDB (Protein Data Bank, с англ. банк данных трехмерных структур белков) (рис. 2).

У бактериородопсина карман связывания отличается компактностью, высокой степенью гидрофобной упаковки и жесткой фиксацией молекулы ретиналя; спектральную настройку здесь существенно определяют остатки Asp85, Asp212, Tyr185, формирующие ионную и водородно-связанную среду вокруг основания Шиффа и влияющие на положение максимума поглощения. Сенсорный родопсин II типа характеризуется большей пластичностью активного центра –

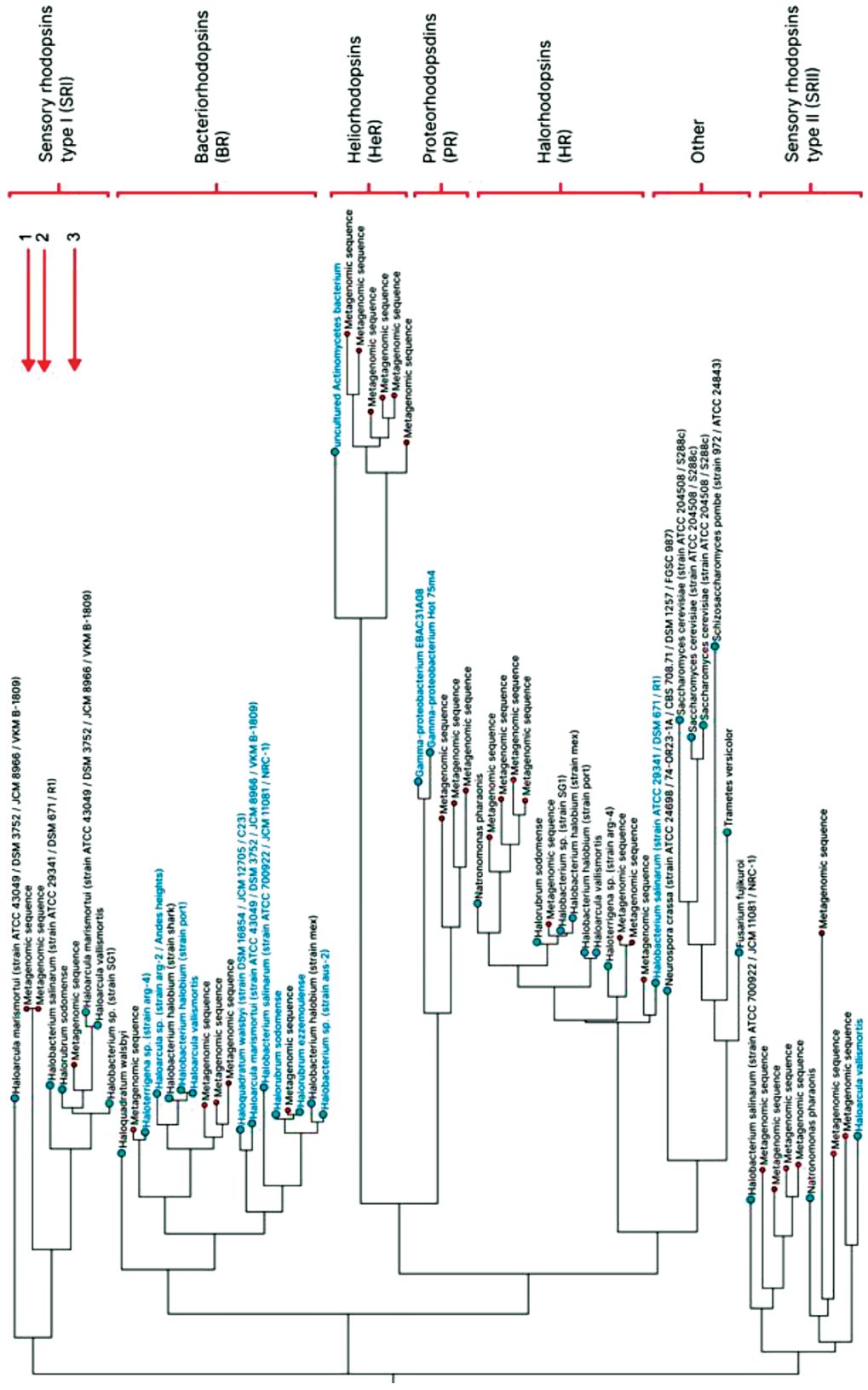


Рис. 1. Филогенетическое дерево родопсин-подобных белков с нанесенными на него целевыми последовательностями (три отобранные для анализа последовательности обозначены стрелками (1, 2, 3); для каждой последовательности указаны видовые названия, синим цветом выделены названия последовательностей с разрешенной структурой; полученные в результате секвенирования последовательности отмечены красными кружками и подписаны «Metagenomic sequence»)

Fig. 1. Phylogenetic tree of rhodopsin-like proteins with mapped target sequences (arrows (1, 2, 3) indicate the three sequences selected for analysis; species names are shown for each sequence; domains with resolved structures are highlighted in blue; sequencing results are marked with red circles and labeled as «Metagenomic sequence»)

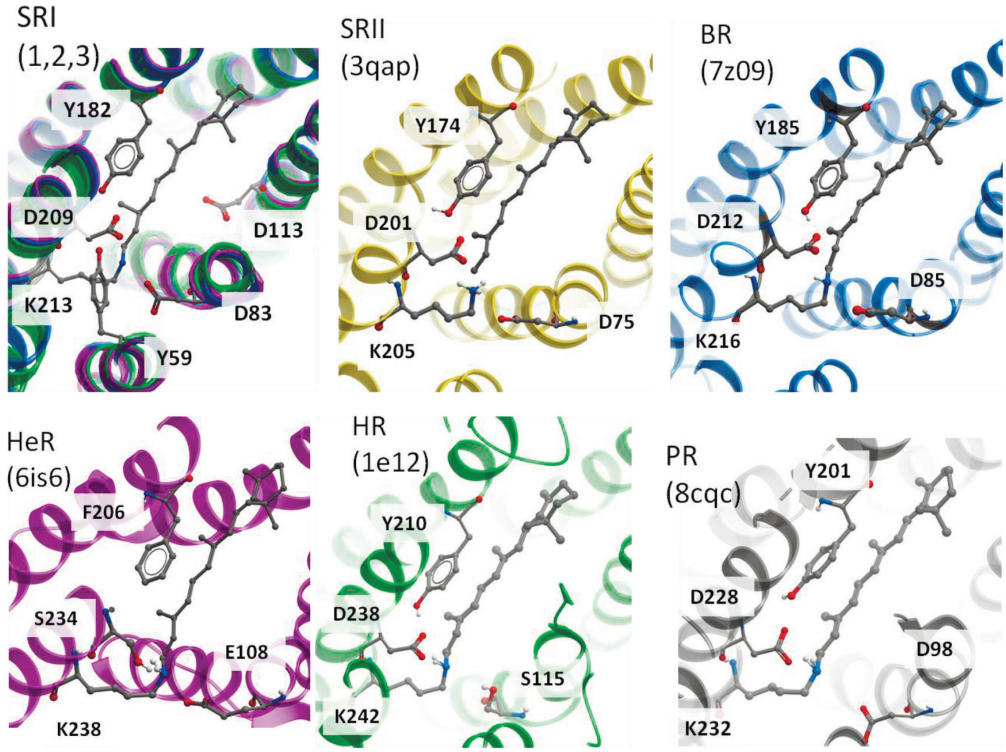


Рис. 2. Карманы связывания ретиналя различных кладов родопсинов (все структуры пространственно совмещены в одной системе координат с помощью функции SuperImpose программного пакета Molsoft MolBrowser 3.9 и представлены отдельно, кроме структур новых родопсинов, которые показаны в совмещенном виде; структуры новых родопсинов предсказаны с помощью AlphaFold3, для остальных клад родопсинов использованы известные структуры из PDB с хорошим разрешением: BR (бактериородопсин) – 7Z09, SRII (сенсорный родопсин II типа) – 3QAP, HeR (гелиородопсин) – 6IS6, PR (протеородопсин) – 8CQC, HR (галородопсин) – 1E12; в пакете связывания ретиналя отмечены ключевые аминокислотные остатки)

Fig. 2. Retinal-binding pockets of different rhodopsin clades (all structures were spatially superimposed in a single coordinate system using the SuperImpose function of the Molsoft MolBrowser 3.9 software package and are shown separately, except for the structures of the new rhodopsins, which are presented in a superimposed view; the structures of the new rhodopsins were predicted using AlphaFold3; for the remaining rhodopsin clades, previously known high-resolution structures from the PDB were used: BR (bacteriorhodopsin) – 7Z09, SRII (sensory rhodopsin II) – 3QAP, HeR (heliorhodopsin) – 6IS6, PR (proteorhodopsin) – 8CQC, HR (halorhodopsin) – 1E12; key amino acid residues in the retinal-binding pocket are highlighted)

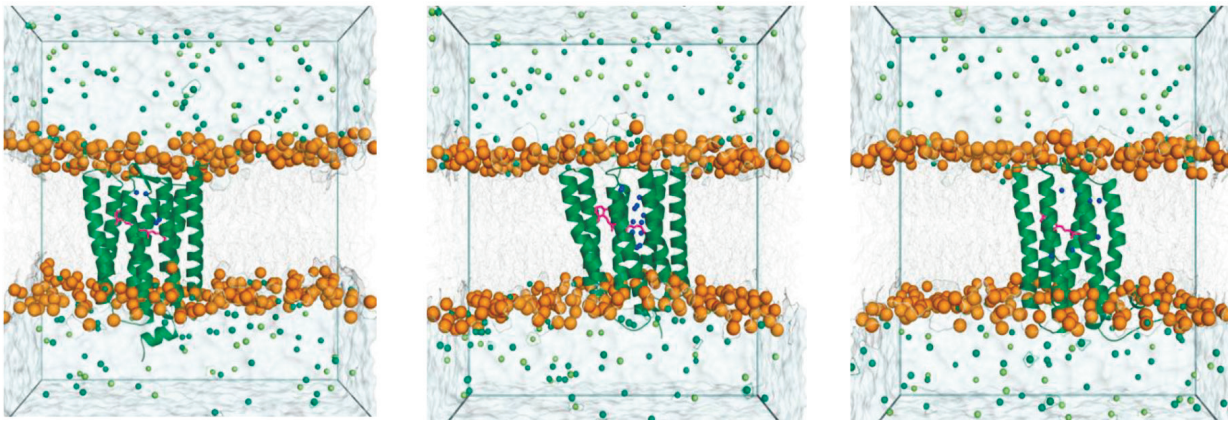
даже минимальные конформационные сдвиги боковых цепей вблизи хромофора приводят к существенной модификации спектральной чувствительности и эффективности передачи сигнала на партнерные трансдукционные системы [28]. Важную роль играет набор полярных позиций в области хромофора, включая Asp201, который модулирует спектральные свойства через изменение локальной электростатики и сети водных молекул. Стоит отметить, что у исследуемых в данной работе родопсинов, определенных как сенсорные I типа, в кармане связывания ретиналя присутствует дополнительный аминокислотный остаток Asp113, значение которого для данной клады родопсинов пока не установлено. Гелиородопсины демонстрируют иные архитектурные особенности кармана, включая вариации в расположении ключевых полярных остатков, таких как Gln108 и Ser234, которые участвуют в стабилизации хромофорного центра и определяют уникальные спектральные характеристики этого семейства. Для галородопсинов характерна повышенная поляризация микроокружения основания Шиффа; спектральную настройку здесь определяют, например, Ser115, Asp85-эквивалентная позиция BR и другие остатки, участвующие в стабилизации анион-связанного состояния и смещении спектра в область более длинных волн. Протеородопсины, сохраняя общий для семейства микробных родопсинов принцип организации хромофор-связывающего центра, демонстрируют вариабельность в архитектуре водородно-

связанной сети и в составе остатков, определяющих pK_a основания Шиффа; для них спектральные особенности часто связаны с заменами в позициях, гомологичных Asp85, Asp212 и Tyr185 BR [28].

Таким образом, для изучения новых родопсинов нужно отмечать различия в геометрии полости, локальной электростатике и наборе конкретных аминокислотных остатков, формирующих хромофорный центр.

Молекулярное моделирование новых родопсинов (МД). Для трех выбранных родопсинов с помощью AlphaFold3 были получены пространственные модели с ковалентно связанным ретиналем. Перед проведением молекулярной динамики протонирование аминокислотных остатков уточняли с использованием PROPKA3 [10]. Такие модели задают положение белка и хромофора, однако не позволяют определить, как в области активного центра будут располагаться молекулы воды. Между тем именно ближайшее окружение протонированного основания Шиффа важно для дальнейшего расчета спектральных свойств белка.

В связи с этим родопсины моделировали в явном мембранном и водно-солевом окружении, не задавая заранее положения воды в кармане. В ходе МД молекулы воды самостоятельно проникали в область хромофора и занимали положение рядом с ретиналем, основанием Шиффа и полярными остатками белка (рис. 3). Таким образом были получены релаксированные конформации активного центра, включающие как белок и ретиналь, так и сформированное в процессе моделирования водное окружение. Подготовленную структуру родопсина 1 далее использовали для геометрической оптимизации и QM/MM-расчетов энергии электронного возбуждения ретиналя.



a *b* *c*

Рис. 3. Репрезентативные структуры исследуемых родопсинов после основного этапа полноатомного МД-моделирования в мембранном окружении: *a* – родопсин 1, *b* – родопсин 2, *c* – родопсин 3 (белок показан зеленым цветом, ретиналь в ретиналь-связывающем кармане – розовым, липидный бислой POPE/POPG – серым с выделенными оранжевым фосфатными группами; водно-солевое окружение – полупрозрачная голубая поверхность; молекулы воды, расположенные вблизи ретиналь-связывающего кармана, – синие сферы; зеленые сферы – ионы Na^+ и Cl^-; голубая рамка – границы расчетной ячейки)

Fig. 3. Representative structures of the rhodopsins under study following the main stage of all-atom MD simulation in a mem-brane environment: *a* – rhodopsin 1, *b* – rhodopsin 2, *c* – rhodopsin 3 (protein – green; retinal in the retinal-binding pocket – pink; POPE/POPG lipid bilayer – gray with phosphate groups highlighted in orange; aqueous-saline environment – semi-transparent blue surface; water molecules located near the retinal-binding pocket – blue spheres; green spheres – Na^+ and Cl^- ions; blue frame – boundaries of the simulation box)

Оценка фотоабсорбции новых родопсинов. Принимая во внимание то, что спектральные характеристики родопсинов в значительной мере зависят от аминокислотного состава пакета связывания ретиналя [29], проведен детальный сравнительный анализ аминокислотного состава вблизи молекулы хромофора для трех новых родопсинов (рис. 4). Аминокислотный состав всех трех родопсинов демонстрирует значительную консервативность. Родопсин 1 и родопсин 2 обладают почти идентичным аминокислотным составом пакета связывания, в то время как аминокислотный состав родопсина 3 отличается в четырех позициях (F205, F142, F116, M91 –

нумерация приведена для родопсина 1). Все отличающиеся аминокислоты находятся на значительном удалении от молекулы ретиналя (4 Å и более), что характеризует их влияние на фотохимические свойства белка как малозначительные. Примечательно, что все три родопсина обладают тремя титрируемыми аминокислотными остатками вблизи хромофора в одинаковых позициях (D83, D113 и D209 – нумерация приведена для родопсина 1). Высокая консервативность сайта связывания в трех новых родопсинах с высокой долей вероятности указывает на сходные фотохимические свойства всех трех родопсинов. На основе проведенного анализа было принято решение оценить спектроскопические характеристики новых родопсинов на примере родопсина 1.

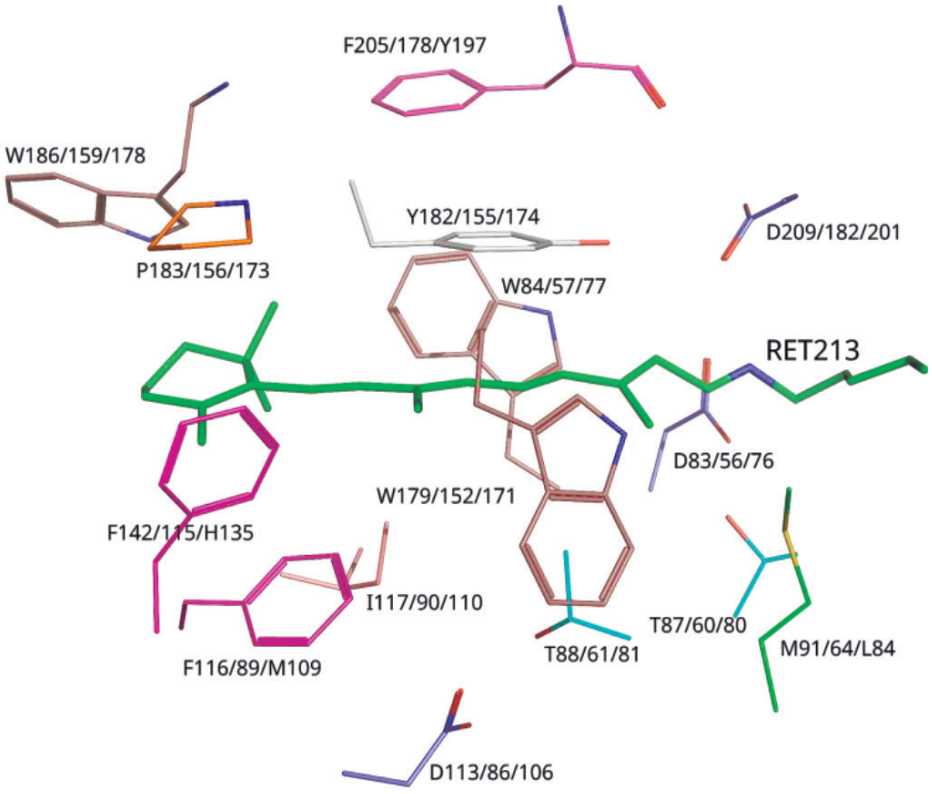
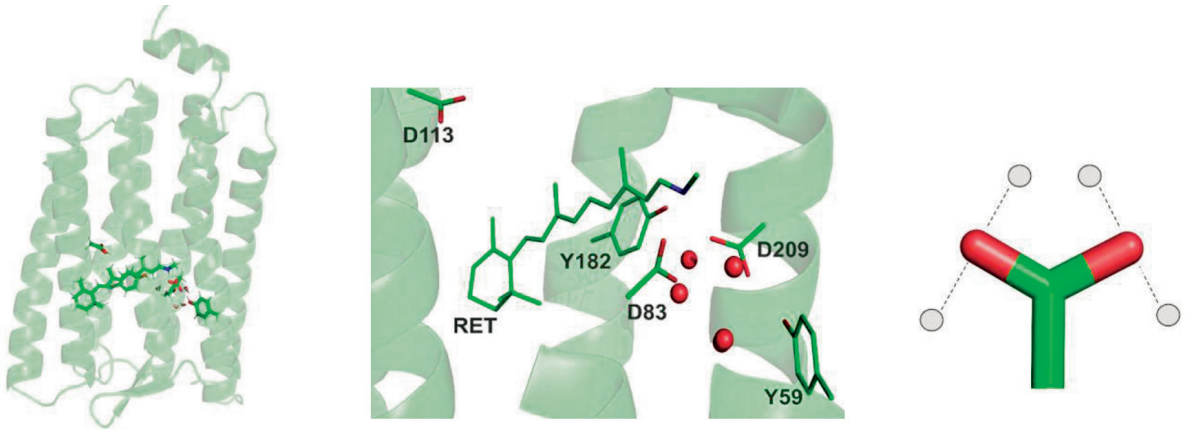


Рис. 4. Сравнение состава пакета связывания трех новых родопсинов, структуры которых были получены с помощью AlphaFold3 (первый индекс аминокислотного остатка относится к родопсину 1, второй – к родопсину 2, третий – к родопсину 3; пакет связывания демонстрирует значительную консервативность у всех трех новых родопсинов)

Fig. 4. Comparison of the binding pocket composition in three novel rhodopsins, the structures of which were predicted using AlphaFold3 (the first residue index corresponds to rhodopsin 1, the second to rhodopsin 2, and the third to rhodopsin 3; the binding pocket exhibits a high degree of conservation across all three rhodopsins)

Оценка максимума абсорбции новых родопсинов. Для оценки фотохимических свойств родопсина I был использован последний кадр траектории МД. В ходе МД пять молекул воды (рис. 5) подошли в непосредственную близость к основанию Шиффа. Наличие молекул воды вблизи основания Шиффа согласуется с экспериментальными структурными данными других микробных родопсинов (PDB: 7Z09, 3QAP, 6IS6, 8CQC, 1E12). Использование метода МД позволило приблизить структуру родопсина 1, полученного с помощью статистической модели AlphaFold3, к более нативному состоянию.

Поскольку вблизи молекулы ретиналя располагаются несколько титруемых аминокислотных остатков, проведена оценка значений pK_a аминокислотных остатков родопсина 1, используя сервис PROPKA [10]. Результаты, представленные в таблице, указывают на то, что при нормальной кислотности (pH = 7) остатки аспарагиновых кислот D83 и D113 находятся в протонированном состоянии и имеют нейтральный заряд, в то время как другие остатки кислот, включая противоион основания Шиффа D209, имеют отрицательный заряд.



a *b* *c*

Рис. 5. Структура родопсина I типа после проведения МД: *a* – структура белковой части родопсина 1; *b* – боковые цепи аминокислот и молекул воды WAT670, WAT339, WAT598, WAT1282, WAT863 (представлены красными сферами, молекулы воды W598 и W670 на рисунке неразличимы) родопсина 1, включенных в QM; атомы водорода опущены для упрощения чтения рисунка; *c* – возможные ориентации протона на карбоксильной группе остатков аспарагиновой или глутаминовой кислот в соответствии с методом из [29] и [30])

Fig. 5. Structure of rhodopsin I after MD simulation: *a* – structure of the protein moiety of rhodopsin 1; *b* – side chains of amino acid residues and water molecules WAT670, WAT339, WAT598, WAT1282, and WAT863 (shown as red spheres, the water molecules W598 and W670 in the figure are indistinguishable) of rhodopsin 1 included in the QM region; hydrogen atoms are omitted for clarity; *c* – possible proton orientations on the carboxyl group of aspartic or glutamic acid residues according to the method described in [29] and [30])

Оценка pK_a всех аспарагиновых и глутаминовых аминокислотных остатков в структуре родопсина 1, произведенная с помощью PROPKA

Evaluation of pK_a of all aspartic and glutamic amino acid residues in the structure of rhodopsin 1, performed using PROPKA3

Аминокислотный остаток	D6	D35	D36	D39	D41	D83	D100	D113	D209	E11	E75	E77	E102	E159	E163	E165	E222	E229	E234
pK_a	3,56	2,15	4,07	4,04	3,66	8,77*	3,98	7,11*	6,68	3,73	4,51	4,01	4,55	4,56	4,75	4,75	4,46	4,93	4,63

Примечание. При нейтральном pH = 7 D83 и D113 pK_a являются протонированными (в таблице отмечены *).

