

**ИОН-ПЛАЗМА ВА ЛАЗЕР ТЕХНОЛОГИЯЛАРИ ИНСТИТУТИ
ҲУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.02/30.12.2019.FM.65.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

**АНТВЕРПЕН УНИВЕРСИТЕТИ (БЕЛЬГИЯ)
ИОН-ПЛАЗМА ВА ЛАЗЕР ТЕХНОЛОГИЯЛАРИ ИНСТИТУТИ**

ЮСУПОВ МАКСУДБЕК СУЛТАНМУРАТОВИЧ

**СОВУҚ ПЛАЗМА БИЛАН БИОМОЛЕКУЛАЛАР
ЎЗARO ТАЪСИРИНИНГ МОЛЕКУЛЯР МЕХАНИЗМЛАРИ**

01.04.03 – Молекуляр физика ва иссиқлик физикаси

**Халқаро илмий маълумотлар базасига киритилган ҳамда
импакт-фактори 1,0 ва ундан юқори бўлган илмий журналларда
чоп этилган мақолалар асосида диссертация ҳимоясиз
физика-математика фанлари бўйича фан доктори (DSc)
илмий даражасини олиш бўйича
ТАҚДИМНОМА**

(2014 йилда фалсафа доктори (PhD) илмий даражаси тасдиқланган)

ТОШКЕНТ - АНТВЕРПЕН – 2020

Тақдимнома мундарижаси

Contents of the presentation

Оглавление презентации

Юсупов Максудбек Султанмуратович

Совуқ плазма билан биомолекулалар ўзаро таъсирининг

молекуляр механизмлари 3

Yusupov Maksudbek Sultanmuratovich

Molecular mechanisms of interaction of cold plasma with biomolecules 42

Юсупов Максудбек Султанмуратович

Молекулярные механизмы взаимодействия холодной плазмы

с биомолекулами 76

Эълон қилинган ишлар рўйхати

List of published works

Список опубликованных работ 83

**ИОН-ПЛАЗМА ВА ЛАЗЕР ТЕХНОЛОГИЯЛАРИ ИНСТИТУТИ
ХУЗУРИДАГИ ИЛМИЙ ДАРАЖАЛАР БЕРУВЧИ
DSc.02/30.12.2019.FM.65.01 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ**

**АНТВЕРПЕН УНИВЕРСИТЕТИ (БЕЛЬГИЯ)
ИОН-ПЛАЗМА ВА ЛАЗЕР ТЕХНОЛОГИЯЛАРИ ИНСТИТУТИ**

ЮСУПОВ МАКСУДБЕК СУЛТАНМУРАТОВИЧ

**СОВУҚ ПЛАЗМА БИЛАН БИОМОЛЕКУЛАЛАР
ЎЗARO ТАЪСИРИНИНГ МОЛЕКУЛЯР МЕХАНИЗМЛАРИ**

01.04.03 – Молекуляр физика ва иссиқлик физикаси

**Халқаро илмий маълумотлар базасига киритилган ҳамда
импакт-фактори 1,0 ва ундан юқори бўлган илмий журналларда
чоп этилган мақолалар асосида диссертация ҳимоясиз
физика-математика фанлари бўйича фан доктори (DSc)
илмий даражасини олиш бўйича
ТАҚДИМНОМА**

(2014 йилда фалсафа доктори (PhD) илмий даражаси тасдиқланган)

ТОШКЕНТ - АНТВЕРПЕН – 2020

Тадқиқот (DSc) мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида B2020.3.DSc/FM160 рақам билан рўйхатга олинган.

Иш Антверпен университети ва Ион-плазма ва лазер технологиялари институтида бажарилган.

Илмий маслаҳатчи: **Мирзаев Сирожиддин Зайниевич**
физика-математика фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар: **Бахрамов Сагдулла Абдуллаевич**
физика-математика фанлари доктори, профессор
Ўзбекистон Республикаси Фанлар академияси академиги

Бенедикт Ян
профессор
Кристиан Альбрехт номидаги Киль университети (Германия)

Расулов Акбарали Махаматович
физика-математика фанлари доктори, профессор

Етакчи ташкилот: **Самарқанд давлат университети**

Тақдимнома Ион-плазма ва лазер технологиялари институти ҳузуридаги DSc.02/30.12.2019.FM.65.01 рақамли Илмий кенгашнинг 2020 йил «02» 12 соат 16⁰⁰ даги мажлисида бўлиб ўтади (манзил: 100125, Тошкент ш., Дўрмон йўли кўчаси, 33-уй. Тел./факс: (99871) 262-32-54, e-mail: info@iplt.uz, Ион-плазма ва лазер технологиялари институти мажлислар зали).



Х.Б. Ашуров
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш раиси
т.ф.д., профессор

И.Дж. Ядгаров
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
илмий котиби
ф.-м.ф.д.

Б.Е. Умирзаков
Илмий даражалар берувчи илмий кенгаш
қошидаги Илмий семинар раиси,
ф.-м.ф.д., профессор

КИРИШ (тақдимнома аннотацияси)

Тадқиқот мавзусининг зарурати ва долзарблиги. Сўнгги йилларда плазма физикаси, молекуляр физика, биофизика ва ҳисоблаш физикаси ютуқларини ўзида мужассам этган ва совуқ атмосферик плазма (САП) билан юмшоқ муҳит ўзаро таъсирининг фундаментал ва амалий муаммолари билан шуғулланувчи, унда юз берадиган физик-кимёвий жараёнлардан фойдаланишга асосланган, фанлараро янги соҳа – плазма тиббиёти жадал ривожланмоқда. САП таъсири остида юзада (ёки ҳажмда) кечадиган жараёнлар биомолекула структурасида ўзгаришлар келтириб чиқаради, бу одатда молекуланинг гидрофилик ва гидрофобик хусусиятларининг ўзгариши билан биргаликда амалга ошади ва натижада биомолекулада биологик фаоллик пайдо бўлишига туртки бериши мумкин.

Бугунги кунда САПлардан фойдаланишда унинг амалий тадбиқлари плазма жараёнларининг физик-кимёвий қонуниятларини тушунишга бағишланган фундаментал тадқиқотлардан олдинда. Бундай плазма жараёнларининг ташқи параметрлари асосан эмпирик тарзда танланади. Бунга сабаб, биринчидан, мувозанатсиз шароитларда кечадиган реакцияларни таҳлил қилишнинг мураккаблиги, иккинчидан эса, плазма ўз-ўзидан изчил тизим эканлиги, унинг кимёвий фаоллигини аниқлайдиган физик хусусиятлари плазма туфайли юзага келадиган молекулалараро ўзаро таъсирлар ва кимёвий ўзгаришлар билан боғлиқлигидир. Шубҳасиз, ўзаро таъсир механизмларини, биомолекулалар билан реакцияларда турли хил фаол зарраларнинг ролини ва плазмада кечадиган кимёвий жараёнларнинг унинг хусусиятларига таъсирини ўрганмасдан плазма технологиясини самарали оптималлаштириш мумкин эмас. Шу муносабат билан, совуқ плазма фаол компонентларининг таркибини аниқлайдиган жараёнлар *механизмларини тадқиқ қилиш*, шунингдек унинг биомолекулаларга таъсир этиш *қонуниятларини аниқлаш, долзарб вазифалардан ҳисобланади*.

Жаҳонда саратон хасталигини даволашда САПдан фойдаланиш плазма тиббиётининг бугунги кундаги энг долзарб мавзулардан бири ҳисобланади. Ушбу соҳада кўплаб тадқиқотлар ўтказилган, жумладан плазма манбаларини тавсифлаш ва такомиллаштириш, плазманинг ва ишлов берилган юзанинг физик ва кимёвий хусусиятлари, плазма ҳосил қилган зарраларнинг биомолекулалар билан ўзаро таъсирида содир бўладиган биофизик жараёнлар ҳамда САП ёрдамида ишлов беришнинг тирик организмларга узоқ муддатли таъсирини ўрганиш бўйича илмий изланишлар олиб борилган. Плазма онкологиясида, жумладан *in vitro* ва *in vivo* тажрибалари асосида, истиқболли натижалар олинган. САП саратон хужайраларини танлаб мақсадли равишда йўқ қилишини ва шу билан соғлом хужайраларни кам шикастланган ёки шикастланмаган ҳолда қолдириши мумкинлигини тажрибалар кўрсатган. Бу эса саратонга қарши анъанавий усулларга нисбатан САПга устунлик беради. Аммо шуни таъкидлаш керакки, кўп сонли тадқиқотлар ўтказилганлигига қарамастан плазманинг саратон хужайраларига танлаб таъсир кўрсатишини

тушунтирувчи туб механизмлар ҳали ҳам номаълумлигича қолмоқда ва бу янада чуқур фундаментал илмий тадқиқотлар ўтказилишини тақозо қилади.

Плазма билан тирик ҳужайралар таъсирлашиш юзасининг мураккаблиги, уларни тажрибалар орқали тадқиқ қилишни қийинлаштиради ёки имконсиз қилади. Шу нуқтаи назардан, компьютерда моделлаштириш жуда аҳамиятлидир, чунки у молекуляр даражадаги жараёнларни тушунишни таъминлайди ва асосий механизмларни батафсил ўрганиш имконини беради. Аммо, бугунги кунга қадар юқоридаги жараёнларни тизимли ўрганишга доир чекланган миқдорда моделлаштириш тадқиқотлари ўтказилган.

Ўзбекистонда плазма тиббиёти соҳаси, хусусан саратон хасталигини даволашда совуқ плазмадан фойдаланиш, плазма тадқиқотининг энг янги йўналишларидан бири ҳисобланиб, ривожланишнинг илк босқичларидадир. Бу борада компьютерда моделлаштириш тадқиқотлари жараёнларни молекуляр даражада фундаментал тадқиқ қилишда ҳамда соҳада олинган экспериментал натижаларнинг туб механизмларини тушунишда муҳим аҳамият касб этади. Шу мақсадда компьютерда моделлаштириш бўйича билим ва кўникмаларни Ўзбекистон ёш илмий тадқиқотчиларига босқичма-босқич етказиш ишлари аллақачон йўлга қўйилган. Келажакда ушбу соҳада амалий ишларни бажариш учун республикада фаолият кўрсатаётган тиббий илмий марказлар билан ҳамкорликни йўлга қўйиш кўзда тутилган. Ҳозирги пайтда ушбу соҳага доир илмий тадқиқот лойиҳалари тайёрланмоқда. Шубҳасиз, Ўзбекистонда плазма тиббиёти соҳасини ривожлантириш турли хил касалликларни даволашда арзон ва самарали ечимларни таклиф қилади. Шундай экан, соҳада илмий ходимлар сонини кўпайтириш устувор вазифалардан бири ҳисобланади ва бунинг учун плазма тиббиёти соҳасида илмий-тадқиқотларни кенгайтириш мақсадга мувофиқ.

Ушбу докторлик тадқиқоти Ўзбекистон Республикаси Президентининг 2017 йил 7 февралдаги ПФ-4947-сон «2017–2021 йилларда Ўзбекистон Республикасини ривожлантиришнинг бешта устувор йўналиши бўйича Ҳаракатлар стратегияси тўғрисида» ги Фармонида ва 2018 йил 14 июлдаги ПҚ-3855-сон «Илмий ва илмий-техникавий фаолият натижаларини тижоратлаштириш самарадорлигини ошириш бўйича қўшимча чора-тадбирлар тўғрисида»ги Қароридан ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишда муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологияларини ривожлантиришнинг устувор йўналишларига мослиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг Ф.2. «Физика, астрономия, энергетика ва машинасозлик» III. Энергетика, энергоресурс тежамкорлиги, асбобсозлик, замонавий электроника, микроэлектроника, электрон асбобсозликни ривожлантиришнинг устувор йўналиши доирасида бажарилган.

Тадқиқот мавзуси бўйича халқаро тадқиқотлар шарҳи¹. Совуқ атмосферик плазма билан юмшоқ муҳит ўзаро таъсирининг фундаментал ва амалий муаммолари, плазма тиббиёти соҳаларида жаҳоннинг кўплаб илғор давлатлари етакчи илмий марказлари ва университетлари: жумладан PLASMANT (University of Antwerp, Бельгия), MpnL (George Washington University, АҚШ), GREMI (University of Orléans, Франция), CSIRO (Австралия), PBRC (Kwangwoon University, Жанубий Корея), CPSEG (University of Michigan, АҚШ), Hamaguchi Lab. (Osaka University, Япония), FII (University of South Australia, Австралия), АЕРТ (Ruhr-Universität Bochum, Германия), GravesLab (US Berkeley, АҚШ), IAP group (University of Bologna, Италия), CLTPS (Nagoya University, Япония), Xinpei Lu's Lab (HuaZhong University of Science and Technology, Хитой), INP-Greifswald (Leibniz Institute for Plasma Science and Technology, Германия) ва С. J. Nyheim Plasma Institute (Drexel University, АҚШ) шуғулланмоқда.

Шундай бўлсада, плазма тиббиёти ва плазма онкологиясига қизиқиш тобора ортиб бораётганига қарамасдан, дунёнинг аксарият илмий гуруҳлари диққат-эътиборни экспериментал тадқиқотларга қаратишган ва плазма билан ишлов бериш ёки даволашнинг фойдали таъсирлари ҳақида натижаларни эълон қилишмоқда. Аммо, молекуляр даражада фундаментал тушунишга қаратилган тадқиқот методларини қўллаш етарлича эмас ва бунга атомистик моделлаштириш усуллари ёрдамида эришиш мумкин. Хозирги кунда PLASMANT илмий гуруҳи плазма тиббиёти ва плазма-саратон хасталигини даволаш йўналишларида атомар даражадаги моделлаштириш тадқиқотларини ўтказишга диққат қаратган дунёдаги деярли ягона гуруҳ ҳисобланади.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. Хорижнинг қатор етакчи илмий марказларида плазма тиббиёти соҳасида илмий изланишлар олиб бориш, хусусан совуқ атмосферик плазманинг саратонга қарши таъсирини фундаментал ва амалий тадқиқ қилиш бўйича етакчи олимлар: жумладан А. Fridman, М. Keidar, А. Bogaerts, М. Kushner, Т. von Woedtke, J. Benedikt, D. Graves, V. Miller, J-M. Pouvesle, E. H. Choi, V. Colombo, S. Hamaguchi, G. Kroesen, M. Hori, K. D. Weltmann, M. Laroussi, D. O'Connell, L. Mir, Xinpei Lu, J. Vandow ва К. Остриковларнинг илмий мактаблари шуғулланишади. Плазма онкологиясида *in vitro* ҳамда *in vivo* тадқиқотлар ва дастлабки клиник синовлар жуда истикболли натижалар бераётганига қарамасдан, асосий механизмларни чуқурроқ тушунишга эҳтиёж ҳануз катталигича қолмоқда. САПнинг саратонга қарши фаоллигининг плазма ҳосил қилган реактив кислород ва азот турлари (РКАТ) билан боғлиқлиги эътироф этилган. Бир қатор тадқиқотлар шуни кўрсатдики, плазма билан ишлов берилганда саратон хужайраларида пайдо бўладиган хужайра ичидаги РКАТ нормал хужайраларга нисбатан сезиларли даражада ошган ва РКАТнинг бу юқори даражаси саратон хужайраларининг танлаб йўқ қилинишига катта эҳтимоллик билан сабаб бўлади. Ҳақиқатан ҳам,

¹ Мавзу бўйича халқаро тадқиқотлар шарҳи қуйидаги шарҳ мақолаларига асосланган: М. Keidar, Plasma Sources Sci. Technol. 24 (2015) 033001, D. Yan et al. Oncotarget 8 (2017) 15977 ва А. Bogaerts et al. Front. Chem. Sci. Eng. 13 (2019) 253.

саратон хужайраларида метаболизм кучлироқ бўлганлиги сабабли, уларнинг базал хужайра ичидаги РКАТ даражаси (концентрацияси) нормал хужайралардагига нисбатан юқори бўлади. Уларга хужайра ташқарисидан кўшимча РКАТ таъсир қилганида, саратон хужайралари ичидаги РКАТ даражаси мумкин бўлган чегарадан (яъни бўсагадан) ошиши мумкин, бу эса хужайралар ўлимига олиб келади. Шу сабабли, саратон хужайралари плазма билан таъсирлашганда нормал хужайраларга қараганда кўпроқ апоптозга (яъни дастурлаштирилган хужайра ўлимига) учраши мумкин.

РКАТ хужайра ичидаги ва хужайралараро муҳитдаги асосий биокимёвий йўллари, шу жумладан хужайралардаги физик ва кимёвий ўзгаришларни, тартибга солади. Сўнгги тадқиқотлар шуни кўрсатдики, тирик хужайраларга плазма орқали ишлов бериш хужайра ичидаги сигнал ўзгаришларига олиб келади, бу эса хасталикларни даволашда муҳим аҳамиятга эга. Аммо, плазма ҳосил қилган реактив зарралар хужайра ичидаги жараёнларни қандай тартибга солиши, яъни бевосита, хужайра ичидаги таркибий қисмларни модификациялаш орқали ва/ёки билвосита, хужайрадан ташқари таркибий қисмларни ёки ташқи мембранани ўзгартириш орқали ҳали ҳам аниқ эмас. Шубҳасиз, бу кўпроқ эксперимент ва компьютер симуляцияларига асосланган фундаментал тадқиқотлар ўтказилишини тақозо қилади.

Гарчи экспериментал тадқиқотлар зарур бўлсада, компьютерда моделлаштириш тадқиқотлари ҳам жуда муҳим аҳамият касб этади, чунки улар нано ўлчамли (нм ва нс) жараёнлар тўғрисида фундаментал тушунчалар беради, бу эса экспериментал равишда ўрганиш қийин бўлган механизмларни батафсил тадқиқ қилишга имкон яратади. Аммо, ҳозирги кунгача реактив плазма зарралари билан биомолекулаларнинг ўзаро таъсирини *in silico* тадқиқ қилишга жуда ҳам кам эътибор берилган.

РКАТнинг хужайралар ичига кириб боришини тушунтирувчи учта эҳтимолий механизмлари таклиф этилган: а) реактив зарраларнинг трансмембрана оқсил каналлари орқали фаол (яъни тўғридан-тўғри) транспорти; б) ўтказувчанликнинг ошишига олиб келувчи хужайра мембранасининг бу зарралар томонидан кимёвий модификацияси; с) хужайра ичида стресс сигналига олиб келувчи маълум оқсиллар билан бу зарраларнинг ўзаро таъсири, буларнинг барчаси хужайрадаги РКАТ даражасининг ошишига сабаб бўлиши мумкин. Саратон хужайраларида юз берадиган РКАТнинг хужайра ичида сезиларли ошишини тушунтирувчи механизмларнинг барчаси ушбу докторлик ишида тадқиқ этилган.

Тадқиқот мавзусининг илмий иш бажарилган олий таълим муассасасининг тадқиқот фаолияти билан боғлиқлиги. Тадқиқотлар Антверпен Университетининг (Бельгия) PLASMANT гуруҳи илмий ишлари режасига мувофиқ ва Фландрия илмий тадқиқот фонди томонидан молиялаштирилган қуйидаги постдокторлик тадқиқот лойиҳалари доирасида олиб борилган: № 1200216N “Плазма ёрдамида саратонини даволашда атомар ўлчамдаги моделлаштириш” (2015-2018 йиллар, Антверпен университети,

Бельгия) ва № 1200219N “Плазма асосида саратон хасталигини даволаш: Атомар даражадаги симуляция” (2018-2021, Антверпен университети, Бельгия).

Тадқиқотнинг мақсади совуқ атмосферик плазма туфайли юзага келадиган реактив зарраларнинг биомолекулалар билан ўзаро таъсири механизмларини аниқлаш орқали плазманинг биомолекулаларга таъсирини ўрганиш бўйича фундаментал тушунчаларга эга бўлиш ва, хусусан жараёнларда реактив зарраларининг ролини аниқлашдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

махсус биомолекулалар учун мос модел системаларни аниқлаш; уларнинг фазовий ҳамда атомар тузилишларини (структураларини) ўрнатиш ва сўнгра энергиясини минималлаштириш ва мувозанатлаш;

модел мембранада плазма ҳосил қилган реактив зарралар томонидан содир қилинган бош гуруҳ ва липид дум оксидланишининг эффеқтини ўрганиш; ушбу модел мембрана оксидланишида реактив кислород турларининг ўзига хос ролини аниқлаш;

хужайра мембранасининг ўтказувчанлигига электр майдон ва липид оксидланишининг синергистик таъсирини ўрганиш; мембранада ғовак ҳосил бўлиши (яъни электропорация) учун зарур бўлган электр майдонининг бўсағавий қийматини аниқлаш; мембрана бўйлаб реактив турларнинг ўтказувчанлик эркин энергия барьерларини ҳисоблаш;

табиий ва оксидланган мембраналар орқали плазма ҳосил қилган турларнинг ўтиш жараёнларини уларнинг транспорт эркин энергия профилларини ҳисоблаш орқали ўрганиш;

табиий ва оксидланган мембрана бўйлаб фосфатидилсериннинг ‘flip-flop’ (яъни бир қатламдан иккинчи қатламга ўтиш) ҳаракатини тадқиқ қилиш; транслокация учун эркин энергия барьерларини ҳисоблаш;

плазма зарраларининг хужайраларга киришида липид думининг тўйинганлик даражаси, липид бош гуруҳининг тури ва мембранадаги холестерин улушининг эффеқтни тадқиқ этиш;

гомоген ва гетероген мембрана системаларидан фойдаланиб оксидланган мембраналарда механик стресс (ёки кучланиш) эффеқтини ўрганиш;

аквапорин трансмембран оқсил канали бўйлаб реактив зарралар транспортига плазма орқали оксидланишнинг таъсирини тадқиқ қилиш; эркин энергия ва диффузия коэффициенти профилларини ҳисоблаш; ўтказувчанлик механизмларини аниқлаш;

хСТ антипортер томонидан цистин транспортига оксидловчи стресснинг таъсирини ўрганиш; ушбу оксидланган оқсил каналидаги аминокислоталарнинг қайта жойлашувини тадқиқ этиш;

инсон эпидермал ўсиш факторининг структуравий хусусиятларида плазма орқали оксидланишнинг ролини аниқлаш; ушбу оқсил системасида конформацион ўзгаришларни ўрганиш;

плазма ёрдамида оксидланишнинг цитоглобин оқсили структурасига таъсирини тушуниш; молекула ичида ҳосил бўлган дисульфид боғининг эффектини тадқиқ қилиш;

токсик амилоид бета пептид агрегацияси барқарорлигида плазма орқали оксидланишнинг ролини аниқлаш; структуравий ўзгаришларни таҳлил қилиш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида реактив кислород ва азот турлари (зарралари), турли хил табиий ва оксидланган липид молекулаларидан ташкил топган фосфолипид қўш қатлам, табиий ва оксидланган аквапорин ва хСТ интеграл мембрана оқсиллари, шунингдек сигнал, глобулар ва толасимон оқсиллар учун модел системалар олинган.

Тадқиқотнинг предмети модел системада атомлар жойлашуви, тезлиги ва ўзаро таъсир энергиялари, битта липидга тўғри келувчи юза ва қўш қатлам қалинлиги, фосфолипид қўш қатлам ва аквапорин орқали реактив зарраларнинг ўтиш эркин энергия ва диффузия коэффициенти профиллари, ўтказувчанлик коэффициенти, эркин энергия баръери, ғовак ҳосил қилиш электр майдон кучланганлиги ва ўртача вақти ҳамда боғланиш эркин энергияси ҳисобланади.

Тадқиқот усуллари. Тадқиқотлар жараёнида реактив ва реактив бўлмаган молекуляр динамика (МД) ҳамда соябонли намуна олиш (umbrella sampling–US) усулларидан фойдаланилган.

Тадқиқотнинг илмий янгилиги куйидагилардан иборат:

илк бор РКАТнинг фосфолипид қўш қатлам (ФҚҚ) бош гуруҳлари билан ўзаро таъсирини ва сўнгра бош гуруҳ ва липид дум оксидланишининг мембрананинг структуравий ва динамик хусусиятларига таъсирини, турли хил моделлаштириш усулларидан фойдаланган ҳолда тизимли ўрганиш усули яратилган ва олинган симуляция натижалари ва тажрибалар ўртасида яхши мувофиқликка эришилган;

САП туфайли юзага келган электр майдон ва липид оксидланишининг ФҚҚда ғоваклар ҳосил бўлишида синергистик эффектининг молекуляр даражадаги механизмлари идентификация қилинган;

липид думларининг оксидланиши электропорацияни бошлаш учун зарур бўлган ўртача вақтнинг камайишига, шунингдек ФҚҚда ғовак пайдо бўлиши учун зарур бўлган бўсағавий электр майдон пасайишига олиб келиши топилган;

илк бор плазма орқали оксидланишнинг ФҚҚда содир бўладиган жараёнларга, жумладан фосфатидилсерин ‘flip-flop’ (бир қатламдан иккинчи қатламга ўтиш) ҳаракатига, РКАТ транспортига ва механик кучланишга таъсирини ўрганиш учун тизимли усуллар ишлаб чиқилган;

ФҚҚнинг оксидланиши гидрофилик РКТнинг у орқали ўтиш эркин энергия баръерларининг умумий пасайишига олиб келиши, ҳолбуки, гидрофобик РКАТ табиий ва оксидланган ФҚҚлар орқали сезиларли даражада яхшироқ ўта олишлари мумкинлиги кўрсатилган;

ФҚҚнинг оксидланиши ФҚҚ орқали фосфатидилсерин транслокациясини осонлаштириши, ундан ташқари механик стресс остидаги ФҚҚда ғовак пайдо бўлиши учун керак бўладиган нисбий кенгайишни пасайтириши, шу билан мембрананинг оқувчанлигига ҳисса қўшиши аниқланган;

илк бор аквапорин (AQP) трансмембран оқсил канали орқали гидрофилик ва гидрофобик РКАТнинг ўтиш жараёнларини тадқиқ қилиш усули яратилган;

гидрофилик зарралар хужайрага AQPлар орқали кириши таклиф қилинган, чунки уларнинг липид мембранаси орқали кириши учун янада юқорирок энергиявий барьерга дуч келиши кўрсатилган;

гидрофобик РКАТ хужайрага катта эҳтимол билан, липид оксидланиши содир бўладиган, мембрана орқали кириши аниқланган, чунки уларнинг AQP орқали ўтиш энергиявий барьерлари юқорирок бўлиши топилган;

илк бор турли симуляция методларидан фойдаланиб, цистин (CYS)нинг хСТ антипортер оқсили орқали транспорт жараёни тўлиқ кузатилган;

хСТнинг оксидланиши CYS транслокацияси учун эркин энергия барьерини келтириб чиқариши ва шу билан CYS нинг субстрат боғланадиган жойга киришини тўсиб қўйиши кўрсатилган;

учта оқсил модел системаларининг хусусиятларига плазма орқали оксидланишнинг таъсири батафсил текширилган; шу мақсадда модел оқсилларнинг оксидланган шакллари яратиш учун (яъни уларни модификация қилиш учун) муайян аминокислоталар танланган; симуляциялар тажрибалар билан биргаликда олиб борилган ва натижаларнинг сифат жиҳатидан мувофиқлигига эришилган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат:

турли хил моделлаштириш методларининг комбинацияси ёрдамида совуқ атмосферик плазма ҳосил қилган зарраларнинг биомолекулалар билан ўзаро таъсирини атомар даражада тадқиқ қилиш усуллари таклиф қилинган;

реактив ва реактив бўлмаган МД ҳамда US методларини бирлаштириш орқали плазма туфайли юзага келувчи фосфолипид қўш қатламда содир бўладиган структуравий ва динамик ўзгаришлар, унинг ўтказувчанлигининг ўзгариши, унга оксидланиш, электр майдони ва механик кучланишнинг таъсири ҳамда у орқали реактив плазма зарраларининг транспорти жараёнларини ўрганиш усуллари яратилган;

US-MD ва GLE методлари ҳамда HOLE ва STRIDE каби дастурларни биргаликда қўллаш ёрдамида совуқ плазма орқали оксидланишнинг интеграл мембрана оқсиллари хусусиятларига ва ўтказувчанлигига таъсири, улар орқали турли хил турлар ўтишининг мураккаб механизмларини тизимли тадқиқ қилиш имконияти кўрсатилган;

модел оқсилларда турли хил оксидланиш даражаларини ҳосил қилишда ўзига хос ёндашув усули, яъни тажриба ва симуляция натижаларига таянган ҳолда муайян аминокислоталарни модификациялаш методи тадбиқ қилинган;

плазма туфайли оксидланган оксилларнинг структуравий хусусиятларини, улардаги конформацион ўзгаришларнинг оксиллар барқарорлигига таъсирини ўрганиш мақсадида реактив бўлмаган МД ва молекуляр бириктириш симуляцияларини биргаликда ишлатиш ҳамда олинган натижаларни таҳлил қилувчи ҳар хил усуллар (яъни PCA, SASA ва DSP) комбинациясини қўллаш услублари ишлаб чиқилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги уларнинг замонавий моделлаштириш усулларини қўллаш ёрдамида олинганлиги, шунингдек, адекват модел тизимлари ва ҳисоблаш алгоритмларининг ишлатилганлиги ҳамда олинган натижалар экспериментал натижаларга мувофиқлиги билан исботини топган. Бундан ташқари, докторлик иши натижаларини ўзида мужассам қилган мақолалар юқори импакт факторли журналларда чоп этилган ва етакчи мутахассислар томонидан тақриз қилинган. Докторлик ишининг натижалари *AdvancedScienceNews.com* илмий янгиликлар веб-сайтида ёритилган ҳамда плазма тиббиётига бағишланган китобларга киритилган, яъни “*Plasma medical science*”, S. Toyokuni *et al.*, Academic Press, 2018 (4-боб) ҳамда “*Plasma cancer therapy*”, M. Keidar, Springer, 2020 (7- боб).