В связи с тем что ориентация протона на титруемых аминокислотных остатках может оказывать значительный эффект на положение максимума абсорбции родопсинов [29, 30], оценено положение максимума абсорбции (и соответствующая энергия основного состояния системы) в зависимости от ориентации протонов на карбоксильных группах D83 и D113 (рис. 6).

Проанализированы различные ориентации протона на карбоксильных группах титруемых групп вблизи хромофора и оценено соответствующее положение максимума поглощения. Такой подход основан на предположении, что каждая карбоксильная группа остатка аспарагиновой кислоты может иметь четыре различные ориентации (рис. 5, *c*). Для родопсина 1 были рассмотрены 16 различных взаимных ориентаций протона на остатках D83 и D113. Результаты изучения представлены на рис. 6. На основании проведенного анализа положение максимума абсорбции родопсина 1 варьируется в диапазоне от 545 до 590 нм. Наиболее энергетически стабильному варианту ориентации протонов соответствует значение максимума поглощения λ_{max} = 576 нм. Другие варианты ориентации протонов являются менее энергетически стабильными и отличаются более чем на 10 ккал/моль, что делает их менее вероятными. Примечательно, что среди разнообразия родопсинов похожая длина волны активации (570–590 нм) соответствует сенсорному родопсину I типа (SRI, Halobacterium salinarum) с λ_{max} ~587 нм, который также является одним из наиболее близких к исследуемым белкам гомологом согласно филогенетическому анализу микробных родопсинов (см. рис. 1).

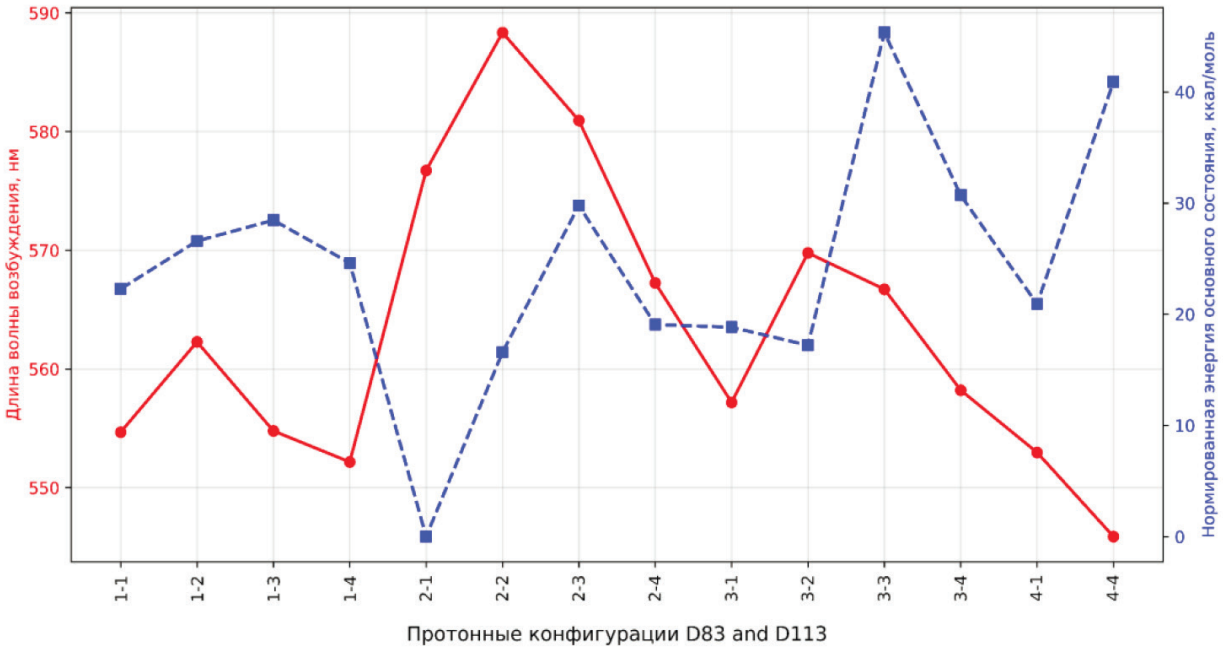


Рис. 6. Оценка энергии основного состояния системы и положения максимума абсорбции для различных ориентаций протонов на карбоксильной группе D83 и D113 (пунктирная и сплошная линии относится к правой и левой шкалам соответственно)

Fig. 6. Evaluation of the system ground-state energy and the position of the absorption maximum for different proton orientations at the carboxyl groups of residues D83 and D113 (the dashed and solid lines correspond to the right and left scales respectively)

Заключение. Квантово-механические расчеты вносят значительный вклад в изучение родопсинов – они позволяют на уровне электронных состояний описывать фотохимические процессы и спектральные свойства хромофора ретиналя в белковом окружении. Гибридные методы квантовой и молекулярной механики (QM/MM) дают возможность моделировать большие белковые системы, выделяя активный центр (ретиналь и ближайшие аминокислотные остатки) для точного квантово-химического описания при учете влияния белкового матрикса классическими потенциалами, что важно для корректного воспроизведения тонкой настройки длины волны поглощения и квантового выхода фотоизомеризации. Такие расчеты позволяют интерпретировать сдвиги спектров при точечном мутагенезе белка, анализировать роль электростатического поля и поляризации белка в стабилизации основного и возбужденного состояний, а также реконструировать энергетический профиль и структуру переходного состояния фемтосекундной изомеризации ретиналя в родопсине. В совокупности это делает квантово-механическое моделирование незаменимым инструментом для сопоставления экспериментальных данных (рентгеноструктурный анализ, ИК- и УФ-видимая спектроскопия, фемтосекундная спектроскопия) с молекулярной картиной фототрансдукции и рационального дизайна мутантов родопсинов с заданными спектральными и функциональными свойствами.

В данной работе использованы квантово-механические расчеты для исследования спектральных свойств новых, не имеющих решенной пространственной структуры и других экспериментальных данных, родопсинов. В совокупности с молекулярным моделированием и филогенетическим анализом предсказана близость фотохимических параметров у исследуемых белков, относящая их к сенсорным родопсинам I типа, и рассчитан максимум поглощения для одного из исследуемых белков (λ_{max} = 576 нм). Такой подход может позволить значительно сократить трудоемкий и длительный процесс поиска новых родопсинов для оптогенетического применения на этапе отбора кандидатов для дальнейшей экспериментальной работы.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания (соглашение 075-03-2026-305, проект FSMG-2024-0012). Филогенетический анализ (грант 25-74-00061), квантово-механические расчеты (грант 25-74-00077), получение моделей структур новых родопсинов (грант 23-14-00160-П), анализ и обобщение результатов (грант 25-24-00770) выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда.

Acknowledgments. This work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the state assignment (Agreement 075-03-2026-305, Project FSMG-2024-0012). Phylogenetic analysis (grant 25-74-00061), quantum-mechanical calculations (grant 25-74-00077), generation of structural models for novel rhodopsins (grant 23-14-00160-P), and analysis and synthesis of results (grant 25-24-00770) were carried out with the financial support of the Russian Science Foundation.

Список использованных источников

1. Nakao, S. Microbial rhodopsins as multifunctional photoreactive membrane proteins for optogenetics / S. Nakao, K. Kojima, Y. Sudo // Biological and Pharmaceutical Bulletin. – 2021. – Vol. 44, № 10. – P. 1357–1363. https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00544

2. McIsaac, R. S. Recent advances in engineering microbial rhodopsins for optogenetics / R. S. McIsaac, C. N. Bedbrook, F. H. Arnold // Current Opinion in Structural Biology. – 2015. – Vol. 33. – P. 8–15. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.05.001

3. Altun, A. Mechanism of spectral tuning going from retinal in vacuo to bovine rhodopsin and its mutants: multireference ab initio quantum mechanics/molecular mechanics studies / A. Altun, S. Yokoyama, K. Morokuma // The Journal of Physical Chemistry B. – 2008. – Vol. 112, № 51. – P. 16883–16890. https://doi.org/10.1021/jp807172h

4. MetaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler / S. Nurk, D. Meleshko, A. Korobeynikov [et al.] // Genome Research. – 2017. – Vol. 27, № 5. – P. 824–834. https://doi.org/10.1101/gr.213959.116

5. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation / T. Seemann // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30, № 14. – P. 2068–2069. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153

6. GPU-accelerated homology search with Mmseqs2 / F. Kallenborn, A. Chacon, C. Hundt [et al.] // Nature Methods. – 2025. – Vol. 22, № 10. – P. 2024–2027. https://doi.org/10.1038/s41592-025-02819-8

7. Eddy, S. R. Accelerated profile HMM searches / S. R. Eddy // PloS Computational Biology. – 2011. – Vol. 7, № 10. – P. e1002195. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195

8. InterPro: the protein sequence classification resource in 2025 / M. Blum, A. Andreeva, L. C. Florentino [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2025. – Vol. 53, № D1. – P. D444–D456. https://doi.org/10.1093/nar/gkae1082

9. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 / J. Abramson, J. Adler, J. Dunger [et al.] // Nature. – 2024. – Vol. 630, № 8060. – P. 493–500. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w

10. PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pK_a predictions / M. H. M. Olsson, C. R. Søndergaard, M. Rostkowski [et al.] // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2011. – Vol. 7, № 2. – P. 525–537. https://doi.org/10.1021/ct100578z

11. CHARMM-GUI membrane builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes / S. Jo, J. B. Lim, J. B. Klauda [et al.] // Biophysical Journal. – 2009. – Vol. 97, № 1. – P. 50–58. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.04.013

12. Zhu, S. Retinal conformation governs pKa of protonated Schiff base in rhodopsin activation / S. Zhu, M. F. Brown, S. E. Feller // Journal of the American Chemical Society. – 2013. – Vol. 135, № 25. – P. 9391–9398. https://doi.org/10.1021/ja4002986

13. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / M. J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz [et al.] // SoftwareX. – 2015. – Vol. 1–2. – P. 19–25. https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001

14. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins / J. Huang, S. Rauscher, G. Nawrocki [et al.] // Nature Methods. – 2017. – Vol. 14, № 1. – P. 71–73. https://doi.org/10.1038/nmeth.4067

15. Warshel, A. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme / A. Warshel, M. Levitt // Journal of Molecular Biology. – 1976. – Vol. 103, № 2. – P. 227–249. https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90311-9

16. Altun, A. Quantum mechanical/molecular mechanical studies on spectral tuning mechanisms of visual pigments and other photoactive proteins / A. Altun, S. Yokoyama, K. Morokuma // Photochemistry and Photobiology. – 2008. – Vol. 84, № 4. – P. 845–854. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00308.x

17. Nocedal, J. Updating quasi-Newton matrices with limited storage / J. Nocedal // Mathematics of Computation. – 1980. – Vol. 35, № 151. – P. 773–782. https://doi.org/10.1090/s0025-5718-1980-0572855-7

18. Neese, F. The ORCA program system / F. Neese // Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. – 2012. – Vol. 2, № 1. – P. 73–78. https://doi.org/10.1002/wcms.81

19. Bannwarth, Y. J. GFN2-xTB—an accurate and broadly parametrized self-consistent tight-binding quantum chemical method with multipole electrostatics and density-dependent dispersion contributions / Y. J. Bannwarth, S. Ehlert, S. Grimme // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2019. – Vol. 15, № 3. – P. 1652–1671. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01176

20. Dunning, T. H. Jr. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen / T. H. Dunning Jr. // The Journal of Chemical Physics. – 1989. – Vol. 90, № 2. – P. 1007–1023. https://doi.org/10.1063/1.456153

21. Runge, E. Density-functional theory for time-dependent systems / E. Runge, E. K. U. Gross // Physical Review Letters. – 1984. – Vol. 52, № 12. – P. 997–1000. https://doi.org/10.1103/physrevlett.52.997

22. Grimme, S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction / S. Grimme // Journal of Computational Chemistry. – 2006. – Vol. 27, № 15. – P. 1787–1799. https://doi.org/10.1002/jcc.20495

23. Vahtras, O. Integral approximations for LCAO-SCF calculations / O. Vahtras, J. Almlöf, M. W. Feyereisen // Chemical Physics Letters. – 1993. – Vol. 213, № 5–6. – P. 514–518. https://doi.org/10.1016/0009-2614(93)89151-7

24. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB / J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala [et al.] // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2015. – Vol. 11, № 8. – P. 3696–3713. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255

25. TURBOMOLE: today and tomorrow / Y. J. Franzke, C. Holzer, J. H. Andersen [et al.] // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2023. – Vol. 19, № 20. – P. 6859–6890. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c00347

26. Optimized accurate auxiliary basis sets for RI-MP2 and RI-CC2 calculations for the atoms Rb to Rn / A. Hellweg, C. Hättig, S. Höfener [et al.] // Theoretical Chemistry Accounts. – 2007. – Vol. 117, № 4. – P. 587–597. https://doi.org/10.1007/s00214-007-0250-5

27. Genomic and transcriptomic evidence of light-sensing, porphyrin biosynthesis, Calvin-Benson-Bassham cycle, and urea production in Bathyarchaeota / J. Pan, Z. Zhou, O. Béjà [et al.] // Microbiome. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 43. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00820-1

28. Tsujimura, M. Insights into the protein functions and absorption wavelengths of microbial rhodopsins / M. Tsujimura, H. Ishikita // The Journal of Physical Chemistry B. – 2020. – Vol. 124, № 52. – P. 11819–11826. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c08910

29. A subgroup of light-driven sodium pumps with an additional Schiff base counterion / E. Podoliak, G. H. U. Lamm, E. Marin [et al.] // Nature Communications. – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 3119. https://doi.org/10.1038/s41467-024-47469-0

30. Rhodopsin-bestrophin fusion proteins from unicellular algae form gigantic pentameric ion channels / A. Rozenberg, I. Kaczmarczyk, D. Matzov [et al.] // Nature Structural & Molecular Biology. – 2022. – Vol. 29, № 6. – P. 592–603. https://doi.org/10.1038/s41594-022-00783-x

References

1. Nakao S., Kojima K., Sudo Y. Microbial Rhodopsins as Multi-functional Photoreactive Membrane Proteins for Optogenetics. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2021, vol. 44, no. 10, pp. 1357–1363. https://doi.org/10.1248/bpb.b21-00544

2. McIsaac R. S., Bedbrook C. N., Arnold F. H. Recent advances in engineering microbial rhodopsins for optogenetics. *Current Opinion in Structural Biology*, 2015, vol. 33, pp. 8–15. https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.05.001

3. Altun A., Yokoyama S., Morokuma K. Mechanism of spectral tuning going from retinal in vacuo to bovine rhodopsin and its mutants: multireference ab initio quantum mechanics/molecular mechanics studies. *Journal of Physical Chemistry B*, 2008, vol. 112, no. 51, pp. 16883–16890. https://doi.org/10.1021/jp807172h

4. Nurk S., Meleshko D., Korobeynikov A., Pevzner P. A. metaSPAdes: a new versatile metagenomic assembler. *Genome Research*, 2017, vol. 27, no. 5, pp. 824–834. https://doi.org/10.1101/gr.213959.116

5. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 2014, vol. 30, no. 14, pp. 2068–2069. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153

6. Kallenborn F., Chacon A., Hundt C., Sirelkhatim H., Didi K., Cha S., et al. GPU-accelerated homology search with Mmseqs2. *Nature Methods*, 2025, vol. 22, no. 10, 2024–2027. https://doi.org/10.1038/s41592-025-02819-8

7. Eddy S. R. Accelerated Profile HMM Searches. *PloS Computational Biology*, 2011, vol. 7, no. 10, p. e1002195. https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195

8. Blum M., Andreeva A., Florentino L. C., Chuguransky S. R, Grego T., Hobbs E., et al. InterPro: the protein sequence classification resource in 2025. *Nucleic Acids Research*, 2025, vol. 53, no. D1, pp. D444–D456. https://doi.org/10.1093/nar/gkae1082

9. Abramson J., Adler J., Dunger J., Evans R., Green T., Pritzel A., et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*, 2024, vol. 630, no. 8060, pp. 493–500. https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w

10. Olsson M. H. M., Søndergaard C. R., Rostkowski M., Jensen J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pK_a Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2011, vol. 7, no. 2, pp. 525–537. https://doi.org/10.1021/ct100578z

11. Jo S., Lim J. B., Klauda J. B., Im W. CHARMM-GUI Membrane Builder for mixed bilayers and its application to yeast membranes. *Biophysical Journal*, 2009, vol. 97, no. 1, pp. 50–58. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2009.04.013

12. Zhu S., Brown M. F., Feller S. E. Retinal conformation governs pKa of protonated Schiff base in rhodopsin activation. J*ournal of the American Chemical Society*, 2013, vol. 135, no. 25, pp. 9391–9398. https://doi.org/10.1021/ja4002986

13. Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 2015, vol. 1–2, pp. 19–25. https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001

14. Huang J., Rauscher S., Nawrocki G., Ran T., Feig M., de Groot B. L., et al. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature Methods*, 2017, vol. 14, no. 1, pp. 71–73. https://doi.org/10.1038/nmeth.4067

15. Warshel A., Levitt M.. Theoretical studies of enzymic reactions: dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 1976, vol. 103, no. 2, pp. 227–249. https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90311-9

16. Altun A., Yokoyama S., Morokuma K. Quantum mechanical/molecular mechanical studies on spectral tuning mechanisms of visual pigments and other photoactive proteins. *Photochemistry and Photobiology*, 2008, vol. 84, no. 4, pp. 845–854. https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00308.x

17. Nocedal J. Updating quasi-Newton matrices with limited storage. *Mathematics of Computation*, 1980, vol. 35, no. 151, pp. 773–782. https://doi.org/10.1090/s0025-5718-1980-0572855-7

18. Neese F. The ORCA program system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, 2012, vol. 2, no. 1, pp. 73–78. https://doi.org/10.1002/wcms.81

19. Bannwarth C., Ehlert S., Grimme S. GFN2-xTB-An Accurate and Broadly Parametrized Self-Consistent Tight-Binding Quantum Chemical Method with Multipole Electrostatics and Density-Dependent Dispersion Contributions. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2019, vol. 15, no. 3, pp. 1652–1671. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.8b01176

20. Dunning T. H. Jr. Gaussian basis sets for use in correlated molecular calculations. I. The atoms boron through neon and hydrogen. *The Journal of Chemical Physics*, 1989, vol. 90, no. 2, pp. 1007–1023. https://doi.org/10.1063/1.456153

21. Runge E., Gross E. K. U. Density-functional theory for time-dependent systems. *Physical Review Letters*, 1984, vol. 52, no. 12, pp. 997–1000. https://doi.org/10.1103/physrevlett.52.997

22. Grimme S. Semiempirical GGA-type density functional constructed with a long-range dispersion correction. *Journal of Computational Chemistry*, 2006, vol. 27, no. 15, pp. 1787–1799. https://doi.org/10.1002/jcc.20495

23. Vahtras O., Almlöf J., Feyereisen M. W. Integral approximations for LCAO-SCF calculations. *Chemical Physics Letters*, 1993, vol. 213, no. 5–6, pp. 514–518. https://doi.org/10.1016/0009-2614(93)89151-7

24. Maier J. A., Martinez C., Kasavajhala K., Wickstrom L., Hauser K. E., Simmerling C. ff14SB: Improving the Accuracy of Protein Side Chain and Backbone Parameters from ff99SB. Journal of Chemical Theory and Computation, 2015, vol. 11, no. 8, pp. 3696–3713. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00255

25. Franzke Y. J., Holzer C., Andersen J. H., Begušić T., Bruder F., Coriani S., et al. TURBOMOLE: Today and Tomorrow. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 2023, vol. 19, no. 20, pp. 6859–6890. https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c00347

26. Hellweg A., Hättig C., Höfener S., Klopper W. Optimized accurate auxiliary basis sets for RI-MP2 and RI-CC2 calculations for the atoms Rb to Rn. *Theoretical Chemistry Accounts*, 2007, vol. 117, no. 4, pp. 587–597. https://doi.org/10.1007/s00214-007-0250-5

27. Pan J., Zhou Z., Béjà O., Cai M., Yang Y., Liu Y., et al. Genomic and transcriptomic evidence of light-sensing, porphyrin biosynthesis, Calvin-Benson-Bassham cycle, and urea production in Bathyarchaeota. *Microbiome*, 2020, vol. 8, no. 1, pp. 43. https://doi.org/10.1186/s40168-020-00820-1

28. Tsujimura M., Ishikita H. Insights into the Protein Functions and Absorption Wavelengths of Microbial Rhodopsins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2020, vol. 124, no. 52, pp. 11819–11826. https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.0c08910

29. Podoliak E., Lamm G. H. U., Marin E., Schellbach A. V., Fedotov D. A., Stetsenko A., et al. A subgroup of light-driven sodium pumps with an additional Schiff base counterion. *Nature Communications*. 2024, vol. 15, no. 1, pp. 3119. https://doi.org/10.1038/s41467-024-47469-0

30. Rozenberg A., Kaczmarczyk I., Matzov D., Vierock J., Nagata T., Sugiura M., et al. Rhodopsin-bestrophin fusion proteins from unicellular algae form gigantic pentameric ion channels. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2022, vol. 29, no. 6, pp. 592–603. https://doi.org/10.1038/s41594-022-00783-x

Информация об авторах

Хорн Полина Александровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: khorn.pa@phystech.edu; http://orcid.org/ 0000-0002-2117-2130

Федотов Даниил Александрович – старший научный сотрудник. Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: fedotov.daniil.kras@gmail.com; http://orcid.org/ 0000-0001-5019-2096

Хныкин Андрей Николаевич – аспирант, Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: khnykin.andrey.fw@gmail.com; http://orcid.org/ 0009-0006-2631-013X