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти, замонавий компьютер симуляцияларини қўллаш орқали, совуқ плазма билан биомолекулалар ўзаро таъсирининг фундаментал физик-кимёвий жараёнларини, ушбу жараёнларни қандай бошқариш мумкинлиги нуқтаи назаридан келиб чиқиб, аниқлашдан иборат.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти шундан иборатки, олинган симуляция натижалари саратон хасталиги билан боғлиқ бўлган биомолекулалар билан плазма ўзаро таъсири механизмларини яхшироқ тушунишга, шунингдек, тажрибада олинган тегишли натижаларни молекуляр даражада талқин қилишга муҳим ҳисса қўшади. Моделлаштириш натижалари асосида САПнинг мумкин бўлган фойдали (ёки зарарли) таъсирларини олдиндан айтиш мумкин, бу эса, ўз навбатида, янада мақсадли ва самарали тиббий плазма терапияларини яратиш имкониятини беради.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. Тадқиқот натижаларининг асосий татбиқи олинган натижаларга, *Web of Science* илмий маълумотлар базасига кўра, юқори импакт факторли журналларда чоп этилган 250 дан ортиқ экспериментал ва моделлаштириш тадқиқотларида, шунингдек шарҳ мақолаларида иқтибос келтириш орқали жорий қилинган:

плазма ҳосил қилган РКАТнинг ФҚҚ билан ўзаро таъсири ва сўнгра бош гуруҳ ва липид дум оксидланишининг мембрананинг хусусиятларига таъсири, шунингдек электр майдони ва липид оксидланишининг ФҚҚ ўтказувчанлигига синергистик таъсири натижалари [*Biol. Chem.* 2019; 400: 19 (IF=3.014), *Sci. Rep.* 2019; 9: 4496 (IF=4.011), *J. Chem. Inf. Model.* 2019; 59: 4413 (IF=3.966), *Cells* 2020; 9: 847 (IF=5.656), *Trends Biotechnol.* 2018; 36: 594 (IF=13.747), *J. Am. Chem. Soc.* 2018; 140: 9606 (IF=14.695), *Chem. Rev.* 2019; 119: 5954 (IF=54.301),

Mat. Sci. Eng. R. 2019; 138: 36 (IF=22.25)] да натижаларни талқин қилиш ва тавсифлашда ишлатилган;

плазма туфайли оксидланишдан келиб чиққан ФКҚда содир бўладиган жараёнлар, чунончи РКАТ транспорти ва фосфатидилсерин ‘flip-flop’ ҳаракати каби тадқиқотлар натижалари [*J. Phys. Chem. B* 2018; 122: 10362 (IF=2.923), *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019; 21: 19327 (IF=3.567), *Cancers* 2020; 12: 269 (IF=6.162), *Nanoscale* 2019; 11: 19497 (IF=6.97), *Cancers* 2019; 11: 1109 (IF=6.162), *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 1939 (IF=4.183), *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2018; 51: 177 (IF=7.052), *Annu. Rev. Biophys.* 2019; 48: 421 (IF=12.175), *Chem. Rev.* 2019; 119: 5954 (IF=54.301)] да таҳлил қилинган ва кўриб чиқилган;

аквапорин орқали гидрофилик ва гидрофобик РКАТнинг ўтиши, шунингдек цистиннинг хСТ оксил канали орқали траспорти бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижалари [*J. Chem. Inf. Model.* 2018; 58: 2193 (IF=3.966), *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019; 2019: 9062098 (IF=4.868), *Cells* 2019; 8: 1316 (IF=5.656), *Cancers* 2019; 11: 1920 (IF=6.162), *Arch. Biochem. Biophys.* 2020; 681: 108253 (IF=3.559), *Neurochem. Res.* 2020; 45; 1375 (IF=2.782), *J. Membr. Biol.* 2019; 252: 465 (IF=1.746), *Arch. Biochem. Biophys.* 2019; 674: 108114 (IF=3.559), *Cancers* 2020; 12: 269 (IF=6.162)] да муҳокама қилинган ва ишлатилган;

учта оксил модел системалари, яъни инсон эпидермал ўсиш фактори, амилоид бета пептид ва цитоглобиннинг структуравий хусусиятларига плазма орқали оксидланишнинг таъсири тадқиқотлари натижалари [*Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019; 2019: 9062098 (IF=4.868), *Cancers* 2019; 11: 1920 (IF=6.162), *Cancers* 2018; 10: 394 (IF=6.162), *J. Mol. Graph. Model.* 2020; 96: 107535 (IF=1.863), *Sci. Rep.* 2019; 9: 16080 (IF=4.011), *ChemSusChem* 2020; 13: 2072 (IF=7.804), *Molecules* 2019; 24: 2568 (IF=3.06), *Plasma. Process. Polym.* 2018; 15: e1800078 (IF=3.173)] да олинган натижалар таҳлили учун фойдаланилган.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Олинган тадқиқот натижалари 31 та нуфузли халқаро конференция, симпозиум ва семинарларда тақдим этилган ва муҳокамадан ўтказилган.

Хусусан, таклиф қилинган маърузалар тўртта халқаро конференцияда тақдим этилган, жумладан 19th Gaseous Electronics Meeting (February 14-17, 2016, Geelong, Australia), International Conference on Electrical Discharges with Liquids (March 13-17, 2016, Kocaeli, Turkey), 2017 International Forum on Functional Materials (June 27-29, 2017, Jeju, Korea) ва 3rd Strasbourg Workshop on Membrane Biophysics (December 3-4, 2018, Strasbourg, France). Бундан ташқари, илмий натижалар маърузалар сифатида халқаро анжуман ва семинарларда тақдим этилган, масалан, 4th Young Professionals Workshop on Plasma Medicine (September 21-24, 2015, Rostock, Germany), 6th International Conference on Plasma Medicine (September 4-9, 2016, Bratislava, Slovakia) ва 7th International Conference on Plasma Medicine (June 17-22, 2018, Philadelphia, USA). Нуфузли конференцияларда иштирок этиш Фландрия илмий тадқиқот

фонди (Бельгия) томонидан тақдим этилган грантларни (№ K179517N ва № K105116N) олиш орқали амалга оширилган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилинганлиги. Докторлик тадқиқотлари натижалари бўйича жами 56 та илмий иш нашр қилинган, жумладан 23 та мақола Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган, *Web of Science* илмий маълумотлар базасида акс этган нуфузли хорижий илмий журналларида нашр этилган.

Тақдимноманинг тузилиши ва ҳажми. Тақдимноманинг таркиби кириш, бешта бўлим, хулоса ва адабиётлар рўйхатидан иборат. Тақдимноманинг ҳажми 88 бетни ташкил этади.

ТАДҚИҚОТНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш. Ушбу тадқиқот совуқ атмосферик плазма туйғулари юзага келадиган реактив зарраларнинг биомолекулалар билан ўзаро таъсири механизмларини аниқлаш орқали плазманинг биомолекулаларга таъсирини ўрганиш бўйича фундаментал тушунчаларга эга бўлиш ва, хусусан жараёнларда реактив зарраларининг ролини аниқлашга қаратилган.

Биринчи бўлим: Моделлаштириш методлари. МД симуляцияси (molecular dynamics–MD) усулида системадаги атомларнинг фазо ва вақт бўйича ҳаракат динамикаси Ньютон қонунлари билан ифодаланади. Атомларга таъсир этувчи кучлар квант механикаси (quantum mechanics–QM) қоидаларига асосланган (“*ab initio* MD”) ёки классик атомлараро ўзаро таъсир потенциали ёки куч майдони (“classical MD”) орқали ҳисобланиши мумкин. Шунингдек, оралик ҳисоблаш методлари, яъни QM концепцияларига асосланган, аммо бир қатор мослаштириш параметрларини ўз ичига олган ярим эмпирик усуллар ҳам мавжуд, масалан зичлик функционали назарияси (density functional theory–DFT)га асосланган зич-боғлаш (density-functional tight-binding–DFTB) методи.

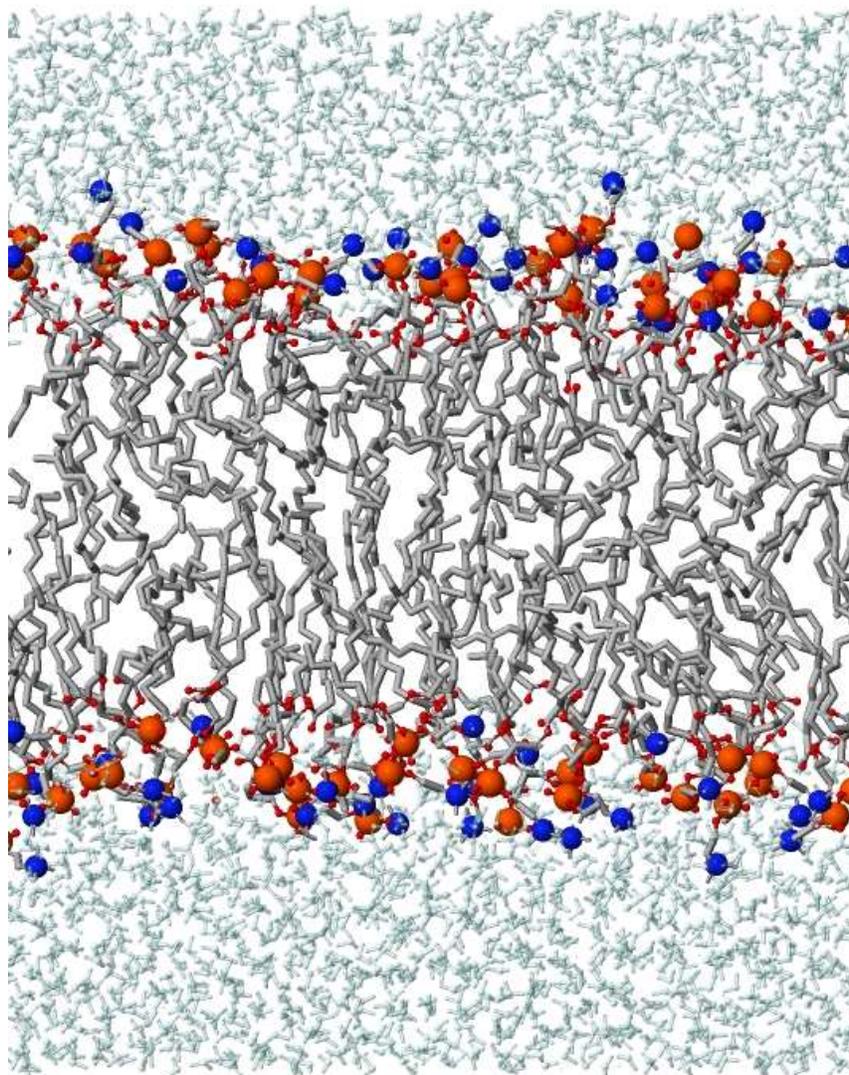
Реактив МД (реактив куч майдонига асосланган метод) кимёвий реакцияларни, яъни боғ ҳосил бўлиши ва узилишини, моделлаштиришга имкон беради, бу эса симуляциялар учун кўп вақт ва ресурслар талаб қилади, шунинг учун бу метод ёрдамида фақат қисқа вақт оралиғидаги (10^2 - 10^3 пс) ва кичик системалардаги (10^2 - 10^3 атом) жараёнларни моделлаштириш мумкин. Реактив бўлмаган МД эса, ўз навбатида, моделлаштиришда анча тез бўлиб, узоқроқ вақтли жараёнларни (бир неча 100 нс) ва каттароқ системаларни (10^4 - 10^5 атом) симуляция қилишга имкон беради.

DFTB-га асосланган реактив МД симуляциялари. DFTB - бу заряд зичлиги флуктуациялари (ўзгаришлари)га нисбатан DFT умумий энергия ифодасини Тейлор қаторига ёйишга асосланган аппроксимацияли DFT методи

ҳисобланади. У ўрганилаётган структуралар реакция энергиялари ва геометрияларини ишончли тавсифини таъминлайди, симуляция натижаларининг экспериментал қийматлардан оғиши DFT билан таққослаш даражасида эканлиги таъкидланади, шу билан бирга DFTга нисбатан икки катталиқ тартиби тезроқ ҳисоблаши айтилади. Бу методнинг ҳисоблаш тезлиги AM1 ва PM3 каби ярим эмпирик методларники сингари. Ушбу метод дисперсия кучларини эмпирик усуллар ёрдамида ечиш орқали каттароқ биомолекулаларни тадқиқ қилиш имкониятларини кенгайтирди.

Реактив бўлмаган МД симуляцияси тажрибалар билан оқилона мувофиқликни таъминлаш учун юқори параметрланган классик куч майдонлари (ёки потенциаллар)дан фойдаланади. Ушбу ишда GROMOS куч майдони қўлланилди, у тадқиқотда ишлатилган оқсил ва липид кўш қатлам системаларини аниқлик билан тавсифлай олади. У бирлашган-атом куч майдони ҳисобланиб, унда маълум бир атомлар гуруҳи (асосан CH_x) ягона гуруҳ сифатида қаралади, шунинг учун у катта (10^5 атофидаги атомли) системаларни яхши аниқлик билан бошқаришга қодир. GROMOS аллақачон кўплаб моделлаштириш тадқиқотларида қўлланилган ва тажрибаларга мос натижаларга эришилган. У модификацияланмаган (яъни табиий) ва модификацияланган (яъни оксидланган) липид молекулалари ва аминокислоталарнинг параметрларини ўзида мужассам этган ва шунинг учун физик жараёнларни, масалан, реактив кислород ва азот турлари (PKT ва PAT ёки PKAT)нинг табиий ва оксидланган липид кўш қатлами ва/ёки оқсил канали орқали транспортини, шунингдек ушбу системалардаги структуравий ва конформацион ўзгаришларни моделлаштириш имконини беради.

US методи реакция координатаси бўйлаб эркин энергия фарқларини ҳисоблашда ёрдам беради. У ‘соябон’ потенциалини қўллаш орқали намуна олишни кучайтириш учун ишлатиладиган кучли методларидан биридир. US да қўлланиладиган ташқи гармоник ‘биас’ (таъсир қилувчи) потенциал системани бир термодинамик ҳолатдан иккинчисига реакция координатаси бўйлаб белгиланган йўналиш ва тезликда ўтказилади. Шундай қилиб, бошланғич ҳолатидан якуний ўтиш ҳолатига қадар оралик қадамлар бир қатор ‘ойналар’ орқали ҳосил бўлади. Ушбу ойналарни кўриладиётган (ёки ўрганиладиётган) молекулалар орасидаги маълум масофага қараб қисмларга бўлиб, бир қатор индивидуал системаларни ажратиш олиш мумкин. Масалан, мембранага нормал бўйлаб жойлашган иккита атом орасидаги масофани реакция координатаси сифатида танлаш (ҳисобга олиш) мумкин. Ажратилган ойналар кейинчалик US-MD симуляцияларида ишлатилади ва олинган натижалар, ўлчанган гистограммани таҳлил қилиш методи (weighted histogram analysis method–WHAM)дан фойдаланиб, эркин энергия профили (ЭЭП)ни масофага боғлиқ равишда ҳисоблашга ёрдам беради. US-MD, масалан, иккита оқсил орасидаги боғланиш ёки диссоциация эркин энергиясини, ёки фосфолипид кўш қатлам (ФҚК, эукариотик хужайра мембранаси учун модел система, 1-расм) бўйлаб PKATнинг ЭЭПларини ҳисоблашда кенг қўлланилади.



1-расм. Реактив бўлмаган МД симуляцияларида хужайра мембранаси учун модел система сифатида ишлатиладиган ФҚҚ. У иккита қатламда жойлаштирилган 128 та липид ва ~8000 та сув молекулаларидан иборат. Сув қатламлари, кислород атомлари ва липид думлари мос равишда зангори, қизил ва кул рангларда кўрсатилган. Бош гуруҳининг Р (тўқ сариқ) ва N (кўк) атомлари тушунарли бўлиши учун каттароқ шарлар билан тасвирланган.

Симуляция методларидан ташқари айрим натижаларни таҳлил қилиш учун бошқа дастур ва усуллардан ҳам фойдаланилди. Хусусан, HOLE ва STRIDE дастурлари мос равишда оқсил каналлари бўйлаб ковак радиуси профилларини ҳисоблашда ва оқсилларнинг иккиламчи структурасини таҳлил қилишда ишлатилди. Бундан ташқари, US-MD симуляциясининг натижаларидан фойдаланиб, диффузия коэффиценти профилларини (ДКП) ҳисоблашда GLE усули қўлланилди. Ушбу метод гармоник осциллятор учун умумлаштирилган Ланжевен тенгламаси (generalized Langevin equation–GLE) ечимларига асосланган. Ўрин автокорреляция функцияси (ЎАКФ)ни интеграллаш орқали,

зарранинг ҳар бир z -ўриндаги диффузия коэффициентини $D(z)$ қуйидагича ҳисобланади:

$$D(z_i = \langle z \rangle_i) = \frac{\text{var}(z)^2}{\tau} \quad (1)$$

τ ЎАКФ ($C_z(t)$) интегралли орқали ҳисобланади:

$$\tau = \int_0^{\infty} C_z(t) dt \quad (2)$$

$C_z(t)$ функцияси траектория бўйлаб тўғридан-тўғри йиғиш (суммалаш) орқали ҳисобланиши мумкин:

$$C_z(t) = \langle \delta z(0) \delta z(t) \rangle \quad (3)$$

бу ерда

$$\delta z(t) = z(t) - \langle z \rangle \quad (4)$$

Кўришиб турганидек, GLE усулининг афзаллиги шундаки, диффузия коэффициентини бевосита z нинг дисперсияси ҳамда корреляция вақти τ орқали ҳисобланиши мумкин. Ушбу тадқиқотда GLE методи асосида ишлайдиган фортран код ёзилди ва унинг аниқлиги бир неча тест синовлари ўтказилиши ва натижаларни адабиётдаги қийматлар билан солиштирилиши орқали текширилди. ЭЭП ва ДҚПлардан фойдаланиб, модел системалар орқали зарраларнинг ўтказувчанлик коэффициентлари (P_m)ни ҳисоблаш мумкин:

$$\frac{1}{P_m} = \int_{z_1}^{z_2} \frac{e^{w(z)/k_B T}}{D(z)} dz \quad (5)$$

бу ерда $w(z)$ зарранинг модел система z -ўқи бўйлаб эркин энергияси.

Шундай қилиб, докторлик иши доирасида РКАТнинг ФҚҚ бош гуруҳлари билан ўзаро таъсирини тадқиқ этиш учун реактив DFTB-MD симуляциялари қўлланилди. Шу билан бирга, плазма орқали оксидланиш, электр майдон, механик стресс ва липид таркибининг ФҚҚ структуравий ва динамик хусусиятларига таъсирини ҳамда оксидланишнинг оксиллар конформациясига таъсирини ўрганиш учун реактив бўлмаган МД симуляцияларидан фойдаланилди (пастга қаранг). Ундан ташқари, ФҚҚ орқали РКАТнинг ўтиш жараёнлари ва фосфатидилсериннинг ‘flip-flop’ ҳаракати, шунингдек,

зарраларнинг модел оксиллар (AQP ва хСТ, пастга қаранг) бўйлаб транспортини тадқиқ қилиш учун US-MD симуляциялари қўлланилди.

Иккинчи бўлим: Хужайра мембранасининг ўтказувчанлиги. Ушбу бўлимда, САП туфайли ҳосил бўлган бош гуруҳ ва липид дум оксидланишининг хужайра мембранасига таъсири, РКАТнинг табиий ва оксидланган мембраналар орқали транспорти, шунингдек, хужайра мембранасининг ўтказувчанлигига электр майдон ва липид оксидланишининг синергистик таъсири ҳақидаги тадқиқотлар натижалари муҳокама қилинади.

Хужайра мембранасига бош гуруҳи ва липид дум оксидланишининг таъсири. Хужайра мембранаси хужайранинг муҳим қисмидир. Унинг асосий вазифаларидан бири хужайрани ташқи томондан келадиган нарсалар (мас., РКАТ)дан ҳимоя қилишдир. Шунинг учун плазма зарраларининг хужайра мембранаси билан қандай ўзаро таъсирлашиши, шу билан, масалан, липид оксидланишини ҳосил қилиши, ҳамда оксидловчи зарар келтириши учун хужайра ичига қандай кириб боришини ўрганиш жуда муҳим ҳисобланади.

РКАТнинг ФКҚ билан ўзаро таъсири бўйича реактив МД симуляция натижалари юқори аниқликдаги масс спектрометрия (МС) тажрибалари билан таққослаш орқали тасдиқланди, реактив бўлмаган МД натижалари эса РКАТ манбаи ҳисобланувчи САП билан ишлов берилган липосомаларда ўтказилган тажрибалар билан тасдиқланди. Иккинчи ҳолатда, липосомалар оқувчанлигига САП нинг таъсири ўрганилди; бу липосомалар Лаурдан деб номланган флуоресцент зонд (молекула)ни интеграция қилиш орқали тайёрланди. Шундай қилиб, мембрана оқувчанлигининг ўзгаришини аниқлаш учун Лаурдан таҳлили ўтказилди. Бу таҳлил умумлаштирилган кутбланиш (generalized polarization–GP) қийматининг ўзгариши билан боғлиқ эди.

Реактив МД симуляциялари ва МС тажрибалари натижалари кўп учровчи оксидланиш маҳсулотлари сифатида иккита муҳим оксидланиш маҳсулотларини аниқлади, яъни липид думлари оксидланиши туфайли улардан бирида ҳосил бўлувчи альдегид гуруҳлари (ALD) ҳамда ФКҚ бош гуруҳи оксидланиши натижасида думлардан бирининг ажралиши ёки узилиши (OX2). Шундай қилиб, реактив бўлмаган МД симуляцияларида ушбу оксидланиш маҳсулотлари ҳисобга олинди (кўриб чиқилди) ва уларнинг ФКҚ хусусиятларига узоқ муддатли таъсирлари ўрганилди. Шу мақсадда кўш қатламнинг айрим муҳим хусусиятлари таҳлил қилинди:

1. *Битта липидга тўғри келувчи сирт юзаси*, у кўш қатлам сирти юзасини битта қатламдаги липидлар сонига нисбати орқали аниқланади,

$$A_L = \frac{L_x \times L_y}{n_L} \quad (6)$$

бу ерда L_x ва L_y - мос равишда ФКҚнинг x ва y ўлчамлари ва n_L - бу битта қатламда мавжуд бўлган липидлар сони.

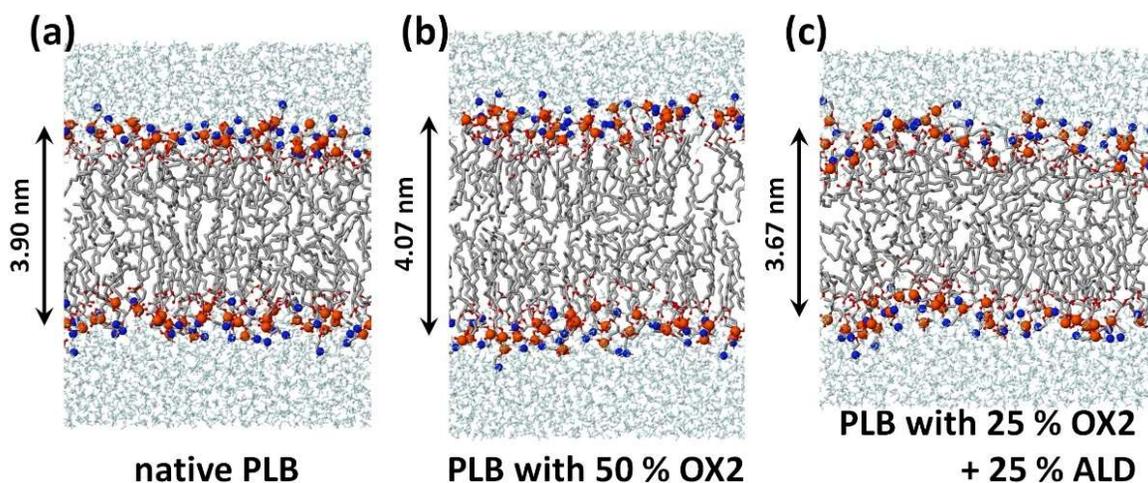
2. *Кўш қатлам қалинлиги*, у ФКҚнинг қарама-қарши икки қатламида жойлашган фосфат гуруҳлари орасидаги масофаларни (*z*-компонентларини) ўртачалаш орқали ҳисобланади (яъни d_{P-P}).

3. *Дейтерий тартиб параметри*, S_{CD} , у кўш қатлам липид думларининг тартибини кўрсатувчи ўлчов катталиқ ҳисобланади. ФКҚ бош гуруҳларининг оксидланиши липид думларининг тартибланиш даражасига ҳам таъсир кўрсатиши мумкин (пастга қаранг),

$$S_{CD} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2(\theta_j) - 1 \rangle \quad (7)$$

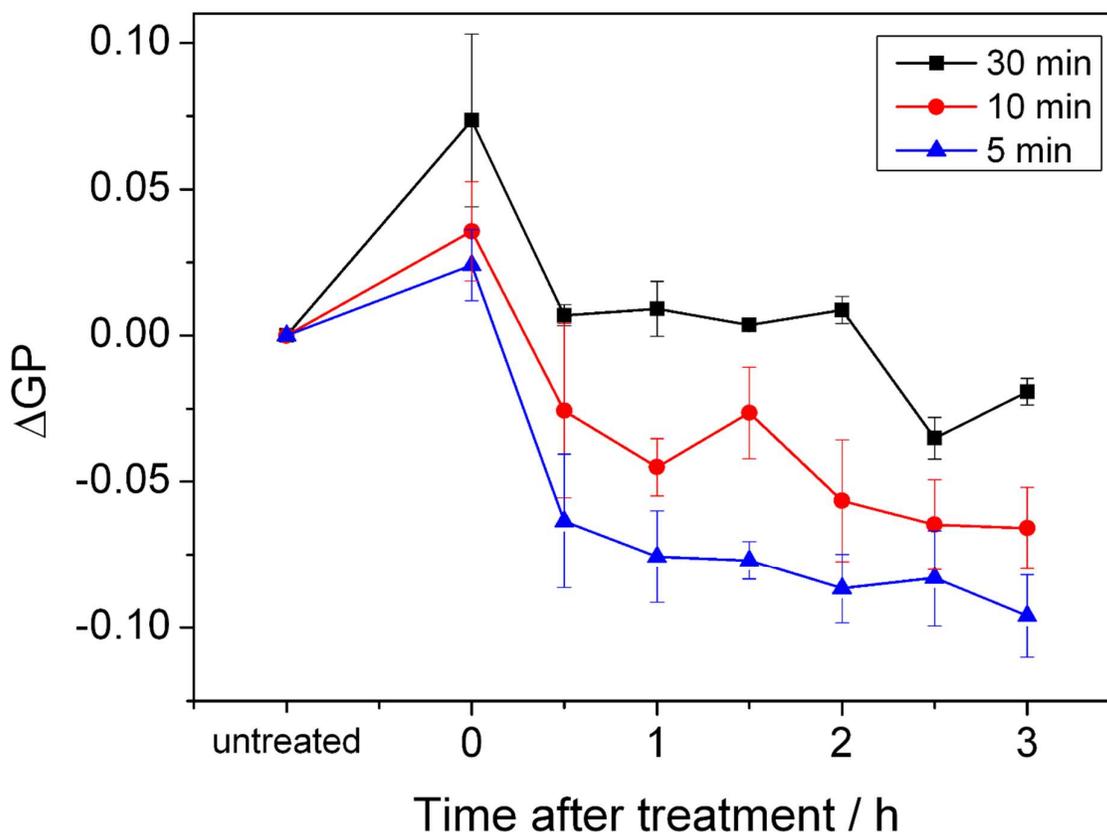
бу ерда θ_j – C-D боғи ва мембрана нормали орасидаги бурчак.

Симуляция натижалари шуни кўрсатдики, OX2 ва бирлашган ALD+OX2 оксидланиш маҳсулотлари барча ҳисобланган катталиқлар бўйича қарама-қарши натижаларга олиб келади, аммо эффеқтлар ALD+OX2 учун яққолроқ кўринади (2-расм).



2-расм. а) табиий, яъни оксидланмаган, (b) фақат бош гуруҳлари оксидланган (яъни 50% OX2) ҳамда (c) бош гуруҳлари ва липид думлари оксидланган (яъни 25% OX2 ва 25% ALD) ФКҚларнинг схематик кўринишлари. Ранглар тушунтирилиши 1-расмдаги билан бир хил.

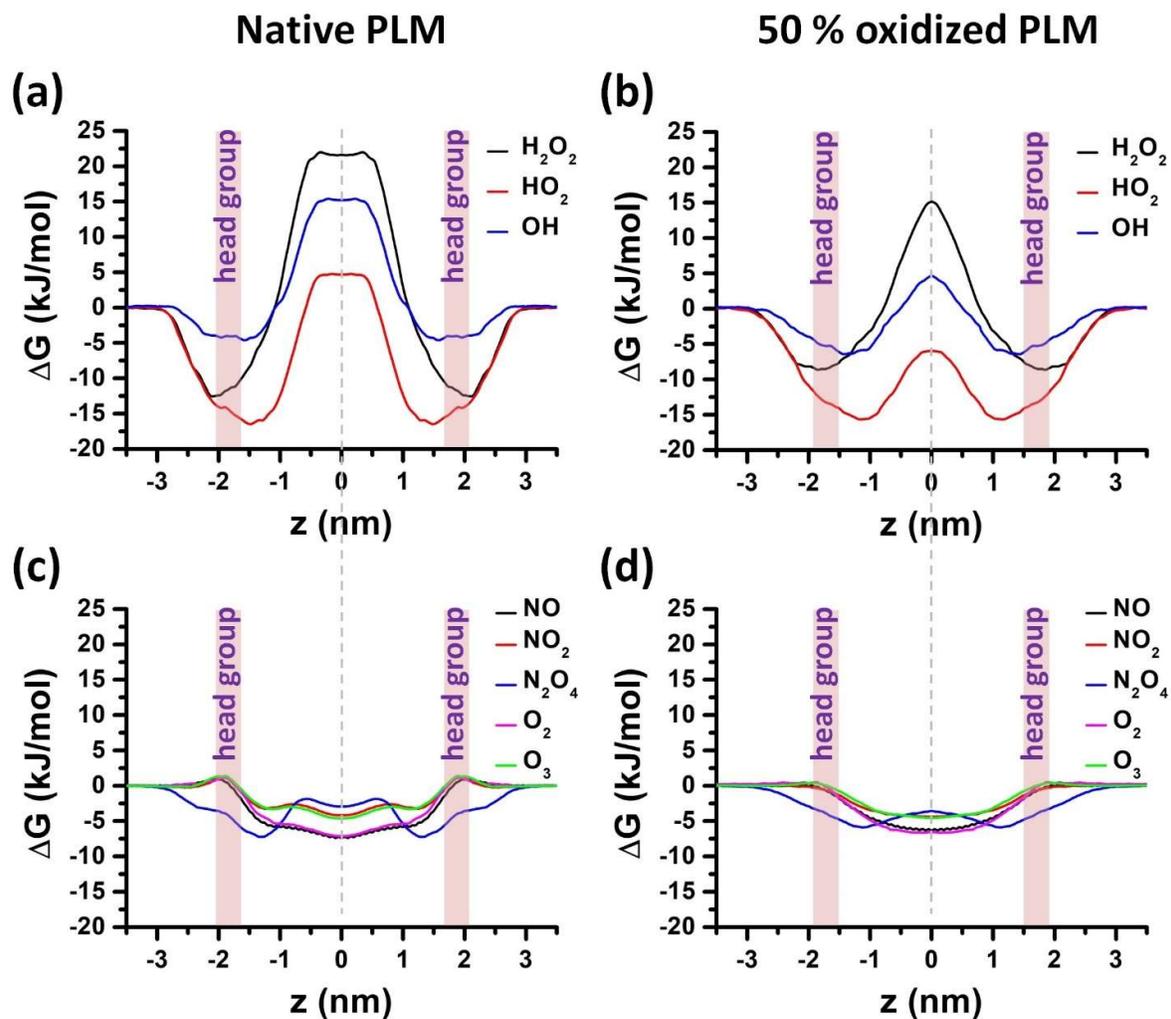
25% ALD оксидланиши аллақачон битта липидга тўғри келувчи сирт юзасининг ~10% га ошишига, кўш қатлам қалинлигининг эса ~10% га камайишига олиб келади, ҳатто ФКҚда 25% OX2 оксидланиш мавжуд бўлса ҳам (яъни 25% ALD + 25% OX2). Шундай қилиб, симуляция натижалари бош гуруҳ ва липид думлар тенг даражада оксидланганда кўш қатлам юзасининг умумий ошиши ва қалинлигининг камайишига олиб келишини башорат қилади, бу эса липидлар тартибини пасайтиради, натижада кўш қатлам оқувчанлиги ошади. Кўш қатлам оқувчанлигининг ўзгариши тажрибалар орқали ҳам аниқланди (3-расм).



3-расм. Лаурдан тахлили ёрдамида мембрана оқувчанлигининг ўзгаришини аниқлаш. Намуналарга плазма манбаи ёрдамида расмда кўрсатилган вақтлар давомида ишлов берилган. Оқувчанликнинг ўзгариши GP қийматининг ўзгариши билан боғлиқ: мусбат ΔGP оқувчанликнинг пасайишини ва манфий ΔGP оқувчанликнинг ортишини англатади.

Липосомаларга плазма орқали ишлов берилганда дастлаб мембрана қаттиқлигининг бироз ошишига ва ундан кейин оқувчанлигининг кучли ва доимий ўсишига олиб келди. Ушбу тажрибада кузатилган натижалар симуляция натижалари билан таққосланиши мумкин; ALD+OX2 оксидланиши липидлар тартибининг юқори даражада бузилишига олиб келади, OX2 нинг ўзи эса липидлар тартибининг ошишига олиб келади, аммо ALD+OX2 нинг эффекти кўпроқ намоён бўлади. Демак, липидлар тартибининг бузилиши мембрана оқувчанлиги билан боғлиқ деб фараз қилинган ҳолда, симуляция натижалари, умуман олганда, оксидланиш мембранада юқори оқувчанликка олиб келишини башорат қилади. Плазма билан ишлов бериш пайтида ёки ундан кўп ўтмай, юқори қаттиқлик кузатилди. Эҳтимол, бу дастлаб OX2 (яъни бош гуруҳ оксидланиши) содир бўлиши туфайлидир. Кейинги босқичда эса, липид думларининг ALD оксидланиши содир бўлади ва бу липидлар тартиби бузилишининг кучайишига олиб келади. Липидлар тартибининг камайиши РКАТнинг ҳужайра ички қисмига киришига ва оксидловчи зарар келтиришига имкон яратади ва натижада ҳужайралар ўлимига олиб келади.

Плазма зарраларининг табиий ва оксидланган мембраналар орқали ўтиши. Табиий ва оксидланган ФҚҚ орқали РКАТ транспорти ҳақида кўпроқ маълумотга эга бўлиш учун US-MD симуляциялари бажарилди. 4-расмда табиий ва 50% оксидланган ФҚҚлар орқали турли хил РКАТнинг ЭЭПлари кўрсатилган.



4-расм. Табиий ва 50% оксидланган ФҚҚлар бўйлаб гидрофилик (a-b) ва гидрофобик (c-d) РКАТнинг эркин энергия профил (ЭЭП)лари. Бош гуруҳлар (яъни Р атомлар, 1-расмга қаранг) ўртача жойлашган соҳаси очик қизил рангда кўрсатилган.

Кўриниб турибдики, табиий ва оксидланган ФҚҚлар орқали гидрофобик турлар (яъни NO , NO_2 , N_2O_4 , O_2 ва O_3), гидрофилик турлар (OH , HO_2 ва H_2O_2)га нисбатан, сезиларли даражада яхши кириб бориши мумкин, чунки уларда эркин энергия барьерлари анча паст. Демак, ФҚҚнинг оксидланиши гидрофобик РКАТ ЭЭПларига кучли таъсир кўрсатмайди, аммо гидрофилик зарралар энергия барьерларини сезиларли пасайтиради ва шу тариқа уларнинг

оксидланган ФҚҚлар орқали транслокацияси (ўтиши) эҳтимоллигини оширади. Бироқ, ушбу гидрофилик турларнинг ФҚҚ орқали ўтиш энергия барьерлари ҳали ҳам нисбатан юқори бўлиб қолмоқда (айниқса H_2O_2 учун), бу эса уларнинг хужайра ичига киришига имкон берувчи муайян оксил каналларига (мас., аквапоринлар), ёки электр майдон томонидан ҳосил қилинган ғовакларга эҳтиёж борлигини кўрсатади.

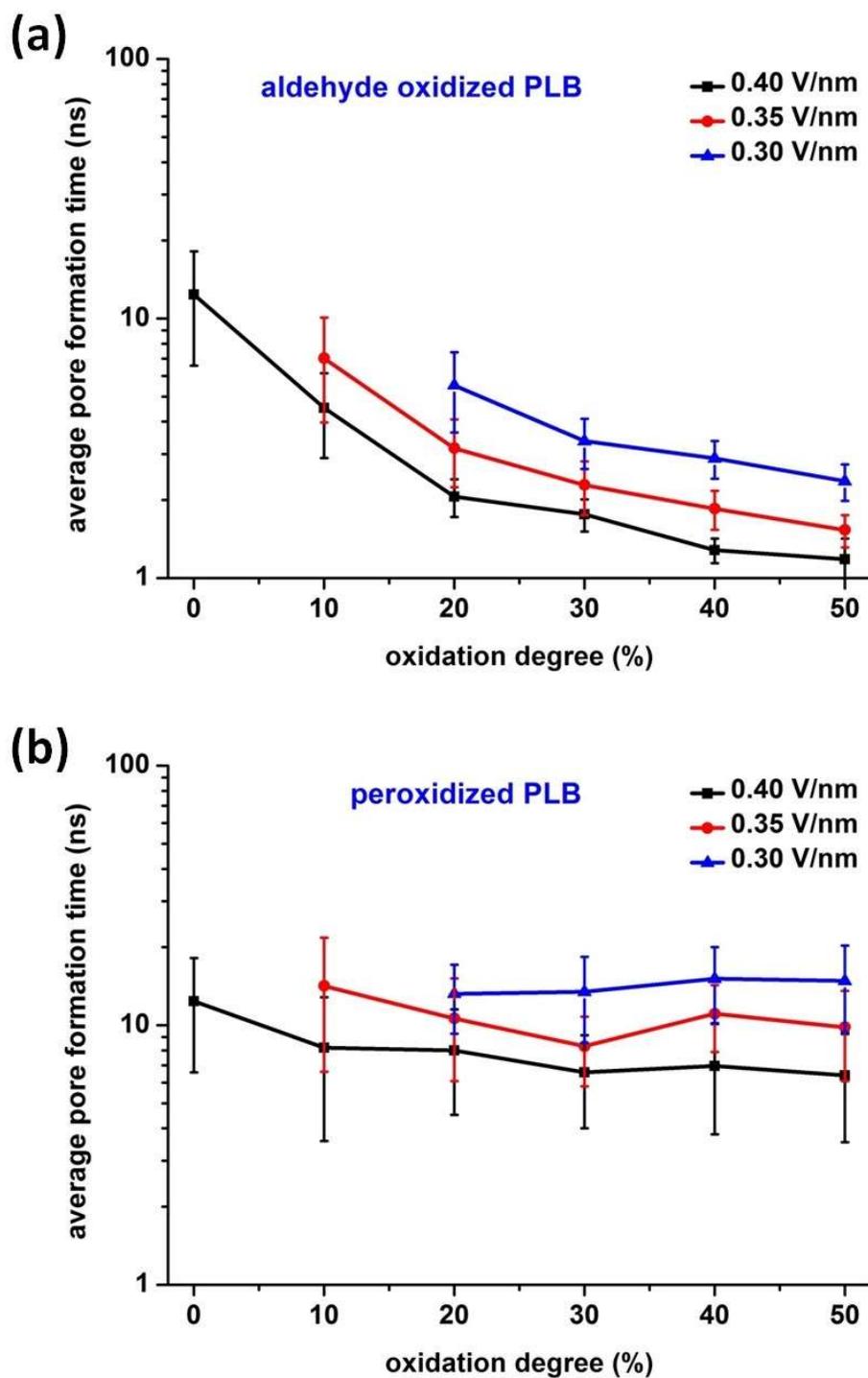
Электр майдони ва липид оксидланишининг хужайра мембранасининг ўтказувчанлигига синергистик таъсири. Маълумки, баъзи САП манбалари (липид оксидланишини келтириб чиқарувчи) РКАТни ҳосил қилишидан ташқари, мембраналарда ғовак пайдо бўлишига олиб келувчи кучли электр майдонларни ҳам юзага келтиради. Шу сабабли, плазма-хужайра ўзаро таъсирини чуқурроқ тушуниш мақсадида электр майдон ва ФҚҚ оксидланишининг синергистик эффекти тадқиқ этилди. Симуляция натижалари шуни кўрсатдики, электр майдонининг кучайиши мембранада ғовак ҳосил бўлиш вақтини қисқартиради. Бундан ташқари, липид думларининг оксидланиши ФҚҚда ғовак пайдо бўлиши (яъни электропорация) учун зарур бўлган электр майдон бўсағавий қийматининг пасайишига олиб келади (5-расм). Мембранада ҳосил бўлган (сувли) ғоваклар плазма зарраларининг хужайра ичига кириб боришини осонлаштиради ҳамда оксидловчи зарар келтиришига имкон яратади ва натижада хужайралар ўлимига олиб келади.

Учинчи бўлим: Хужайра мембранасининг плазма орқали оксидланиши. Ушбу бўлимда плазма туфайли оксидланишнинг мембрана орқали фосфатидилсерин ‘flip-flop’ (яъни бир қатламдан иккинчи қатламга ўтиш) ҳаракатига таъсири, H_2O_2 нинг турли хил липид таркибли мембрана орқали ўтиши ҳамда механик стресс (ёки кучланиш)нинг оксидланган мембраналарга таъсири натижалари кўриб чиқилади.

Фосфатидилсерин ‘flip-flop’ ҳаракатига плазма орқали оксидланишнинг таъсири. Фосфатидилсерин (phosphatidylserine–PS) липид молекуласининг мембрана бўйлаб ‘flip-flop’ ҳаракати апоптоз (дастурлаштирилган хужайра ўлими) сигнали юзага келишида муҳим рол ўйнайди. Ушбу ишда ФҚҚ бўйлаб PS ‘flip-flop’ ҳаракатининг мембрана оксидланиш даражасига боғлиқлиги тадқиқ қилинди. Натижалар шуни кўрсатдики, липидлар пероксидланиш даражасининг ошиши мембрана юзасининг кенгайишига (6-расм), бу эса (экспериментал натижаларга мувофиқ ҳолда) мембрана ўтказувчанлигининг сезиларли даражада ўзгаришига олиб келади. Натижада, пероксидланиш даражасининг ошиши PSнинг мембрана бўйлаб ‘flip-flop’ эркин энергия барьерини пасайтиради (6-расм). Бу пировардида хужайра ташқи сиртига PSнинг транслокация тезлигини оширади ва мембрана юзасида PS топилиши (аниқланиши)га олиб келади, натижада макрофаглар (иммун тизим хужайралари)га хужайрани қамраб олиб ҳазм қилиши (яъни апоптоз) учун сигнал вазифасини бажаради.

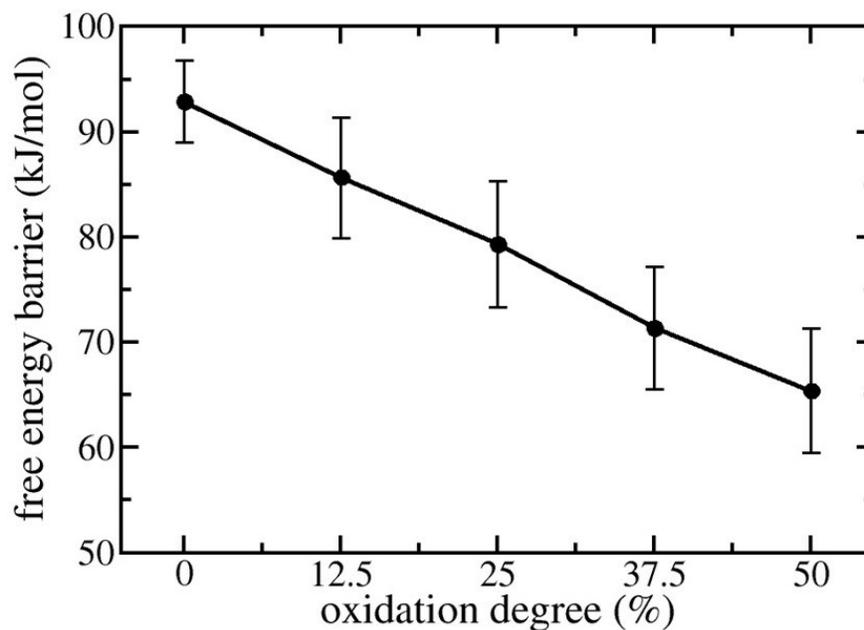
Умуман, ФҚҚнинг оксидланиши PS транслокация энергия барьерининг камайишига олиб келишига қарамай, PSни ички қатламдан ташқи қатламга

Ўтказиш учун ҳали ҳам мембранада (мас., электр майдон туфайли) ҳосил бўлувчи (сувли) ғовакга эҳтиёж бор, чунки эркин энергия барьерлари PS ‘flip-flop’ ҳаракатининг ўз-ўзидан (бевосита) содир бўлиши учун ҳали ҳам юқори.

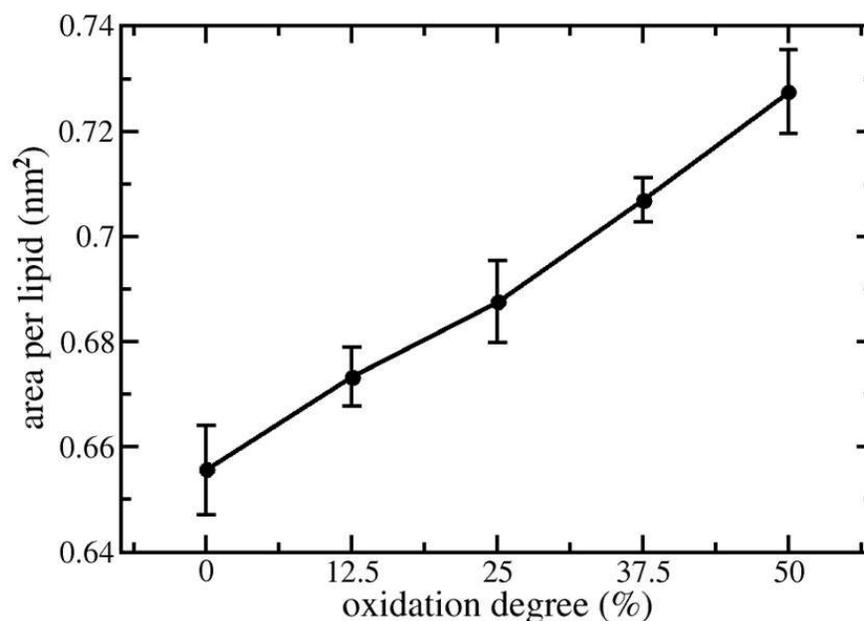


5-расм. ФҚҚда ғовак ҳосил бўлиши ўртача вақтининг липидлар оксидланиш даражасига боғлиқлиги, (a) альдегид оксидланиши ва (b) пероксидланиш. Натижалар турли хил электр майдон кучланганликлари учун ҳисобланган.

(a)



(b)



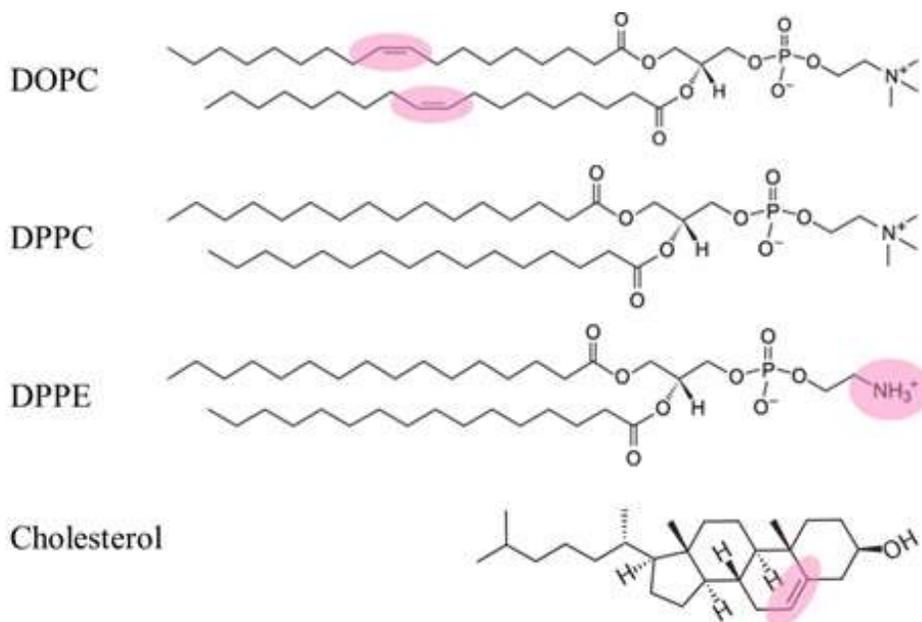
б-расм. (а) Фосфатидилсериннинг ФҚҚ орқали транслокация эркин энергия баръери ва (б) битта липидга тўғри келувчи сирт юзаси, икковининг ФҚҚ пероксидланиш даражасига боғлиқлиги.

Умуман, ФҚҚнинг оксидланиши PS транслокация энергия баръерининг камайишига олиб келишига қарамай, PSни ички қатламдан ташқи қатламга ўтказиш учун ҳали ҳам мембранада (мас., электр майдон туфайли) ҳосил

бўлувчи (сувли) ғовакга эҳтиёж бор, чунки эркин энергия барьерлари PS ‘flip-flop’ ҳаракатининг ўз-ўзидан (бевосита) содир бўлиши учун ҳали ҳам юқори.

Ушбу тадқиқот айниқса плазма тиббиёти учун қизиқарли, чунки плазма РКАТ ва электр майдонини ҳосил қилади, иккаласи ҳам (а) липидларнинг оксидланишига ва (б) ҳужайра мембранасида (сувли) ғовакларнинг пайдо бўлишига олиб келиши мумкин, шу билан PS ‘flip-flop’ тезлигини оширади ва натижада саратон ҳужайраларининг апоптозига олиб келади.

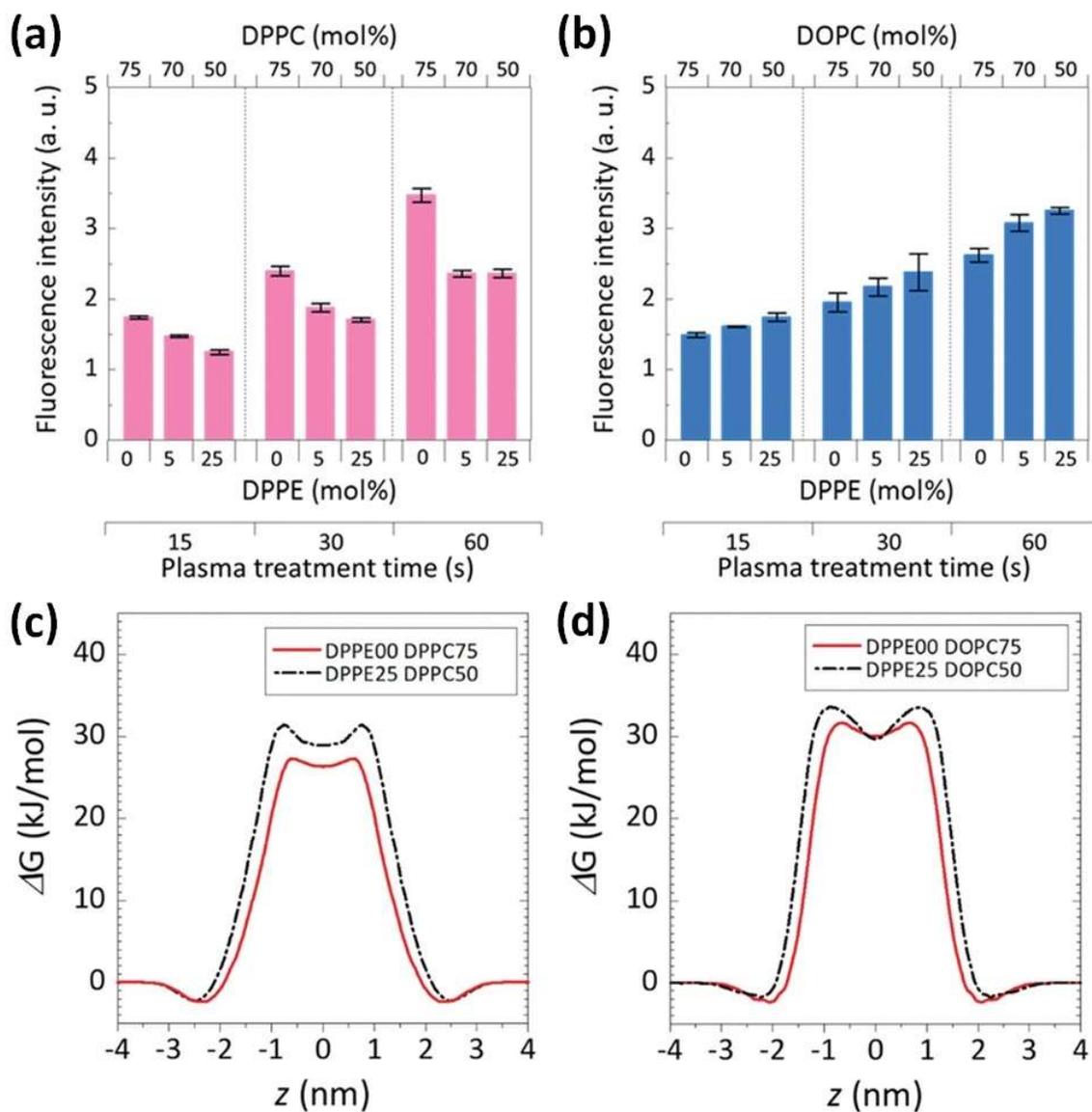
Мембрана таркибининг мембрана орқали H_2O_2 ўтишига таъсири. Саратон ва соғлом ҳужайралар мембраналари турли хил концентрацияли липидлар ва холестериндан ташкил топган. Шунинг учун, мембрана таркибий тузилишининг ФҚҚ орқали плазма зарраларининг ўтишига таъсирини тадқиқ этиш муҳим ҳисобланади. Ушбу ишда фосфолипид везикула экспериментлари натижаларини талқин қилиш мақсадида US-MD симуляциялари бажарилди. Хусусан, H_2O_2 (РКТ вакили)нинг турли хил липидли таркибларга эга бўлган ФҚҚлар орқали транспорти (i) липид думининг тўйинганлик даражаси, (ii) липид бош гуруҳининг тури ва (iii) мембранадаги холестерин улушига эътибор қаратиш орқали тадқиқ этилди (7-расм). Охиргиси, фосфолипидлар ва холестерин ўртасидаги ўзаро боғлиқлик қандай қилиб соғлом ва саратон ҳужайралар мембраналарининг плазма ҳосил қилган РКТга реакцияси (жавоби)га таъсир қилиши мумкинлиги бўйича тушунча бериш учун қилинди.



7-расм. DOPC, DPPC ва DPPE липидлари ҳамда холестериннинг схематик кўриниши. Пушти ранг билан ажратилган қисмлар ушбу ишда ўрганилган ҳар бир молекула таркибидаги муҳим фарқларни кўрсатади.

Экспериментал натижалар шуни кўрсатдики, дипалмитойл-фосфатидил-холин (dipalmitoyl-phosphatidyl-choline–DPPC) ёки диолеойл-фосфатидил-холин (dioleoyl-phosphatidyl-choline–DOPC) везикулаларида дипалмитойл-

фосфатидил-этаноламин (dipalmitoyl-phosphatidyl-ethanolamine–DPPE) улуши (концентрацияси)нинг ошиши липидлар тўпламини (зич жойлашувини) кучайтиради ва бу битта липидга тўғри келувчи сирт юзасининг камайишига олиб келади. Демак, DPPE концентрациясининг ошиши иккала системада ҳам РКТнинг пассив диффузиясига тўсқинлик қилиши керак. DPPE везикулалари учун, бу нарса US-MD симуляцияларида ҳам кузатилади, яъни DPPE улушининг ошиши ФКҚ орқали H_2O_2 ўтиш эркин энергия баръери ошишига олиб келади (8-расм (а ва с)).



8-расм. DPPE (а) ёки DOPC (б) везикулаларига САП ҳосил қилган РКТнинг киришига ҳамда DPPE (с) ва DOPC (д) модел мембраналари бўйлаб H_2O_2 ЭЭПларига DPPE концентрациясининг таъсири. (а) ва (б) да горизонтал ўқда келтирилган рақамлар ҳар бир компонентнинг моляр улушини англатади. Барча ҳолатлар учун холестерин миқдори 25 моль% га тенг.