Анучина Арина Артуровна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: anuchina.aa@mipt.ru; http://orcid.org/0000-0003-1820-5461

Малышева Екатерина Вячеславовна – студент. Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова (ул. Трубецкая, 8, 119991, Москва, Российская Федерация). E-mail: malyshevaekaterina 27@gmail.com; http://orcid.org/0009-0009-7849-0680

Information about the authors

Khorn Polina A. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy Per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: khorn.pa@phystech.edu; http://orcid.org/ 0000-0002-2117-2130

Fedotov Daniil A. – Senior Researcher. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy Per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: andex.daniil.kras@gmail.com; http://orcid.org/ 0000-0001-5019-2096

Khnykin Andrey N. – Postgraduate Student. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy Per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: khnykin.andrey.fw@gmail.com; http://orcid.org/0009-0006-2631-013X

Anuchina Arina A. – Ph. D. (Biology), Senior Researcher. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy Per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: anuchina.aa@mipt.ru; http://orcid.org/0000-0003-1820-5461

Malysheva Ekaterina V. – Student. I. M. Sechenov First Moscow State Medical University (8-2, Trubetskaya Str., 119991, Moscow, Russian Federation). E-mail: malyshevaekaterina 27@gmail.com; http://orcid.org/0009-0009-7849-0680

Ilyinsky Nikolai S. – Ph. D. (Physics and Mathematics), Senior Researcher. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy Per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: ilinsky@phystech.edu; http://orcid.org/0000-0002-8812-5849

Ильинский Николай Сергеевич – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник. Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: ilinsky@phystech.edu; http://orcid.org/0000-0002-8812-5849

Охрименко Иван Станиславович – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник – заведующий лабораторией. Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: okhrimenko.is@mipt.ru; http://orcid.org/ 0000-0002-1053-2778

Павлов Андрей Владимирович – студент. Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: pavlov.andrei@phystech.edu; http://orcid.org/0009-0002-6620-4316

Павлов Владислав Владиславович – студент. Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: pavlov.vv@phystech.edu; http://orcid.org/0009-0009-6861-3261

Колесник Матвей Владимирович – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник. Институт биологии гена РАН (ул. Вавилова, 34/5, 119334, Москва, Российская Федерация). E-mail: matveykolesnik@gmail.com; http://orcid.org/0000-0002-7997-657X

Демкина Алина Олеговна – старший научный сотрудник. Институт биологии гена РАН (ул. Вавилова, 34/5, 119334, Москва, Российская Федерация). E-mail: ademkina@biotc.ru

Рубинштейн Илья Дмитриевич – студент. Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: ilrubi.ru@yandex.ru; http://orcid.org/0009-0005-3056-2076

Талдаев Амир Халилевич – младший научный сотрудник. Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: t-amir@bk.ru; http://orcid.org/0000-0003-2593-1963

Мишин Алексей Викторович – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник. Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: mishinalexej@gmail.com; http://orcid.org/0000-0003-3759-380X

Борщевский Валентин Иванович – доктор физико-математических наук, заведующий лабораторией. Московский физико-технический институт (Институтский пер., 9, Долгопрудный, 141700, Российская Федерация). E-mail: borshchevskiy@gmail.com; http://orcid.org/0000-0003-4398-9712

Okhrimenko I. S. – Ph. D. (Physics and Mathematics), Senior Researcher – Head of the Laboratory. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy Per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: okhrimenko.is@mipt.ru; http://orcid.org/ 0000-0002-1053-2778

Pavlov Andrey V. – Student. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy Per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: pavlov.andrei@phystech.edu; http://orcid.org/0009-0002-6620-4316,

Pavlov Vladislav V. – Student. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy Per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: pavlov.vv@phystech.edu; http://orcid.org/0009-0009-6861-3261

Kolesnik Matvey V. – Ph. D. (Biology), Junior Researcher. Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences (34/5, Vavilova Str., 119334, Moscow, Russian Federation). E-mail: matveykolesnik@gmail.com; http://orcid.org/0000-0002-7997-657X

Demkina Alina O. – Senior Researcher. Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences (34/5, Vavilova Str., 119334, Moscow, Russian Federation). E-mail: ademkina @biotc.ru

Rubinshteyn Ilya D. – Student. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: ilrubi.ru@yandex.ru; http://orcid.org/0009-0005-3056-2076

Taldaev Amir – Junior Researcher. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy Per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: t-amir@bk.ru; http://orcid.org/0000-0003-2593-1963

Mishin Alexei V. – Ph. D. (Physics and Mathematics), Senior Researcher. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy Per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: mishinalexej@gmail.com; http://orcid.org/0000-0003-3759-380X

Borshchevskiy Valentin I. – Dr. Sci. (Physics and Mathematics), Head of the Laboratory. Moscow Institute of Physics and Technology (9, Institutskiy Per., 141700, Dolgoprudny, Russian Federation). E-mail: borshchevskiy@gmail.com; http://orcid.org/0000-0003-4398-9712

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 577.112, 577.112.85
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-323-332

Поступила в редакцию 11.08.2026
Received 11.08.2026

Y. D. Khyuppenen, A. S. Savich, M. S. Kisel, A. V. Svirid

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

RECOMBINANT PRODUCTION IN *ESCHERICHIA COLI*, FUNCTIONAL ASSESSMENT AND *IN SILICO* INTERACTOME MAPPING OF HUMAN CYP2J2

Abstract. Cytochrome P450 2J2 (CYP2J2) is an epoxygenase expressed in various tissues, including cardiomyocytes, enterocytes, and vascular endothelial cells. This enzyme participates in the metabolism of arachidonic acid and other polyunsaturated fatty acids, and serves as a significant factor in drug metabolism. In this study, a system was developed for obtaining recombinant human CYP2J2 in *Escherichia coli*. The obtained protein was subjected to a two-step purification using affinity chromatography and hydroxyapatite sorbent chromatography. For several active-site ligands, apparent dissociation constants of the complexes (K_d) were determined. For the first time, the AlphaFold Multimer computational approach was applied for the computational screening of potential protein partners of CYP2J2, allowing the identification of a number of proteins involved in the regulation of the ubiquitin-proteasome pathway, signal transduction, and DNA repair.

Keywords: cytochrome P450, CYP2J2, recombinant protein, epoxygenase, protein-protein interactions, AlphaFold, *in silico* screening

For citation. Khyuppenen Y. D., Savich A. S., Kisel M. S., Svirid A. V. Recombinant production in *Escherichia coli*, functional assessment and *in silico* interactome mapping of human CYP2J2. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2026, vol. 62, no. 4, pp. 323–332 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-323-332

Е. Д. Хюппенен, А. С. Савич, М. С. Кисель, А. В. Свирид

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*, ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОЦЕНКА И *IN SILICO* КАРТИРОВАНИЕ ИНТЕРАКТОМА CYP2J2 ЧЕЛОВЕКА

Аннотация. Цитохром P450 2J2 (CYP2J2) представляет собой эпоксигеназу, экспрессируемую в различных тканях, включая кардиомиоциты, энтероциты и клетки сосудистого эндотелия. Данный фермент участвует в метаболизме арахидоновой и других полиненасыщенных жирных кислот, а также выполняет роль значимого фактора метаболизма лекарственных препаратов. Разработана система получения рекомбинантного CYP2J2 человека в бактериях *Escherichia coli*. Была применена стратегия по очистке с применением аффинной хроматографии и хроматографии на гидроксиапатитном сорбенте. Для ряда лигандов активного центра определены кажущиеся константы диссоциации комплексов (K_d). Впервые применен вычислительный подход AlphaFold Multimer для идентификации потенциальных белков-партнеров CYP2J2, позволивший выявить ряд белков, вовлеченных в регуляцию убиквитин-протеасомного пути, передачу сигнала и репарацию ДНК.

Ключевые слова: цитохром P450, CYP2J2, рекомбинантный белок, эпоксигеназа, белок-белковые взаимодействия, AlphaFold, *in silico* скрининг

Для цитирования. Получение рекомбинантного белка в клетках *Escherichia coli*, функциональная оценка и *in silico* картирование интерактома CYP2J2 человека / Е. Д. Хюппенен, А. С. Савич, М. С. Кисель, А. В. Свирид // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2026. – Т. 62, № 4. – С. 323–332 https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-323-332

Introduction. Cytochrome P450 enzymes (CYPs) constitute a superfamily of monooxygenases playing an essential role in the metabolism of endogenous compounds and xenobiotics [1]. Among the diverse families within this superfamily, CYP2 represents a particularly important group of enzymes with distinct tissue-specific distribution patterns and substrate specificities [2]. Members of the CYP2 family are involved in the oxidative metabolism of fatty acids, steroids, eicosanoids, and numerous pharmaceutical agents, thereby influencing physiological homeostasis and pharmacological outcomes [3].

Within the CYP2 family, CYP2J2 stands out as a non-hepatic isoform with a tissue distribution pattern fundamentally different from that of hepatic isoforms of the same family. The highest levels of CYP2J2 expression have been documented in cardiomyocytes, where it serves as the dominant epoxygenase of arachidonic acid, as well as in enterocytes of the small intestine, lung tissue, vascular endothelial cells, adrenal glands, and brain [4, 5]. This unique distribution profile suggests that CYP2J2 plays critical roles in cardiovascular homeostasis, gastrointestinal function and neurovascular regulation.

The principal endogenous function of CYP2J2 is the bioactivation of polyunsaturated fatty acids. Regarding arachidonic acid, the enzyme acts as an epoxygenase generating four regioisomeric epoxyeicosatrienoic acids (EETs): 5,6-, 8,9-, 11,12- and 14,15-EET. In the myocardium, the reaction exhibits high stereoselectivity with the predominant formation of 14(R),15(S)-EET [6, 7]. In addition to arachidonic acid, CYP2J2 demonstrates a high affinity for omega-3 fatty acids: docosahexaenoic acid is metabolized to epoxydocosapentaenoic acids, eicosapentaenoic acid – to epoxyeicosatetraenoic acids, while linoleic acid is converted predominantly to 9,10- and 12,13-epoxyoctadecenoic acids capable of exerting cytotoxic effects at high concentrations [8, 9].

Beyond endogenous substrates, CYP2J2 participates in oxidative metabolism of a wide range of xenobiotics, including antihistamines (terfenadine, astemizole, ebastine), cardiological drugs (amiodarone, dronedarone), tamoxifen, cyclosporin A, nabetasone and various anthelminthic agents (albendazole, fenbendazole) [10, 11]. Of particular clinical significance in this context is the intestinal expression of the enzyme: the metabolism of pharmaceutical agents in enterocytes directly determines their systemic bioavailability upon oral administration.

Despite the well-established biological importance of CYP2J2, systematic investigations of its molecular interactions remain limited. The enzyme operates within complex macromolecular assemblies involving redox partner proteins, yet comprehensive profiling of its interaction network has not been performed. Recent advances in computational structural biology, particularly the development of AlphaFold-Multimer and related approaches, now enable prediction of protein-protein interactions with unprecedented accuracy [12, 13]. These tools open new possibilities for identifying previously unknown protein partners of CYP enzymes and for understanding their functional networks beyond classical monooxygenase activity.

The present study was designed to address several interrelated objectives: (1) the development of the system for production and purification of recombinant human CYP2J2, (2) the characterization of the catalytically competent enzyme fraction and evaluation of its ligand-binding properties through spectrophotometric titration, and (3) the computational prediction of potential protein interaction partners using the AlphaPulldown pipeline based on AlphaFold-Multimer. The combination of experimental and computational approaches employed in this work provides a foundation for future functional studies of the CYP2J2 interaction networks.

Materials and methods. *Materials.* Reagents used in this study included LB, TB and LB-agar media (Conda, Spain); NaCl, KCl, $MgCl_2$, Na_2HPO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$, imidazole (Thermo Fisher Scientific, USA); $ZnSO_4$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, Na_2MoO_4, D-arabinose, D-biotin (Sigma, Germany); acrylamide, CHAPS, dithiothreitol (DTT), acetic acid, glycerol, SDS, Tween-20, IPTG, ALA, Coomassie G-250 (Serva, Germany); Tris (Melford, UK); beta-mercaptoethanol (AppliChem, Germany); hydroxyapatite sorbent Bio-Gel HTP (Bio-Rad, USA); TEMED, ampicillin, kanamycin, agarose (Glentham, UK); HRP-conjugated anti-His-tag antibodies (E-AB-20008), chemiluminescence reagent kit (Elabscience, China).

Expression vectors and plasmids. The prokaryotic expression vector pCW-LIC-2J2-cw02 was constructed for production of recombinant CYP2J2 in *E. coli* using a ligase-independent cloning (LIC) system. The vector contains the tac promoter, ampicillin resistance gene, and the CYP2J2 coding sequence (N′-truncated to omit the membrane anchor, C′-6x-histidine tagged). The plasmid was maintained in the collection of the Laboratory of Molecular Diagnostics and Biotechnology, Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus.

Equipment. Protein purification was performed on the ÄKTApurifier 10 medium-pressure chromatography system (GE Healthcare, Sweden). Absorption spectra were recorded on Cary 5000 UV-Vis-NIR (Agilent Technologies, USA) and DeNovix DS-11 spectrophotometers (DeNovix, USA). Bacterial cell cultivation was carried out in a Multitron Pro shaker-incubator (Infors HT, Switzerland). Molecular masses of proteins and peptides were determined by MALDI-TOF mass spectrometry on a Microflex LRF instrument (Bruker Daltonik GmbH, Germany). Cell disruption of *E. coli* was performed using an Emulsiflex C3 homogenizer (Avestin, Canada). SDS-PAGE was carried out using a CLINX XinPRO system (Clinx, China). Bacterial cultures were pelleted using a ScanSpeed 2236R floor centrifuge (Labogene, Denmark), and clarified cell lysates were obtained using an Avanti J-25 centrifuge (Beckman Coulter, USA). Computer modeling was performed on a computing cluster of the Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus (4xNvidia RTX 5090, 7975WX, 256 GB DDR5 RAM).

Methods. Protein expression and purification. Heterologous expression was carried out in *E. coli* BL21(DE3) cells in a volume of 2 L of culture medium. The cells were co-transformed with the

expression plasmid and the pGro12 plasmid carrying the chaperonine genes groEL/ES. These proteins ensure the proper folding of recombinant cytochromes and increase the overall product yield; their expression was induced by the addition of L-arabinose. On the day preceding the experiment, a seed culture was inoculated into LB medium supplemented with ampicillin and kanamycin. The next day, the culture was diluted 100-fold in two 2 L flasks containing the TB medium with the same antibiotics and a trace elements mixture (54 mM $FeCl_3$, 12 mM $ZnCl_2$, 400 μM each of $CoCl_2$, $CuCl_2$, Na_2MoO_4, $MnCl_2$ and Na_2SeO_3). The cultures were grown at 37 °C and 190 rpm until the optical density reached 0.6-0.8 units.

Upon reaching the desired cell density, IPTG was added to the medium for induction of the target gene expression, along with δ-aminolevulinic acid (δ-ALA) as a precursor of the prosthetic group of cytochromes, and L-arabinose for the activation of chaperone expression. After that, the temperature was reduced to 30 °C. Expression was carried out for 48 h for CYP2J2 in accordance with literature data [14].

After expression, the cells were pelleted by centrifugation; the pellet was resuspended in buffer (50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4; 20 % glycerol; 0.3 M NaCl; 0.3 % CHAPS; 1 mM PMSF) at a ratio of 1 : 4. Cell disruption was performed by passing the suspension twice through a high-pressure homogenizer. For the solubilization of membrane proteins, CHAPS was additionally added to the lysate to a final concentration of 1 % and incubated at 4 °C for 1 h with constant stirring. Cell debris was removed by centrifugation at 30 000 g for 1.5 h. The resulting clarified lysate was used for the subsequent affinity chromatography.

For the purification of the recombinant proteins carrying a His-tag, affinity chromatography was performed on a 5 mL HisTrap HP column (Cytiva, USA). Washing was performed sequentially at imidazole concentrations of 30 mM and 50 mM, followed by the application of a linear gradient to separate impurities from the target protein. Elution of the target protein was performed at 500 mM imidazole. Protein yield was monitored spectrophotometrically at 280 nm.

Hydroxyapatite (HA) chromatography was used as the second purification stage. Before applying to HA, the protein was concentrated and diluted with 10 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer without imidazole. Elution was performed with a stepwise gradient of potassium phosphate buffer (KPB); the colored band migrated down the column with increasing KPB concentration, and the target protein was collected at 500 mM KPB as brown-colored fractions.

K_d estimation from differential spectrophotometric titration data. For the selected compounds, spectrophotometric titration with sequential ligand addition and the recording of difference spectrum changes was performed. From the saturation curves of the dependence of ΔA on ligand concentration, the dissociation constants (K_d) were calculated [15]:

$$A = A_{\max} \frac{[L]+[E]+K_d - \sqrt{([L]+[E]+K_d)^2 - 4[E][L]}}{2[E]}$$

where A is the spectral response amplitude at the ligand concentration [L]; $A_{\max}$ is the spectral response amplitude when the enzyme is saturated with the ligand; [L] is the current ligand concentration in solution; [E] is the enzyme concentration.

Computational screening of potential protein partners of CYP2J2. To identify putative protein partners of CYP2J2, we performed a systematic *in silico* screening using the AlphaPulldown v2.1.5 pipeline, which leverages the AlphaFold-Multimer v3 architecture to predict binary and multiprotein complexes. As candidate interactors, we compiled a library of human proteins with experimentally annotated expression in physiologically relevant tissues, sourced from the Human Protein Atlas database (https://www.proteinatlas.org). Proteins with documented cytoplasmic, nuclear, membrane-associated, or mitochondrial localizations were included, reflecting the subcellular distribution of CYP2J2 and its known substrates. For each enzyme, approximately 5,000 potential pairwise interactions were computationally evaluated.

Results and discussion. *Protein expression and purification.* The first stage of this work was the preparation of purified recombinant CYP2J2. This task pursued two goals: first, to confirm that the construct encodes functional and a stable protein suitable for further work; and second, to create a reproducible system for enzyme isolation for subsequent ligand testing under *in vitro* conditions.

IMAC is based on the ability of a polyhistidine fragment of the protein to specifically bind to Ni^{2+} ions immobilized on the matrix, allowing the selective retention of the target protein during sample

loading, while most impurities are removed during washing. The necessity of a second chromatographic step was determined by the presence of imidazole in the eluate after the Ni-NTA column: imidazole coordinates the Fe atom of the heme, blocking the active site of the enzyme and making it incompatible with subsequent functional studies. Hydroxyapatite resin mixed-mode binding is well suited for cytochromes P450. In addition, this method is especially robust for these objects: when the sample was applied to the column, a characteristic brown ring was clearly visible forming at the binding site of the heme-containing protein on the resin.

The imidazole removal efficiency was controlled spectrophotometrically: in the absolute absorption spectra, the maximum in the Soret band region shifted from 425 nm to 419 nm, indicating the restoration of the native state of the heme center and the displacement of imidazole from the coordination sphere of iron (Figure 1).

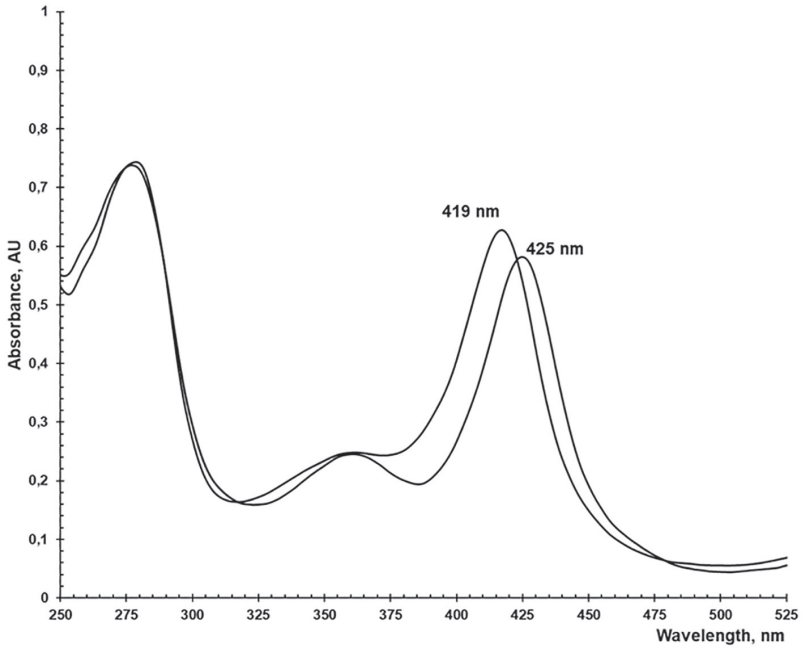


Fig. 1. Absolute absorption spectra of CYP2J2 before and after the imidazole removal

As shown in Figure 2, *a*, MALDI-TOF mass spectrometry confirmed that the experimentally determined molecular mass matches the theoretical value calculated from the amino acid sequence. SDS-PAGE analysis of CYP2J2 (Figure 2, *b*) showed a pronounced band with a molecular mass of approximately 55 kDa, in addition to densitometry analysis that suggests protein preparation purity of > 95 %. Protein identity was confirmed by Western blotting with anti-His-tag antibodies (Figure 2, *c*): a specific signal was detected exclusively at the expected molecular mass level.

The yield of purified CYP2J2 was 21.5 mg/L of culture (~10 g of cells). The purity of the final protein preparations was > 95 % (by SDS-PAGE).

Confirmation of the presence of a catalytically active form in the preparation was performed by CO-difference spectrophotometry. After reduction with sodium dithionite and saturation with carbon monoxide, the CO-difference spectrum of the purified protein revealed a prominent Soret peak at 450 nm, characteristic of the catalytically competent cytochrome P450, with a minor peak at 420 nm corresponding to the inactive P420 form (Figure 3). Analysis of the peaks (corrected by the extinction coefficients for P450 and P420) on the spectrum yielded a P450 : P420 ratio of ~81 : 19, indicating that > 80 % of the spectrally detectable hemoprotein was in the active P450 state. This confirms the successful folding and heme incorporation of the recombinant CYP2J2. Using the extinction coefficient $\varepsilon_{450-490}$ = = 91mM^{-1}cm^{-1} [16], the concentration of functional P450 was calculated accordingly.

Functional activity testing of recombinant protein. To test the functional activity of the obtained preparations, their interaction with compounds known from the literature as ligands of CYP2J2, as well as with a series of potential substrates from the Institute of Bioorganic Chemistry collection, was

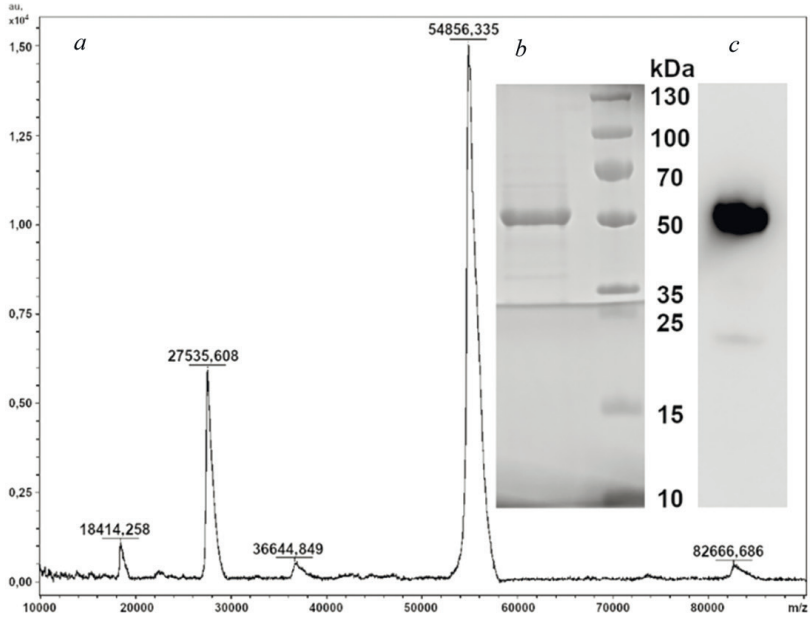


Fig. 2. CYP2J2 physicochemical properties:
a – MALDI-TOF spectrum, *b* – SDS-PAGE profile, *c* – western blotting with anti-His-tag antibodies

assessed. Among the tested low-molecular-weight ligands the following can be highlighted: terfenadine, a substrate and competitive inhibitor of CYP2J2 (IC_{50} = 8.1 μM) [17], and its metabolite terfenadone (IC_{50} = 0.7 μM) [17]; miconazole suppressing CYP2J2 activity by more than 90 % at 30 μM [3]; 17-ODYA, an inhibitor of CYP-epoxygenases (IC_{50} < 100 nM) [18]; and HET0016, a selective inhibitor of omega-hydroxylases CYP4A/4F (IC_{50} ~9–35 nM) with weaker action on CYP2J2 (IC_{50} ~2.8 μM), allowing a distinction between the omega-hydroxylase and epoxygenase pathways of arachidonic acid metabolism [19].

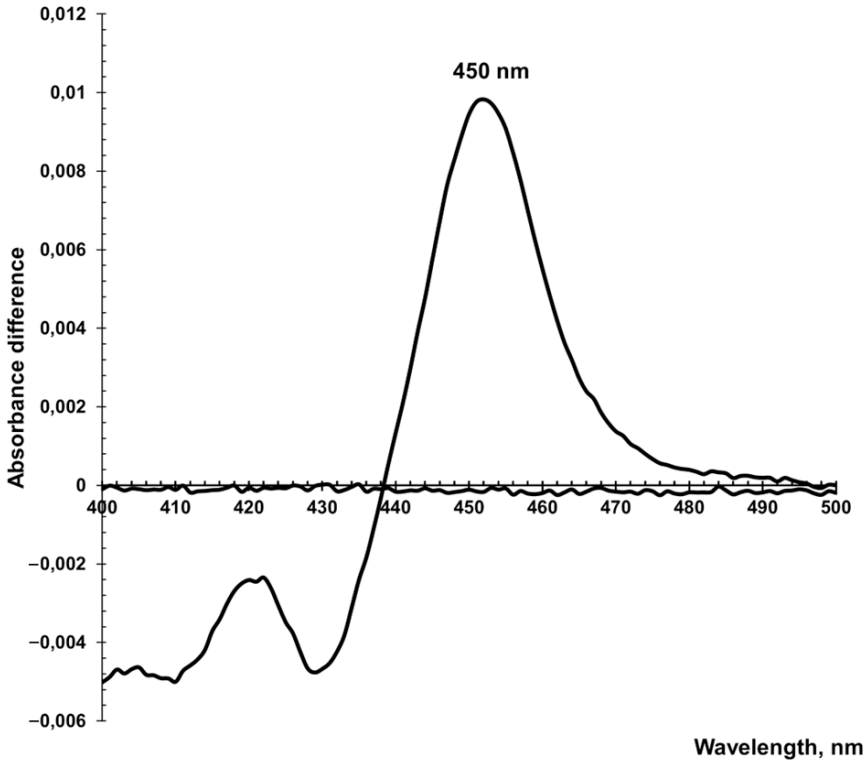
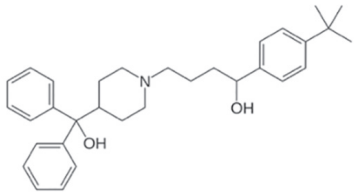
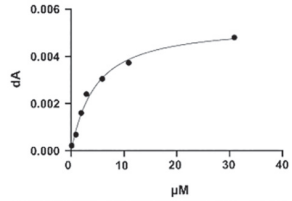
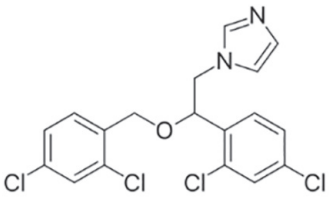
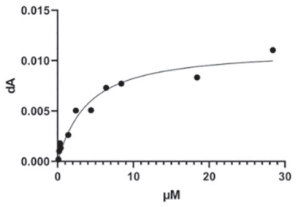
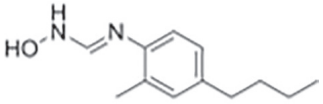
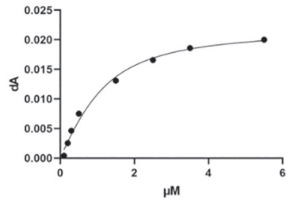
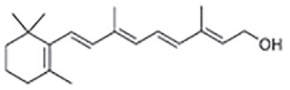
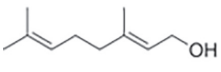
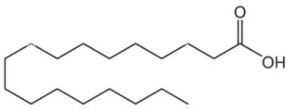
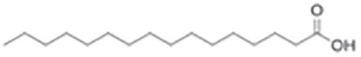
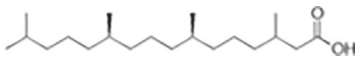
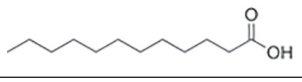


Fig. 3. CO-difference spectrum of recombinant human CYP2J2

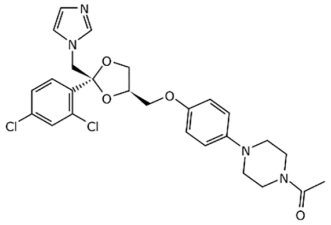
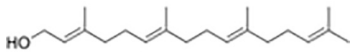
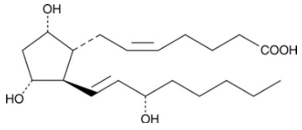
Primary screening was performed by difference spectrophotometry in a microplate format. Upon ligand binding to the active site of cytochrome P450, characteristic changes in the heme absorption spectrum are observed. A Type I spectral response (maximum around 390 nm and minimum around 420 nm) corresponds to binding of substrate-like compounds displacing water molecules from the iron coordination sphere. Type II spectral response (maximum around 430 nm and minimum around 390 nm) is characteristic of azole-type inhibitors coordinating the nitrogen atom directly to the heme iron [20]. Based on primary screening results, compounds with the most pronounced difference signals were selected for subsequent quantitative analysis.

As shown in the graphs, some of the studied compounds demonstrated saturable binding, indicating specific interaction with the active sites of the enzymes. Summary K_d values are presented in Table 1.

Table 1. **Ligand spectrophotometric titration results**

Ligand	Structural formula	Spectral response type	Titration curve	K_d, μM
Terfenadine		I		3.95 ± 0.19
Miconazole		II		3.34 ± 0.17
HET-0016		II		0.54 ± 0.04
Retinol		n/a	n/d	–
Geraniol		n/a	n/d	–
Stearic acid		n/a	n/d	–
Palmitic acid		n/a	n/d	–
Phytanic acid		n/a	n/d	–
Lauric acid		I	n/d	–
17-ODYA		I	n/d	–

End of tabl. 1

Ligand	Structural formula	Spectral response type	Titration curve	K_d, μM
Ketoconazole		n/a	n/d	–
Geranylgeraniol		I	n/d	–
Prostaglandin $F2_a$		I	n/d	–

Note: n/a – no spectral response, n/d – no data. Lauric acid, 17-ODYA, geranylgeraniol, and prostaglandin F2a after the initial assessment of binding (with a distinct spectral response type) in the microplate format failed to show saturable titration curves.

The highest affinity was demonstrated by the inhibitor HET0016, with K_d = 0.54 μM. To validate the experimental system, we compared our measured K_d values with published spectrophotometric binding data for CYP2J2. For terfenadine, our observed K_d of 3.95 μM is in good agreement both with the reported values of 0.90–2.2 μM (Type I binding) determined by spectral titration for wild-type CYP2J2 and its genetic variants [21], and with the K_m value of 1.5 μM for terfenadine hydroxylation in human cardiomyocytes [22]. These binding affinities fall within the range expected for CYP2J2 substrates exhibiting Type I spectral responses. For azole-type inhibitors, direct K_d comparisons from spectrophotometric titration are limited in the literature; published data primarily report functional IC_{50} values from enzymatic inhibition assays, which cannot be directly compared to spectroscopically determined K_d values due to differences in experimental conditions and the influence of substrate competition. The consistency of our terfenadine K_d with published substrate binding constants confirms the reliability of the purification and spectrophotometric characterization methods employed. Several potential Type I ligands, after the initial assessment of binding in the microplate format, failed to show a saturable titration curve (lauric acid, 17-ODYA, geranylgeraniol, and prostaglandin $F2_\alpha$).

Computational screening of potential protein partners of CYP2J2. Prediction confidence was assessed using two complementary metrics implemented in AlphaFold-Multimer. We retained only complexes with an interface predicted TM (iPTM) score ≥ 0.8, indicating high-confidence predicted binding interfaces [12], and a predicted DockQ (pDockQ) score > 0.23, which is a metric calibrated to estimate the structural accuracy of predicted protein–protein complexes [23]. Applying both filters yielded 14 high-confidence predicted interactors for CYP2J2 (Table 2, Figure 4).

Interaction maps were constructed by treating predicted partners as primary nodes and connecting them according to their iPTM scores (Figure 4). To embed these predictions within a broader interactomic context, we queried the STRING database (version 12.0 [24]) for experimentally supported and co-expressed interactions among the predicted partners, generating secondary neighbor nodes. This enrichment strategy revealed a modular organization within the predicted interactome: a STAT3-centric cluster enriched for inflammatory cytokine receptors (IL20RA, IL26, IL22RA1, and IL19), a ubiquitin-ligase module encompassing RNF5, RNF180, and RNF146, and a distinct THAP-domain transcription factor cluster comprising THAP12 and its paralogs (THAP1, THAP3, THAP4, THAP7, and THAP11).

Functional categorization of the predicted interactors reveals that CYP2J2 may participate in a range of cellular processes beyond its canonical monooxygenase activity. The strongest predicted modules involve: (I) ubiquitin-proteasome regulation, through the predicted association with RNF5, RNF180,

Table 2. **Potential protein partners of CYP2J2**

Protein	Localization	Function	Metabolic pathway
EIF3I	Cytoplasm	eIF3 subunit; assembly of the 43S preinitiation complex	Translation initiation
GLUL	Cytoplasm	Glutamine synthetase; synthesizes glutamine from glutamate and NH_4^+	Amino acid metabolism; ammonia detoxification
LONRF1	ER, membrane	E3 ubiquitin ligase; quality control of ER proteins	Stress response
MACC1	Nucleus, cytoplasm	Transcription regulator	HGF/MET and MAPK/ERK signaling
PPP1R37	Nucleus, cytoplasm	Phosphatase regulatory subunit PP1	Protein dephosphorylation
RNF146	Nucleus, cytoplasm	PAR-dependent ubiquitination	DNA repair
RNF180	Membrane, cytoplasm	E3 ubiquitin ligase	Ubiquitin-proteasome pathway
RNF5	ER, mitochondrion	E3 ubiquitin ligase	Apoptosis
SORCS3	Cell membrane, endosomes	Vps10/sortilin receptor	Neurotrophin signaling
STAT3	Nucleus, cytoplasm	Transcription factor; activated by JAK upon cytokine stimulation	JAK/STAT; IL-6/IFN-γ signaling; immune response
TBC1D19	Cytoplasm	Putative Rab-GAP	GTPase regulation
TBCEL	Cytoplasm	Tubule-like protein; regulation of microtubule dynamics	Cytoskeletal organization
THAP12	Nucleus	THAP family transcription factor	Transcription regulation
UNC5A	Cell membrane	Netrin receptor	Netrin-1/UNC5 pathway; axonal navigation

Note: predictions were filtered by iPTM ≥ 0,8 and pDockQ > 0,23. The network topology shown in Figure 4 includes secondary interaction partners retrieved from STRING v12.0 [24] to contextualize predicted interactors within established protein–protein interaction databases.

and RNF146, suggesting a role in proteasome substrate turnover and protein homeostasis; (II) signal transduction, centered on STAT3, which is a transcription factor implicated in various oncogenic processes [25]; (III) translation control, via the predicted interaction with EIF3I, a core component of the eukaryotic translation initiation factor 3 complex; and (IV) transcriptional regulation, through THAP12 and the UNC5A/NTN4 axis.

These predictions should be interpreted with appropriate caution. AlphaFold-Multimer excels at recognizing structurally plausible interfaces but cannot account for cellular concentration gradients, post-translational modifications, or competitive binding dynamics, all of which critically influence true physiological interactions [12]. Moreover, the iPTM and pDockQ thresholds employed here represent heuristic filters optimized for recall in a broad interactome screen and were not validated against a gold-standard CYP2J2 interactome. CYP2J2 has been independently shown to promote the neoplastic phenotype of carcinoma cells [25] and is increasingly recognized as a contributor to diverse pathophysiological processes [26], making the identification of its protein partners of particular interest. Nevertheless, definitive assignment requires experimental validation. We propose proximity-labeling strategies – either TurboID- or APEX2-mediated biotin labeling coupled with mass spectrometry [27, 28] – as the most direct means of confirming these predicted interactions in native cellular contexts. The obtained results

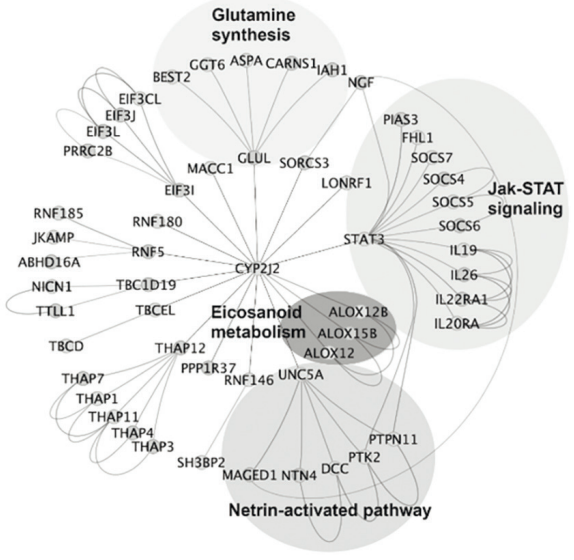


Fig. 4. Protein-protein interaction maps calculated *in silico* (primary interaction nodes are supplemented by secondary nodes)

form an informed list of priority candidates for experimental verification and indicate a possible multifunctional role of CYP2J2 in the cell, which is not limited to xenobiotic metabolism.

Conclusion. In this study, an optimized two-stage procedure for the isolation and purification of recombinant human CYP2J2 was developed, providing the production of high-purity preparations in a native catalytically active form suitable for subsequent biochemical studies and *in vitro* ligand testing. The yield of 21.5 mg/L of culture for CYP2J2 makes the developed system practically applicable for further research.

Functional characterization confirmed that the purified CYP2J2 retained native ligand-binding activity and adequately reproduced affinities known from the literature. The developed system of separation and functional testing creates a reliable basis for further screening of new compounds.

The application of the AlphaPulldown computational approach enabled the identification of 14 potential protein partners of CYP2J2, revealing an unexpected involvement of the enzyme in cellular processes beyond classical monooxygenase metabolism, including the regulation of ubiquitin-proteasome degradation, signal transduction and DNA repair. These findings suggest that CYP2J2 may play a multifunctional role in the cell, and form an informed list of priority candidates for experimental validation by proximity labeling methods.

Acknowledgements. The authors thank the staff of the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus for their assistance in performing the experiments. The study was financially supported by the State Committee on Science and Technology of the Republic of Belarus (grant X26SRBG-002).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Института биоорганической химии НАН Беларуси за помощь в проведении экспериментов. Исследование было финансово поддержано Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь (грант X26SRBG-002).

References

1. Ma H., Ning J., Ge G., Yang L., Hao D. Research progress of human cytochrome P450 2J2 and its ligands. *Yaoxue Xuebao*, 2017, vol. 52, iss. 1, pp. 26–33 (in Chinese).

2. Enayetallah A. E., French R. A., Grant D. F. Distribution of soluble epoxide hydrolase, cytochrome P450 2C8, 2C9 and 2J2 in human malignant neoplasms. *Journal of Molecular Histology*, 2006, vol. 37, iss. 3–4, pp. 133–141. https://doi.org/10.1007/s10735-006-9050-9

3. Solanki M., Pointon A., Jones B., Herbert K. Cytochrome P450 2J2: Potential Role in Drug Metabolism and Cardiotoxicity. *Drug Metabolism and Disposition*, 2018, vol. 46, iss. 8, pp. 1053–1065. https://doi.org/10.1124/dmd.117.078964

4. Yang B., Graham L., Dikalov S., Mason R. P., Falck J. R., Liao J. K., Zeldin D. C. Overexpression of cytochrome P450 CYP2J2 protects against hypoxia-reoxygenation injury in cultured bovine aortic endothelial cells. *Molecular Pharmacology*, 2001, vol. 60, iss. 2, pp. 310–320. https://doi.org/10.1124/mol.60.2.310

5. Yu Z., Huse L. M., Adler P., Graham L., Ma J., Zeldin D. C., Kroetz D. L. Increased CYP2J expression and epoxyeicosatrienoic acid formation in spontaneously hypertensive rat kidney. *Molecular Pharmacology*, 2000, vol. 57, iss. 5, pp. 1011–1020. https://doi.org/10.1016/s0026-895x(24)26512-3

6. Node K., Huo Y., Ruan X., Yang B., Spiecker M., Ley K., Zeldin D. C., Liao J. K. Anti-inflammatory Properties of Cytochrome P450 Epoxygenase-Derived Eicosanoids. *Science*, 1999, vol. 285, iss. 5431, pp. 1276–1279. https://doi.org/10.1126/science.285.5431.127

7. Spector A. A., Norris A. W. Action of epoxyeicosatrienoic acids on cellular function. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007, vol. 292, iss. 3, pp. C996–C1012. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00402.2006

8. Fer M., Dréano Y., Lucas D., Corcos L., Salaün J.-P., Berthou F., Amet Y. Metabolism of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids by recombinant human cytochromes P450. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, vol. 471, iss. 2, pp. 116–125. https://doi.org/ 10.1016/j.abb.2008.01.002

9. Zeldin D. C. Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, iss. 39, pp. 36059–36062. https://doi.org/10.1074/jbc.R100030200

10. Hashizume T., Imaoka S., Mise M., Terauchi Y., Fujii T., Miyazaki H., Kamataki T., Funae Y. Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the Metabolism of Ebastine in Human Intestinal Microsomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002, vol. 300, iss. 1, pp. 298–304. https://doi.org/https://doi.org/10.1124/jpet.300.1.298

11. Leow J. W. H., Gu Y., Chan E. C. Y. Investigating the relevance of CYP2J2 inhibition for drugs known to cause intermediate to high risk torsades de pointes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2023, vol. 187, pp. 106475. https://doi.org/10.1016/j.ejps.2023.106475

12. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., Tunyasuvunakool K. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, vol. 596, iss. 7873, pp. 583–589. https://doi.org/ 10.1038/s41586-021-03819-2

13. Zhu W., Shenoy A., Kundrotas P., Elofsson A. Evaluation of AlphaFold-Multimer prediction on multi-chain protein complexes. *Bioinformatics*, 2023, vol. 39, iss. 7, art. Btad424. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btad424

14. Zelasko S., Palaria A., Das A. Optimizations to achieve high-level expression of cytochrome P450 proteins using Escherichia coli expression systems. *Protein Expression and Purification*, 2013, vol. 92, iss. 1, pp. 77–87. https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.07.017

15. Locuson C. W., Hutzler J. M., Tracy T. S. Visible Spectra of Type II Cytochrome P450-Drug Complexes: Evidence that "Incomplete" Heme Coordination Is Common. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007, vol. 35, no. 4, pp. 614–622. https://doi.org/10.1124/dmd.106.012609

16. Omura T., Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for it hemeprotein nature. *Journal of Biological Chemistry*, 1964, vol. 239, № 7, pp. 2370–2378. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)82244-3

17. Lafite P., Dijols S., Buisson D., Macherey A.-C., Zeldin D. C., Dansette P. M., Mansuy D. Design and synthesis of selective, high-affinity inhibitors of human cytochrome P450 2J2. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, vol. 16, iss. 10, pp. 2777–2780. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.02.004

18. Zou A. P., Ma Y. H., Sui Z. H., de Montellano P. R. O., Clark J. E., Masters B. S., Roman R. J. Effects of 17-octadecynoic acid, a suicide-substrate inhibitor of cytochrome P450 fatty acid omega-hydroxylase, on renal function in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1994, vol. 268, iss. 1, pp. 474–481. https://doi.org/10.1016/s0022-3565(25)38498-3

19. Wu C. C., Gupta T., Garcia V., Ding Y., Schwartzman M. L. 20-HETE and Blood Pressure Regulation: Clinical Implications. *Cardiology in Review*, 2014, vol. 22, iss. 1, pp. 1–12. https://doi.org/10.1097/CRD.0b013e3182961659