Аммо, DOPC везикулаларида экспериментал натижалар DPPE улушининг ошиши билан ортиб борувчи ўтказувчанликни кўрсатади, бу эса US-MD симуляция натижаларига мос келмайди (8-расм (b ва d)). Бунинг сабаби шуки, DPPE концентрацияси ошганда липид уюмлари пайдо бўлиши мумкин, бу уюмлар DPPE ва холестериннинг юқори даражасини ўз ичига олади. Шундай қилиб, липид уюмлари вужудга келиши туфайли мембрананинг бошқа қисмлари DOPC липидлари билан бойитилиши мумкин, улар бу мембраналарнинг ‘заиф нуқтаси’ бўлиб хизмат қилади ва липид оксидланиши туфайли (сувли) ғовак пайдо бўлишига жуда мойил бўлади. Бу эса 8(b)-расмда кўрсатилган DOPC везикулалари учун, DPPE таркибини оширганда РКТнинг ошишини тушунтиради. DPPC везикулаларида бундай уюмлар ҳосил бўлмайди, чунки DPPC ва DPPE иккаласи ҳам бир хил алифатик липид думларга эга ва уларнинг холестерин билан ўзаро таъсири тенг даражада кучли.

Умуман олганда, тажриба ва симуляция натижалари шуни кўрсатдики, кўп қиррали физик ва кимёвий жараёнлар, жумладан липид оксидланиши, липидлар тўплами (зич жойлашуви) ва липид уюмларининг ҳосил бўлиши, рол ўйнаши мумкин. Ушбу тадқиқот САП таъсирига асосланган терапияларни ишлаб чиқишда ёрдам бериши мумкин, бунда хужайра мембранаси ва хужайралардаги оксидловчи стрессга реакция (жавоб) мақсад қилинган.

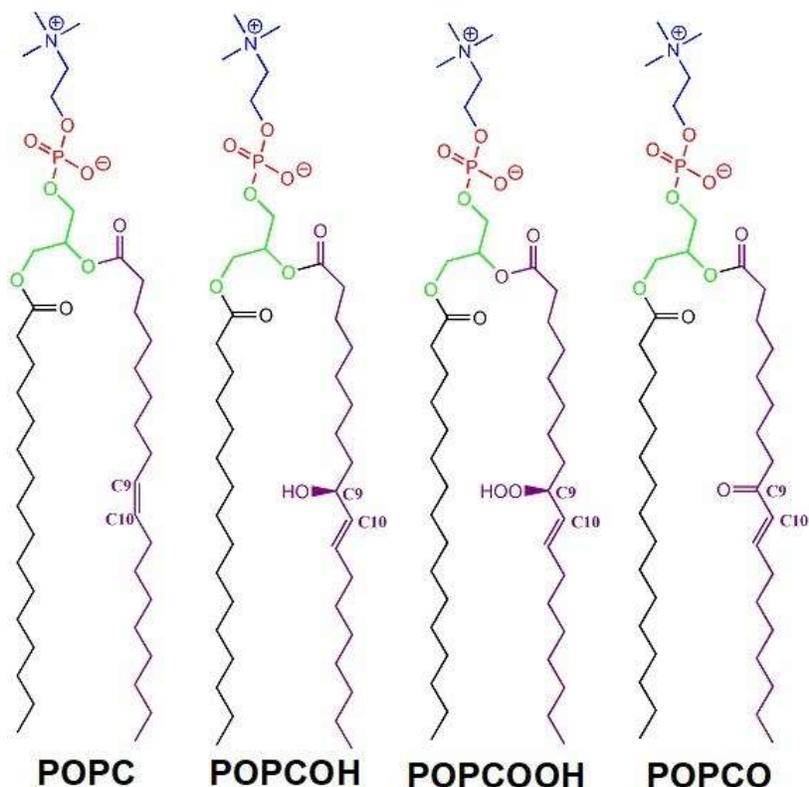
Механик стресснинг оксидланган мембраналарга таъсири. Липид оксидланишининг мембрана хусусиятларига таъсири механизмлари яхшироқ тушунилиши керак. Шу мақсадда, ушбу тадқиқотда (сувли) ғовак ҳосил қилиш қанчалик осонлиги ҳақидаги атомистик маълумотга эга бўлиш учун липид оксидланиши туфайли ФКҚ моделларида механик беқарорликни ўрганиш бўйича реактив бўлмаган МД симуляциялари бажарилди. Шундай қилиб, икки турдаги модел мембраналар, яъни битта компонентли гомоген (бир жинсли) ФКҚ ва икки компонентли гетероген ФКҚ ишлатилди. Хусусан, битта компонентли гомоген ФКҚ ҳолатида тўрт хилдаги модел мембраналар тадқиқ этилди (9-расм), яъни табиий палмитойл-олеойл-фосфатидил-холин (palmitoyl-oleoyl-phosphatidyl-choline–POPC) ва унинг оксидланган шакллари (POPCOH, POPCOOH ва POPCO). Гетероген мембрана ҳолатида эса табиий ва оксидланган фосфолипид доменлари (POPC+POPCOOH)дан ташкил топган система ўрганилди. Ушбу модел системалардан фойдаланиб, ғовак ҳосил бўлишининг энг бошида қайд этилган нисбий кенгайиш (яъни ε_A) ҳисобланди:

$$\varepsilon_A = \frac{\Delta A}{A_0} \quad (8)$$

бу ерда A_0 – мембрана сиртининг дастлабки юзаси, ΔA эса ўша юзанинг ҳар бир вақт momentiдаги ўзгариши.

Моделлаштириш натижалари шуни кўрсатдики, механик стресс (кучланиш) шароитида мембрананинг оксидланиши ε_A ни камайтиради ва унда (сувли) ғовак ҳосил бўлишига ёрдам беради, шу билан мембрананинг оқувчанлигига ҳисса қўшади. Гомоген ФКҚларда ε_A оксидланиш турига боғлиқ.

POPCON ва POPCOOH мембранани (сувли) ғовак пайдо бўлишига кўпроқ мойил қилади, POPCO эса сезиларли таъсир кўрсатмайди. Гетероген мембраналар (яъни POPC+POPCOOH) табиий POPC мембраналарига қараганда (сувли) ғовак пайдо бўлишига кўпроқ мойил бўлиб кўринади, аммо улар статистик ноаниқлик доирасида гомоген POPCOOH мембраналарига ўхшаб ўзини тутади.



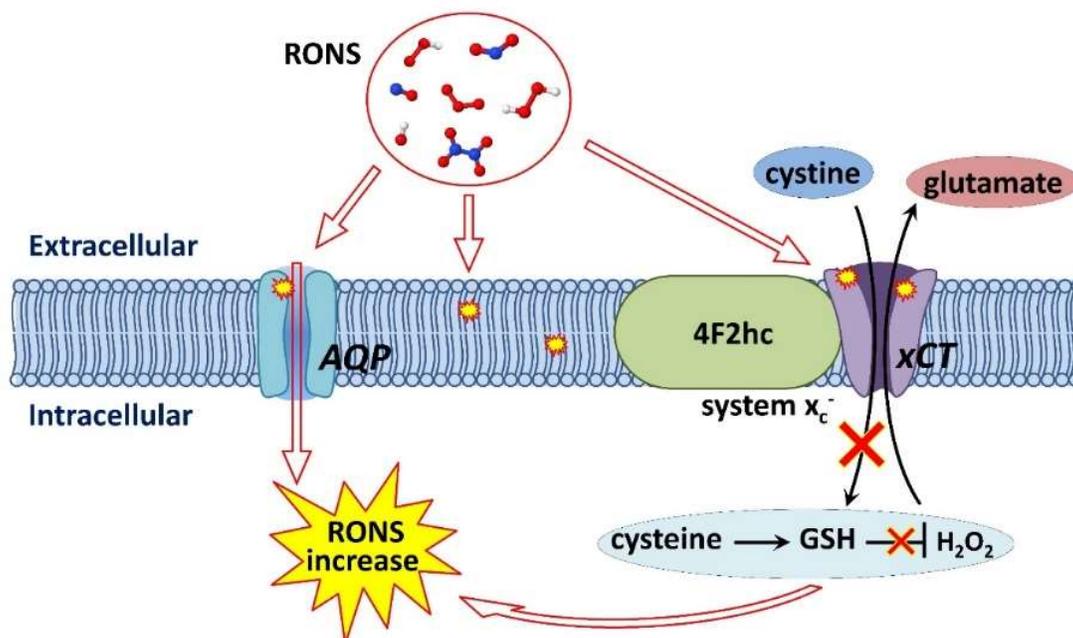
9-расм. POPC молекуласи ва унинг оксидланган шакллариининг схематик кўриниши.

Ундан ташқари, гетероген мембраналарда ғоваклар POPC ва POPCOOH доменлари интерфейси (оралиғи)да ёки оксидланган соҳанинг асосий қисмида ҳосил бўлади.

Тўртинчи бўлим: Интеграл мембрана оқсилларининг ўтказувчанлиги. Ушбу бўлимда плазма орқали оксидланишнинг аквапорин (aquaporin–AQP) канали орқали РКАТ транспортига ҳамда хСТ антипортер орқали цистин (CYS) ўтишига таъсири натижалари муҳокама қилинади.

Гидрофилик ва гидрофобик РКАТнинг AQP орқали транспорти. AQPлар трансмембрана оқсил каналлари бўлиб, улар ҳужайра мембранаси бўйлаб нафақат сув молекулаларини, балки бошқа зарраларни, масалан, САП ҳосил қилган РКАТни ҳам ўтказадилар (10-расм). Дастлабки ишда, H₂O₂ нинг табиий AQP1 (AQP оиласининг аъзоларидан бири) ва ФҚҚ орқали ўтиши тадқиқ этилди. AQP1 бўйлаб H₂O₂ нинг эркин энергия баръери ФҚҚникига нисбатан

паст, ўтказувчанлик коэффиценти эса икки катталик тартиби (тахминан 380 марта) катта эканлиги аниқланди, бу эса H_2O_2 нинг хужайра ичкарасига кириб бориши AQP орқали бўлиши кераклигини кўрсатади.

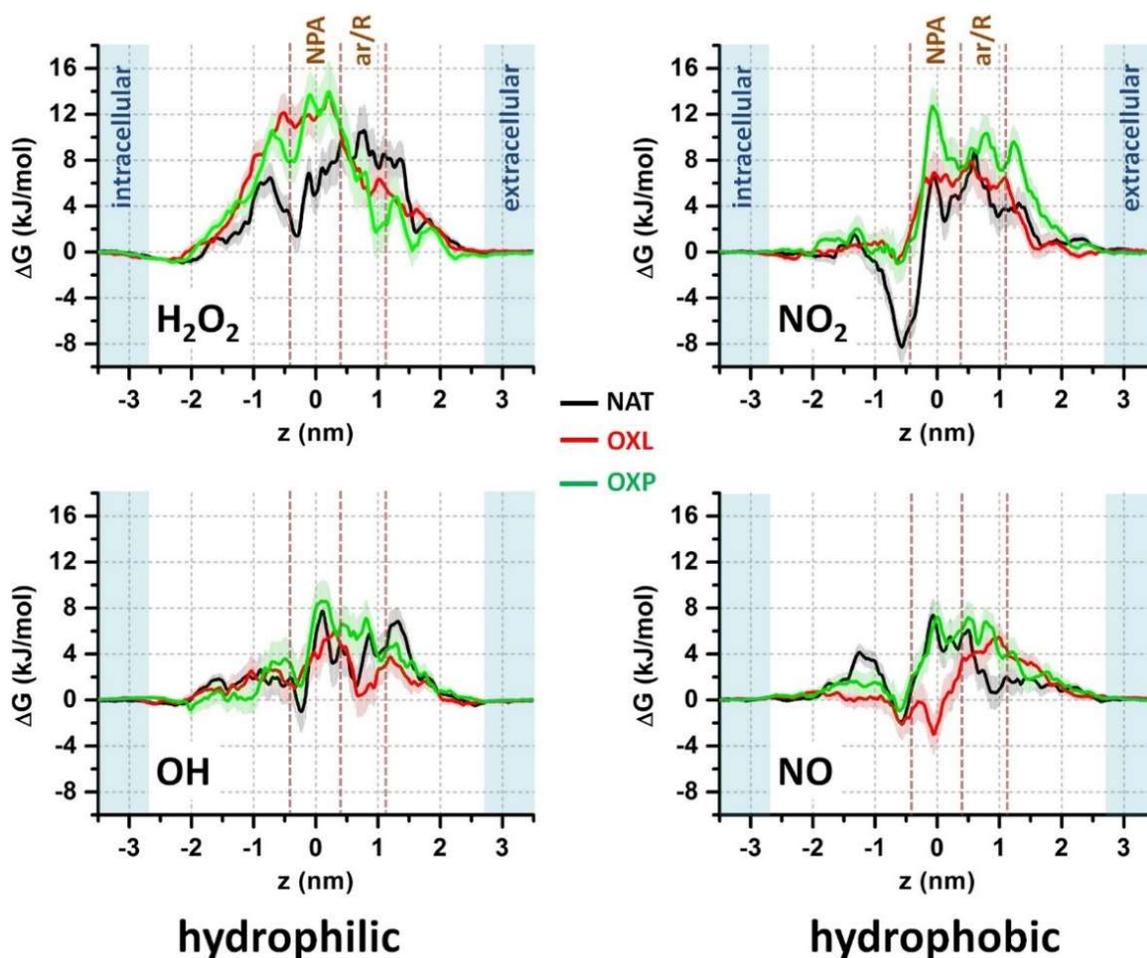


10-расм. AQP (чапда) ва xCT антипортер (ўнгда) интеграл мембрана оқсилларининг схематик кўриниши. Плазма ҳосил қилган РКАТ (мас., H_2O_2) AQPнинг хужайрадан ташқари қисмини модификациялаб/оксидлаб (сарик юлдуз) ёки ўзгартирмасдан у орқали диффузияланиши ва хужайра ичидаги РКАТ даражасини ошириши мумкин. Ушбу зарралар xCT билан ҳам ўзаро таъсирлашиб, хужайрадан ташқари қисмини оксидлаши (сарик юлдузлар) ва натижада унинг функциясига таъсир қилиши мумкин (мас., цистин (CYS) транспортини тўхтатиш орқали). Бу ҳам, ўз навбатида, хужайрадаги РКАТ миқдорининг ошишига ҳисса қўшиши мумкин.

Бироқ, AQP орқали РКАТ транспортининг умумий табиати ҳали ҳам ноаниқ эди. Шунинг учун, кейинги ишда ушбу тадқиқот кўпроқ РКАТни жалб қилиш ва ўрганиш орқали кенгайтирилди. Хусусан, AQP1 бўйлаб гидрофилик (H_2O_2 ва OH) ва гидрофобик (NO_2 ва NO) РКАТнинг ўтиш жараёнлари тадқиқ этилди. Натижалар кўрсатдики, ўрганилган РКАТнинг барчаси AQP1 орқали ўтиши мумкин. OH ва NO зарраларининг AQP1 орқали ўтиш эркин энергия барьерлари H_2O_2 ва NO_2 ларникига нисбатан паст, бу ушбу зарраларнинг AQP1 ғовагининг ички қисмига киришини осонлаштириши ва AQP1 нинг аминокислоталари билан ўзаро таъсирлашиши мумкинлигини кўрсатади.

Плазма орқали ФКҚ (липид) ва AQP1 (оқсил) оксидланишининг юқорида келтирилган РКАТ транспортига таъсири ҳам тадқиқ этилди. Натижалар кўрсатдики, липид (OXL) ва оқсил (OXP) оксидланишининг иккаласи ҳам H_2O_2

ва NO_2 зарраларининг ўтиш эркин энергия барьерини бироз оширади, OH ва NO зарралари учун эса оксидланишнинг кучли таъсири кузатилмайди (11-расм). Шундай қилиб, гидрофилик зарралар ҳужайрага АҚРлар орқали кириши таклиф қилинди, чунки улар липид мембранаси, айниқса табиий ФҚҚ, орқали янага юқорироқ барьерга дуч келишади. Аксинча, гидрофобик РКАТ катта эҳтимол билан, липид оксидланиши содир бўладиган, мембрана орқали ўтишади, чунки уларнинг АҚР орқали ўтиш барьерлари юқорироқ.

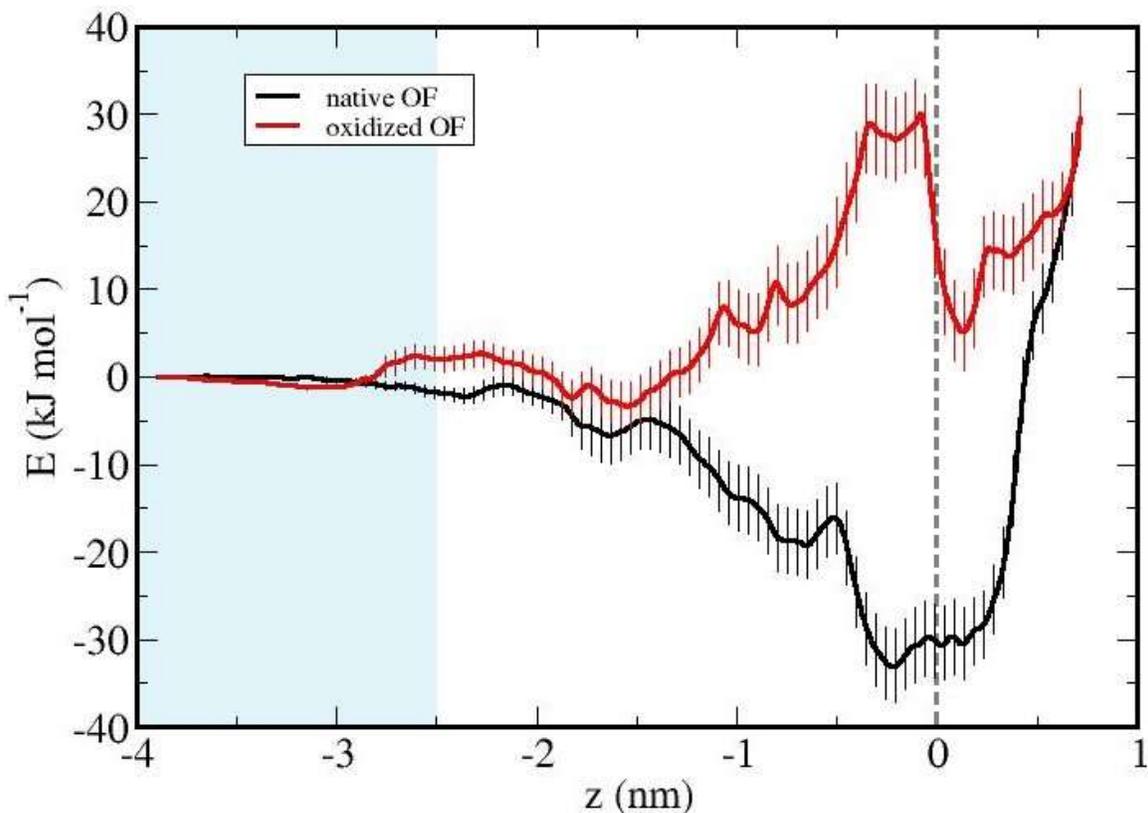


11-расм. АҚР1 нинг табиий (NAT, қора чизик) ва оксидланган (OXL ва OXP, қизил ва яшил чизиклар) модел системалари бўйлаб гидрофилик (H_2O_2 ва OH) ва гидрофобик (NO_2 ва NO) зарраларнинг ЭЭПлари. Ҳужайра ичидаги ва ҳужайрадан ташқари сув қатламлари очик кўк рангда кўрсатилган. Жигарранг чизиклар ёрдамида АҚР1 нинг Asn-Pro-Ala (NPA) ва ароматик/Arg (ar/R) соҳалари ажратиб кўрсатилган.

Моделлаштириш натижалари саратон ҳужайраларида аниқланган САП туфайли РКАТнинг сезиларли даражада кўпайишининг туб механизмларини тушунишга ёрдам беради ва шу билан САПнинг саратонга қарши фаоллигида АҚРларнинг роли ҳақидаги тушунчалармизни яхшилади.

xCT антипортер оқили орқали цистин (CYS) транспорти. Ушбу тадқиқот икки қисмдан иборат. Биринчи қисмда xCT , яъни xCT^- антипортер оқилининг CYS ва глутамат транслокациясига масъул енгили бўлинмаси, учта модел системаси орқали CYS ўтиш жараёнлари тадқиқ этилди (юқоридаги 10-расмга қаранг). Хусусан, xCT нинг ташқи томонга қараган (outward facing–OF), ёпиқ (occluded–OCC) ва ички томонга қараган (inward facing–IF) конфигурациялари кўриб чиқилди. Натижалар CYS ни ушлаб олиш, ташиш ва қўйиб юбориш учун масъул бўлган OF, OCC ва IF конфигурацияларида аминокислоталарнинг муҳим ролларини аниқлади. OF, OCC ва IF структуралари орқали CYSнинг ҳисобланган ЭЭПлари IF конформациясида CYS энергия минимуми энг юқори бўлишини кўрсатди, бу антипортердан CYS чиқиши учун кам энергия талаб этилишини англатади.

Иккинчи қисмда саратон хасталигини даволашда муҳим бўлган xCT оқили орқали CYS транспортига плазма туфайли оксидланишнинг таъсири тадқиқ этилди. Бу ишда xCT нинг OF конфигурацияси ҳисобга олинди ва оксидланиш таъсирини ўрганиш учун хужайра ташқи муҳитига яқин жойлашган xCT нинг Cys₃₂₇ аминокислота қолдиғи оксидланди. Натижалар шуни кўрсатдики, Cys₃₂₇ қолдиғининг оксидланиши CYS транслокацияси учун эркин энергия баръерини келтириб чиқаради (12-расм), бу эса OF структурасининг субстрат боғланадиган жойига CYS киришини тўсиб қўяди.



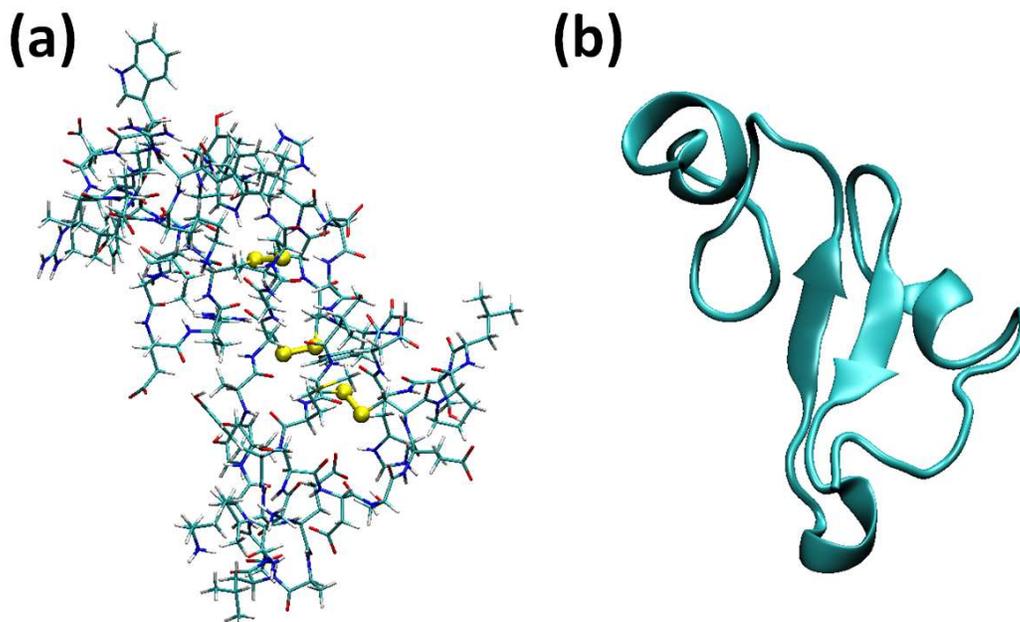
12-расм. Табиий ва оксидланган OF системалари бўйлаб CYSнинг ЭЭПлари. Оч кўк ранг хужайрадан ташқари сувли фазага тўғри келади.

Шундай қилиб, натижалар шуни кўрсатдики, хСТ каналини тўсиб қўйишда Cys₃₂₇ қолдигини (мас., САП орқали) оксидлаш уни Ala га мутациялашга қараганда самаралироқ.

Ушбу тадқиқот жуда муҳим, чунки у Cys₃₂₇ оксидланишининг оксил каналининг ёпилишига таъсирини тушунтиради ва шу билан хСТ орқали СҮС ўтишини қийинлашишини кўрсатади. Ушбу оксидланиш, масалан, кислотали рН муҳитидаги саратон ҳужайраларига САП қўлланилиши натижасида юзага келиши мумкин. Шундай қилиб, ушбу тадқиқот хС⁻ антипортерини тўсиб қўйиш орқали саратон ҳужайраларида СҮСга бўлган эҳтиёж (очлик) механизмини тушунтириши мумкин, бу эса ҳужайралар ичидаги глутатион (GSH, 10-расм) даражасининг пасайишига ва натижада ҳужайралар ўсишининг секинлашишига (ёки тўхташига), апоптоз юзага келишига ва саратон ҳужайралари дорига қаршилигининг пасайишига олиб келади.

Бешинчи бўлим: сигнал, глобулар ва толасимон оксилларнинг оксидланиши. Ушбу бўлимда плазма орқали оксидланишнинг инсон эпидермал ўсиш фактори ва цитоглобин оксилларининг структуравий хусусиятларига, шунингдек токсик амилоид бета пептид агрегациясининг барқарорлигига таъсири бўйича тадқиқотлар натижалари муҳокама қилинади.

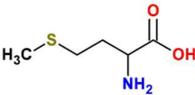
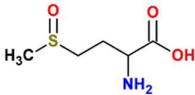
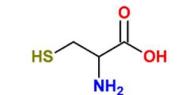
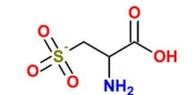
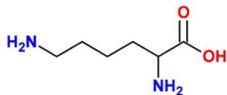
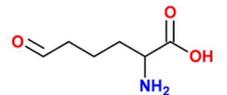
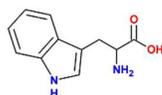
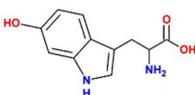
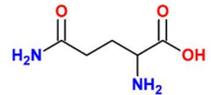
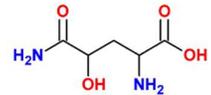
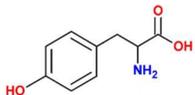
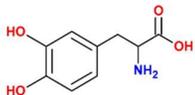
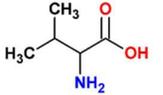
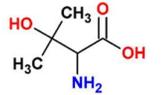
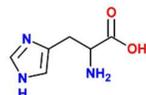
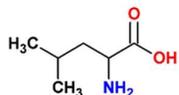
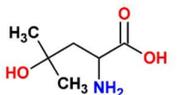
Инсон эпидермал ўсиш фактори (hEGF)нинг плазма орқали оксидланиши. hEGFлар кичик сигнал оксиллари бўлиб (13-расм), уларнинг оксидланиши структуравий ва конформацион ўзгаришларни келтириб чиқаради, бу эса ҳужайрадаги сигнализация йўллари тартибга солиниши ёки бузилишига олиб келади ва натижада ҳужайралар кўпайишига таъсир кўрсатади.



13-расм. Licorice (a) ва cartoon (b) кўринишидаги hEGF оксил структураси. (a) да цистеин қолдиқларининг олтингугурт атомлари ва улар орасидаги дисульфид боғлар аниқлик учун сариқ рангда кўрсатилган.

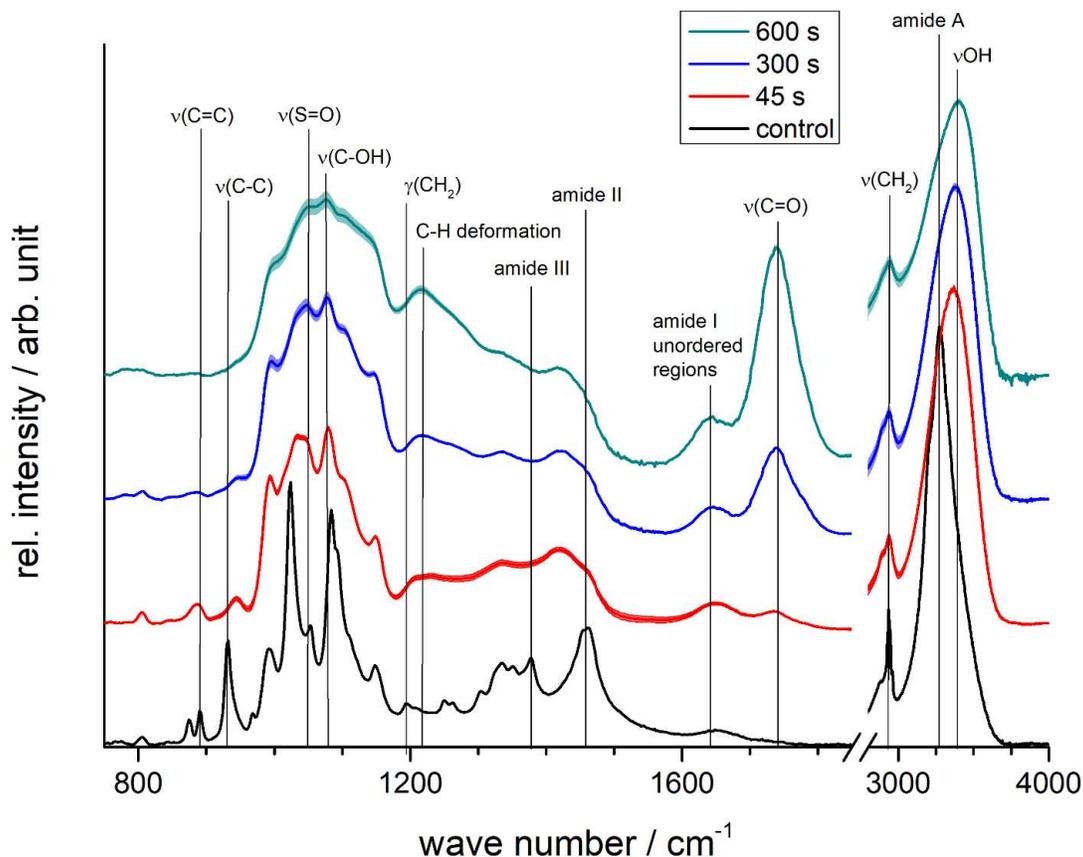
Ушбу ишда САП билан ишлов бериш натижасида келиб чиқадиган hEGF оксидланишини тадқиқ этиш мақсадида реактив бўлмаган МД симуляциялари ва экспериментлар биргаликда олиб борилди. Хусусан, САП билан ишлов беришнинг қисқа ёки узоқ вақтларига тўғри келувчи турли хил оксидланиш даражаларига эга hEGFнинг конформацион ўзгаришлари ўрганилди. hEGFнинг оксидланган структураларини ҳосил қилиш учун табиий hEGF таркибидаги маълум бир аминокислоталарни оксидланган шаклга ўзгартириш орқали эришилди (1-жадвал).