20. Omura T., Sato R. A new cytochrome in liver microsomes. *Journal of Biological Chemistry*, 1962, vol. 237, pp. 1375–1376. https://doi.org/10.1016/0006-3002(56)90128-7

21. Jeong D., Park H.-G., Lim Y.-R., Lee Y., Kim V., Cho M.-A., Kim D. Terfenadine metabolism of human cytochrome P450 2J2 containing genetic variations (G312R, P351L and P115L). *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 2018, vol. 33, iss. 1, pp. 61–66. https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2017.10.004

22. Evangelista E. A., Kaspera R., Mokadam N. A., Jones J. P., Totah R. A. Activity, inhibition, and induction of cytochrome P450 2J2 in adult human primary cardiomyocytes. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 2013, vol. 41, iss. 12, pp. 2087–2094. https://doi.org/ 10.1124/dmd.113.053389

23. Bryant P., Pozzati G., Elofsson A. Improved prediction of protein-protein interactions using AlphaFold2. *Nature Communications*, 2022, vol. 13, iss. 1, art. 1265. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28865-w

24. Szklarczyk D., Kirsch R., Koutrouli M., Nastou K., Mehryary F., Hachilif R., Gable A. L. et al. The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Research*, 2023, vol. 51, iss. D1, pp. D638–D646. https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000

25. Jiang J.-G., Chen C.-L., Card J. W., Yang S., Chen J.-X., Fu X.-N., Ning Y.-G., Xiao X., Zeldin D. C., Wang D. W. Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors. *Cancer Research*, 2005, vol. 65, iss. 11, pp. 4707–4715. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4173

26. Leow J. W. H., Chan E. C. Y. CYP2J2-mediated metabolism of arachidonic acid in heart: A review of its kinetics, inhibition and role in heart rhythm control. *Pharmacology & Therapeutics*, 2024, vol. 258, pp. 108637. https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2024.108637

27. Hung V., Udeshi N. D., Lam S. S., Loh K. H., Cox K. J., Pedram K., Carr S. A., Ting A. Y. Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nature Protocols*, 2016, vol. 11, iss. 3, pp. 456–475. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.018

28. Cho K. F., Branon T. C., Udeshi N. D. Proximity labeling in mammalian cells with TurboID and split-TurboID. *Nature Protocols*, 2020, vol. 15, iss. 12, pp. 3971–3999. https://doi.org/10.1038/s41596-020-0399-0

Информация об авторах

Хюппенен Евгения Дмитриевна – младший научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: khuppenenevgeniya@gmail.com

Савич Анна Сергеевна – практикант. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: an.sav1298@gmail.com

Кисель Мария Сергеевна – научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: marusen.kee@gmail.com

Свирид Андрей Васильевич – кандидат химических наук, доцент, старший научный сотрудник. Институт биоорганической химии НАН Беларуси (ул. Академика В. Ф. Купревича, 5/2, 220084, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svirid@iboch.by

Information about the authors

Khyuppenen Yauhenia D. – Junior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: khuppenenevgeniya@gmail.com

Savich Anna S. – Trainee. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: an.sav1298@gmail.com

Kisel Mariya S. – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: marusen.kee@gmail.com

Svirid Andrey V. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Senior Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician V. F. Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svirid@iboch.by

ISSN 1561-8331 (Print)
ISSN 2524-2342 (Online)
УДК 577.112, 577.112.854
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-333-343

Поступила в редакцию 11.08.2026
Received 11.08.2026

M. A. Shapira[1], A. D. Miguckaya[2], V. P. Bakhir[1], D. O. Dormeshkin[1]

[1]Institute of Bioorganic Chemistry, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus
[2]Belarusian State University, Minsk, Belarus

CORRELATION ANALYSIS OF PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES REVEALS HIDDEN STRUCTURAL RELATIONSHIPS IN NANOBODIES FRAMEWORK REGIONS

Abstract. Nanobodies (VHH) – single-domain antibody fragments derived from camelid heavy-chain-only immunoglobulins – represent a rapidly expanding class of therapeutic and research tools whose unique structural properties depend on a compact immunoglobulin fold maintained in the absence of a light chain [1]. Despite the broad interest in nanobody engineering, a systematic large-scale characterization of the physicochemical principles governing their region architecture has not been performed. In the present study, a non-redundant dataset of 1 119 experimentally determined VHH structures was compiled from three open-access structural repositories and subjected to a comprehensive statistical and correlation analysis. A comparison of the framework regions and complementarity-determining regions revealed that each structural domain possesses a distinct physicochemical signature consistent with its biological role: FR1 is the most hydrophobic and aliphatic region, FR2 and FR3 exhibit the highest solubility and protein-binding potential, FR4 provides stabilization of FR1, and the CDR regions display a high variability, with CDR3 carrying a characteristic negative charge. Position-level Pearson correlation analysis identified specific residues whose amino acid properties are predictive of global region characteristics, including position 52, whose conformational propensity correlates significantly with the CDR3 length. Interpositional distance correlation analysis further revealed long-range co-variation networks that persist after removal of direct structural contacts, forming compact spatial clusters within the VHH beta-sandwich. These findings demonstrate that the VHH structural integrity is maintained through coordinated physicochemical adaptation across multiple framework positions and provide a data-driven basis for further rational nanobody scaffold engineering and synthetic library design.

Keywords: VHH, physicochemical analysis, structural bioinformatics

For citation. Shapira M. A., Miguckaya A. D., Bakhir V. P., Dormeshkin D. O. Correlation analysis of physicochemical properties reveals hidden structural relationships in nanobodies framework regions. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2026, vol. 62, no. 4, pp. 333–343 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-333-343

М.А. Шапіра[1], А.Д. Мігуцкая[2], В.П. Бахір[1], Д.А. Дармешкін[1]

[1]Інстытут біярганічнай хіміі Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі, Мінск, Беларусь
[2]Беларускі дзяржаўны ўніверсітэт, Мінск, Беларусь

КАРЭЛЯЦЫЙНЫ АНАЛІЗ ФІЗІКА-ХІМІЧНЫХ УЛАСЦІВАСЦЕЙ, ЯКІ ВЫЯЎЛЯЕ СХАВАНЫЯ СТРУКТУРНЫЯ СУВЯЗІ Ў КАРКАСНЫХ РЭГІЁНАХ НАНАЦЕЛ

Анатацыя. Нанацелы (VHH) – аднадаменавыя фрагменты антыцелаў, атрыманыя з цяжкаланцуговых імуноглабулінаў вярблюдавых, – прадстаўляюць хутка пашыраемы клас тэрапеўтычных і даследчых інструментаў, унікальныя структурныя ўласцівасці якіх абумоўлены кампактным фолдам імуноглабуліну, які захоўваецца ў адсутнасць лёгкага ланцуга [1]. У дадзенай рабоце з трох агульнадаступных структурных рэпазіторыяў быў сфарміраваны набор з 1 119 эксперыментальна вызначаных структур VHH, які прайшоў комплексны статыстычны і карэляцыйны аналіз. Параўнанне каркасных абласцей (FRs) і абласцей, якія вызначаюць камплементарнасць (CDRs), паказала, што кожны структурны дамен валодае ўласцівым яму фізіка-хімічным профілем, які адпавядае яго біялагічнай функцыі: FR1 з'яўляецца найбольш гідрафобнай і аліфатычнай вобласцю, FR2 і FR3 вызначаюцца найвышэйшай растваральнасцю і патэнцыялам звязвання бялкоў, FR4 забяспечвае стабілізацыю FR1, тады як CDR-вобласці характарызуюцца высокай зменлівасцю, прычым CDR3 нясе характэрны адмоўны зарад. Карэляцыйны аналіз Пірсана на ўзроўні асобных пазіцый выявіў канкрэтныя рэшткі, уласцівасці амінакіслот якіх прадказваюць глабальныя характарыстыкі даменаў; у прыватнасці, пазіцыя 52 дэманструе значную карэляцыю з даўжынёй CDR3. Аналіз міжпазіцыйных дыстанцыйных карэляцый дадаткова выявіў залежнасці, якія захоўваюцца пасля выняцця прамых структурных кантактаў і ўтвараюць кампактныя прасторавыя кластары ў межах β-структуры VHH. Атрыманыя вынікі сведчаць аб тым, што структурная суцэльнасць VHH падтрымліваецца дзякуючы скаардынаванай фізіка-хімічнай адаптацыі шматлікіх каркасных пазіцый, і фарміруюць грунт для рацыянальнай інжынерыі сінтэтычных бібліятэк.

Ключавыя словы: VHH, фізіка-хімічны аналіз, структурная біяінфарматыка

Для цытавання. Карэляцыйны аналіз фізіка-хімічных уласцівасцей, які выяўляе схаваныя структурныя сувязі ў каркасных рэгіёнах нанацел / М. А. Шапіра, А. Д. Мігуцкая, В. П. Бахір, Д. А. Дармешкін // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2026. – Т. 62, № 4. – С. 333–343 https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-333-343

Introduction. Nanobodies, also referred to as VHH domains, are the antigen-binding fragments of the heavy-chain-only antibodies naturally produced by members of the family *Camelidae* and certain cartilaginous fishes [2]. Unlike conventional immunoglobulins, camelid heavy-chain antibodies lack an associated light chain, and their single variable region is sufficient for high-affinity, high-specificity antigen recognition. This structural autonomy confers several practically important properties: nanobodies are approximately ten times smaller than conventional IgG molecules, exhibit high thermal and chemical stability, are readily expressed in microbial systems, and retain their function under conditions that would denature conventional antibody fragments. These characteristics have driven their adoption across therapeutic development, molecular imaging, structural biology, and biosensor design, and a growing number of nanobody-based therapeutics have entered clinical evaluation [3].

The structural basis of VHH stability and antigen-binding diversity has been the subject of considerable investigation. The immunoglobulin fold of the VHH region is organized into four framework regions (FR1-FR4) that form the conserved beta-sandwich scaffold, and three complementarity-determining regions (CDR1-CDR3) that project from the scaffold surface to form the paratope [4]. Several hallmark positions within the framework – most notably the substitutions at positions 37, 44, 45, and 47 (the IMGT numbering scheme was applied throughout the study) that replace the canonical VH-VL interface residues – are well characterized as necessary adaptations to the absence of a light-chain partner [5]. CDR3 in VHH regions is typically longer than its conventional VH counterpart and frequently folds back over the framework scaffold, where it interacts with FR2 residues and contributes additional contacts that compensate for the missing light chain [1].

Such a description is of direct practical value. Rational engineering of VHH scaffolds for improved stability, altered biophysical properties, or expanded library diversity requires knowledge not only of which positions are conserved and why, but also of which non-conserved positions are functionally coupled and must therefore be treated as coordinated units during mutagenesis. Existing analyses have largely focused on sequence conservation, hallmark position identity, and structural classification of CDR3 conformations. A systematic statistical examination of physicochemical descriptors across structural regions, and particularly the analysis of long-range interpositional co-variation that persists after the removal of direct physical contacts, has not been reported for a large non-redundant VHH dataset.

In the present study, we address this gap by constructing a curated non-redundant database of 1 119 VHH structures drawn from three complementary structural repositories and performing a layered statistical analysis. We characterize the physicochemical profile of each structural region using six regional descriptors, identify specific positions whose amino acid properties drive regional characteristics through Pearson correlation analysis, and apply a permutation-based distance correlation protocol to detect long-range interpositional dependencies that reflect coordinated evolutionary adaptation. The results provide a comprehensive statistical map of the VHH domain and establish a quantitative foundation for structure-guided nanobody engineering.

Materials and methods. *Database construction*. Structural data were obtained from three open-access repositories: SAbDab (Structural Antibody Database [6]), NAStructuralDB (Natural Antibody Structural Database [7]), and SNAC-DB (Structural Nanobody Antigen Complex Database [8]). A total of 21 686 structural entries were retrieved from SAbDab, including full-length antibodies, VHH, scFv, Fab, and isolated V_H and V_L regions. All available entries from NAStructuralDB were retrieved, comprising 2 678 nanobody–antigen complexes and 4 160 single-chain VHH structures. In addition, all single-chain VHH and nanobody–antigen complex structures available in SNAC-DB were included.

For each entry, the atomic coordinates and associated metadata were extracted from the PDB files and corresponding summary tables. The collected data included atomic coordinates, amino acid sequences, IMGT-based sequence annotations, structural descriptions, and source information.

Chain identities and sequence integrity were validated using ANARCI (Antibody Numbering and Antigen Receptor Classify) *in silico* [9].

Sequence redundancy was removed using CD-HIT [10] with a 95 % sequence identity threshold, yielding a non-redundant dataset of 5 885 structures. Subsequent filtering for the VHH domains resulted in a final dataset of 1 119 unique structures.

Region annotation. Nanobody structures were divided into framework regions (FRs) and complementarity-determining regions (CDRs). The standardized IMGT numbering system was applied throughout the study for sequence annotation, structural analysis, and comparison of nanobody regions.

Primary structure analysis. Aromaticity was defined as the fraction of aromatic residues (phenylalanine, tryptophan, and tyrosine) within the analyzed region.

The aliphatic index (AI) was calculated according to Equation 1:

$$AI = (A + 2.900 \times V + 3.900 \times (I + L)) \times 100, \quad (1)$$

where *A*, *V*, *I*, and *L* represent the fractions of alanine, valine, isoleucine, and leucine, respectively. Higher *AI* values (> 80–100) are associated with increased protein thermostability and hydrophobicity, whereas values below 70 indicate greater structural flexibility and lower thermal stability [11]. For short peptide fragments, the AI was interpreted primarily as a measure of local hydrophobicity and aggregation propensity.

Net charge was calculated at pH 5.0, 7.4, and 9.0 using the ProteinAnalysis class implemented in Biopython (hereinafter – v. 1.76). The total charge was determined by summing the contributions of ionizable amino acid residues according to their predicted protonation states.

The Grand Average of Hydropathy (GRAVY) index was calculated as the mean Kyte–Doolittle hydropathy score across all residues in the analyzed region.

The instability index was determined from dipeptide composition using the Biopython implementation; values below 40 were considered indicative of protein stability [12].

The Boman index was computed using the Peptides Python library (v. 0.5.0). This parameter reflects the average solvation free energy of amino acid side chains, with values > 2.480 indicating a high binding potential and hydrophilicity, whereas negative values indicate predominantly hydrophobic regions [13].

Applied descriptors. The set of descriptors applied to the VHH domains is listed above. For individual residues, a list of 669 available descriptors was used during the position analysis [14]. This constituted a table in which each of the 20 possible amino acids was assigned a specific value for each property. These properties were pre-grouped into clusters covering hydrophobicity, structural propensity, volume, polarity, solvation, flexibility, conformational preferences, thermodynamic properties, contact energies, mutability, linker propensity, membrane association, and substitution matrices.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed to identify significant differences between the structural regions (FR1–FR4 and CDR1–CDR3) and to evaluate correlations between the calculated physicochemical descriptors. All data processing and statistical testing were conducted in Python using the scipy.stats (v. 1.18.0) and statsmodels (v. 0.14.6) libraries.

The normality of each numerical parameter (aromaticity, aliphatic index, net charge, GRAVY index, instability index, and Boman index) across the seven structural regions was assessed using the Shapiro–Wilk test. Since most distributions significantly deviated from normality ($p < 0.050$), non-parametric statistical methods were applied.

Differences among the seven regions were evaluated using the Friedman test, which is a non-parametric alternative to repeated-measures ANOVA. Significant results ($p < 0.050$) were followed by pairwise comparisons using two-tailed Wilcoxon signed-rank tests across all 21 possible region pairs. Multiple testing correction was performed using the Bonferroni method, resulting in an adjusted significance threshold of $\alpha = 0.050/21.00 \approx 0.00238$. Differences were considered statistically significant at $p < 0.00238$.

Associations between the physicochemical descriptors (e. g., hydrophobicity and aliphatic index) were assessed using Kendall's rank correlation coefficient (τ). Kendall's τ was selected as a robust non-parametric measure suitable for the outlier-resistant analysis of monotonic relationships. The correlation significance was evaluated at $\alpha = 0.050$.

Pearson correlation analysis. To identify residue-level physicochemical determinants underlying the structural region properties, Pearson correlation coefficients (r) were calculated between position-specific amino acid descriptors and aggregated regional characteristics.

A vectorized parallel processing pipeline was implemented in Python to enable a large-scale analysis across all structures, amino acid properties, and regional metrics. The sequence-position matrices (669 properties per position) and regional property tables were indexed by unique antibody object identifiers and pre-grouped according to the IMGT positions and structural regions. Correlation matrices were calculated using vectorized column-wise operations (pandas. corrwith).

The statistical significance of the Pearson correlation coefficients was assessed using a two-tailed Student's *t*-test (equation 2) under the null hypothesis of no correlation ($H_0 : \rho = 0$):

$$t = (r\sqrt{(n-2)}) / \sqrt{(1-r^2)}\,, \tag{2}$$

where r is the Pearson correlation coefficient, and n is the number of paired observations with non-null values. The resulting t-statistic was used to calculate two-tailed p-values from the cumulative t-distribution.

Entries lacking defined sequence positions were excluded from the analysis. To focus on biologically relevant associations, only strong correlations ($|r| \geq 0.500$) were initially retained. To correct for multiple testing, a group Bonferroni correction (equation 3) was applied within each amino acid property group:

$$p_adj = \min(p_pearson \times M_g, 1.0)\,, \tag{3}$$

where M_g represents the total number of tested positions for a given property group. Correlations with adjusted significance values of $p_adj < 0.05$ were considered statistically significant.

To minimize potential bias from low sample sizes, candidate correlations were stratified into high-confidence ($n > 30$) and exploratory ($n < 30$) groups before ranking.

Distance correlation analysis. To rigorously validate non-random co-variation and spatial-functional dependencies between sequence alignment positions (pos_i and pos_j), a high-performance permutation protocol was implemented. Position-specific physicochemical profiles were standard-scaled across valid antibody structures ($mean = 0$, $\sigma = 1$), and pairwise feature divergence was quantified via Euclidean distance. First, to construct the empirical null distribution (H_0) for all objects, their indices of position j were randomly permuted across 10 iterations while keeping position i fixed. For each object, position j was permuted within the fixed set of amino acids to speed up the calculations.

Empirical p-values (equation 4) and standardized effect sizes (Z-scores) were derived as follows:

$$p = \frac{\sum(\left|d_{shuffled} - \mu_{shuffled}\right| \geq \left|d_{real} - \mu_{shuffled}\right|) + 1}{N_{perm} + 1}, \tag{4}$$

$$Z = \frac{d_{real} - \mu_{shuffled}}{\sigma_{shuffled}}. \tag{5}$$

Subsequently, the results of this rapid, approximate test were filtered based on a Z-score > 3.0 and an adjusted p-value > 0.050. The remaining pairs were then subjected to further permutation testing – specifically, 1 000 permutations per pair. In this step, position j was permuted, thereby preserving position-specific amino acid frequencies while systematically disrupting inter-positional associations.

Multiple hypothesis testing across all evaluated position-descriptor pairs was controlled using the Benjamini–Hochberg False Discovery Rate (FDR) procedure ($p_{fdr} < 0.050$). To reduce feature redundancy inherently present in biological descriptor databases, individual amino acid properties were mapped to higher-level functional clusters. Pairwise links were deduplicated by retaining exclusively the maximum effect-size edge (Z-score) per unique cluster-position pair (pos_i, $cluster_i$) ↔ (pos_j, $cluster_j$).

All obtained data were filtered by Z-score > 2, correlations between positions that usually have physical interactions in structures or have one common "neighbor" were also eliminated. For each residue, the total amount of correlations (by higher-level functional clusters) and the number of correlated positions were collected. The normalized interaction index was obtained by dividing the total number of correlations by the number of correlated positions.

Results and discussion. *Statistical analysis of* the *VHH domain properties*. During the analysis of the basic chemical and physical descriptors of the antibody structural regions we have found that among the VHH framework regions, FR1 exhibited the most pronounced hydrophobic and aliphatic character, with significantly higher GRAVY index (0.273 ± 0.210) and aliphatic index (100.720 ± 9.950) values compared to other regions. At the same time, it is strikingly low in aromatic residues (aromaticity index of 0.002 ± 0.009). That is well described by the enrichment of FR1 in aliphatic residues (*A*, *V*, *I*, *L*). Such an amino acid composition also explains the lowest Boman index (0.612±0.323) and the highest instability index (62.660 ± 13.300) values. Nevertheless, the instability of FR1 is well balanced by the other frameworks. Especially by FR4 (instability index –15.570 ± 11.240), which is indirectly but clearly confirmed by the high stability of VHH molecules in solution.

The FR2 and FR3 regions are notably less aliphatic compared to FR1 (46.620 ± 15.440 and 62.900 ± 6.910, respectively). At the same time, both have an average aromaticity (0.147 ± 0.034 and 0.139 ± 0.019, respectively) that is higher than that of FR1 but lower than in the CDR regions. For FR2, it is primarily explained by the hallmark positions: 42 (where F/Y account for 89.2 %), 49, 50 and 52 (where F/W/Y account for 51.7 %), that are crucial for the antibody architecture. This pattern is consistent with the tight packing of FR2 and FR3 within the VH/VL interface, where aromatic side chains frequently contribute to hydrophobic stabilization and interdomain complementarity [15]. Thus, the observed physicochemical profiles of FR2 and FR3 likely reflect structural constraints imposed by their role in forming the VH/VL interface rather than CDR-like functional diversification. Also, position 41 is strictly conserved as an aromatic residue (*W* 99.9 %, *Y* 0.01 %). In FR3, the key structural positions are 66, 67, 76, 88, 102, and 103. Despite the significant number of positions listed, their contribution is distributed across the sequence of FR3, which represents the longest region of the VHH domain (average length of 37.940 ± 0.660 AA). At the same time, positions 67, 76, and 102 display their side chains inside the protein globule and form a single spatial cluster, interacting with each other and contributing to the protein fold. Residue 103 frequently interacts with CDR3 and is highly conserved (*Y* 90.7 %). Only positions 66 and 88 are exposed to the solvent and are not involved in structure stabilization. While position 66 has wide amino acid variability, position 88 is quite conserved (*Y* 87.2 %). The reason for such conservation is still unclear. These characteristics do not contradict the high Boman index values of FR2 (2.085 ± 0.538) and FR3 (2.273 ± 0.296). On the one hand, these two regions are the key elements determining protein folding, and their protein-protein interaction potential must be high enough to ensure the binding of all other VHH domains. On the other hand, the Boman index is calculated by summing the free energies of transfer from cyclohexane to water for each amino acid side chain; therefore, it indirectly describes the solubility of the peptide. Nevertheless, it also does not contradict the physicochemical principles (expected physical behavior), as FR2 and FR3 contain many hydrophilic amino acids. Thus, FR2 and FR3 GRAVY index values are –0.713 ± 0.276 and –0.627 ± 0.152 respectively (the lowest among all other regions), which describes them as soluble protein regions. Another notable characteristic of FR2 is its average charge at pH 7.4. It is the only framework region that has a positive charge (0.52 ± 0.775) at the physiological pH, while all other framework regions have a slightly negative or close-to-zero charge. At the same time, all CDRs have a negative charge (it seems to be a characteristic property of CDRs), but CDR3 has the lowest charge (–0.820 ± 1.528). These properties facilitate the interaction between CDR3 and FR2, thereby compensating for the absence of the light chain.