1-жадвал. Турли оксидланган hEGF оқсилларини ҳосил қилиш учун ишлатиладиган 10 та аминокислоталарнинг рўйхати ва уларнинг кимёвий тузилишлари.

AA in native hEGF	modified AA in oxidized hEGF	AA in native hEGF	modified AA in oxidized hEGF
 methionine (MET)	 methionine sulfoxide	 proline (PRO)	 pyroglutamic acid
 cysteine (CYS)	 cysteic acid	 lysine (LYS)	 allysine
 tryptophan (TRP)	 6-hydroxytryptophan	 glutamine (GLN)	 4-hydroxyglutamine
 tyrosine (TYR)	 3,4-dihydroxyphenylalanine	 valine (VAL)	 3-hydroxyvaline
 histidine (HIS)	 2-oxo-histidine	 leucine (LEU)	 4-hydroxy-leucine

Бунда оксидланиш бўйича hEGFнинг ўзига хос модификацияси моделлаштириш ва Фурье трансформацияси инфрақизил спектроскопияси (FTIR) натижаларини бирлаштириш орқали аниқланди. FTIR таҳлилари натижалари шуни кўрсатдики, плазма билан 45 с ишлов берилганда hEGF структурасида S=O ва OH гуруҳлари ҳосил бўлган (14-расм). Бу шуни англатадики, оксидланиш даражаси паст бўлган ҳолатда таркибида тиол гуруҳи мавжуд бўлган аминокислоталарни (Met ва Cys) симуляцияда модификациялаш учун уларни эътиборга олиш керак. 300 ва 600 с ҳолатларида эса (улар ўртача

ва юқори оксидланиш даражаларига мос келади), $\nu(\text{C-OH})$ сигналининг интенсивлиги пастроқ бўлди, C=O ҳосил бўлиши эса ошди (14-расм), бу тиол оксидланишидан ташқари, симуляцияда His ва Lys каби қолдиқларни ҳам модификациялаш кераклигини билдирди.

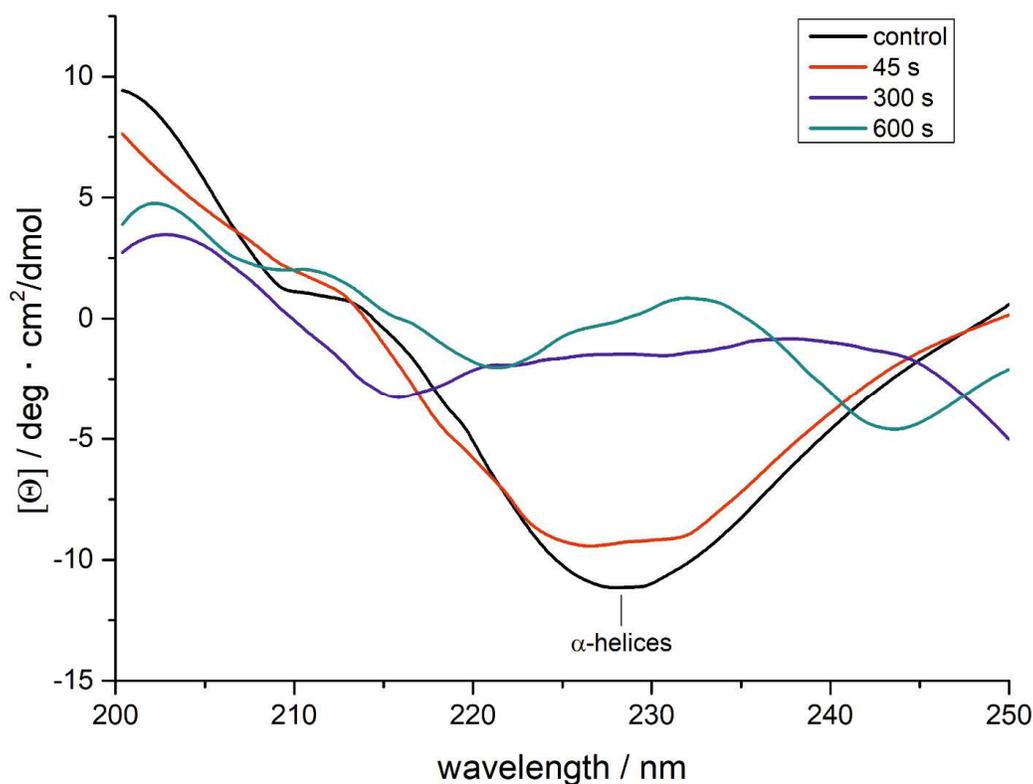


14-расм. Плазма билан ишлов берилган hEGFнинг FTIR спектрлари. Ҳар бир ишлов бериш вақти учун ўртача қиймат ва стандарт хато (соя шаклида) кўрсатилган. Ўқиш осон бўлиши учун спектрлар 0,03 ўзгармас коэффициентга силжиб кўрсатилган.

Симуляция қилинган hEGF тузилишида рўй берган структуравий ўзгаришларни текшириш учун айланма дихроизм (circular dichroism—CD) спектроскопияси ҳам амалга оширилди (15-расм). CD таҳлиллари натижалари шуни кўрсатдики, плазма ёрдамида 45 с ишлов бериш, hEGF иккиламчи структурасида контрол спектрига нисбатан озгина ўзгаришларни келтириб чиқаради, холбуки узокроқ ишлов бериш (300 ва 600 с) hEGF иккиламчи структурасининг бузилишига олиб келади. Бу симуляцияларда ҳам кузатилди.

Умуман олганда, симуляция ва экспериментал натижалар ўртасида сифат жиҳатидан яхши мувофиқликка эришилди. Олинган натижалар кўрсатдики, оксидланган структуралар (айниқса юқори оксидланиш даражасида) улардаги конформацион ўзгаришлар ва дисульфид боғларнинг узилиши туфайли, кўпроқ

эгилювчан бўлиб қолади. Бундан ташқари, паст оксидланиш даражаси hEGFнинг унинг рецептори билан боғланиш энергиясига сезиларсиз таъсир қилади (яъни ўзаро таъсир деярли бузилмайди), ҳолбуки юқори оксидланган hEGF унинг рецептори билан кам ўзаро таъсирлашади (яъни боғланиш бузилади). Бу охир-оқибатда, хужайранинг кўпайиш жараёнига ёрдам бериш ёки тўхтатиб қўйиш орқали таъсир қилади.

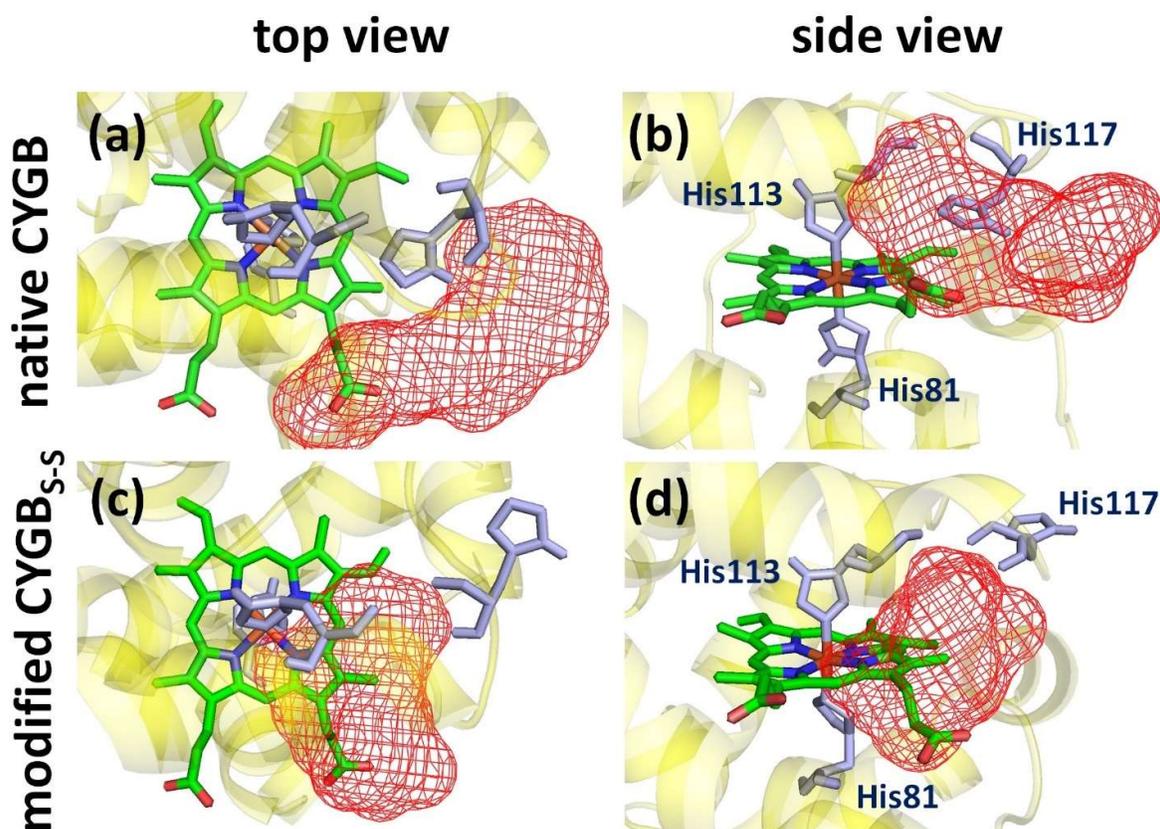


15-расм. CD-спектроскопияси ёрдамида плазма билан ишлов берилган hEGFнинг иккиламчи структуравий таҳлили.

Шундай қилиб, олинган натижалар узокроқ вақт давомида саратон хасталигини даволашда ва қисқа вақтларда эса ярани тузатишда САПдан фойдаланиш билан боғланиши мумкин.

Цитоглобин (CYGB) структурасига плазма ҳосил қилган РКАТнинг таъсири. CYGB оксидланиш-қайтарилиш реакциялари (redox)ни тартибга солувчи яқинда кашф этилган глобин оксиллардан биридир, у хужайрани оксидловчи стрессдан химоя қилишда иштирок этади деб фараз қилинади. Ушбу ишда плазма ҳосил қилган РКАТнинг CYGBга таъсири экспериментал тадқиқ этилди ва бу тажрибаларни қўллаб-қувватлаш (яъни натижаларнинг молекуляр механизмларини талқин қилиш) мақсадида компьютер симуляциялари ўтказилди. Экспериментал тадқиқотлар шуни кўрсатдики, CYGB ни САП билан ишлов бериш цистеин аминокислоталари (яъни, Cys₃₈ ва Cys₈₃) орасида дисульфид боғ ҳосил бўлишига олиб келади, яъни CYGB_{S-S}. Ушбу боғнинг CYGB структурасига таъсирини тадқиқ этиш учун МД

симуляциялари амалга оширилди. Симуляция натижалари шуни кўрсатдики, модификацияланган CYGB_{S-S} таркибидаги гем гуруҳининг табиий CYGB-дагига нисбатан эътиборсиз даражада силжиши мавжуд. Демак, Cys₃₈ ва Cys₈₃ орасида дисульфид боғнинг ҳосил бўлиши гем гуруҳининг локал ориентациясини ўзгартирмайди, бу ҳақда адабиётда ҳам маълум қилинган. Аммо, симуляция натижалари, гем гуруҳи яқинида жойлашган His₁₁₇ қолдиғи ўз ўрнини модификацияланган CYGB_{S-S} да сезиларли даражада ўзгартирганлигини кўрсатди. His₁₁₇ азот атомларидан бири билан гем темири орасидаги масофа модификацияланган CYGB_{S-S} да деярли икки баробарга ошди, бу дисульфид боғи туфайли юзага келган конформацион ўзгаришлар натижасида бўлди (16-расм).

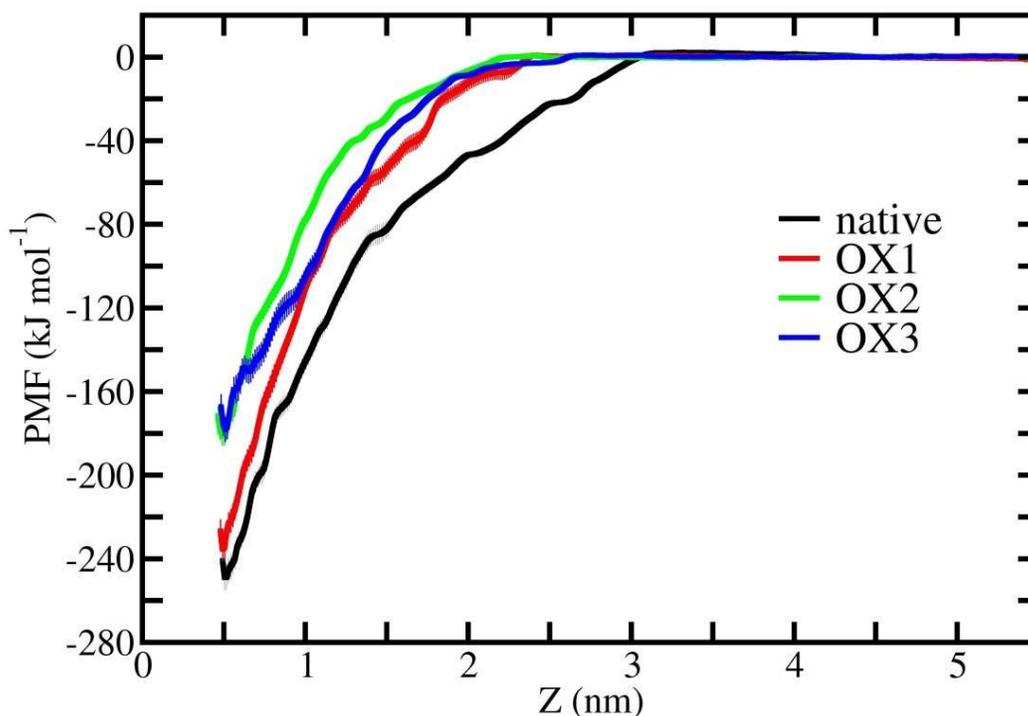


16-расм. Қизил тўрсимон юза сифатида кўрсатилган табиий CYGB (a-b) ва модификацияланган CYGB_{S-S} (c-d) системаларнинг боғланиш (ўзаро таъсирлашиш) жойлари. Кўриниб турганидек, табиий CYGBда гем гуруҳига (яшил) яқинлашиш имконияти модификацияланган CYGB_{S-S} га нисбатан чекланган.

Шундай қилиб, САП оксидлаши туфайли дисульфид боғининг ҳосил бўлиши CYGBнинг 3D структурасига таъсир қилади ва шу билан His₁₁₇ нинг дарвоза функцияси орқали гем гуруҳига яқинлашиш имконияти очилади. Бу, ўз навбатида, гем гуруҳини жалб қилиш орқали CYGBда боғловчи яқинликни

оширади, қайсики тадқиқотнинг экспериментал натижалари билан мос келади. Ушбу тадқиқот жуда муҳим, чунки CYGB, молекуляр асосда, оксидловчи стрессга қарши ҳужайра курашишида рол ўйнаши имкониятига эга эканлиги тўғрисида қўшимча маълумот ва янги тушунчалар беради.

Оксидланишнинг токсик амилоид бета пептид агрегациясига таъсири. Мияда эримайдиган амилоид бета (A β) пептидларининг агрегацияси Альцгеймер хасталиги каби нейродегенератив хасталикларнинг бошланишига сабаб бўлиши маълум. Аммо, A β агрегатларини бекарорлаштиришни тушунтирувчи туб механизмлар ҳали ҳам яхши ўрганилмаган. A β агрегатларини САП орқали оксидлашга бағишланган сўнгги тажрибалар ушбу токсик агрегатларни йўқ қилишда истиқболли натижаларини кўрсатди. Шундай қилиб, ушбу тадқиқотда МД симуляцияларидан фойдаланиб A β пентамернинг стабиллигига оксидланиш таъсири ўрганилди. Симуляция натижалари шуни кўрсатдики, A β пентамернинг оксидланиши структурада юқори эгилувчанликка ва кўпроқ конформацион ўзгаришларга олиб келади ва шу билан эритувчига кириш имкониятини оширади. Бу ‘туз-кўприги’ ўзаро таъсири бузилган ОХ3 (15% оксидланиш) ҳолатида янада яққол кўринади. Бундан ташқари, оксидланиш пептидлараро боғланиш эркин энергиянинг пасайишига олиб келади (17-расм), натижада амилоид бета агрегацияси жараёнини издан чиқаради.



17-расм. Табиий ва оксидланган A β пентамер структураларининг ЭЭПлари (PMF). OX1, OX2 ва OX3 мос равишда 3, 9 ва 15% оксидланган структураларга тўғри келади. Боғланиш эркин энергиялари профиллардаги минимал ва максимал қийматлар фарқидан ҳисобланади.

Шундай қилиб, ушбу тадқиқот Альцгеймер хасталиги учун муҳим бўлган токсик Аβ пептид агрегациясини секинлаштириш (ёки тўхтатиш)га сабаб бўладиган механизмларидан бирини яхшироқ тушунишга ёрдам беради.

ХУЛОСАЛАР

Экспериментал тадқиқотлар билан бир қаторда компьютер симуляциялари ҳам тирик ҳужайралар сиртида содир бўладиган молекуляр жараёнлар тўғрисида фундаментал тушунчалар бериши мумкин. Шу билан бирга, бу жараёнларни тажрибалар орқали ўрганиш қийин ёки ҳатто имконсиз бўлиши мумкин. Шундан келиб чиққан ҳолда, ушбу докторлик ишида саратон ҳужайраларида юзага келадиган ҳужайра ичидаги РКАТнинг сезиларли даражада ошишининг барча учта потенциал механизмлари, яъни а) ўтказувчанликнинг ошишига олиб келувчи ҳужайра мембранасининг РКАТ томонидан модификацияси, б) РКАТнинг трансмембрана оқсил каналлари орқали фаол (бевосита) транспорти ва с) РКАТнинг ҳужайра ичидаги стресс сигналига олиб келувчи маълум оқсиллар билан ўзаро таъсири, атомар даражадаги замонавий компьютерда моделлаштиришдан фойдаланилиб батафсил тадқиқ этилди. Компьютер симуляцияларида модел системалар сифатида липид молекулаларининг ҳар хил турларидан ташкил топган ФҚҚ ва турли хил турдаги оқсиллардан фойдаланилди.

Ушбу докторлик ишида қилинган хулосалар қуйидагилардан иборат:

1. ФҚҚда липидларнинг плазма орқали оксидланиши битта липидга тўғри келувчи сирт юзасининг умумий ошишига ва қўш қатлам қалинлигининг камайишига олиб келади; аллақачон 25% ALD оксидланиши битта липидга тўғри келувчи сирт юзасининг ~10% га ошишига, қўш қатлам қалинлигининг эса ~10% га камайишига олиб келади, ҳатто ФҚҚда 25% OX2 оксидланиш мавжуд бўлса ҳам (яъни 25% ALD + 25% OX2); бу, натижада қўш қатлам оқувчанлигининг ошишига олиб келади.

2. Липид оксидланиши, шунингдек, мембрана ўтказувчанлигининг умумий ошишига олиб келади ва шу билан мембрана орқали РКАТ ўтишига таъсир қилади; ФҚҚ оксидланиши туфайли гидрофилик РКТ (ОН, NO₂ ва H₂O₂)нинг мембрана орқали ўтиш эркин энергия барьерлари камаяди, айниқса альдегид оксидланиш ҳолатида; 50% альдегид оксидланган ФҚҚда ОН, NO₂ ва H₂O₂ зарраларининг қўш қатлам марказига кириш активация энергиялари табиий ФҚҚ билан солиштирганда мос равишда 45, 26 ва 31% га камаяди; гидрофобик РКАТ (NO, NO₂, N₂O₄, O₂ ва O₃) сезиларли даражада паст энергия барьерларига эга бўлади ва шунинг учун табиий ва оксидланган ФҚҚлар орқали гидрофилик РКТга қараганда осонроқ ўтишади.

3. РКТнинг мембрана орқали ўтиш эркин энергия барьерларининг пасайиши ушбу турларнинг хужайра ичига (оксидловчи зарар келтириши учун) кириб бориши эҳтимоллигини оширади, аммо энергия барьерлари ҳали ҳам нисбатан юқори бўлиб, бу муайян оқсил каналларига ёки электр майдон томонидан ҳосил қилинган ғовакларга эҳтиёж борлигини кўрсатади.

4. Электр майдонининг синергистик таъсири шуни кўрсатадики, липид оксидланиши мембранада ғовак пайдо бўлиши (яъни электропорация)ни бошлаш учун зарур бўлган ўртача вақтнинг камайишига, шунингдек мембранада ғовак пайдо бўлиши учун зарур бўлган бўсағавий электр майдоннинг пасайишига олиб келади; 0.4 В/нм электр майдон кучланганлиги ва 50% альдегид оксидланишида, ғовак ҳосил бўлиш вақти ~12 дан 1.2 нс гача (яъни 10 марта) камаяди, пероксидланган ФҚҚда эса оксидланишнинг кучли таъсири кузатилмайди (яъни ~12 ва 6 нс, 2 баравар камаяди).

5. Электр майдони туфайли ғоваклар ҳосил бўлиши мембранада битта-файлли сув дефекти (яъни, битта сув молекуласи кенглигидаги тор сувли канал) пайдо бўлиши билан бошланади, бу дефект тез (бир неча нс ичида) кенгайиб бориб натижада (сувли) ғовак ҳосил бўлишига олиб келади; ҳосил бўлган ғоваклар реактив плазма турларининг хужайра ички қисмига кириб боришини осонлаштиради ва натижада оксидловчи зарар келтиришига имкон яратади.

6. Липид пероксидланиш даражасини ошириш орқали PSнинг ички қатламдан ташқи қатламга ўтиш транслокация энергия барьерини камайтириш мумкин; табиий ФҚҚ учун ҳисобланган эркин энергия баръери 93 кЖ/моль га тенг ва у адабиётда келтирилган қийматлар оралиғида жойлашган (яъни 75-120 кЖ/моль); 50% пероксидланган ФҚҚда бу барьер 65 кЖ/моль гача пасаяди (яъни 30% камайиш); бу эса PS 'flip-flop' ҳаракатини осонлаштиради ва натижада хужайралар апоптозини келтириб чиқаради.

7. Механик стресс (кучланиш) шароитида мембрананинг оксидланиши нисбий кенгайиш (ϵ_A)ни камайтиради ва унда ғовак ҳосил бўлишига ёрдам беради, шу билан мембрананинг оқувчанлигига ҳисса қўшади; гомоген (бир жинсли) мембраналарда ϵ_A оксидланиш турига боғлиқ; табиий (PORC липидли) кўш қатламда $\epsilon_A=1.17$ ва бу қиймат тўлиқ пероксидланган (PORCOOH липидли) мембранада 0.9 гача пасаяди (яъни 23% пасайиш); гетероген (яъни PORC+PORCOOH) мембраналарда эса ғовак ҳосил бўлиши табиий PORC мембраналарига қараганда осонроқ (яъни PORCOOH га ўхшаш) ва ғоваклар ё интерфейсда ёки оксидланган соҳанинг асосий қисмида ҳосил бўлади;

8. Липид думининг тўйинганлик даражаси, липид бош гуруҳининг тури ва мембранадаги холестерин улуши ҳам плазма зарраларининг хужайралар ичига киришига таъсир қилади; мембранадаги DPPЕ улушининг ошиши 25% холестеринли DPPC ва DOPC мембрана системалари орқали H_2O_2 ўтишининг эркин энергия баръери ошишига олиб келади; турли хил физик ва кимёвий жараёнлар, жумладан липид оксидланиши, липидлар тўплами (зич жойлашуви) ва липид доменлари уюмларининг ҳосил бўлиши, РКАТни хужайралар ичига етказиб беришда рол ўйнаши мумкин.

9. AQP1 бўйлаб H_2O_2 ўтказувчанлик коэффициентлари ФКҚдагига нисбатан икки катталик тартиби, аниқроғи 388 марта, катта ($P_{\text{AQP1}} = 2.57 \text{ см/с}$ ва $P_{\text{РОРС ФКҚ}} = 6.62 \times 10^{-3} \text{ см/с}$) ва бу H_2O_2 нинг ҳужайра ичкарасига кириб бориши AQP орқали бўлиши кераклигини кўрсатади;

10. Гидрофилик (H_2O_2 ва OH) ва гидрофобик (NO_2 ва NO) РКАТнинг барчаси AQP1 орқали ўтиши мумкин; OH ва NO зарраларининг AQP1 орқали ўтиш эркин энергия барьерлари ($\sim 8 \text{ кЖ/моль}$) H_2O_2 ва NO_2 зарралариники ($\sim 12 \text{ кЖ/моль}$)га нисбатан паст, бу ушбу турларнинг AQP1 ғовагининг ички қисмига осон кира олишини ва AQP1 нинг аминокислоталари билан ўзаро таъсирлашиши мумкинлигини кўрсатади; липид ва оксил оксидланишининг иккаласи ҳам H_2O_2 ва NO_2 зарраларининг AQP1 орқали ўтиш эркин энергия барьерини бироз оширади, OH ва NO зарралари учун эса оксидланишнинг кучли таъсири кузатилмайди.

11. Гидрофилик турлар ҳужайрага AQPлар орқали кириб боради, чунки улар липид мембранаси орқали юқори барьерга учрашади, айниқса табиий ФКҚда (яъни H_2O_2 ҳолатида мос равишда ~ 10 ва 22 кЖ/моль), гидрофоб турлар эса катта эҳтимол билан липид оксидланиши мумкин бўлган мембрана орқали ўтишади, чунки уларнинг AQP орқали ўтиш барьерини юқорироқ (яъни, NO ҳолатида мос равишда ~ 8 ва 1 кЖ/моль).

12. хСТ антипортери Cys_{327} қолдигининг оксидланиши СҮС транслокацияси учун эркин энергия барьерини келтириб чиқаради (яъни 33.9 кЖ/моль), бу эса хСТ структурасининг субстрат боғланадиган жойига СҮС киришини тўсиб қўяди ва шу билан хСТ антипортер функциясини тўхтатиб қўяди.

13. hEGFнинг оксидланиши унда конформацион ўзгаришлар ва дисульфид боғларининг узилишига олиб келади, бу эса ушбу оксилни айниқса юқори оксидланиш даражасида эгилувчан қилади; α -спирал структураси 11.2% дан 7.4% гача пасаяди, β -структура эса 10.9% дан 0.5% гача пасаяди ва шу билан тасодифий бурамалар фоизини оширади; шундай қилиб, паст оксидланиш даражаси hEGFнинг унинг рецептори билан боғланиш энергиясига кам таъсир қилади (-105.2 ва -71.2 ккал/моль), ҳолбуки юқори оксидланган hEGFда унинг рецептори билан ўзаро таъсири пасаяди (-105.2 ва -49.5 ккал/моль).

14. САП оксидланиши натижасида дисульфид боғининг ҳосил бўлиши СҮГВнинг конформациясига таъсир қилади; ҳақиқатан ҳам, гем темири билан His_{117} нинг азот атомларидан бири орасидаги масофа $\text{CUGB}_{\text{S-S}}$ да деярли икки баробарга ошади (6.63 га нисбатан 13.48 \AA); бу эса His_{117} нинг дарвоза функцияси орқали гем гуруҳига яқинлашиш имконини беради ва шу билан гем гуруҳини жалб қилиш орқали СҮГВда боғловчи яқинликни оширади, қайсики тадқиқотнинг экспериментал натижалари билан мос келади.

15. А β пентамернинг оксидланиши унда юқори эгилувчанликка ва конформацион ўзгаришларга олиб келади ва шу билан эритувчи (сув)нинг пептидлар орасига кириш имконияти ортади; бу энг юқори оксидланиш даражасида янада яққол кўринади (бу ерда β -структура 73.3% дан 64% гача пасаяди) ва у туз кўприги ўзаро таъсирининг бузилиши билан боғлиқ; натижада

пептидлараро боғланиш энергияси пасаяди (-248.93 дан -178.17 кЖ/моль гача) ва бу, оксидланиш туфайли Аβ агрегацияси жараёнининг издан чиқишини кўрсатади.