FR4, which is the shortest (10.690 ± 0.830 AA) framework region, has an average aliphatic index value (57.560 ± 12.760) and a low aromaticity (0.087 ± 0.031). Along with a low Boman index value (0.917 ± 0.513), these characteristics highlight its main function – the stabilization of FR1, to which it is spatially close.

Because of the high sequence variability of the CDRs, most of the statistical analyses performed were not sufficiently informative for this region. Aside from the CDR3 charge, the only exception was the CDR2 instability index (24.860 ± 36.863), which showed a statistically significant difference (p-value < 0.05) and seems to be of interest. Such a value of the instability index is surpassed only by that of FR4, and as FR4 is spatially located next to FR1, this suggests that CDR2 All the obtained data are illustrated in Figure 1.

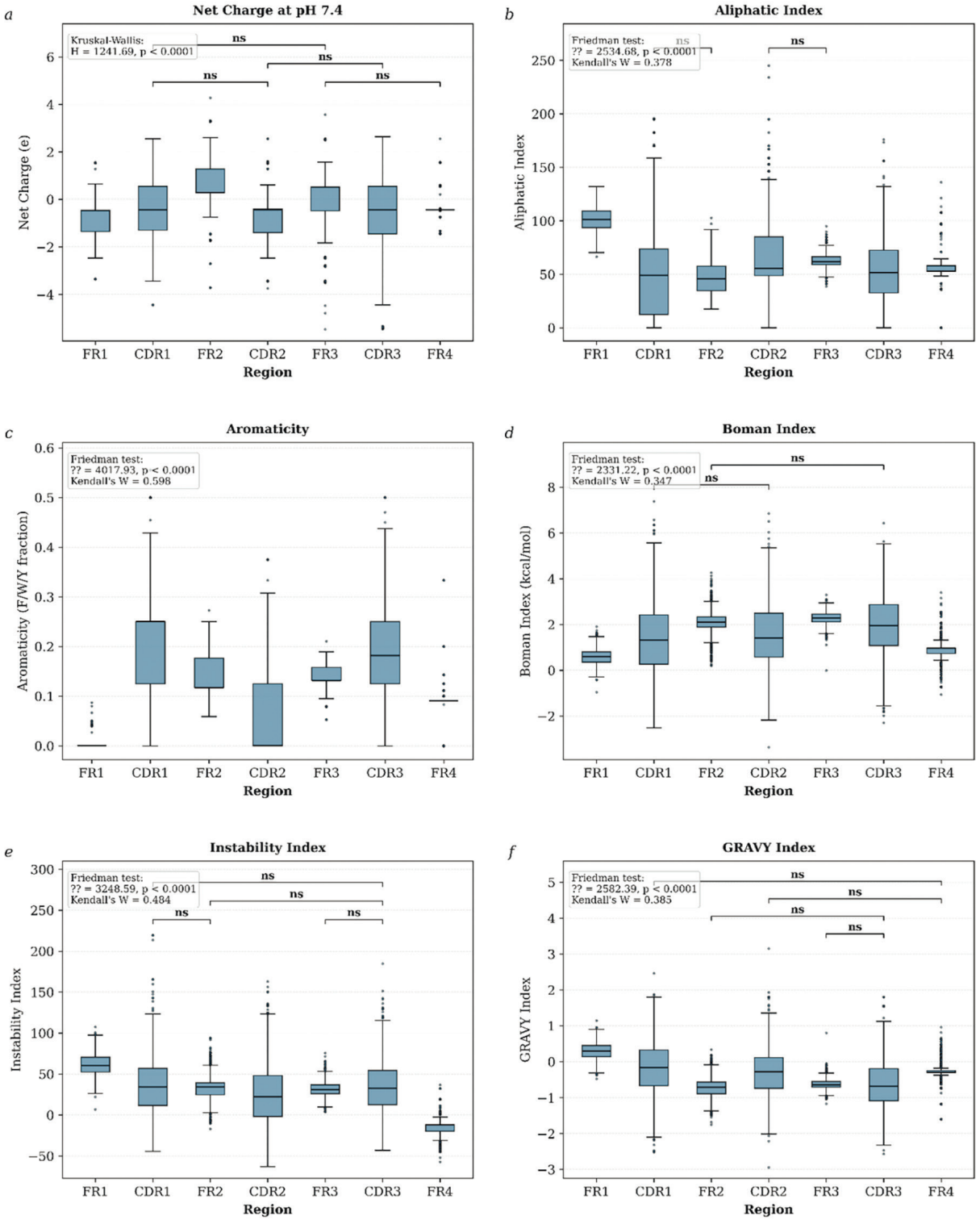


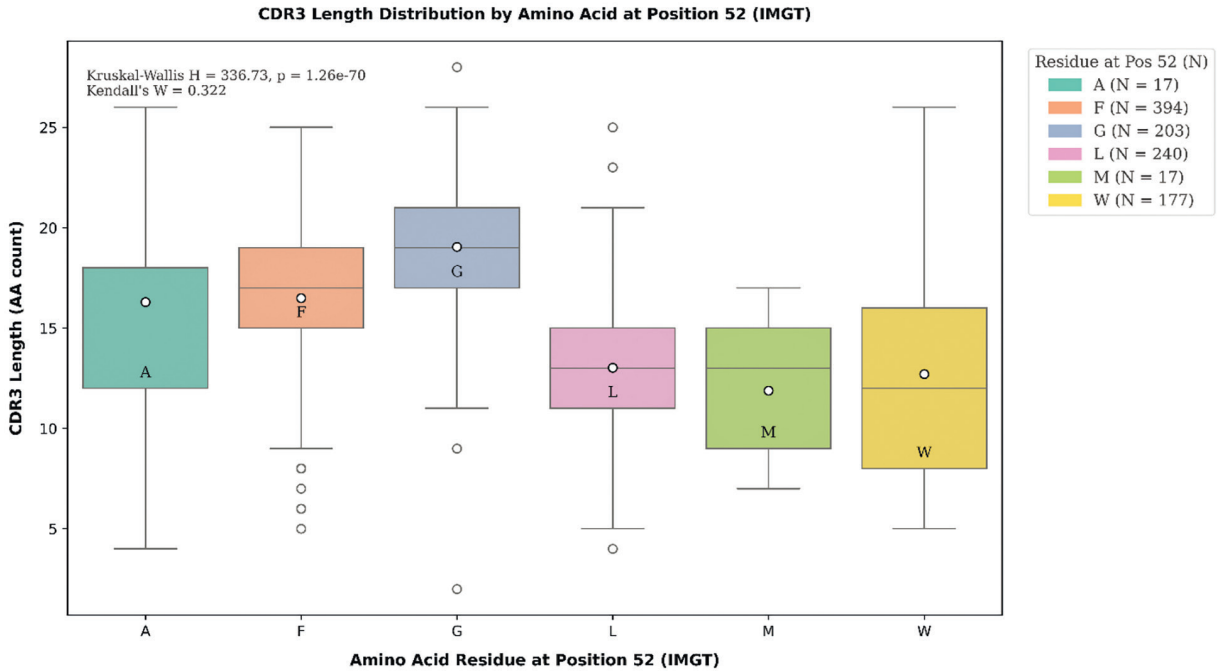
Fig. 1. Statistical evaluation of VHH domain physicochemical descriptors. Comparison across the framework regions (FR1–FR4) and CDRs of: (*a*) the net charge distribution at physiological pH 7.4, (*b*) the aliphatic index, (*c*) the aromaticity, (*d*) the Boman index, (*e*) the instability index, and (*f*) the GRAVY index. Only statistically insignificant correlations are displayed in the graphs; the absence of brackets indicates a statistically significant difference ($p < 0.050$)

All hallmark positions demonstrated moderate ($r > 0.500$) to strong ($r > 0.750$) correlations with several FR2-associated characteristics. Among these, the strongest correlation ($r = 0.540$) was observed for hallmark position 52, described by the "Normalized frequency of turn in all-alpha class (PALJ8101)"

descriptor [22] and the CDR3 length (Figure 2). This descriptor reflects the statistical propensity of amino acids to adopt turn or loop conformations. Although VHH position 52 resides within a β-strand adjacent to the CDR3 loop, its turn-propensity metric may indicate an increased likelihood of local β-sheet destabilization, thereby facilitating conformational deviation from the canonical β-architecture. Given that position 52 is highly variable and located in direct spatial proximity to CDR3, an influence on certain CDR3 structural properties is plausible. Another mechanistic interpretation is that variation at position 52 may modulate the elevation or orientation of the β-hairpin formed by positions 44–50 relative to the FR2 β-sheet plane, potentially affecting hairpin–antigen interactions.

The next notable association involves position 58, located within CDR2, which exhibits a moderate negative correlation with the aromaticity of the entire CDR2 region (r = –0.55; descriptor "AA composition of total proteins» (NAKH9001)"[23]). Although aromatic residues occupy position 58 considerably more frequently (22.6 %) than their average abundance in proteins (8.32 %) [24], the observed negative correlation indicates that the physicochemical profile of this position does not simply follow the overall aromatic character of CDR2. Instead, the relationship suggests that variation at position 58 is coordinated with changes in regional aromaticity, potentially reflecting compensatory constraints within the loop.

Analysis of the FR4 region identified residue 118 as the most prominent position. It has high r-value correlations with multiple FR4-related properties. However, the invariant presence of tryptophan at position 118 (90.8 %) at the FR4 boundary is widely recognized as essential for stabilizing the β-sheet core structure of the immunoglobulin fold. Moreover, its universal prevalence in functional repertoires largely reflects germline inheritance and evolutionary conservation rather than post-recombination selection for specific physicochemical properties.



p_adj	F	G	L	M	W
A	ns	0.159	0.050*	0.085	0.074
F	-	3.5e-16*	8.1e-31*	2.9e-05*	5.7e-20*
G	-	-	6.5e-48*	1.5e-08*	7.0e-33*
L	-	-	-	ns	ns
M	-	-	-	-	ns
W	-	-	-	-	-

Fig. 2. CDR3 length distribution by amino acids at position 52. The p-values of the pairwise comparison are presented in the table below

During *V*(*D*)*J* recombination, the RAG1/2 recombinase recognizes and cleaves the DNA exclusively at the conserved recombination signal sequences (RSSs), independently of the downstream coding sequence and its encoded amino acids [25, 26]. Subsequent processing of the coding ends by the non-homologous end joining (NHEJ) machinery, together with the terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), generates extensive junctional diversity through nucleotide trimming and non-templated nucleotide addition [27]. However, because these modifications are largely confined to the immediate coding ends, the highly conserved TGG codon encoding *W*118 within the germline IGHJ segment is generally preserved, maintaining this characteristic residue in the mature antibody repertoire [26].

Interposition correlation analysis. Not only can position-region correlation be useful for mining nonobvious structural features. During the interpositional correlation analysis, several positions influencing other structures were selected based on having the highest correlation coefficients (Figure 3).

Thus, Figure 4 demonstrates the strongest interpositional correlation networks identified for the selected framework residues from Cluster 3 as those with the highest interaction index. Despite the exclusion of direct physical contacts and neighboring residues during data processing, the correlated positions are not randomly distributed throughout the VHH structure. Instead, they form compact spatial clusters combined according to their spatial proximity, indicating that the detected associations reflect coordinated structural modules rather than isolated residue-residue interactions.

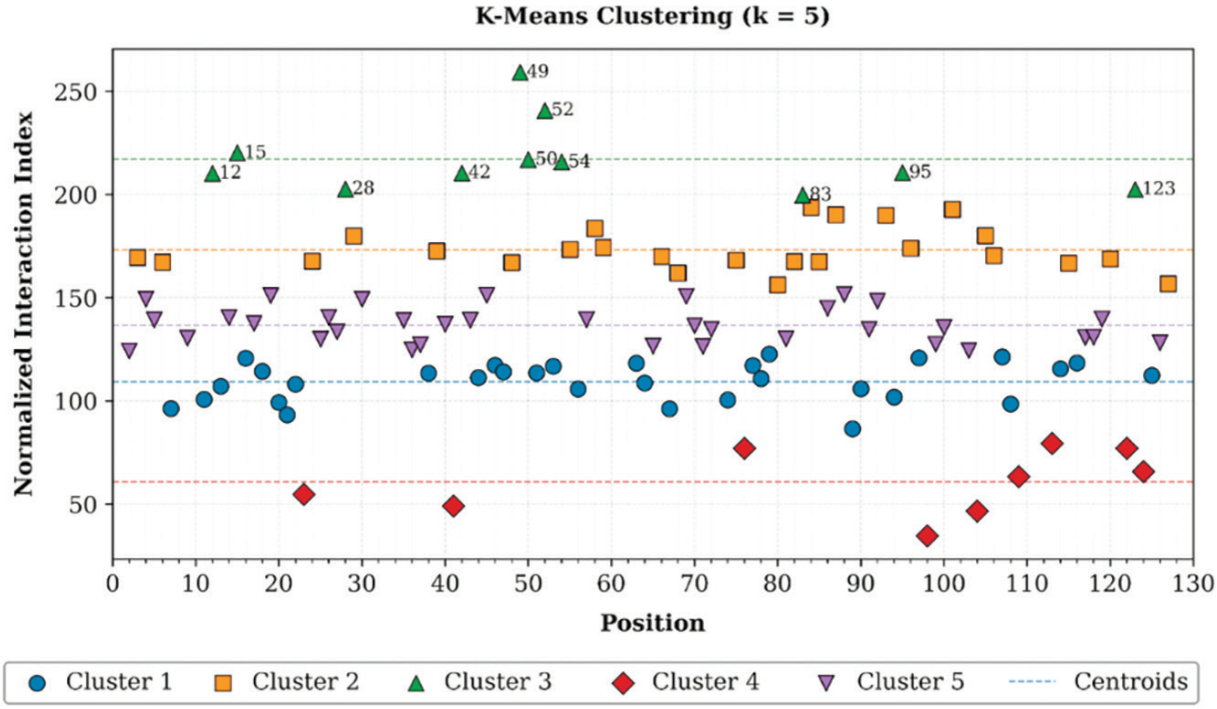


Fig. 3. Results of k-means clustering of the normalized interaction index for VHH positions. Cluster 3 was chosen for further analysis. Hallmark positions were excluded from the analysis, as modifications at these sites must be approached with caution

The most extensive network was observed for positions 13 and 123 (Figure 4, *a*).

Although these residues are located at the opposite termini of the VHH sequence, they occupy the framework scaffold and are spatially positioned beneath one face of the β-sandwich. The most strongly correlated positions (49–50, 83–84, and 115–116) are concentrated within specific structural regions rather than around the highlighted residues themselves. This pattern suggests that variability at positions 13 and 123 is associated with coordinated physicochemical adaptation across an entire framework surface instead of being limited to local structural contacts. Such behavior is consistent with their potential role as scaffold anchor residues contributing to the maintenance of the global architecture of the immunoglobulin fold.

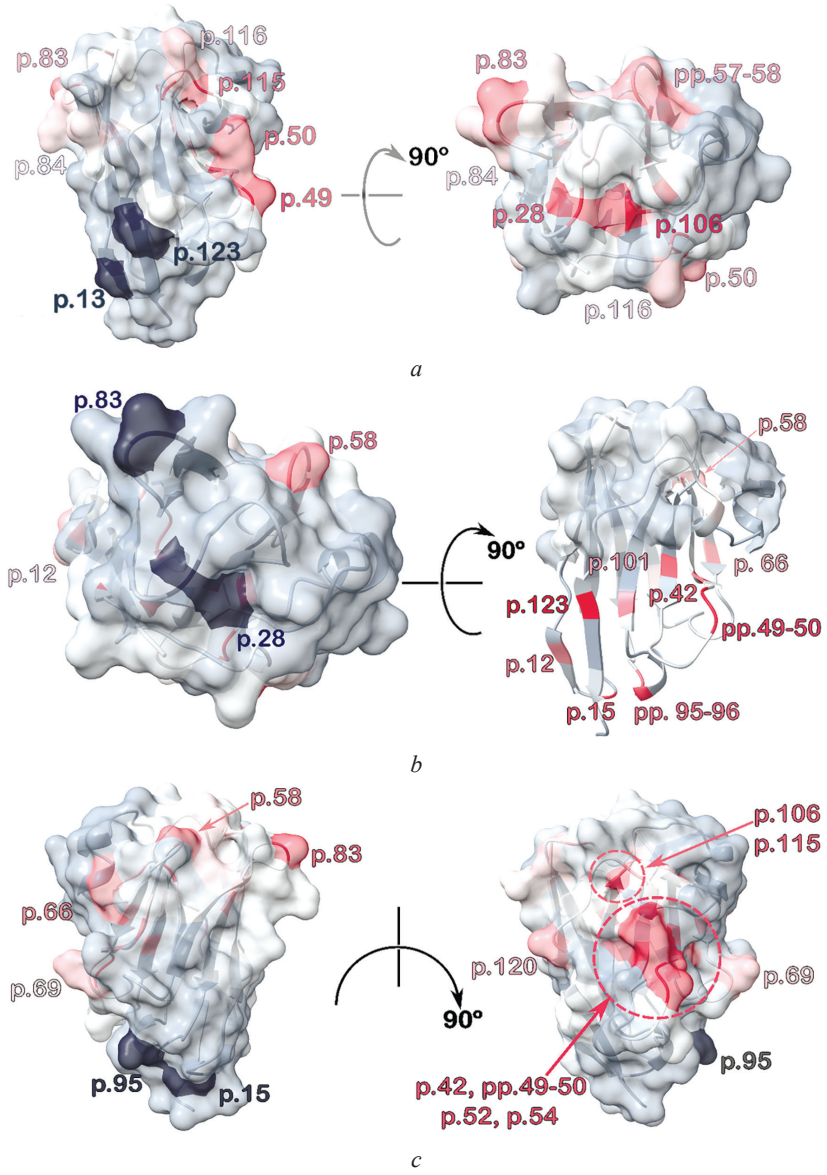


Fig. 4. The most significant correlations between positions from Cluster 3 (pointed black) with other positions. Color scale representing normalized interaction index from the lowest (gray) to intermediate (white) and highest (red): *a* – positions 13 and 123, *b* – positions 28 and 83, *c* – positions 15 and 95. The color saturation of the labels corresponds directly to the correlation level. VHH domain structure with PDB ID 1f2x was used as a template

In contrast, the networks centered on positions 28 and 83 (Figure 4, *b*) and positions 15 and 95 (Figure 4, *c*) exhibit a more localized organization. In both cases, the majority of highly correlated residues occupy compact structural neighborhoods within a β-sandwich, with pronounced enrichment around positions 42, 49–54, and 106–115. Although these residues are distant in the primary sequence, they converge into spatially continuous patches in the folded protein. The recurrence of these regions across independent correlation networks suggests that they represent structurally coordinated modules that accommodate physicochemical variation while preserving the integrity of the VHH framework.

Collectively, these observations indicate that the proposed statistical approach reconstructs higher-order evolutionary relationships rather than direct residue-residue interactions. The emergence of well-defined structural clusters after removing neighboring contacts implies that long-range compensatory dependencies are embedded within the VHH scaffold. Such dependencies likely reflect the coordinated adaptation of physicochemical properties that preserves β-sandwich geometry and provides structural support for the highly variable antigen-binding loops.

Conclusions. In this study, we performed a comprehensive statistical analysis of a non-redundant dataset of 1 119 experimentally determined VHH structures to identify the physicochemical principles underlying nanobody architecture. A comparison of the framework and complementarity-determining regions demonstrated that each structural domain possesses a distinct physicochemical profile closely related to its biological function. FR1 was identified as the most hydrophobic and aliphatic region, whereas FR2 and FR3 exhibited the highest protein-binding potential and solubility, consistent with their central role in maintaining the immunoglobulin scaffold. In contrast, the CDR regions displayed substantially greater variability, with CDR3 distinguished by its characteristic negative charge, suggesting a previously underappreciated contribution of electrostatic interactions to the stabilization of the heavy-chain-only antibody architecture.

Residue-level correlation analysis further demonstrated that global regional properties are governed by a relatively small number of structurally important positions. Several hallmark framework residues were found to correlate with regional physicochemical characteristics, while position 52 exhibited significant associations with the CDR3 length and other structural features. These findings indicate that local amino acid composition contributes not only to immediate structural stability but also to the modulation of distant functional regions.

The interpositional correlation analysis revealed an additional level of structural organization that cannot be explained by direct residue contacts alone. After removing neighboring residues and local interaction effects, the correlated positions remained organized into compact spatial clusters within the VHH domain fold. Rather than forming isolated residue pairs, the identified framework positions acted as hubs linking multiple distant regions of the β-sandwich. This observation suggests the existence of long-range compensatory relationships that preserve the physicochemical balance and mechanical integrity of the immunoglobulin scaffold during sequence variation.

Collectively, these findings demonstrate that the statistical analysis of large structural datasets can recover a biologically meaningful organization beyond conventional conservation or contact analyses. The presented approach identifies framework residues that participate in coordinated evolutionary adaptation and highlights structural modules that are likely to contribute to nanobody stability while accommodating extensive diversity within antigen-binding loops. These results provide a data-driven foundation for the rational engineering of VHH scaffolds and may facilitate the design of synthetic nanobody libraries with improved stability and functional diversity.

Acknowledgements. The authors thank the staff of the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus for their assistance in performing the experiments. This study was financially supported by the State Committee on Science and Technology of the Republic of Belarus (grants B26BF-012 and X25U-006).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам Института биоорганической химии НАН Беларуси за помощь в проведении экспериментов. Работа была финансово поддержана Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь (гранты B26BF-012 и X25U-006).

References

1. Mullin M., McClory J., Haynes W., Grace J., Robertson N., van Heeke G. Applications and challenges in designing VHH-based bispecific antibodies: leveraging machine learning solutions. *mAbs*, 2024, vol. 16, no. 1, art. 2341443. https://doi.org/10.1080/19420862.2024.2341443

2. Ye Z., Li X., Zhan M. Nanobodies as next-generation targeting platforms: From discovery technologies to translational biomedicine. *VIEW*, 2026, art. 20260027. https://doi.org/10.1002/VIW.20260027

3. Steeland S., Vandenbroucke R. E., Libert C. Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies. *Drug Discovery Today*, 2016, vol. 21, no. 7, pp. 1076–1113. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.04.003

4. Evers A., Guarnera E., Pekar L., Zielonka S. From discovery to the clinic: structural insights, engineering options, clinical, and "next wave" applications of camelid-derived single-domain antibodies. *mAbs*, 2025, vol. 17, no. 1, art. 2583210. https://doi.org/10.1080/19420862.2025.2583210

5. Wang X., Zhang L., Zhang Y., Li J., Xu W., Zhu W. Distinct types of VHHs in Alpaca. *Frontiers in Immunology*, 2024, vol. 15, art. 1447212. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1447212

6. Capel H. L., Vavourakis O., Williams B. H., Taylor C. R., Deane C. M. SAbDab2: The structural antibody database in the age of machine learning. SAbDab2. *bioRxiv* [preprint], 2026. https://doi.org/10.64898/2026.06.16.732554

7. Chomicz D., Dudzic P., Wrobel S., Gawlowski T., Demharter S., Spreafico R., Minoux H., Phillips A., Krawczyk K. NAStructuralDB : structural database to facilitate computational studies of molecular modeling and recognition of proteins with special focus on antibody–antigen interactions. *mAbs*, 2026, vol. 18, no. 1, art. 2630438. https://doi.org/10.1080/1942086.2026.2630438

8. Gupta A., Rivero B. M., Li R., Roel-Touris J., Nanfack Y. F., Wendt M., Qiu Y., Furtmann N. SNAC-DB: An ML-Ready Database for Antibody and NANO-BODY® VHH–Antigen Complexes with Expanded Structural Diversity and Real-World Benchmarking. SNAC-DB. *Protein Science*, 2026, vol. 35, no. 7, e70655. https://doi.org/10.1002/pro.70655

9. Dunbar J., Deane C. M. ANARCI: antigen receptor numbering and receptor classification. *Bioinformatics*, 2016, vol. 32, no. 2, pp. 298–300. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv552

10. Li W., Godzik A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 2006, vol. 22, no. 13, pp. 1658–1659. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158

11. Ikai A. Thermostability and Aliphatic Index of Globular Proteins. *The Journal of Biochemistry*, 1980, vol. 88, no. 6, pp. 1895–1898, https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133168

12. Kyte J., Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 1982, vol. 157, no. 1, pp. 105–132. https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0

13. Boman H. G. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine*, 2003, vol. 254, no. 3, pp. 197–215. https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2003.01228.x

14. Kawashima S., Kanehisa M. AAindex: amino acid index database. *Nucleic Acids Research*, 2000, vol. 28, no. 1, art. 374. https://doi.org/10.1093/nar/28.1.374

15. Seidler C. A., Spanke V. A., Gamper J., Bujotzek A., Georges G., Liedl K. R. Data-driven analyses of human antibody variable domain germlines: pairings, sequences and structural features. *mAbs*, 2025, vol. 17, no. 1, art. 2507950. https://doi.org/10.1080/19420862.2025.2507950

16. Rackovsky S., Scheraga H. A. Differential Geometry and Polymer Conformation. 2. Development of a Conformational Distance Function. *Macromolecules*, 1980, vol. 13, no. 6, pp. 1440–1453. https://doi.org/10.1021/ma60078a017

17. Rackovsky S., Scheraga H. A. Differential geometry and polymer conformation. 4. Conformational and nucleation properties of individual amino acids. *Macromolecules*, 1982, vol. 15, no. 5, pp. 1340–1346. https://doi.org/10.1021/ma00233a025

18. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*, 1974, vol. 185, no. 4154, pp. 862–864. https://doi.org/10.1126/science.185.4154

19. Saerens D., Ghassabeh G., Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, vol. 8, no. 5, pp. 600–608. https://doi.org/10.1016/j.coph.2008.07.006

20. Peng X., Zhu B. Different features identified by machine learning associated with the HIV compartmentalization in semen. *Infection, Genetics and Evolution*, 2022, vol. 98, art. 105224. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105224

21. Koshi J., Goldstein M. R. A. Context-dependent optimal substitution matrices. *Protein Engineering Design and Selection*, 1995, vol. 8, no. 7, pp. 641–645. https://doi.org/10.1093/protein/8.7.641

22. Malvar S., Bhagavathula A., de Luis Balaguer M. A., Sharma S., Chandra R. Machine learning can guide experimental approaches for protein digestibility estimations. *arXiv*, 2022. https://doi.org/10.48550/arXiv.2211.00625

23. NakashimaH., Nishikawa K., Ooi T. Distinct character in hydrophobicity of amino acid compositions of mitochondrial proteins. *Proteins*, 1990, vol. 8, no. 2, pp. 173–178. https://doi.org/10.1002/prot.340080207

24. Schatz D. G., Swanson P. C. V(D)J Recombination: Mechanisms of Initiation. *Annual Review of Genetics*, 2011, vol. 45, no. 1, pp. 167–202. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110410-132552

25. Liu C., Zhang Y., Liu C. C., Schatz D. G. Structural insights into the evolution of the RAG recombinase. *Nature Reviews Immunology*, 2022, vol. 22, no. 6, pp. 353–370. https://doi.org/10.1038/s41577-021-00628-6

26. Gellert M. V(D)J Recombination: RAG Proteins, Repair Factors, and Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 2002, vol. 71, no. 1, pp. 101–132. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.090501.150203

Information about the authors

S*hapira Michail A.* – Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: mshapira2016@gmail.com, https://doi.org/0000-0003-3284-5860

Miguckaya Arianna A. – Student. Belarusian State University (4, Nezavisimosti Ave., 220030, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bio.miguckayAD@bsu.by, https://doi.org/0009-0002-3595-8748

Bakhir Veranika P. – Ph.D. Student Junior Researcher., Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: bakhirveranika@gmail.com, https://doi.org/0009-0001-5480-2178

Dormeshkin Dmitry O. – Ph. D. (Chemistry), Associate Professor, Leading Researcher. Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus (5/2, Academician Kuprevich Str., 220084, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: Dormeshkin@gmail.com, https://doi.org/0000-0003-2505-3005

Інфармацыя аб аўтарах

Шапіра Міхаіл Анатольевіч – навуковы супрацоўнік. Інстытут біаарганічнай хіміі НАН Беларусі (вул. Акадэміка Купрэвіча, 5/2, 220084, Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: mshapira2016@gmail.com, https://doi.org/0000-0003-3284-5860

Мігуцкая Арыяна Дзмітрыеўна – студэнт. Беларускі дзяржаўны ўніверсітэт (4, пр-т Незалежнасці, 220030, Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: bio.miguckayAD@bsu.by, https://doi.org/0009-0002-3595-8748

Бахір Вераніка Паўлаўна – аспірант, малодшы навуковы супрацоўнік. Інстытут біаарганічнай хіміі НАН Беларусі (вул. Акадэміка Купрэвіча, 5/2, 220084, Мінск, Рэспубліка Беларусь). E-mail: bakhirveranika@gmail.com, https://doi.org/0009-0001-5480-2178

Дармешкін Дзмітрый Алегавіч – кандыдат хімічных навук, дацэнт, вядучы навуковы супрацоўнік. Інстытут біаарганічнай хіміі НАН Беларусі (вул. Акадэміка Купрэвіча, 5/2, 220084, Мінск, Рэспубліка Беларусь), E-mail: Dormeshkin@gmail.com, https://doi.org/0000-0003-2505-3005

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

ТЭХНІЧНАЯ ХІМІЯ І ХІМІЧНАЯ ТЭХНАЛОГІЯ

TECHNICAL CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING

УДК 661.833+66.096.5
https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-344-352

Поступила в редакцию 09.02.2026
Received 09.02.2026

S. V. Vasilevich, S. O. Stoiko, S. D. Yukhnevich

Belarusian State Aviation Academy, Minsk, Belarus

THERMAL DECOMPOSITION OF SODIUM HEXAFLUOROSILICATE IN A FLUIDIZED BED

Abstract. We studied the thermal decomposition of sodium hexafluorosilicate Na_2SiF_6, carried out under isothermal conditions at temperatures of 773, 873, 973, and 1 073 K in a fluidized bed. A mathematical model of sodium hexafluorosilicate fluidization is proposed, taking into account the kinetics of chemical transformations and changes in the physicochemical properties of the fluidized bed material and the gaseous medium. The results of calculations show that the height and porosity of the fluidized bed change during the conversion of sodium hexafluorosilicate. The specific consumption of silicon tetrafluoride during a single loading of sodium hexafluorosilicate varies with time and depends on the bed temperature. Proposed analytical expression for the time-dependent mass flow rate of Na_2SiF_6 allows obtaining a constant mass yield of silicon tetrafluoride SiF_4. The use of fluidized bed technology enables the thermal conversion of sodium hexafluorosilicate in a fluidized bed in an air environment with continuous removal of the reacted dispersed material and supply of the initial dispersed material. This reduces the equipment cycle time without regular reactor shutdowns and startups, thereby increasing the reliability of the Na_2SiF_6 thermal decomposition equipment and the SiF_4 production productivity.

Keywords: sodium hexafluorosilicate, silicon tetrafluoride, fluidized bed, decomposition kinetics, rate constant, reactor scheme

For citation. Vasilevich S. V., Stoiko S. O., Yukhnevich S. D. Thermal decomposition of sodium hexafluorosilicate in a fluidized bed. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical Series*, 2026, vol. 62, no. 4, pp. 344–352 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-344-352

С. В. Василевич, С. О. Стойко, С. Д. Юхневич

Белорусская государственная академия авиации, Минск, Республика Беларусь

ТЕРМИЧЕСКОЕ РАЗЛОЖЕНИЕ ГЕКСАФТОРСИЛИКАТА НАТРИЯ В ПСЕВДООЖИЖЕННОМ СЛОЕ

Аннотация. Исследовано термическое разложение гексафторсиликата натрия Na_2SiF_6, проводимое в изотермических условиях при температурах 773, 873, 973 и 1 073 К в псевдоожиженном слое. Предложена математическая модель псевдоожижения гексафторсиликата натрия, учитывающая кинетику химических превращений и изменение физико-химических свойств материала псевдоожиженного слоя и газовой среды. Результаты расчетов показывают, что высота и порозность псевдоожиженного слоя изменяются в процессе конверсии гексафторсиликата натрия. Удельный выход тетрафторида кремния при однократной загрузке гексафторсиликата натрия изменяется со временем и зависит от температуры слоя. Предложенное аналитическое выражение для зависящего от времени массового расхода Na_2SiF_6 позволяет получать постоянный массовый выход тетрафторида кремния SiF_4. Использование технологии псевдоожиженного слоя позволяет осуществлять термическую конверсию гексафторсиликата натрия в псевдоожиженном слое в воздушной среде с непрерывным удалением прореагировавшего диспергированного материала и подачей исходного диспергированного материала. Это сокращает время цикла работы оборудования без регулярных остановок и запусков реактора, тем самым повышая надежность оборудования термического разложения Na_2SiF_6 и производительность производства SiF_4.

Ключевые слова: гексафторсиликат натрия, тетрафторид кремния, псевдоожиженный слой, кинетика разложения, константа скорости, схема реактора

Для цитирования. Василевич, С. В. Термическое разложение гексафторсиликата натрия в псевдоожиженном слое / С. В. Василевич, С. О. Стойко, С. Д. Юхневич // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя хімічных навук. – 2026. – Т. 62, № 4. – С. 344–352. https://doi.org/10.29235/1561-8331-2026-62-4-344-352

© Василевич С. В., Стойко С. О., Юхневич С. Д., 2026

Introduction. Sodium hexafluorosilicate Na_2SiF_6 is a valuable product, the production of which has been the subject of a number of studies [1–3]. Na_2SiF_6 is currently widely used to produce silicon, which is utilized in various industries. The demand for pure silicon on the global market is growing due to its growing use in industries such as solar energy and electronics.

Sodium hexafluorosilicate can be used as a silicon source to form silicon nitride Si_3N_4 coatings using a hybrid precursor system – chemical vapor deposition [1, 4].

In the production of high-purity ^{28}Si, the starting product is silicon tetrafluoride SiF4, which is obtained by the thermal decomposition of sodium hexafluorosilicate: $Na_2SiF_6 \rightarrow 2NaF + SiF_4$ [5, 6]. Thermal decomposition of sodium hexafluorosilicate begins at a temperature of 300 °C. The process of obtaining SiF_4 is carried out at temperatures of 540–710 °C.

A description of a method and a device for processing (thermal decomposition) Na_2SiF_6 is given in [7]. This device is intended for the recycling of secondary products of apatite processing during the production of phosphate fertilizers, in particular, sodium hexafluorosilicate Na_2SiF_6, to produce silicon tetrafluoride SiF_4 and sodium fluoride NaF.

In this device, the reaction occurs in a dense layer, which causes passivation of the reaction as the upper layers of sodium hexafluorosilicate react, thereby preventing a continuous process of its thermal decomposition.

This paper presents the results of studies on the features of fluidization of Na_2SiF_6 during its thermal decomposition under isothermal conditions in an air atmosphere in a fluidized bed.

The aim of the study is to determine the influence of various factors on the process of fluidization of sodium hexafluorosilicate during its thermal conversion.

Fluidized bed model. Sodium hexafluorosilicate Na_2SiF_6, a powder with a particle size $d_{Na_2SiF_6}$ of 0.317 mm, was used as the study object. The density of Na_2SiF_6 is 2.68 g/cm³ [8, 9]. Air was used as the fluidizing agent.

The thermal decomposition of Na_2SiF_6 in air can be written as a formal reaction [1–5]:

$$Na_2SiF_6 \rightarrow SiF_4 + 2NaF \quad (1)$$

Since the thermal decomposition of Na_2SiF_6 is not instantaneous and is accompanied by a shift of the reaction front from the periphery to the center of the particle, the composition and density of sodium hexafluorosilicate change gradually during the conversion process. The particle density of the layer can be determined as:

$$\rho_p = \rho_{Na_2SiF_6}(1-\alpha) + \rho_{2NaF}\alpha,$$

where α is the degree of decomposition of Na_2SiF_6; $\rho_{Na_2SiF_6}$ is the density Na_2SiF_6, kg/m³; ρ_{NaF} is the density of NaF, kg/m³.

The density of sodium fluoride is 2.79 g/cm³ [8, 10]. The volume of NaF particles is 2.33 times smaller than that of the original Na_2SiF_6. The decrease in size occurs due to the compaction of the crystal lattice. If the dimensions of the unit cell of Na_2SiF_6 are 0.886 nm and 0.504 nm (the crystal has the form of a trigonal syngony with two sodium ions in the lattice) [9], then for NaF they are 0.463 nm (the crystal has the form of a cube with four sodium ions in the lattice) [10]. Then the particle size (equivalent particle diameter) will be determined as:

$$d_p = d_{Na_2SiF_6}\sqrt[3]{1-\alpha\left(1-\frac{2\rho_{Na_2SiF_6}M_{NaF}}{\rho_{NaF}M_{Na_2SiF_6}}\right)} = d_{Na_2SiF_6}\sqrt[3]{1-0.5708\alpha}. \quad (2)$$

Here d_p is the equivalent particle diameter, m; $M_{Na_2SiF_6}$ – molecular weight of sodium hexafluorosilicate, kg/mol; M_{NaF} – molecular weight of sodium fluoride, kg/mol:

$$M_{Na_2SiF_6} = 188 \cdot 10^{-3} \text{ kg/mol}; \; M_{NaF} = 42 \cdot 10^{-3} \text{ kg/mol}.$$

Previously [11], the authors conducted studies on the thermal conversion of this material in a dense layer. It was determined that the kinetics of the thermal decomposition of sodium hexafluorosilicate under the conditions of the studies performed is described by the Avrami–Erofeev equation:

$$\left(-\ln\left(1-\alpha\right)\right)^{n} = kt\,, \tag{3}$$

where n – is a certain indicator; k – is the rate constant of the formal reaction of decomposition of the substance, min^{-1}; t – is the time of holding the sample at the decomposition temperature, min.

Analysis of the obtained data revealed that the range of n-values ranged from 0.541 to 1.291. The average n-value calculated across all study variants was 0.761.

The rate constant k is determined from the Arrhenius equation:

$$k = A\exp\left(-\frac{E}{RT}\right), \tag{4}$$

where A is the pre-exponential factor, s^{-1}; E – activation energy, J/mol; R – universal gas constant (8.314 J/mol·K); T – temperature, K.

The decomposition rate of Na_2SiF_6 increases with increasing temperature [11]. The average activation energy was 63.23 kJ/mol. The average pre-exponential factor A was $1.807 \cdot 10^2$ min^{-1}.

Since the Na_2SiF_6 density changes during the thermal conversion of the fluidized bed (due to changes in the composition), the bed height also changes. It is known that the bed height depends on its porosity:

$$H = H_0\frac{\left(1-\varepsilon_0\right)}{\left(1-\varepsilon\right)}, \tag{5}$$

where H_0 – the height of the dense layer, m; ε – the fluidized bed porosity; ε_0 – the porosity of the dense layer.

The porosity ε depends on the Reynolds number Re and the Archimedes number Ar, and therefore depends on the particle density, velocity, density and viscosity of the fluidizing gas.

Clearly, during the thermal conversion of the fluidized bed material, a gas component (SiF_4) is released and entrained in the gas flow, increasing the mass flow rate of the resulting gas mixture compared to the initial fluidizing gas. Since this process (gas release and its "entrainment" in the gas flow) occurs throughout the entire height of the fluidized bed, the mass flow rate, and therefore the gas velocity, are not uniform across the height. Therefore, equation (5) is transformed as follows:

$$H = \int_0^{H_0}\frac{\left(1-\varepsilon_0\right)}{\left(1-\varepsilon\right)}dh. \tag{6}$$

The porosity of the fluidized bed is determined by the equation [12]:

$$\varepsilon = \left(\frac{18\,\mathrm{Re} + 0.36\,\mathrm{Re}^2}{\mathrm{Ar}}\right)^{0,21}. \tag{7}$$

The Reynolds and Archimedes numbers are defined as:

$$\mathrm{Re} = \frac{v d_p\,\rho_g}{\mu_g},$$

$$\mathrm{Ar} = \frac{d_p^3\rho_g^2 g}{\mu_g^2}\;\frac{\rho_p - \rho_g}{\rho_g}, \tag{8}$$

where v is the velocity of the fluidizing gas, m/s; d_p – particle size, m; ρ_p – particle density, kg/m^3; ρ_g – gas density, kg/m^3; μ_g – dynamic viscosity of gas, Pa · s.

The particle density is determined by equation (2).

The viscosity of gas mixtures does not obey the additivity rule. The dynamic viscosity μ_g of a gas mixture is determined by the Wilke formula [13, 14]:

$$\mu_g = \frac{\mu_{air}}{1+\left(\frac{X_{SiF_4}}{X_{air}}\right)f_1} + \frac{\mu_{SiF_4}}{1+\left(\frac{X_{air}}{X_{SiF_4}}\right)f_2}, \tag{9}$$

$$f_1 = \frac{\left[1+\left(\frac{\mu_{air}}{\mu_{SiF_4}}\right)^{\frac{1}{2}}\left(\frac{M_{SiF_4}}{M_{air}}\right)^{\frac{1}{4}}\right]^2}{4\sqrt{2}\left[1+\left(\frac{M_{air}}{M_{SiF_4}}\right)\right]^{\frac{1}{2}}}, \quad f_2 = \frac{\left[1+\left(\frac{\mu_{SiF_4}}{\mu_{air}}\right)^{\frac{1}{2}}\left(\frac{M_{air}}{M_{SiF_4}}\right)^{\frac{1}{4}}\right]^2}{4\sqrt{2}\left[1+\left(\frac{M_{SiF_4}}{M_{air}}\right)\right]^{\frac{1}{2}}}, \tag{10}$$

where X_{air}, X_{SiF4} – volume fractions of air and SiF_4 in the gas mixture; M_{air}, M_{SiF4} – molecular masses of air and SiF_4, kg/mol; $\mu_в$, μ_{SiF4} – dynamic viscosities of air and SiF_4, Pa · s:

$$M_{air} = 28.98 \cdot 10^{-3} \text{ kg/mol}; \; M_{SiF4} = 104.08 \cdot 10^{-3} \text{ kg/mol}.$$

The dynamic viscosities of air and SiF_4 depend on temperature and can be determined using the Sutherland equation:

$$\mu_{air} = \mu_{air}^{273K}\frac{273+C_{air}}{T+C_{air}}\left(\frac{T}{273}\right)^{\frac{1}{2}},$$

$$\mu_{SiF_4} = \mu_{SiF_4}^{273K}\frac{273+C_{SiF_4}}{T+C_{SiF_4}}\left(\frac{T}{273}\right)^{\frac{1}{2}}, \tag{11}$$

where μ_{air}^{273K} – dynamic viscosity of air at a temperature of 273 K, Pa · s; $\mu_{SiF_4}^{273K}$ – dynamic viscosity of SiF_4 at a temperature of 273 K, Pa · s; C_{air} – Sutherland constant for air, K; C_{SiF4} – Sutherland constant for SiF_4, K.

The velocity of the fluidizing gas is defined as:

$$v = \frac{4G}{\rho_g \pi D^2}, \tag{12}$$

where G – gas mass flow rate, kg/s; D – reactor diameter in the reaction zone, m.

The mass flow rate of gas can be defined as:

$$G = G_0 + \int_0^h dG = G_0 + \frac{d\alpha}{dt}\frac{\pi D^2}{4}\left(\rho_{Na_2SiF_6} - \frac{\rho_{NaF}}{2.33}\right)\int_0^h (1-\varepsilon)\,dh, \tag{13}$$

where G_0 – gas flow rate at the entrance to the reaction zone of the fluidized bed, kg/s; h – height of the considered area of the layer above the grate, m; $\frac{d\alpha}{dt}$ – rate of change of the degree of conversion of sodium hexafluorosilicate, s^{-1}.