**SCIENTIFIC COUNCIL No. DSc.02/30.12.2019.FM.65.01
FOR AWARDING SCIENTIFIC DEGREES AT THE INSTITUTE OF
ION-PLASMA AND LASER TECHNOLOGIES**

**UNIVERSITY OF ANTWERP (BELGIUM)
INSTITUTE OF ION-PLASMA AND LASER TECHNOLOGIES**

YUSUPOV MAKSUDBEK SULTANMURATOVICH

**MOLECULAR MECHANISMS OF
INTERACTION OF COLD PLASMA WITH BIOMOLECULES**

01.04.03 – Molecular physics and thermal physics

PRESENTATION

**for obtaining the degree of Doctor of Physical and Mathematical Sciences (DSc)
on the basis of articles published in scientific journals with an impact factor of 1.0 and
higher, and included in the international scientific databases
(without defending a dissertation)**

(the degree of Doctor of Philosophy (PhD) was obtained in 2014)

TASHKENT - ANTWERP – 2020

The title of the research (DSc) has been registered by the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan under the number B2020.3.DSc/FM160.

The work was carried out at the University of Antwerp and the Institute of Ion-Plasma and Laser Technologies.

Scientific consultant: **Mirzaev Sirojiddin Zaynievich**
DSc in physics and mathematics, professor

Official opponents: **Bakhramov Sagdulla Abdullaevich**
DSc in physics and mathematics, professor, academician

Benedikt Jan
professor, Christian-Albrecht University of Kiel (Germany)

Rasulov Akbarali Makhamatovich
DSc in physics and mathematics, professor

Leading organization: **Samarkand State University**

The presentation will take place on « 02 » 12 2020 at 16⁰⁰ at the meeting of the Scientific Council No. DSc.02/30.12.2019.FM.65.01 at the Institute of Ion-Plasma and Laser Technologies (address: Durmon Road 33, 100125 Tashkent, Uzbekistan, Phone: (99871) 262-42-54, e-mail: info@iplt.uz.).



Kh.B. Ashurov
Chairman of the Scientific Council
on Award of Scientific Degrees
DSc Thech, professor

I.D. Yadgarov
Scientific Secretary of the Scientific Council
on Award of Scientific Degrees
DSc in physics and mathematics

B.E. Umirzakov
Chairman of the Scientific Seminar
under Scientific Council on Award of Scientific Degrees
DSc in physics and mathematics, professor

INTRODUCTION (description of the presentation)

Relevance and necessity of the research topic. In recent years, a new interdisciplinary field, plasma medicine, has been developing rapidly, combining the achievements of plasma physics, molecular physics, biophysics and computational physics, and dealing with fundamental and applied problems of the interaction of cold atmospheric plasma (CAP) and soft media, based on the use of physicochemical processes occurring in it. The processes that occur under the influence of CAP on the surface (or in the volume) cause alterations in the structure of biomolecule, which is usually accompanied by a change in its hydrophilic and hydrophobic properties and can stimulate the appearance of the biological activity of the biomolecule.

Nowadays, the situation with the use of CAPs is such that practical implementations are ahead of fundamental research devoted to understanding the physicochemical laws of plasma processes. The external parameters of such plasma processes are mainly chosen empirically. This is due, firstly, to the complexity of the analysis of reactions proceeding under non-equilibrium conditions, and secondly, to the fact that the plasma is a self-consistent system, the physical characteristics of which, determining its chemical activity, depend on the intermolecular interactions and chemical transformations initiated by the plasma. Obviously, without understanding the interaction mechanisms, the role of various active species in reactions with biomolecules and the effect of chemical processes in plasma on its properties, effective optimization of plasma technology is impossible. In this regard, *investigating the mechanisms* of processes that determine the composition of the active components of cold plasma as well as *identificating the regularities* of its effect on biomolecules, *are urgent tasks*.

In the world, the use of CAP for cancer treatment is currently one of the most relevant topics in plasma medicine. Many studies have been conducted in this field, including the characterization and development of plasma sources, the physics and chemistry occurring in the plasma and in the surface treated, the biophysical processes occurring when plasma-generated species come in contact with biomolecules and the long-term effects of CAP treatment in living organisms. Promising results have been obtained in plasma oncology, both *in vitro* and *in vivo*. Experiments have revealed that CAP may selectively target the destruction of cancer cells, thereby leaving healthy cells less or undamaged. This, in turn, gives an advantage to CAP over traditional anticancer methods. Nevertheless, despite a large number of studies, the underlying mechanisms by which plasma acts selectively on cancer cells still remain elusive, and require more thorough fundamental investigations.

The complexity of the contact region of plasma with the living cells, makes it difficult or impossible to investigate through experiments. In this respect, computer modeling is very valuable, which provides an understanding of processes at the molecular level, thereby allowing the study of the underlying mechanisms in detail. Yet, to date, a limited number of simulation studies have been carried out that are devoted to a systematic study of the above processes.

In Uzbekistan, the field of plasma medicine, especially the use of cold plasma for cancer treatment, is one of the newest areas of plasma research and is in the early

stages of development. In this regard, the research using computer modeling plays an important role in the fundamental study of processes at the molecular level and in understanding the underlying mechanisms of experimental results obtained in the field. For this purpose, the gradual transfer of knowledge and skills in computer simulations for young researchers of Uzbekistan has already been established. In the future, the establishment of the cooperation with medical research centers in the country, to carry out practical studies in this area, is envisaged. Currently, research projects are being prepared in this field. Undoubtedly, the development of plasma medicine field in Uzbekistan offers cheap and effective solutions for the treatment of various diseases. Therefore, increasing the number of researchers in the field is one of the priority tasks, and for this purpose, it is expedient to expand research in the field of plasma medicine.

This doctoral research serves to some extent in the implementation of the tasks stipulated in the Decree of the President of the Republic of Uzbekistan dated February 7, 2017 No. PD-4947 “About the strategy of actions in five priority directions of development of the Republic of Uzbekistan in 2017-2021” and the Resolution dated July 14, 2018 No. PR-3855 “About additional measures to increase the efficiency of commercialization of the results of scientific and scientific-technical activities” and other regulations related to this activity.

Compliance of the research with the priority directions of the development of science and technology in the country. This research was carried out in the framework of the priority directions of the development of science and technology of the Republic of Uzbekistan: F.2. “Physics, astronomy, energy and mechanical engineering” III. Energy, energy saving, instrumentation, modern electronics, microelectronics, electronic equipment.

International context of the research². Numerous leading research centers and universities worldwide with long time expertise on plasma research are performing research in the field of plasma medicine to investigate the fundamental and practical problems of the interaction of cold plasma with the soft media. Among them are PLASMANT (University of Antwerp, Belgium), MpNL (George Washington University, USA), GREMI (University of Orléans, France), CSIRO (Australia), PBRC (Kwangwoon University, South Korea), CPSEG (University of Michigan, USA), Hamaguchi Lab. (Osaka University, Japan), FII (University of South Australia, Australia), AEPT (Ruhr-Universität Bochum, Germany), GravesLab (US Berkeley, USA), IAP group (University of Bologna, Italy), CLTPS (Nagoya University, Japan), Xinpei Lu’s Lab (HuaZhong University of Science and Technology, China), INP-Greifswald (Leibniz Institute for Plasma Science and Technology, Germany) and C.J. Nyheim Plasma Institute (Drexel University, USA).

Nevertheless, despite the growing interest in plasma medicine and plasma oncology, most research groups focus on experiments, reporting some beneficial effects of the plasma treatment. There is, however, a lack in applying complementary

² The review of international research on the topic is based on the following review articles: M. Keidar, Plasma Sources Sci. Technol. 24 (2015) 033001, D. Yan et al. Oncotarget 8 (2017) 15977 and A. Bogaerts et al. Front. Chem. Sci. Eng. 13 (2019) 253.

research methods aimed at fundamental understanding at the molecular level, which can be achieved using atomistic simulation techniques. To date, the research group PLASMANT is virtually the only group worldwide, focusing on such atomic scale simulation studies for plasma medicine and plasma-cancer treatment.

Current state of the research on the topic. Research schools of a number of leading foreign research centers, headed by leading scientists, including A. Fridman, M. Keidar, A. Bogaerts, M. Kushner, T. von Woedtke, J. Benedikt, D. Graves, V. Miller, J-M. Pouvesle, E. H. Choi, V. Colombo, S. Hamaguchi, G. Kroesen, M. Hori, K. D. Weltmann, M. Laroussi, D. O'Connell, L. Mir, Xinpei Lu, J. Bandow and K. Ostrikov, are conducting investigations in the field of plasma medicine, in particular, in the fundamental and applied research of the anticancer effects of cold atmospheric plasma. Although very promising results are being obtained in plasma oncology from *in vitro* to *in vivo* studies, and even some first clinical trials, the need for more fundamental insight in the underlying mechanisms remains at large.

It is generally accepted that the anticancer activity of CAP treatment is associated with reactive oxygen and nitrogen species (RONS) generated by plasma. A number of studies have already reported a noticeable rise of intracellular RONS occurring in cancer cells compared to normal cells upon plasma treatment, and this elevated level of RONS most probably causes the selective death of cancer cells. Indeed, because of the stronger metabolism in cancer cells, their basal intracellular RONS levels are higher than in normal cells. When further extracellular RONS stress is exerted on them, the intracellular RONS level in cancer cells may pass a threshold, leading to cell death. Hence, cancer cells can experience more apoptosis (i.e., programmed cell death) than normal cells upon plasma treatment.

RONS regulate key biochemical pathways within intra- and intercellular environments, inducing chemical and physical changes in cells. Recent research has shown that plasma treatment of living cells results in intracellular signaling changes, important for the treatment of diseases. However, it is still not understood how RONS regulate intracellular processes, directly through modification of intracellular components and/or indirectly through modification of extracellular components (e.g., proteins) or the external membrane. Obviously, this requires more fundamental investigations based on both experiments and computer simulations.

While experiments are indispensable, computer simulations are very valuable as they provide fundamental insight into nanoscale processes (in nm and ns), allowing to study the underlying mechanisms in detail, which is difficult to achieve experimentally. However, to date very limited attention has been paid to detailed *in silico* investigations of reactive plasma species interacting with biomolecules.

Three possible mechanisms are proposed for RONS permeation into cells: a) active transport of reactive species through transmembrane channels, b) chemical modification of the cell membrane, leading to increased permeability and c) interactions with membrane-bound proteins leading to stress signaling inside the cell, which can lead to an increase in cellular RONS levels. All these possible

mechanisms of noticeable rise of intracellular RONS occurring in cancer cells were addressed in this doctoral work.

Connection of the research topic with the research activities of the institution. The research was conducted in accordance with the research plans of the PLASMANT group of the University of Antwerp (Belgium) and in the framework of the following postdoctoral research projects funded by the Research Foundation-Flanders: grants No. 1200216N “Atomic scale modeling for plasma cancer treatment” (2015-2018, University of Antwerp, Belgium) and No. 1200219N “Plasma-based cancer treatment: Atomic level simulations” (2018-2021, University of Antwerp, Belgium).

The aim of the work is to obtain a fundamental understanding of the effect of cold atmospheric plasma on biomolecules by identifying the mechanisms of interaction of reactive species with biomolecules, caused by plasma, and in particular, to determine the role of reactive particles in processes.

The tasks of the research are:

determination of appropriate model systems for specific biomolecules; setting up their spatial atomic structures, and subsequent energy minimization and equilibration;

study the effect of head group and lipid tail oxidation, induced by plasma-generated reactive species, in the model membrane; describing the specific role of the reactive oxygen species in the oxidation of this model membrane;

investigation of the synergistic effect of electric field and lipid oxidation (both caused by plasma) on the permeability of cell membrane; determination of the electric field threshold needed for pore formation (i.e., electroporation) together with the permeation free energy barriers of reactive species across the membrane;

study the permeation processes of plasma-generated species across native and oxidized membranes, through calculation of their transport free energy profiles;

investigation of the phosphatidylserine flip-flop motion across native and oxidized membrane; calculation of the free energy barriers for the translocation;

study the impact of lipid tail saturation degree, lipid head group type and membrane cholesterol fraction on the delivery of plasma species into cells;

examination of the effect of mechanical stress on oxidized membranes, using homogeneous and heterogeneous membrane systems;

investigation of the effect of plasma oxidation on the transport of reactive species across aquaporin transmembrane channel; calculation of the free energy and diffusion rate profiles; analysis of the permeation mechanisms;

study the impact of oxidative stress on cystine transportation by xCT antiporter; analysis of the rearrangements of the amino acids in the oxidized protein channel;

defining the role of plasma oxidation on structural features of human epidermal growth factor; study the conformational changes in this protein system;

understanding the effect of plasma oxidation on the structure of cytoglobin;
investigation of the effect of intramolecular disulfide bridge formation;

identification of the role of plasma oxidation on stability of toxic amyloid beta peptide aggregation; analysis of the structural changes.

The object of the research are reactive oxygen and nitrogen species, a phospholipid bilayer consisting of various native and oxidized lipid molecules, native and oxidized integral membrane proteins aquaporin and xCT, as well as model systems for signaling, globular and fiber-like proteins.

The subject of the research are atomic positions and velocities in the model system, their interaction energies, area per lipid and bilayer thickness, free energy and diffusion rate profiles of the reactive species across phospholipid bilayers as well as through aquaporin, permeability coefficient, free energy barrier, electric field needed for pore formation, average pore formation time and binding free energy.

Methods of the research. Both the reactive and non-reactive molecular dynamics (MD) simulations as well as the umbrella sampling (US) method were used in the doctoral research.

The scientific novelty of the research is as follows:

for the first time, a systematic method was developed to investigate the interaction of RONS with the head groups of the phospholipid bilayer (PLB), and the subsequent effect of the head group and lipid tail oxidation on the structural and dynamic properties of the membrane, applying several different modeling approaches; the obtained simulation results were validated with experiments and a good agreement was obtained;

for the first time, the molecular level mechanisms of the synergistic effect of the electric field and lipid oxidation, both induced by CAP, on the formation of pores in a PLB, were identified;

it was found that oxidation of the lipid tails results in a drop in the average time needed to initiate electroporation, as well as a lower threshold electric field needed for pore formation in the PLB;

for the first time, systematic methods have been developed to study the effects of plasma-induced oxidation on the processes occurring in the PLB, such as transport of RONS, phosphatidylserine (PS) flip-flop motion as well as mechanical stress;

it was shown that the oxidation of the PLB leads to an overall decrease in the permeation free energy barriers of the hydrophilic ROS, whereas hydrophobic RONS can significantly better penetrate across both native and oxidized PLBs;

it was identified that the oxidation of the PLB facilitates the PS translocation across the PLB and reduces the critical areal strain required for pore formation in the PLB under mechanical stress, thereby contributing to membrane leakage;

for the first time, a detailed investigation method was developed to study the permeation processes of hydrophilic and hydrophobic RONS across aquaporin (AQP) transmembrane protein channel;

it was suggested that hydrophilic species enter the cell through AQPs, as they experience a clearly higher energy barrier to enter through the lipid membrane;

the hydrophobic RONS were found to permeate the cell most likely across the membrane, where lipid oxidation can take place, as their energy barriers through AQP were defined to be higher;

for the first time, a complete process of the cystine (CYC) transportation through xCT antiporter was observed using several simulation techniques;

it was shown that the oxidation of xCT leads to a free energy barrier for CYC translocation, thereby blocking the access of CYC to the substrate binding site;

the impact of plasma oxidation on the properties of three model proteins was examined in detail; for this purpose, specific amino acids were selected for modification to create oxidized forms of the model proteins; the simulations were carried out in combination with the experiments and an overall good qualitative agreement was achieved.

Practical results of the work are as follows:

using a combination of different modeling approaches, methods were proposed for atomic level investigation of the interaction of cold atmospheric plasma-generated particles with biomolecules;

new methods were developed by combining the reactive and non-reactive MD and US techniques to study the structural and dynamic changes in the phospholipid bilayer caused by plasma, changes in its permeability, the effect of oxidation, electric field and mechanical stress on its properties as well as the transport of reactive plasma species across the bilayer;

the ability to systematically investigate the complex mechanisms of the effect of cold plasma oxidation on the properties and permeability of integral membrane proteins and the permeation of various species across them, was demonstrated through the use of the US-MD and GLE methods together with the HOLE and STRIDE programs;

to create different degrees of oxidation in model proteins a specific method was implemented, i.e., the modification of certain amino acids based on the results of experiments and simulations;

in order to study the structural properties of plasma-oxidized proteins and the effect of conformational changes on their stability, methods of using non-reactive MD and molecular docking simulations together with a combination of different analyzing techniques (i.e. PCA, SASA and DSP), were developed.

Reliability of the research results is supported by the fact that they were obtained using modern modeling techniques. The validity of the results is also based on the use of adequate model systems and computational algorithms as well as the

compatibility of obtained results with the experimental results. Moreover, all articles of the doctoral work were published in high impact factor journals and peer-reviewed by the experts. Furthermore, some of the results of the doctoral work were highlighted on the scientific news website *AdvancedScienceNews.com* and also included in the books devoted to plasma medicine, i.e., “*Plasma medical science*”, S. Toyokuni *et al.*, Academic Press, 2018 (Chapter 4) and “*Plasma cancer therapy*”, M. Keidar, Springer, 2020 (Chapter 7).

Scientific and practical significance of research results. The scientific significance of the research results lies in the identification of fundamental physical and chemical processes of the interaction of cold plasma with biomolecules, applying the state-of-the-art computer simulations, with the aim of unraveling how to control these processes.

The practical importance of the research results lies in the fact that the obtained simulation results make an important contribution to a better understanding of the mechanisms of plasma interaction with biomolecules relevant for cancer, as well as to the interpretation of the corresponding experimentally obtained results at the molecular level. Based on the simulation results, possible beneficial (or harmful) effects of CAP can be predicted, which, in turn, enables the development of more targeted and effective medical plasma therapies.

Implementation of the research results. The main implementation of the research results was through the citation of the simulation results by other research papers. According to the *Web of Science* scientific database, the obtained simulation results were discussed in reviews and used in the interpretation and description of the experimental or computational outcomes of more than 250 papers, published in high impact factor journals:

the results of the interaction of plasma-generated RONS with the PLB and the subsequent effect of the head group and lipid tail oxidation on the properties of the membrane, as well as the synergistic effect of the electric field and lipid oxidation on the permeability of PLB, were used to interpret and describe the observed results in [*Biol. Chem.* 2019; 400: 19 (IF=3.014), *Sci. Rep.* 2019; 9: 4496 (IF=4.011), *J. Chem. Inf. Model.* 2019; 59: 4413 (IF=3.966), *Cells* 2020; 9: 847 (IF=5.656), *Trends Biotechnol.* 2018; 36: 594 (IF=13.747), *J. Am. Chem. Soc.* 2018; 140: 9606 (IF=14.695), *Chem. Rev.* 2019; 119: 5954 (IF=54.301), *Mat. Sci. Eng. R.* 2019; 138: 36 (IF=22.25)];

the outcomes of the investigations of the processes occurring in the PLB induced by plasma oxidation, such as the transport of RONS and phosphatidylserine flip-flop, were analyzed and reviewed in [*J. Phys. Chem. B* 2018; 122: 10362 (IF=2.923), *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019; 21: 19327 (IF=3.567), *Cancers* 2020; 12: 269 (IF=6.162), *Nanoscale* 2019; 11: 19497 (IF=6.97), *Cancers* 2019; 11: 1109 (IF=6.162), *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 1939 (IF=4.183), *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2018; 51: 177 (IF=7.052), *Annu. Rev. Biophys.* 2019; 48: 421 (IF=12.175), *Chem. Rev.* 2019; 119: 5954 (IF=54.301)];

the studies on the permeation of hydrophilic and hydrophobic RONS across aquaporin, as well as the cystine transportation through xCT, transmembrane protein channels, were considered and discussed in [*J. Chem. Inf. Model.* 2018; 58: 2193 (IF=3.966), *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019; 2019: 9062098 (IF=4.868), *Cells* 2019; 8: 1316 (IF=5.656), *Cancers* 2019; 11: 1920 (IF=6.162), *Arch. Biochem. Biophys.* 2020; 681: 108253 (IF=3.559), *Neurochem. Res.* 2020; 45; 1375 (IF=2.782), *J. Membr. Biol.* 2019; 252: 465 (IF=1.746), *Arch. Biochem. Biophys.* 2019; 674: 108114 (IF=3.559), *Cancers* 2020; 12: 269 (IF=6.162)];

the results of the studies on the effect of plasma oxidation on the structural properties of three model proteins, i.e., human epidermal growth factor, amyloid beta peptide and cytoglobin, were used in the analysis and interpretation of the obtained outcomes in [*Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019; 2019: 9062098 (IF=4.868), *Cancers* 2019; 11: 1920 (IF=6.162), *Cancers* 2018; 10: 394 (IF=6.162), *J. Mol. Graph. Model.* 2020; 96: 107535 (IF=1.863), *Sci. Rep.* 2019; 9: 16080 (IF=4.011), *ChemSusChem* 2020; 13: 2072 (IF=7.804), *Molecules* 2019; 24: 2568 (IF=3.06), *Plasma. Process. Polym.* 2018; 15: e1800078 (IF=3.173)].

Approbation of the research results. The results of the research were presented and discussed at 31 prestigious international conferences, symposiums and workshops.

Specifically, the invited talks were given at four international conferences, such as the 19th Gaseous Electronics Meeting (February 14-17, 2016, Geelong, Australia), the International Conference on Electrical Discharges with Liquids (March 13-17, 2016, Kocaeli, Turkey), the 2017 International Forum on Functional Materials (June 27-29, 2017, Jeju, Korea) and the 3rd Strasbourg Workshop on Membrane Biophysics (December 3-4, 2018, Strasbourg, France). Moreover, the research results were presented as oral talks, e.g., at the 4th Young Professionals Workshop on Plasma Medicine (September 21-24, 2015, Rostock, Germany), the 6th International Conference on Plasma Medicine (September 4-9, 2016, Bratislava, Slovakia) and the 7th International Conference on Plasma Medicine (June 17-22, 2018, Philadelphia, USA). Participation in prestigious conferences was accomplished by receiving grants (K179517N and K105116N) provided by the Research Foundation-Flanders.

Publication of the research results. The results of the doctoral research are reflected in 56 scientific works, including 23 peer-reviewed articles published in prestigious scientific journals recommended by the Supreme Attestation Commission of the Republic of Uzbekistan for publication of the main scientific results of doctoral thesis and displayed in the *Web of Science* scientific database.

The structure and volume of the presentation. The structure of the presentation consists of an introduction, five chapters, a conclusion and a list of references. The volume of the presentation is 88 pages.

MAIN CONTENT OF THE RESEARCH

Introduction. This research aims to gain fundamental insights into the effects of cold atmospheric plasma on biomolecules by identifying the mechanisms of interaction of reactive species with biomolecules, caused by plasma, and in particular, to determine the role of reactive particles in processes.

Part 1: Simulation methods. In a MD simulation, the atoms in the system are followed through space and time by integrating Newton's equations of motion. Forces acting on the atoms can be obtained either from quantum mechanical (QM) calculations (“*ab initio* MD”) or from a classical interatomic interaction potential or force field (“classical MD”). There are also intermediate methods, e.g, density functional based tight binding (DFTB), which is an approximate semi-empirical method, based on QM concepts, but containing a number of fitting parameters.

Reactive MD (i.e., based on a reactive force field) allows to simulate chemical reactions, i.e., bond formation and dissociation, which makes it computationally expensive, so that only small systems (10^2 - 10^3 atoms) with short timescales (10^2 - 10^3 ps) can be simulated. Non-reactive MD, on the other hand, is computationally much faster, and can handle 10^4 - 10^5 atoms and simulate for several 100 ns.

DFTB-based reactive MD simulations. DFTB is an approximate density functional theory (DFT) method, based on a Taylor series expansion of the DFT total energy expression with respect to charge density fluctuations. It provides a reliable description of reaction energies and geometries of the structures to be studied, and the deviations of the results from experimental values are stated to be comparable to DFT, while still being two orders of magnitude faster. The computational speed of this method is similar to semi-empirical methods like AM1 and PM3. This method has been augmented with an empirical treatment of the dispersion forces, to extend its ability to larger biomolecules.

Non-reactive MD simulations make use of classical force fields (or potentials), which are highly parameterized to provide reasonable agreement with experiments. In this work the GROMOS force field was used, which can handle both proteins and lipid bilayer systems used in this research. It is a united-atom force field, where specific groups of atoms (mainly CH_x) are treated as a single group, so it can handle larger systems (around 10^5 atoms) with good accuracy. GROMOS has already been used in many computational studies and reasonable agreements with experiments have been obtained. It contains parameters of both unmodified (i.e., native) and modified (i.e., oxidized) lipid molecules and amino acids and therefore allows to simulate the physical processes, e.g., transport of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS or RONS) across native and oxidized lipid bilayer and/or protein channel as well as the structural changes in these systems.

Umbrella sampling (US) method helps to calculate the free energy differences along the reaction coordinate. It is one of the powerful techniques used to enhance sampling, by applying the umbrella potential. In US, an applied external harmonic bias potential transfers the system from one thermodynamic state to another along

the reaction coordinate by a specified direction and a fixed speed. Thus, from the initial to the final transfer state, the intermediate steps are formed by a series of windows. These windows can be separated by a certain distance between the considered molecules, extracting a number of individual systems. The distance between two atoms, located along e.g., the normal of membrane, can be considered as a reaction coordinate. The separated windows are used further in US-MD simulations, which help to calculate the free energy profile (FEP) in a path-dependent manner, using the weighted histogram analysis method (WHAM). US-MD is widely used to compute, e.g., the binding or dissociation free energy between two proteins, or FEPs of RONS across the phospholipid bilayer (PLB, used as a model system for the eukaryotic cell membrane, Figure 1).

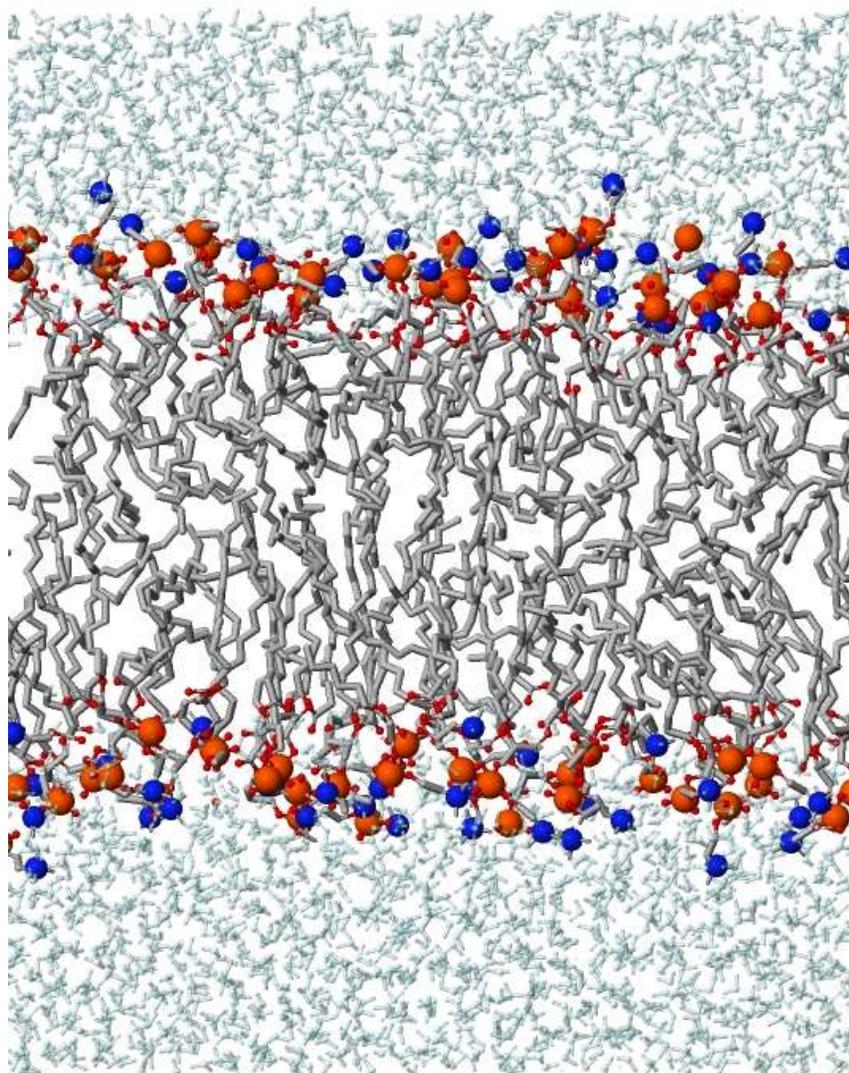


Figure 1. The PLB used as model system for eukaryotic cell membrane in non-reactive MD simulations. It consists of 128 lipid molecules with ~8000 water molecules organized in two lamellae. The water layers, oxygen atoms and lipid tails are shown in cyan, red and grey colours, respectively. The P (orange) and N (blue) atoms of the head group are depicted with bigger beads, for the sake of clarity.