In formula (13), the density of sodium fluoride is divided by 2.33, since during reaction (1) the volume occupied by the solid substance decreases by a factor of 2.33, which must be taken into account when determining the mass of gaseous SiF_4 released during the reaction from a unit volume of the reaction zone.

Then the flow rate of the gas mixture is determined as:

$$v = \frac{T}{293}\left(\frac{4G_0}{\rho_{air}^{nc}\pi D^2} + \frac{d\alpha}{dt}\frac{\left(\rho_{Na_2SiF_6} - \frac{\rho_{NaF}}{2.33}\right)}{\rho_{SiF_4}^{nc}}\int_0^h (1-\varepsilon)\,dh\right), \tag{14}$$

where ρ_{air}^{nc} – air density under normal conditions (at a temperature of 293 K), kg/m^3; $\rho_{SiF_4}^{nc}$ – density of SiF_4 under normal conditions (at a temperature of 293 K), kg/m^3.

The density of a gas mixture is defined as the ratio of the mass flow rate to the product of the velocity and the cross-sectional area of the reaction zone:

$$\rho_g = \frac{4G}{v\pi D^2} = \frac{293\rho_{air}^{nc}\left(v_0 + \frac{d\alpha}{dt}\left(\rho_{Na_2SiF_6} - \frac{\rho_{NaF}}{2.33}\right)\int_0^h (1-\varepsilon)\,dh\right)}{T\left(v_0 + \frac{d\alpha}{dt}\frac{\rho_{air}^{nc}\left(\rho_{Na_2SiF_6} - \frac{\rho_{NaF}}{2.33}\right)}{\rho_{SiF_4}^{nc}}\int_0^h (1-\varepsilon)\,dh\right)}, \quad (15)$$

where v_0 – air velocity at the reactor inlet, m/s.

The volume fractions of air and SiF_4 are determined as:

$$X_{air} = \frac{T}{293}\frac{v_0}{v} = \frac{1}{1 + \frac{d\alpha}{dt}\frac{\left(\rho_{Na_2SiF_6} - \frac{\rho_{NaF}}{2.33}\right)}{v_0\rho_{SiF_4}^{nc}}\int_0^h (1-\varepsilon)\,dh}, \quad (16)$$

$$X_{SiF_4} = 1 - \frac{T}{293}\frac{v_0}{v} = \frac{\frac{d\alpha}{dt}\left(\rho_{Na_2SiF_6} - \frac{\rho_{NaF}}{2.33}\right)\int_0^h (1-\varepsilon)\,dh}{v_0\rho_{SiF_4}^{nc} + \frac{d\alpha}{dt}\left(\rho_{Na_2SiF_6} - \frac{\rho_{NaF}}{2.33}\right)\int_0^h (1-\varepsilon)\,dh}. \quad (17)$$

Based on expression (3), we can write a formula for the rate of change of the conversion degree:

$$\frac{d\alpha}{dt} = \frac{k^{\frac{1}{n}}\,t^{\frac{1}{n}-1}}{n}\exp\left(-(kt)^{\frac{1}{n}}\right). \quad (18)$$

A program was developed for calculating layer parameters using a numerical method.

The following initial data were adopted for the calculation: reactor diameter D equal to 0.05 m; dense bed height H_0 equal to 0.1 m; dense bed porosity ε_0 equal to 0.3; air dynamic viscosity μ_{air}^{273K} at 273 K equal to $18.2 \cdot 10^{-6}$ Pa · s; dynamic viscosity $\mu_{SiF_4}^{273K}$ of SiF_4 at 273 K equal to $14.5 \cdot 10^{-6}$ Pa · s; Sutherland constant C_{air} for air equal to 124 K; Sutherland constant C_{SiF4} for SiF_4 equal to 300 K; air mass flow rate G_0 equal to $1.6 \cdot 10^{-4}$ kg/s; air density ρ_{air}^{nc} under normal conditions equal to 1.22 kg/m^3; sodium hexafluorosilicate density $\rho_{Na_2SiF_6}$ equal to 2 680 kg/m^3; sodium fluoride density ρ_{NaF} equal to 2 790 kg/m^3; SiF_4 density $\rho_{SiF_4}^{nc}$ under normal conditions equal to 4.64 kg/m^3.

Figure 1 shows graphs of layer porosity versus height and temperature. The graphs are presented for temperatures of 773, 873, 973, and 1 073 K and conversion levels of 0.1, 0.5, 0.7, and 0.9.

The graphs show that the porosity of the fluidized bed increases with height. This is due to the addition of the thermal conversion products of the bed material to the fluidizing gas. Furthermore, with increasing temperature, the bed porosity increases, which is associated with an increased Na_2SiF_6 conversion rate. Once a conversion rate of 0.9 is reached, the bed porosity increases significantly more slowly with height due to a rapid decrease in the conversion rate and, consequently, a decrease in the amount of gaseous products replenishing the fluidizing agent.

Clearly, as the bed porosity increases, so does the height of the fluidized bed. Figure 2 shows graphs of the relative bed height (relative to the dense bed height) as a function of the Na_2SiF_6 conversion rate and temperature.

The figure shows that at all temperatures considered, the conversion process is accompanied by an increase in the height of the fluidized bed. At temperatures of 973 and 1 073 K, the height initially increases, followed by a slow decrease. This is due to the fact that the thermal conversion of sodium hexafluorosilicate releases gaseous silicon tetrafluoride SiF_4. The specific consumption of silicon tetrafluoride (SiF_4) during a single Na_2SiF_6 feed is variable and depends on time and temperature (initially, the specific consumption increases, then decreases after reaching its maximum value).

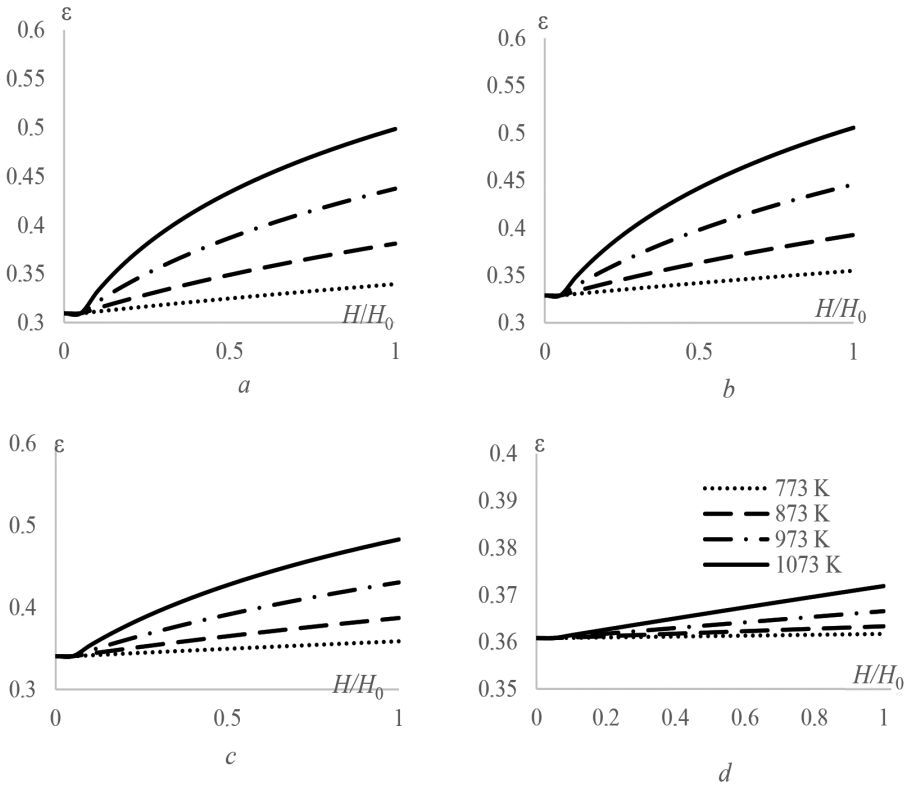


Fig. 1. Calculated dependences of porosity on temperature and relative height of the fluidized bed at a conversion degree of Na_2SiF_6 of 0.1 (*a*), 0.5 (*b*), 0.7 (*c*) and 0.9 (*d*)

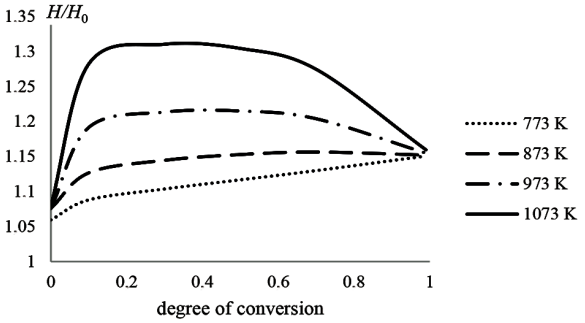


Fig. 2. Calculated dependences of the relative layer height (related to the dense layer height) on the degree of conversion of Na_2SiF_6 and on temperature

The specific consumption of SiF_4 during a single load is determined by the equation

$$W_{SiF_4} = \frac{d\alpha}{dt}\left(1-\frac{\rho_{NaF}}{2.33\,\rho_{Na_2SiF_6}}\right) = \frac{k^{\frac{1}{n}}\,t^{\frac{1}{n}-1}}{n}\left(1-\frac{\rho_{NaF}}{2.33\,\rho_{Na_2SiF_6}}\right)\exp\left(-(kt)^{\frac{1}{n}}\right). \quad (19)$$

Figure 3 shows graphs of the dependence of the specific consumption of silicon tetrafluoride on time at conversion temperatures of 773, 873, 973 and 1 073 K.

To ensure a constant specific SiF_4 consumption, it is necessary to continuously feed Na_2SiF_6 (replenish the bed) with continuous removal of the reacted solid residue. Assuming that the conversion degree of the reacted material should be at least 0.9, the following condition must be met to ensure a constant specific SiF_4 consumption:

$$\frac{d\alpha}{dt}M_{Na_2SiF_6}\left(1-\frac{\rho_{NaF}}{2.33\,\rho_{Na_2SiF_6}}\right)+0{,}9\left(1+\frac{\rho_{NaF}}{2.33\,\rho_{Na_2SiF_6}}\right)\int_{t_0}^{t}\left(G_{Na_2SiF_6}\int_{0}^{t-t_0}\frac{d\alpha}{dt}dt\right)dt = \text{const},$$

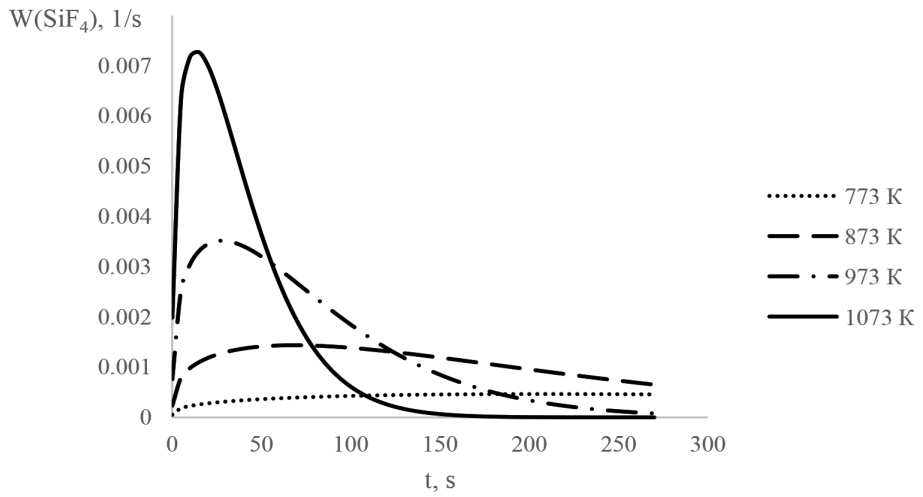


Fig. 3. Calculated dependences of the specific consumption of silicon tetrafluoride on time at conversion temperatures of 773, 873, 973 and 1 073 K

$$\frac{d^2\alpha}{dt^2} M_{Na_2SiF_6}\left(1-\frac{\rho_{NaF}}{2.33\,\rho_{Na_2SiF_6}}\right)+0,9\left(1+\frac{\rho_{NaF}}{2.33\,\rho_{Na_2SiF_6}}\right)G_{Na_2SiF_6}\int_0^{t-t_0}\frac{d\alpha}{dt}\,dt=0, \tag{20}$$

where $M_{Na2SiF6}$ – initial loading weight of sodium hexafluorosilicate, kg; $G_{Na2SiF6}$ – mass flow rate of sodium hexafluorosilicate, kg/s; t_0 – time of start of layer replenishment, s.

By solving equation (20) taking into account expression (18), we can obtain an analytical expression for the mass flow rate of sodium hexafluorosilicate

$$G_{Na_2SiF_6}=\frac{M_{Na_2SiF_6}}{0,9}\frac{(kt)^{\frac{1}{n}}}{(nt)^2}\left(\frac{2.33\,\rho_{Na_2SiF_6}-\rho_{NaF}}{2.33\,\rho_{Na_2SiF_6}+\rho_{NaF}}\right)\frac{(kt)^{\frac{1}{n}}+n-1}{1-\exp\left(1-n-(kt)^{\frac{1}{n}}\right)}. \tag{21}$$

Figure 4 shows graphs of the Na_2SiF_6 mass flow rate versus time for temperatures of 773, 873, 973, and 1 073 K. It is evident that to ensure a constant SiF_4 flow rate, the Na_2SiF_6 flow rate must be increased. During the first half hour, the consumption of sodium hexafluorosilicate should be increased by approximately 4.2 times, during the second half hour – by 1.3 times, etc.

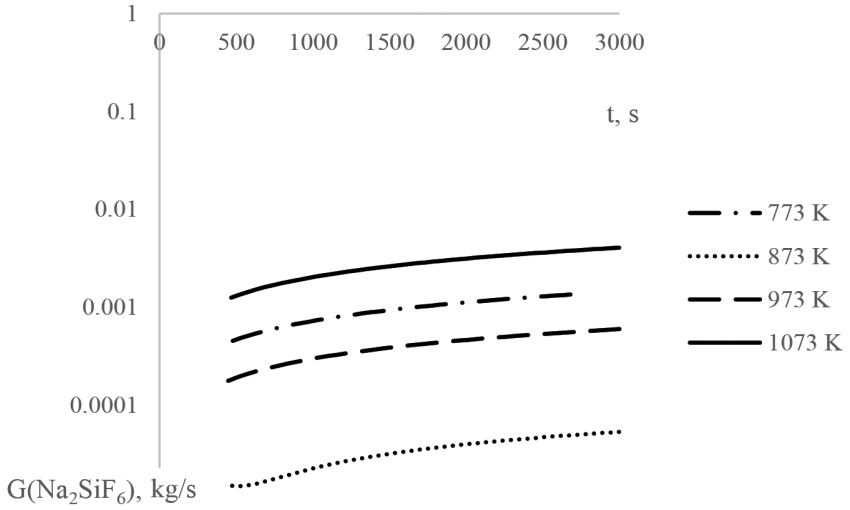


Fig. 4. Calculated dependences of the mass flow rate of Na_2SiF_6 on time for temperatures of 773, 873, 973 and 1 073 K

The mass flow rate of the discharged waste material is determined as:

$$G_{NaF} = G_{Na_2SiF_6}\left(0.1 + 0.9\frac{\rho_{NaF}}{2.33\,\rho_{Na_2SiF_6}}\right). \quad (22)$$

Obviously, it is necessary to replenish the layer with "fresh" sodium hexafluorosilicate not at the beginning, but after a period of time equal to $t_0 = \frac{(1-n)^n}{k}$. At this point in time, the specific consumption of silicon tetrafluoride will be at its maximum (see Fig. 3). Further, with a continuous supply of Na_2SiF_6 and removal of NaF, the specific consumption of SiF_4 will be constant and equal to:

$$W_{SiF_4}^{max} = \frac{k(1-n)^{1-n}}{n}\left(1 - \frac{\rho_{NaF}}{2.33\,\rho_{Na_2SiF_6}}\right)\exp\left(-(1-n)\right). \quad (23)$$

Implementation of the presented model in a fluidized bed reactor will enable the thermal conversion of sodium hexafluorosilicate Na_2SiF_6 in a fluidized bed in an air environment with continuous removal of the reacted dispersed material and supply of the initial dispersed material to replenish the fluidized bed. This will reduce the equipment cycle time without regular reactor shutdowns and startups, thereby increasing the reliability of the sodium hexafluorosilicate Na_2SiF_6 thermal decomposition equipment (by ensuring constant equipment operation) and increasing the productivity of silicon tetrafluoride SiF_4 production (by reducing the cycle time).

Acknowledgements. This work was supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant T26M-001).

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант T26M-001).

References

1. Leal-Cruz A. L., Pech-Canul M. I. Thermodynamics and Kinetics of Na_2SiF_6 Decomposition in the Synthesis of Si_3N_4 via the Hybrid Precursor System (HYSYCVD). *Advances in technology of materials and materials processing journal*, 2007, vol. 9, no. 5, art. 153. https://doi.org/10.2240/azojomo0269

2. Kashiwaya, Y., Cramb, A. W. Kinetics of formation and dissociation of Na_2SiF_6. *Metallurgical and Materials Transactions B*, 2002, vol. 33, pp. 129–136. https://doi.org/10.1007/s11663-002-0093-3

3. Kumar M., Babu M. N., Mankhand T.R., Pandey B.D. Precipitation of sodium silicofluoride (Na_2SiF_6) and cryolite (Na_3AlF_6) from HF/HCl leach liquors of alumino-silicates. *Hydrometallurgy*, 2010, vol. 104, pp. 304–307. https://doi.org/10.1016/j.hydromet.2010.05.014

4. Soltani N., Pech-Canul M.I., Ganzalez L.A., Bahrami A. Mechanism and Parameters Controlling the Decomposition Kinetics of Mechanism and Parameters Controlling the Decomposition Kinetics of Na_2SiF_6 Powder to SiF_4. *International Journal of Chemical Kinetics*, 2016, vol. 48, no. 7, pp. 379–395. https://doi.org/10.1002/kin.20999

5. Krylov V. A., Sorochkina T. G. Investigation of the source of the appearance of hydrocarbons in SiF_4 during its production by pyrolysis of Na_2SiF_6. *IX Nauchnaya konferentsiya "Analitika Sibiri i Dal'nego Vostoka": sbornik materialov* [IX Scientific Conference "Analytics of Siberia and the Far East": Collection of Materials]. Krasnoyarsk, Siberian Federal University, 2011. Available at: http://conf.sfu-kras.ru/conf/asfe12/report?memb_id=4248 (in Russian).

6. Orlova E. A., Zagrebaev S. A., Orlov M. A. Kozlov F. A., Alekseev V. V., Drobyshev A. V., Zhmurin V. G., Zasorin I. I., Kozlova N. A. Silicon production from phosphate industry waste (Na_2SiF_6). *Bulletin of the Lebedev Physics Institute*, 2010, vol. 37, pp. 321–323. https://doi.org/10.3103/S1068335610100052

7. Stepanenko V. N., Stepanenko N. V., Telushchenko E. A. *Method and device for processing sodium fluorosilicate*. Patent RU 2331582. Publ. date 20.08.2008 (in Russian).

8. Lidin R. A., Molochko V. A., Andreeva L. L. *Chemical properties of inorganic substances.* 3rd ed. Moscow, Khimiya Publ., 2000. 480 p. (in Russian).

9. Dudka A. P., Karimov D. N., Golovina T. G., Konstantinova A. F. The Temperature Evolution of the Atomic Structure and the Influence of the Local Environment of Atoms on the Optical Properties of the Na_2SiF_6 Crystal. *Crystallography Reports*, 2024, vol. 69, pp. 692–703. https://doi.org/10.1134/S1063774524601801

10. Bracamonte-Estrada C. E., Bernal R., Álvarez-Montaño V. E., Castro-Campoy A. I., Cruz-Vázquez C. Thermoluminescence of NaF and NaF:Tm phosphors exposed to beta particle irradiation. *Applied Radiation and Isotopes*, 2025, vol. 217, art. 111639. https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2024.111639

11. Vasilevich S. V., Degterov D. V., Yukhnevich S. D. Kinetics of thermal decomposition of sodium hexafluorosilicate under isothermal conditions. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya fizika-tekhnichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Physical-technical series*, 2025, vol. 70, no. 2, pp. 145–158 (in Russian). https://doi.org/10.29235/1561-8358-2024-70-2-145-158

12. Dvoretsky S. I., Korolev V. N., Nagornov S. A., Tarov V. P. *Fluidization engineering and technology: hydrodynamics and heat transfer with submerged bodies*. Tambov, TSTU Publishing House, 2005. 166 p. (in Russian).

13. Wilke C. R. A Viscosity Equation for Gas Mixtures. *The journal of chemical physics,* 1950, vol. 18, no. 4, pp. 517−519. https://doi.org/10.1063/1.1747673

14. Tsirelman N. M., Komarov A. V. Determination of thermophysical properties of multicomponent gas mixtures. *Aviation and rocket-space technology. Bulletin of the Ufa State Aviation Technical University,* 2017, vol. 21, no. 1, pp. 128–135 (in Russian).

Информация об авторах

Василевич Сергей Владимирович – кандидат технических наук, доцент, ведущий научный сотрудник. Белорусская государственная академия авиации (ул. Уборевича, 77, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: svasilevich@yandex.ru

Стойко Сергей Олегович – начальник центра. Белорусская государственная академия авиации (ул. Уборевича, 77, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sergey_14_95@mail.ru

Юхневич Сергей Дмитриевич – старший преподаватель. Белорусская государственная академия авиации (ул. Уборевича, 77, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: sergei.museum@mail.ru

Information of the authors

Vasilevich Sergey V. – Ph. D. (Engineering), Associate Professor, Leading Researcher. Belarusian State Aviation Academy (77, Uborevich Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: svasilevich@yandex.ru

Stoiko Sergey O. – Head of the Center. Belarusian State Aviation Academy (77, Uborevich Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sergey_14_95@mail.ru

Yukhnevich Sergey D. – Senior Lecturer. Belarusian State Aviation Academy (77, Uborevich Str., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: sergei.museum@mail.ru