Apart from simulation techniques, other programs and methods were also applied for the analysis of certain results. Specifically, the HOLE and STRIDE programs were used to calculate the profiles of the funnel radii across the protein channels and to analyze the secondary structure of proteins, respectively. Moreover, the GLE method was applied to calculate the diffusion rate profiles (DRP), using the same results of US-MD simulations. This method is based on the solutions to the generalized Langevin equation (GLE) for a harmonic oscillator. Through the integration of the position autocorrelation function (PACF), the diffusion coefficient of a solute in each z position $D(z)$ is calculated as follows:

$$D(z_i = \langle z \rangle_i) = \frac{\text{var}(z)^2}{\tau} \quad (1)$$

τ is calculated from the integral of the PACF ($C_z(t)$):

$$\tau = \int_0^{\infty} C_z(t) dt \quad (2)$$

The function $C_z(t)$ can be calculated in a straightforward way by a summation over the trajectory:

$$C_z(t) = \langle \delta z(0) \delta z(t) \rangle \quad (3)$$

where

$$\delta z(t) = z(t) - \langle z \rangle \quad (4)$$

As is obvious, an advantage of this GLE method is that the diffusion coefficient can be calculated directly from the variance of z and the correlation time τ . Based on the GLE method a fortran code was developed and its accuracy was already validated doing some test runs. Using the FEPs and DRPs, the permeability coefficients (P_m) of the permeants across the model systems can be calculated:

$$\frac{1}{P_m} = \int_{z_1}^{z_2} \frac{e^{w(z)/k_B T}}{D(z)} dz \quad (5)$$

where $w(z)$ is the free energy of the permeant along the z -axis of the system.

Thus, in the framework of the doctoral work, the reactive DFTB-MD simulations were applied to study the interaction of RONS with the head groups of the PLB. Moreover, the non-reactive MD simulations were used to study the effect of plasma oxidation, electric field, mechanical stress and lipid composition on the structural and dynamic properties of the PLB, and the impact of oxidation on the

conformations of model proteins (see below). Furthermore, the US-MD simulations were employed to investigate the permeation processes of RONS and the flip-flop motion of phosphatidylserine across PLB, as well as the transport of solutes across model proteins (AQP and xCT, see below).

Part 2: Permeability of cell membrane. In this part, the results of the studies on the effect of the head group and lipid tail oxidation induced by CAP in the cell membrane, the transport of RONS across native and oxidized membranes as well as the synergistic effect of electric field and lipid oxidation on the permeability of cell membranes are discussed.

Effect of head group and lipid tail oxidation in the cell membrane. The cell membrane is an important part of the cell. One of its basic functions is to protect the cell from substances applied from outside (e.g., RONS). Therefore, it is important to study how plasma species interact with the cell membrane, thereby forming e.g., lipid oxidation, and how they penetrate deep into the cell to cause oxidative damage.

The reactive MD simulation results on the interaction of RONS with the PLB were validated by comparison with the high-resolution mass spectrometry (MS) experiments, whereas the results of the non-reactive MD simulations were validated with experiments on liposomes treated with a CAP as external RONS source. In the latter case, the influence of CAP-treatment on the fluidity of liposomes were examined, which were prepared with integration of the fluorescent probe so-called Laurdan. Thus, the Laurdan assay was performed to determine the changes in fluidity of the membrane. It is associated with the change of the generalized polarization (GP) value.

The results of the reactive MD simulations and MS experiments revealed two important oxidation products (i.e., the formation of aldehyde groups (ALD) in one of the lipid tails and detachment of one of the tails (OX2) of the PLB) as more prominent oxidation products. Thus, in the non-reactive MD simulations these oxidation products were considered and their long-term effects on the properties of the PLBs were studied. For this purpose, some important properties of the bilayers were analyzed:

1. *The surface area per lipid*, determined by dividing the surface area of the bilayer by the number of lipids of one leaflet of the PLB,

$$A_L = \frac{L_x \times L_y}{n_L} \quad (6)$$

where L_x and L_y are the x and y dimensions of the PLB, respectively, and n_L is the number of lipids present in one layer.

2. *The bilayer thickness*, calculated by averaging all distances (z -components) between the phosphate groups of the two opposite layers of the PLB (i.e., d_{P-P}).

3. The deuterium order parameter, S_{CD} , which is a measure for the order of the lipid tails in the bilayer. The degree of ordering of the lipid tails can also be influenced when the head groups are oxidized (see below),

$$S_{CD} = \frac{1}{2} \langle 3 \cos^2(\theta_j) - 1 \rangle \quad (7)$$

where θ_j is the angle between a C–D bond and the normal of the membrane.

The simulation results showed that the oxidation products OX2 and combined ALD+OX2 lead to opposite results for all calculated parameters, but the effects are more pronounced for ALD+OX2 (Figure 2).

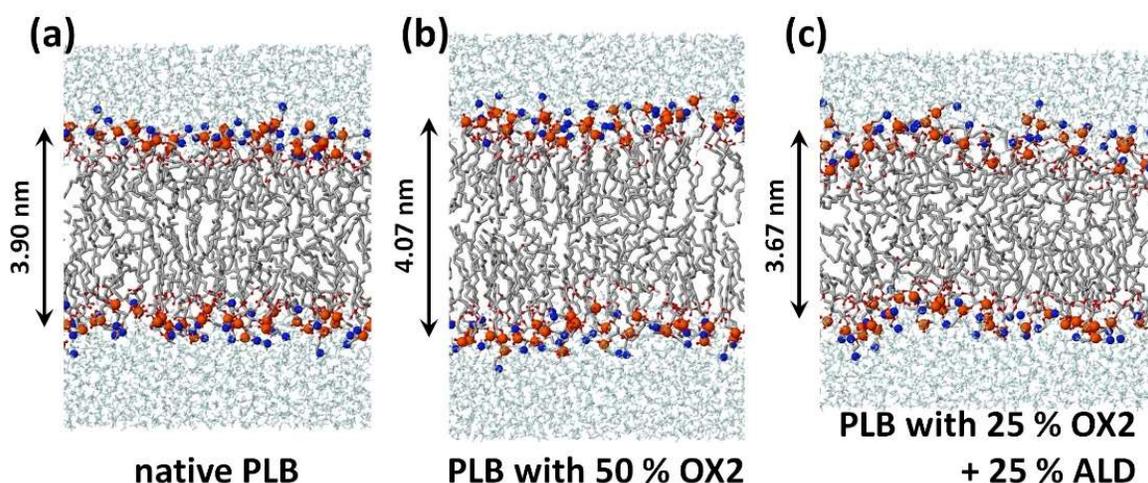


Figure 2. Schematic picture of the native PLB (a), and the PLB with only oxidized head groups (i.e., 50% OX2 (b)) as well as with oxidized head groups and lipid tails (i.e., 25% OX2 and 25% ALD (c)). The color legend is identical to Figure 1.

Already 25% of ALD oxidation leads to an increase of the surface area per lipid and a decrease of the bilayer thickness by around 10%, even when 25% of OX2 takes place in the PLB. Thus, the simulations predict an overall increase in area per lipid and a drop of the bilayer thickness upon equal oxidation of the head groups and lipid tails, thereby decreasing the lipid order, which eventually leads to an increase of the bilayer fluidity. The change in fluidity was also revealed by the experiments (Figure 3). It was found that plasma treatment of liposomes leads to a slight initial rise in membrane rigidity, followed by a strong and persistent increase in fluidity. This observation can be correlated to the simulation results, as ALD+OX2 leads to a higher disorder while OX2 alone leads to a lower disorder, but the effect of ALD+OX2 is more pronounced. So overall, the simulations predict a higher fluidity, assuming that the disorder correlates with fluidity. During or shortly after plasma treatment, a higher rigidity was observed. This is probably due to the initial OX2 oxidation. In a second step, presumably the ALD oxidation of lipid tails takes place,

increasing the disorder. A drop in lipid order might allow RONS to penetrate into the cell interior and cause oxidative damage, eventually leading to cell death.

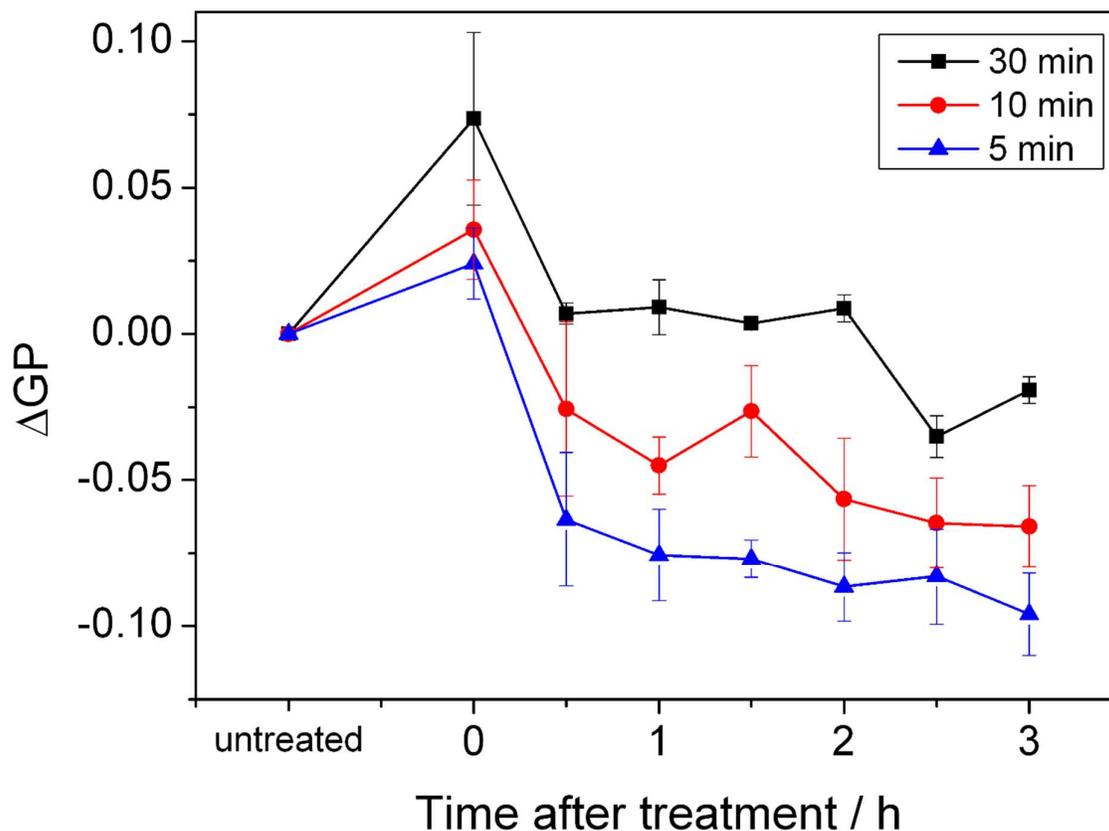


Figure 3. Determination of changes in membrane fluidity by Laurdan assay. Samples were treated for indicated durations with the plasma source. The change of fluidity is associated with the change of the GP value: a positive ΔGP indicates a decrease in fluidity and a negative ΔGP indicates an increase in fluidity.

Permeation of plasma species across native and oxidized membranes. To gain more insight in the permeability of RONS across both native and oxidized PLB, the US-MD simulations were performed. Figure 4 illustrates the FEPs of various RONS across native and 50% oxidized PLBs. As is clear, hydrophobic species (i.e., NO, NO₂, N₂O₄, O₂ and O₃) can significantly better penetrate across both native and oxidized PLBs, compared to hydrophilic species (OH, HO₂ and H₂O₂), as they have much lower free energy barriers. Hence, oxidation of the PLB does not strongly affect the FEPs of the hydrophobic RONS, but it significantly reduces the barriers of hydrophilic species, thus increasing their translocation probability across oxidized PLBs. However, the energy barriers for permeation of these hydrophilic species across the PLB still remain relatively high (especially for H₂O₂), indicating the need for specific protein channels, e.g., aquaporins (AQPs), or pores created by an electric field (see next section), to allow their penetration into the cell interior.

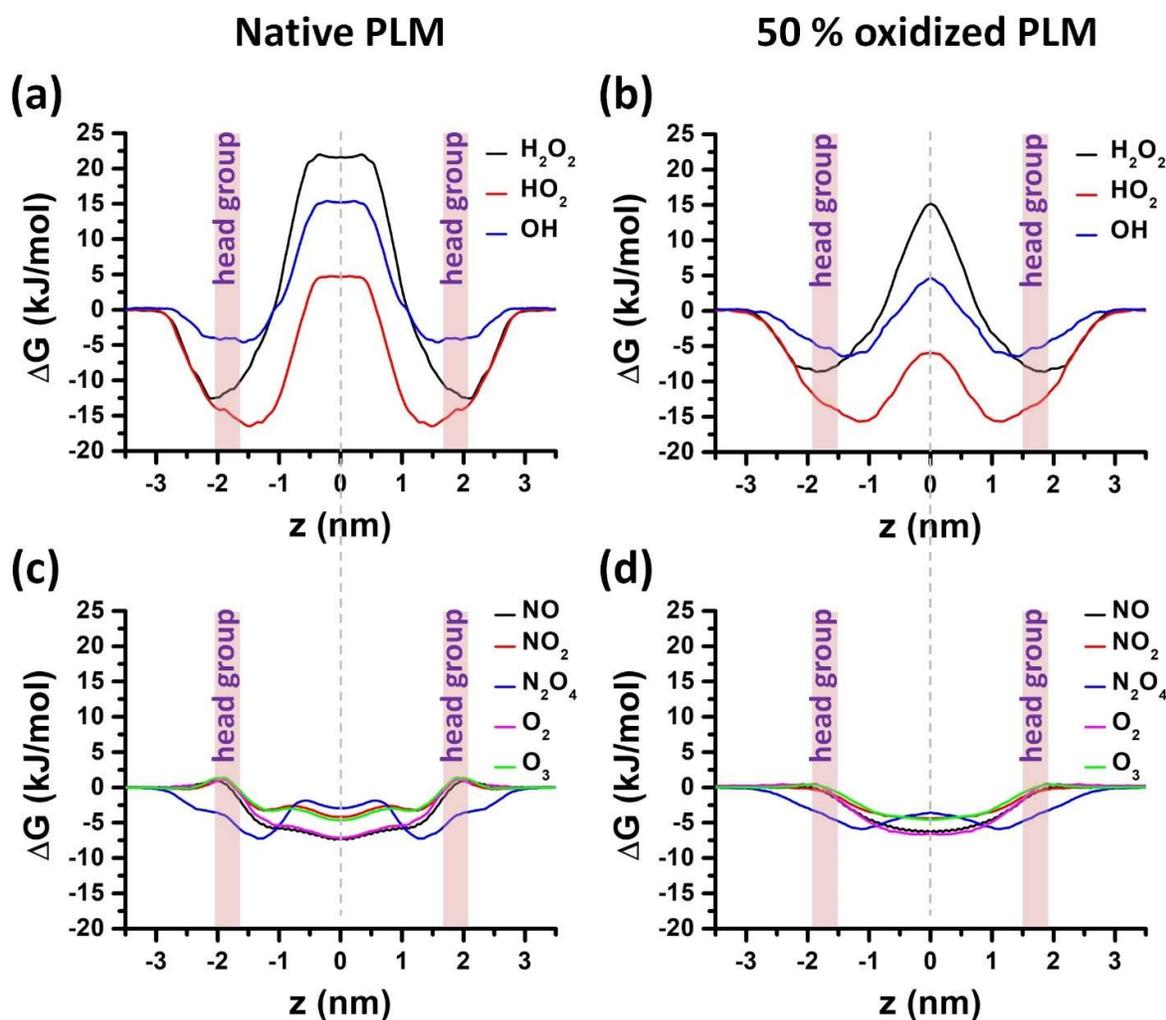


Figure 4. Free energy profiles (FEPs) of the hydrophilic (a-b) and hydrophobic (c-d) RONS, across the native and 50% oxidized PLBs. The average positions of the head group regions (i.e. average position of P atoms, see Figure 1) are indicated by light red colour.

Synergistic effect of electric field and lipid oxidation on the permeability of cell membrane. It is known that in addition to the creation of RONS (which can lead to lipid oxidation), some CAP sources also generate strong electric fields that induce pore formation in membranes. Therefore, in order to gain insight in the plasma-cell interactions, the synergistic effect of the electric field and oxidation of the PLB were studied. The non-reactive MD simulation results revealed that a stronger electric field yields a shorter pore formation time. Moreover, oxidation of lipid tails leads to a drop of the electric field threshold needed for pore formation in the PLB (Figure 5). The created pores in the membrane facilitate the penetration of RONS deep into the cell interior to cause oxidative damage, eventually leading to cell death. The created pores in the membrane facilitate the penetration of RONS deep into the cell interior to cause oxidative damage, eventually leading to cell death.

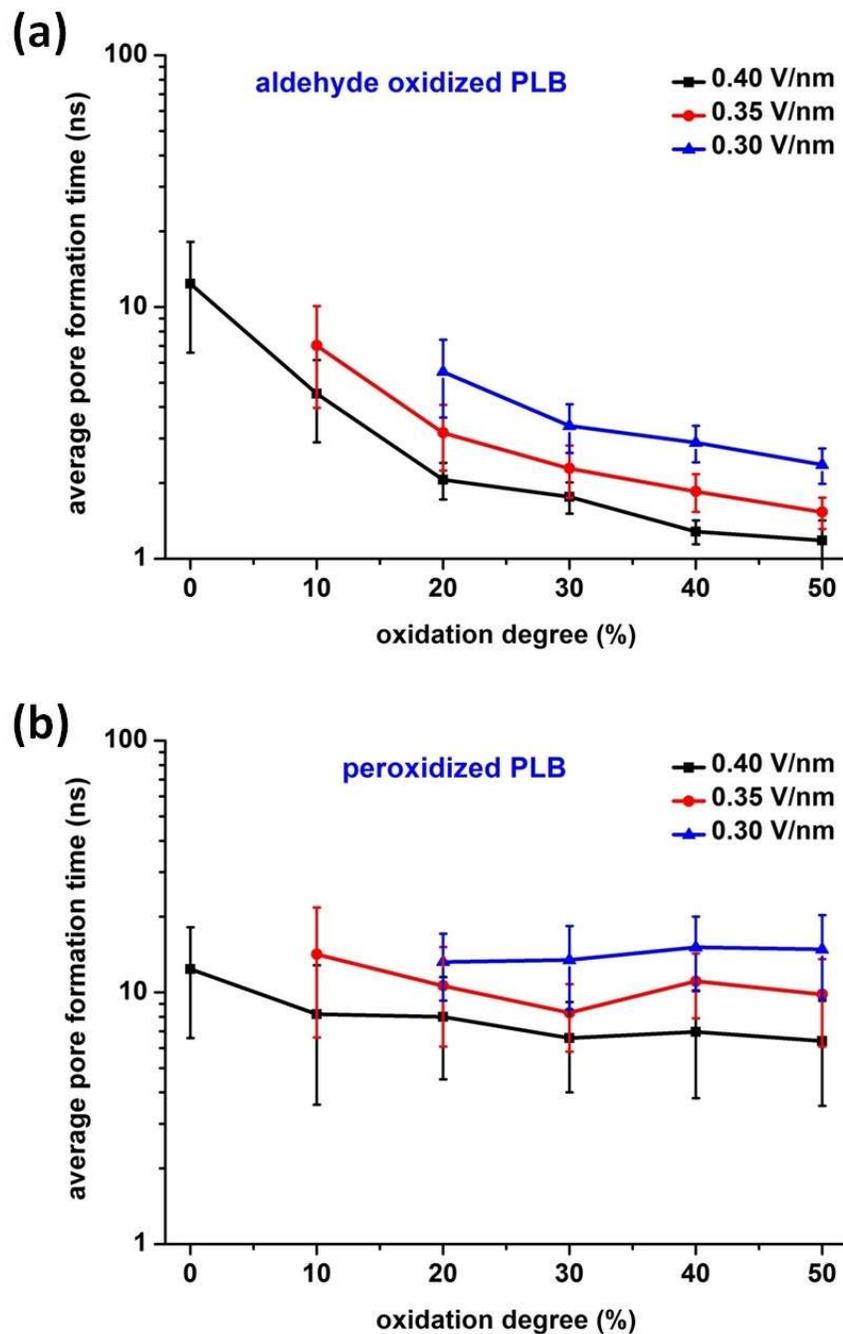


Figure 5. Average time needed to initiate pore formation, for different applied electric fields, versus oxidation degree, for aldehyde oxidation (a) and peroxidation (b).

Part 3: Plasma oxidation of cell membrane. The results of the effect of plasma oxidation on the phosphatidylserine flip-flop motion across the membrane, the permeation of H_2O_2 through membrane with different lipid compositions and the impact of mechanical stress on oxidized membranes are considered in this part.

Phosphatidylserine flip-flop induced by plasma oxidation. Phosphatidylserine (PS) translocation across the membrane plays a vital role in apoptosis signalling. In

this study, the flip-flop motion of PS across the PLB was investigated, as a function of increasing oxidation degree of the membrane. It was found that increasing the oxidation level of the lipids leads to an expansion of the membrane area (Figure 6), which causes a noticeable change in the membrane permeability, in line with experimental results. As a result, the free energy barrier for PS flip-flop across the membrane decreases upon increasing peroxidation level (Figure 6).

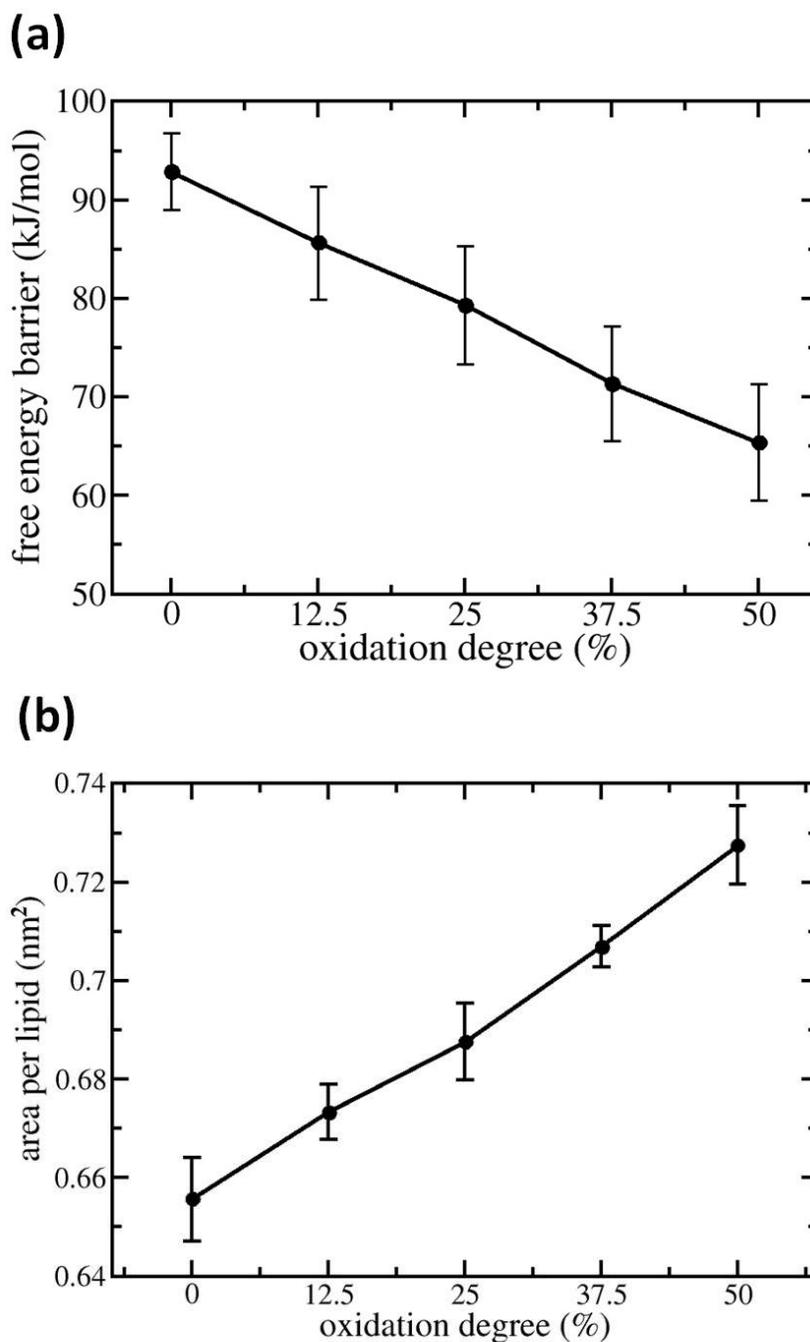


Figure 6. (a) Free energy barrier for the translocation of PS across a PLB and (b) average area per lipid, both calculated as a function of the peroxidation degree of the PLB.

This subsequently increases the translocation rate of PS to the extracellular surface of the cell, eventually causing PS detection on the surface of the membrane, acting as a signal for macrophages to engulf the cell, i.e., apoptosis.

In general, despite the fact that the oxidation of the PLB leads to a reduction of the energy barrier for the translocation of PS, there is still a need for water pores (created e.g., by electric field) in order to traverse PS from the inner leaflet to the outer leaflet, as the free energy barriers are still too high for PS flip-flop to occur spontaneously. This study is particularly interesting for plasma medicine, as plasma generates ROS and electric fields, both of which can lead to (a) oxidation of the lipids, as well as (b) pore formation in the cell membrane, thereby increasing the PS flip-flop rate, which eventually results in apoptosis of cancer cells.

Effect of different membrane compositions on the permeation of H₂O₂. Cancer and healthy cell membranes contain different concentrations of lipids and cholesterol. Hence, it is important to study whether the membrane composition has an effect on plasma ROS ingress across the PLB. In this study, the US-MD simulations were performed to support the phospholipid vesicle experiments. Specifically, the translocation of H₂O₂ (representing ROS) across PLBs with various lipid compositions was investigated, focusing on the (i) lipid tail saturation degree, (ii) lipid head group type, and (iii) membrane cholesterol fraction (Figure 7).

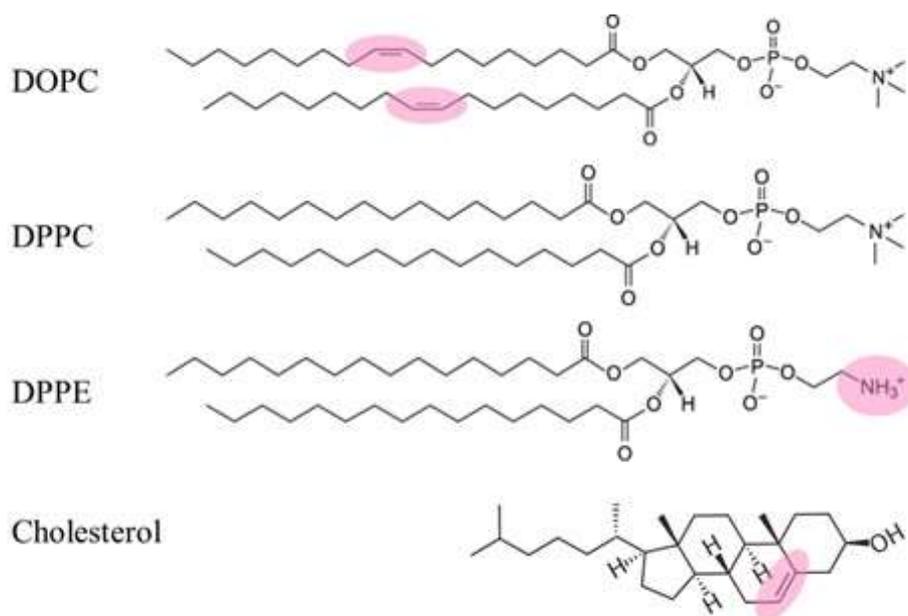


Figure 7. Schematic representation of the structures of DOPC, DPPC and DPPE lipids, and cholesterol. The parts highlighted in pink indicate key differences in the structure of each molecule that was tested in this study.

The latter was done to provide insight into how the interplay between phospholipids and cholesterol may influence the response of healthy and cancerous cell membranes to plasma-derived ROS. The experimental results revealed that increasing the dipalmitoyl-phosphatidyl-ethanolamine (DPPE) concentration in either the

dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (DPPC) or the dioleoyl-phosphatidyl-choline (DOPC) vesicles increases the packing of the lipids, leading to a decreasing area per lipid. The experimental results revealed that increasing the dipalmitoyl-phosphatidyl-ethanolamine (DPPE) concentration in either the dipalmitoyl-phosphatidyl-choline (DPPC) or the dioleoyl-phosphatidyl-choline (DOPC) vesicles increases the packing of the lipids, leading to a decreasing area per lipid. Thus, upon increasing the DPPE fraction, the passive diffusion of ROS should be hampered in both systems. For the DPPC vesicles, this is also observed in the US-MD simulations, which show that upon increasing DPPE content, the free energy barrier of H_2O_2 permeation increases (Figure 8 (a and c)).

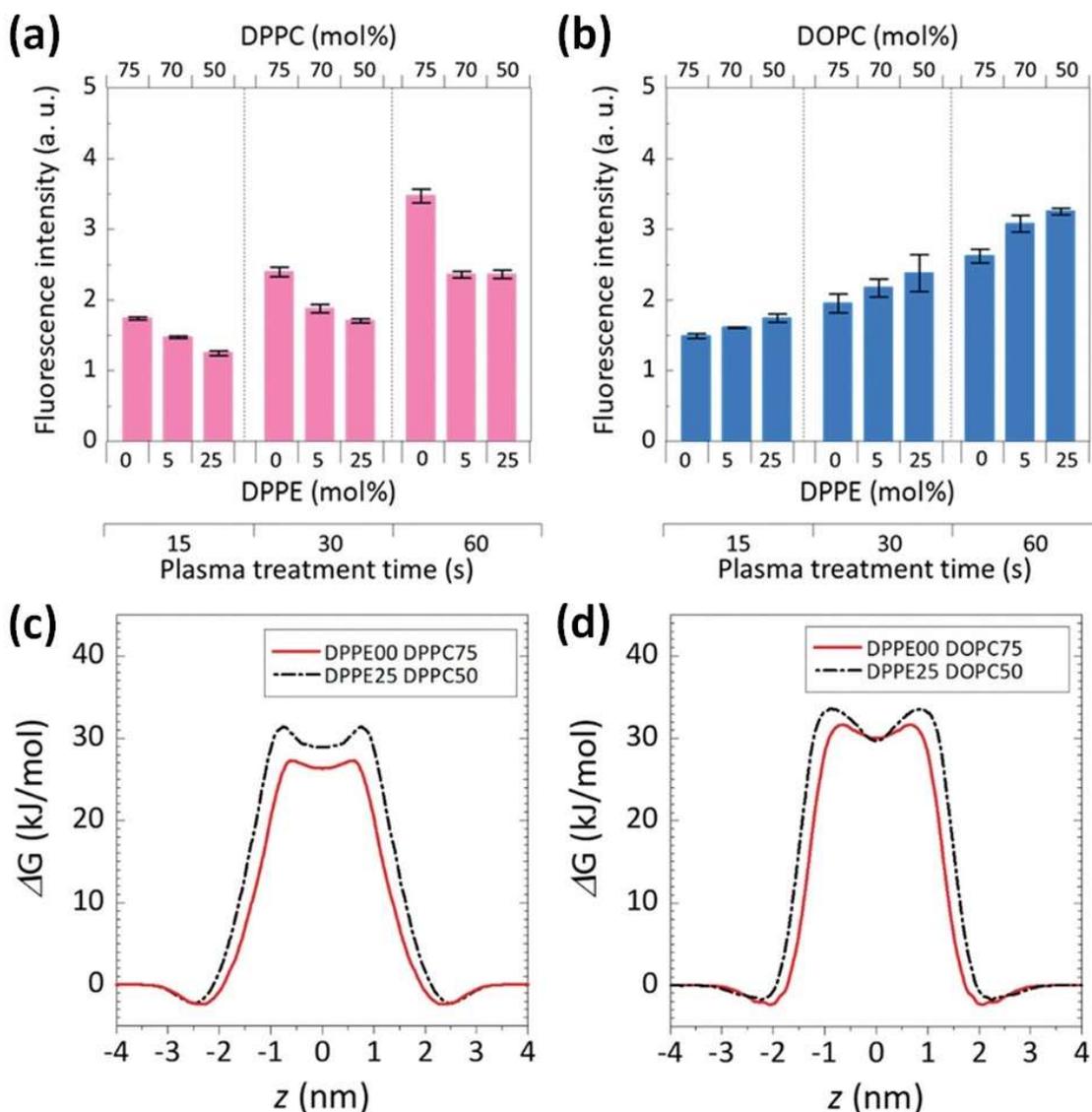


Figure 8. Effect of DPPE content on the ingress of CAP-derived ROS into DPPC (a) or DOPC (b) vesicles, as well as on the FEPs of H_2O_2 across DPPC (c) and DOPC (d). The numbers mentioned in the legend indicate the molar fraction of each component in the lipid bilayer. The cholesterol content was fixed at 25 mol%.

However, in the DOPC vesicles, the experimental results indicate an increasing permeability upon increasing DPPE fraction, which does not correlate with the results of the US-MD simulations (Figure 8 (b and d)). The reason is that upon increasing the DPPE content, lipid rafts could be generated, containing elevated levels of DPPE and cholesterol. Thus, due to the generation of lipid rafts, other parts of the membrane might be enriched in DOPC, which serve as the ‘weak spot’ of these membranes, being extremely vulnerable to pore formation upon lipid oxidation. This explains the increased ROS ingress in Figure 8(b) upon increasing DPPE content, for the DOPC vesicles. In DPPC vesicles, such rafts are not created as both DPPC and DPPE contain the same aliphatic lipid tails, and their interaction with cholesterol are equally strong.

In general, the experimental and simulation results showed that multifactorial chemical and physical processes might play a role, which include lipid oxidation, lipid packing and lipid rafts formation. This study might be helpful in the development of therapies relying on the action of CAP, in which the cell membrane and oxidative stress response in cells is targeted.

Impact of mechanical stress on oxidized membranes. The mechanisms by which lipid oxidation affects membrane properties need to be better understood. For this purpose, in this research the non-reactive MD simulations were performed to study the mechanical instability on PLB models due to lipid oxidation, in order to access atomistic information about how easy it is to form a pore. Hence, two types of model membranes were used, i.e., the single-component homogeneous PLBs and a two-component heterogeneous PLB. Specifically, four different model membranes were studied in the case of the single-component homogeneous PLB (Figure 9) that either contain native palmitoyl–oleoyl–phosphatidyl–choline (POPC) or oxidized phospholipids (POPCOH, POPCOOH and POPCO). In the case of the heterogeneous system, a membrane with coexisting native and oxidized phospholipid domains (i.e., POPC+POPCOOH) was investigated. Using these model systems, the critical areal strain was calculated as the value of ε_A , recorded at the very beginning of pore formation:

$$\varepsilon_A = \frac{\Delta A}{A_0} \quad (8)$$

where ΔA is the area variation at a given instant, and A_0 is the initial membrane surface area.

The simulation results showed that under mechanical stress, membrane oxidation reduces the critical ε_A and facilitates pore formation, contributing to membrane leakage. In homogeneous PLBs, the ε_A depends on the oxidation product. The POPCOH and POPCOOH turn the membrane more susceptible to pore formation, whereas POPCO has no significant effect. Heterogeneous membranes (i.e., POPC+POPCOOH) appear more prone to pore formation than pure POPC membranes, but they behave similarly to pure POPCOOH membranes within

statistical uncertainty. Moreover, in heterogeneous membranes, pores are formed either at the interface or at the bulk of oxidized domain.

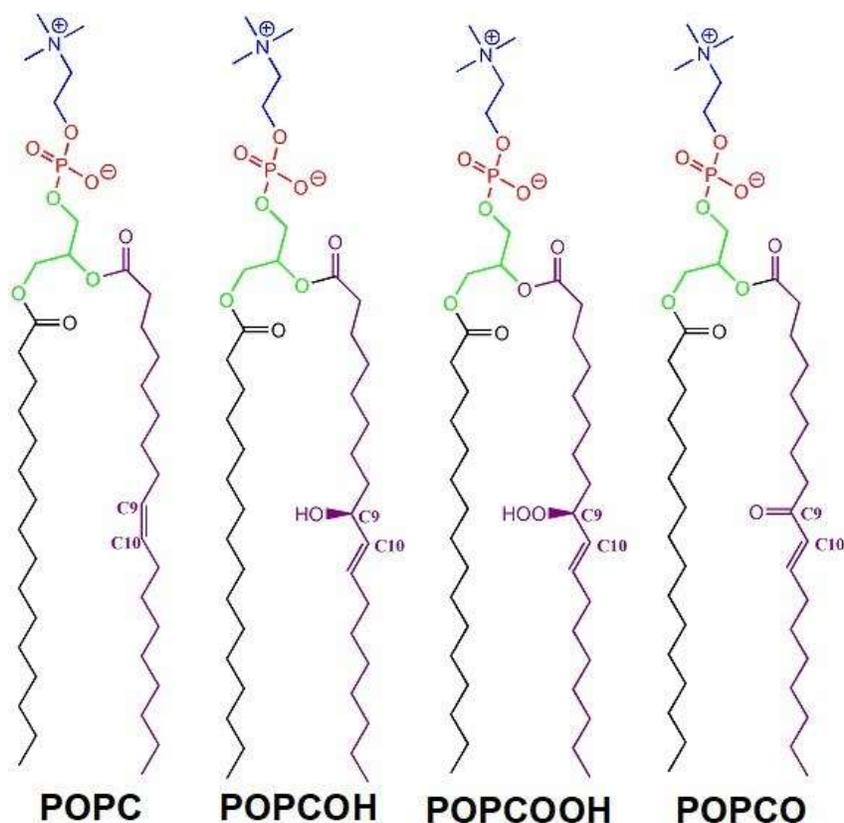


Figure 9. Schematic representation of the POPC molecule and its oxidation products.

Part 4: Permeability of integral membrane proteins. In this part, the results of the effect of plasma oxidation on the transport of RONS across aquaporin (AQP) channel and the permeation of cystine (CYC) across xCT antiporter are discussed.

Transport of hydrophilic and hydrophobic RONS across AQP. AQPs are transmembrane protein channels that conduct not only water molecules across the cell membrane but also other solutes, such as RONS produced e.g., by CAP (Figure 10). Initially, the permeation of H_2O_2 across native AQP1 (one of the members of the AQP family) and the PLB was studied. It was found that the free energy barrier of H_2O_2 across AQP1 is lower than for the PLB, while the permeability coefficient is two orders of magnitude higher, indicating that the delivery of H_2O_2 into the cell interior should be through AQP. However, the overall nature of RONS transport through AQP was still obscure. Therefore, in the next study this research was extended, including more RONS. Specifically, the permeation processes of both hydrophilic (H_2O_2 and OH) and hydrophobic (NO_2 and NO) RONS through AQP1 were investigated. The results revealed that these RONS could all penetrate across the AQP1.

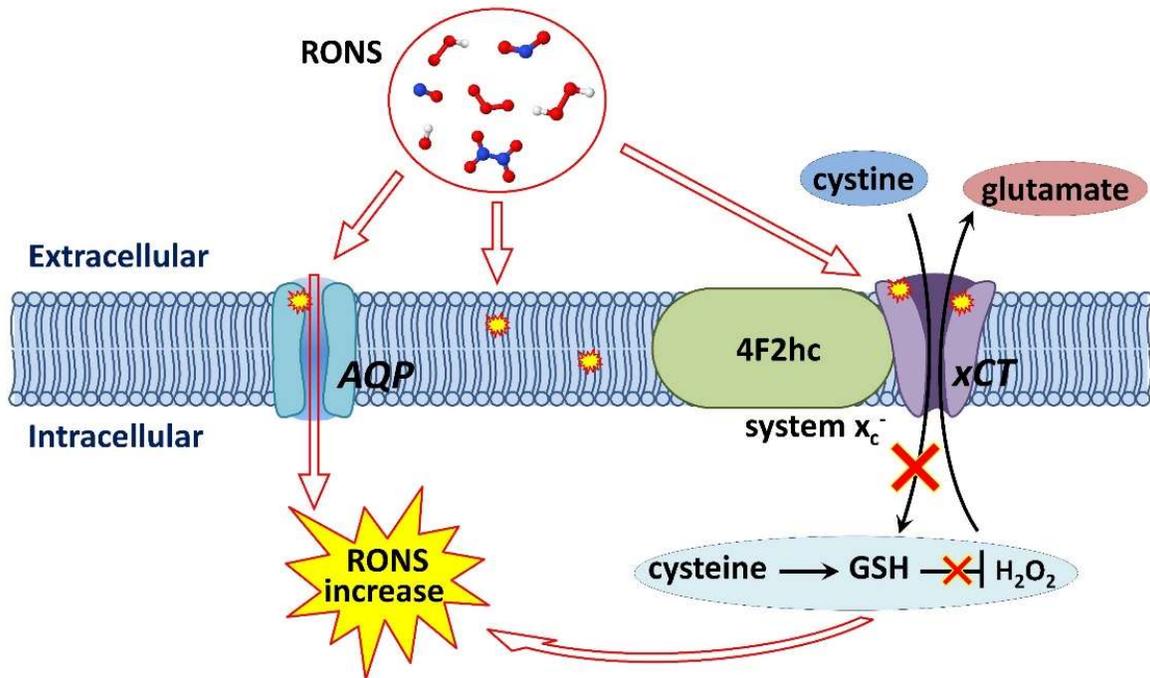


Figure 10. Schematic illustration of the integral membrane proteins AQP (left) and xCT antiporter (right). Plasma-generated RONS (e.g., H_2O_2) can diffuse across AQP with and without modifying/oxidizing the extracellular part of AQP (yellow star), thereby increasing the intracellular RONS level. These species may also interact with xCT, oxidizing its extracellular part (yellow stars), thereby affecting the xCT function (by e.g., suppressing the cystine (CYC) permeation), which might also contribute to increasing RONS levels in the cell.

The permeation free energy barriers for OH and NO were lower than that of H_2O_2 and NO_2 , indicating that these species may have easier access to the pore interior and interact with the amino acid residues of AQP1.

The effect of RONS-induced oxidation of both the phospholipids and AQP1 on the transport of the above-mentioned RONS across AQP1 were also studied. It was found that both lipid (OXL) and protein (OXP) oxidation slightly increased the free energy barrier for H_2O_2 and NO_2 permeation, while for OH and NO, a strong effect of oxidation was not observed (Figure 11). Hence, it was suggested that the hydrophilic species enter the cell through AQPs, as they experience a clearly higher barrier through the lipid membrane, especially in the native PLB. On the other hand, the hydrophobic RONS most likely permeate through the membrane, where lipid oxidation can take place, as their barrier through AQP is higher.

The simulation results help to gain insight in the underlying mechanisms of the noticeable rise of CAP-induced RONS in cancer cells, thereby improving our understanding on the role of AQPs in the selective anticancer capacity of CAP.

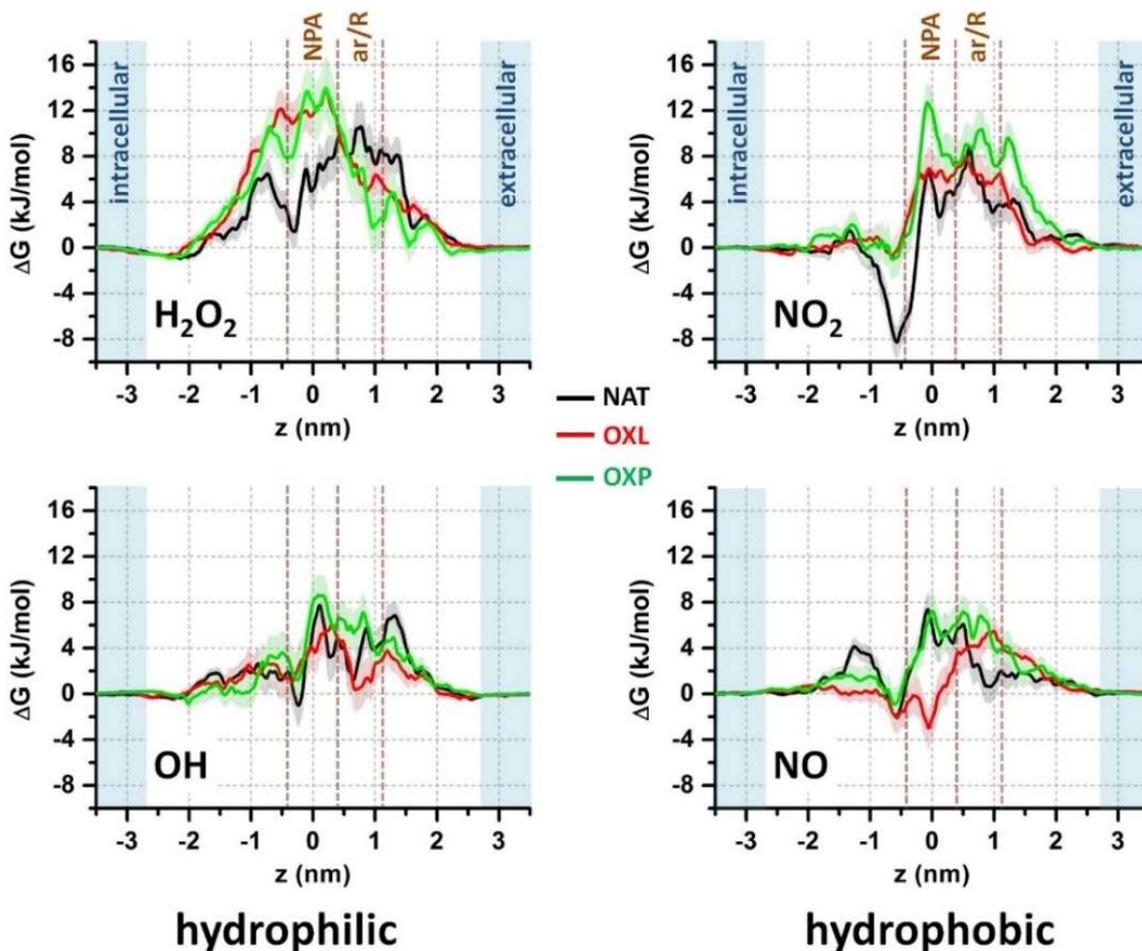


Figure 11. FEPs of the hydrophilic (H_2O_2 and OH) and hydrophobic (NO_2 and NO) RONS across AQP1 pores of the native (NAT, black curve) and oxidized (OXL and OXP, red and green curves) model systems. The intra- and extracellular water layers are shown in light blue colour. The brown dashed lines indicate the Asn-Pro-Ala (NPA) and aromatic/Arg (ar/R) regions of the AQP1.

Transport of cystine (CYC) across xCT transporter protein. This study consists of two parts. In a first part, the permeation of CYC across three model systems of xCT, the light subunit of the xCT^- antiporter responsible for the CYC and glutamate translocation (see Figure 10 above), was investigated. Specifically, the outward facing (OF), occluded (OCC) and inward facing (IF) configurations of xCT were considered. The results revealed the key role of amino acid residues in the OF, OCC and IF configurations responsible for the uptake, transport and release of CYC. The calculated FEPs of CYC across the OF, OCC and IF structures showed the energy minimum of CYC to be higher in the IF conformation, indicating that a lower energy is required for the release of CYC from the antiporter.

The second part was dedicated to the effect of plasma oxidation on the extracellular CYC uptake by the xCT, which is important for cancer therapy. In this

study the OF configuration of xCT was considered, and to study the effect of oxidation, the Cys₃₂₇ residue was oxidized, which is located in the vicinity of the extracellular milieu. The results showed that oxidation of Cys₃₂₇ leads to a free energy barrier for CYC translocation (Figure 12), thereby blocking the access of CYC to the substrate binding site of the OF system.

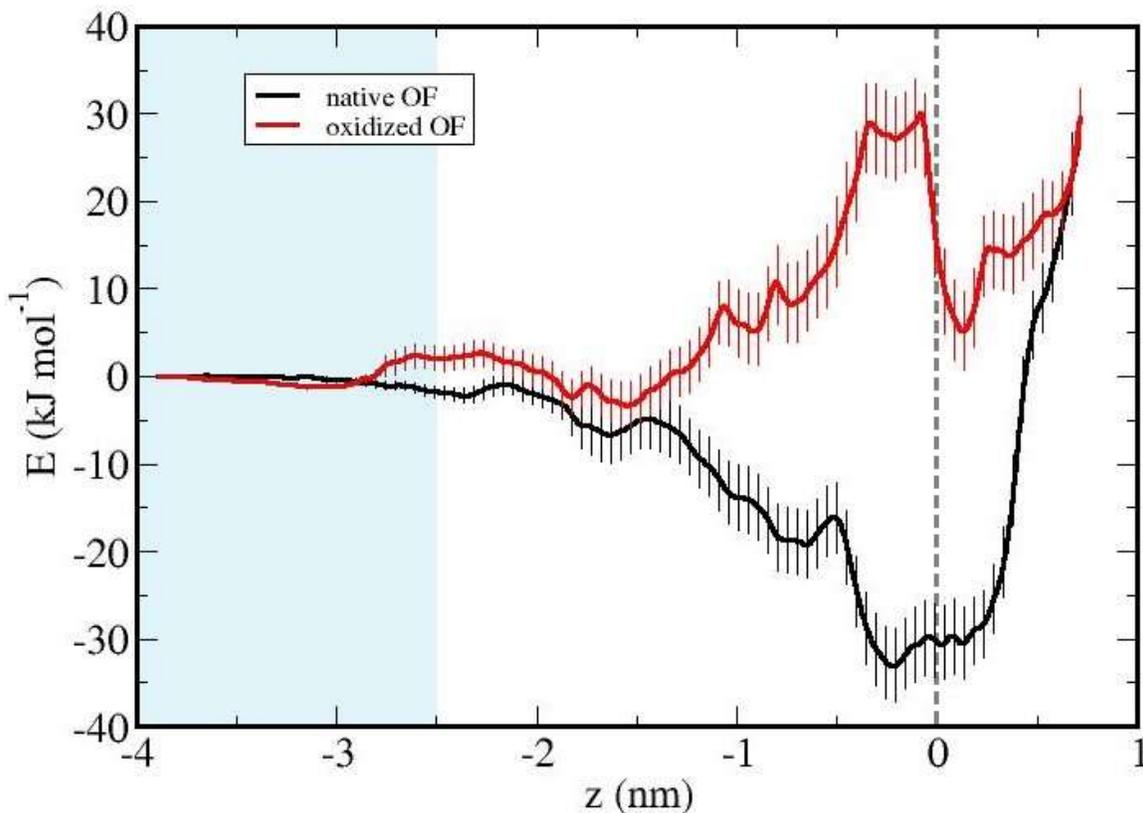


Figure 12. FEPs of CYC across the native and oxidized OF structures. The light blue color corresponds to the extracellular aqueous phase.

Thus, the results indicated that the oxidation of Cys₃₂₇, by e.g., CAP, is more effective in inhibiting the xCT transporter than the mutation of it to Ala.

This study is important, since it elucidates the effect of oxidation of Cys₃₂₇ on closure of the protein channel, thereby making CYC uptake by the xCT more difficult. This oxidation can occur as a result of e.g., CAP application to cancer cells at an acidic pH. Hence, this study might explain the possible mechanism of CYC starvation in cancer cells, through inhibition of the xC⁻ antiporter, which results in a depletion of the intracellular level of glutathione (GSH, Figure 10), and consequently, in inhibition of cell growth, inducing apoptosis and reducing the cancer cell drug resistance.

Part 5: Oxidation of fiber-like, globular and signaling proteins. In this part, the results of the studies on the effect of plasma oxidation on structural features of human epidermal growth factor and cytoglobin proteins as well as the stability of toxic amyloid beta peptide aggregation are discussed.

Plasma oxidation of human epidermal growth factor (hEGF). hEGFs are small signaling proteins (Figure 13), and their oxidation causes structural and conformational changes, which can lead to either regulation or disturbance of the signaling pathways in a cell, eventually affecting the cell proliferation. In this study, the non-reactive MD simulations were carried out, in combination with experiments, to study the oxidation of hEGF caused by CAP treatment.

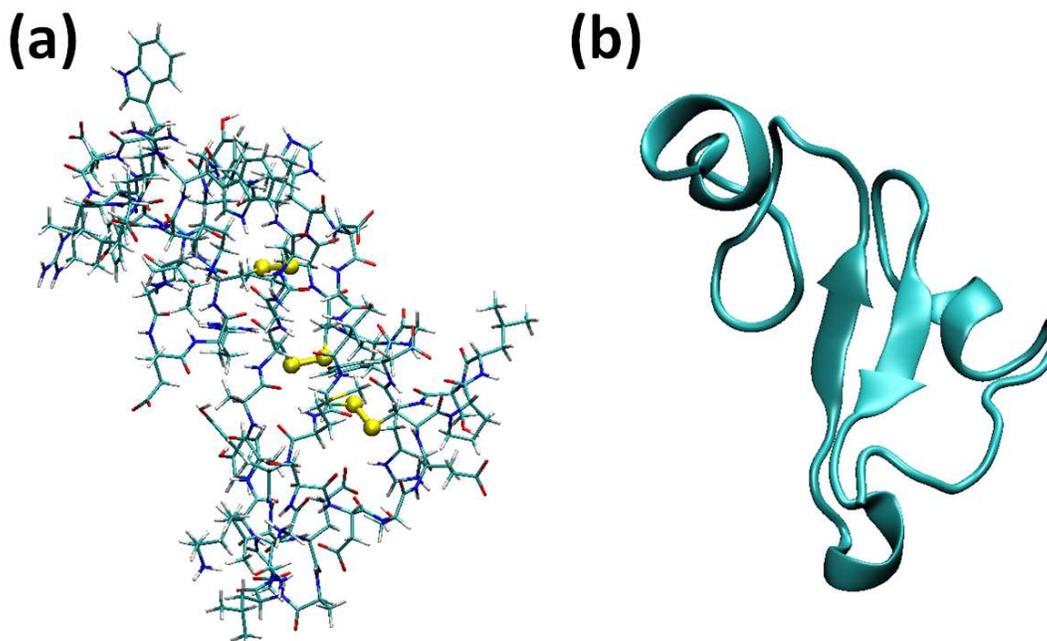
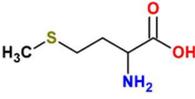
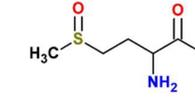
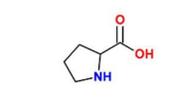
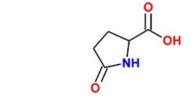
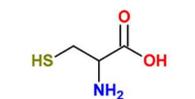
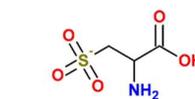
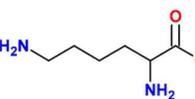
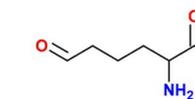
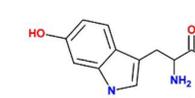
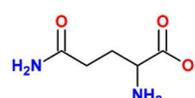
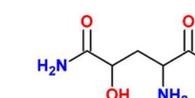
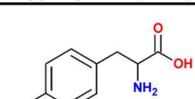
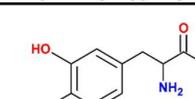
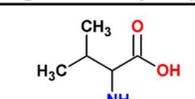
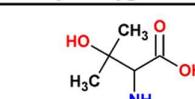
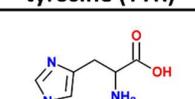
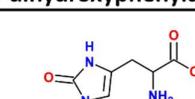
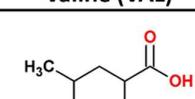
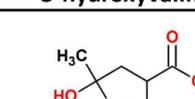


Figure 13. Structure of hEGF shown in licorice (a) and cartoon (b) views. The sulfur atoms of the cysteine residues and the disulfide bonds between them are illustrated in yellow color in (a), for the sake of clarity.

Specifically, the conformational changes of hEGF with different degrees of oxidation, corresponding to short or longer CAP treatment times, were studied. The creation of oxidized forms of hEGF was achieved by modifying certain amino acids in the native hEGF into oxidized forms (Table 1), where the specific modification of hEGF upon oxidation was determined from combining the simulation results with Fourier transform infrared (FTIR) results. The results of the FTIR measurements showed that S=O and OH groups are already introduced after 45 s of CAP treatment of hEGF (Figure 14). This indicates that in the case of a low oxidation degree, the thiol-containing residues (Met and Cys) should be considered for modification in the simulations. In the case of 300 s and 600 s (which correspond to moderate and higher oxidation degrees), the intensity of the $\nu(\text{C-OH})$ signal was lower, whereas the C=O formation was increased (Figure 14), which indicates that besides thiol oxidation, simulated changes should be introduced to His and Lys residues. Circular dichroism (CD) spectroscopy was also performed to verify the simulated structural changes occurred in the hEGF structure (Figure 15).

Table 1. List and chemical structures of the 10 amino acids used for the creation of the various oxidized hEGF proteins.

AA in native hEGF	modified AA in oxidized hEGF	AA in native hEGF	modified AA in oxidized hEGF
 methionine (MET)	 methionine sulfoxide	 proline (PRO)	 pyroglutamic acid
 cysteine (CYS)	 cysteic acid	 lysine (LYS)	 allysine
 tryptophan (TRP)	 6-hydroxytryptophan	 glutamine (GLN)	 4-hydroxyglutamine
 tyrosine (TYR)	 3,4-dihydroxyphenylalanine	 valine (VAL)	 3-hydroxyvaline
 histidine (HIS)	 2-oxo-histidine	 leucine (LEU)	 4-hydroxyisoleucine

The results of the CD data indicated that 45 s of treatment causes only slight alterations in the hEGF secondary structure compared to control spectrum, whereas longer treatments (300 and 600 s) result in a stronger disturbance of the secondary structure of the hEGF. This was also observed in the simulations.

In general, good qualitative agreement was found between the results of the simulations and experiments. The results indicated that the oxidized structures become more flexible, due to their conformational changes and breakage of the disulfide bonds, especially at higher oxidation degrees. Moreover, a low oxidation degree has insignificant effect on the binding affinity of hEGF with its receptor, whereas highly oxidized hEGF exhibits less interaction. This will ultimately affect the cell proliferation, by assisting or inhibiting the process. Thus, the results can be linked to the use of CAP for wound healing at short treatment times vs. cancer treatment at longer treatment times.

Effect of plasma-induced RONS on the structure of cytoglobin (CYGB). CYGB is one of the redox-regulatory proteins, a recently discovered globin proposed to be involved in the protection of the cell against oxidative stress. In this study, the effect of plasma-generated RONS on CYGB was investigated by experiments, and computer simulations were performed to support these experiments.

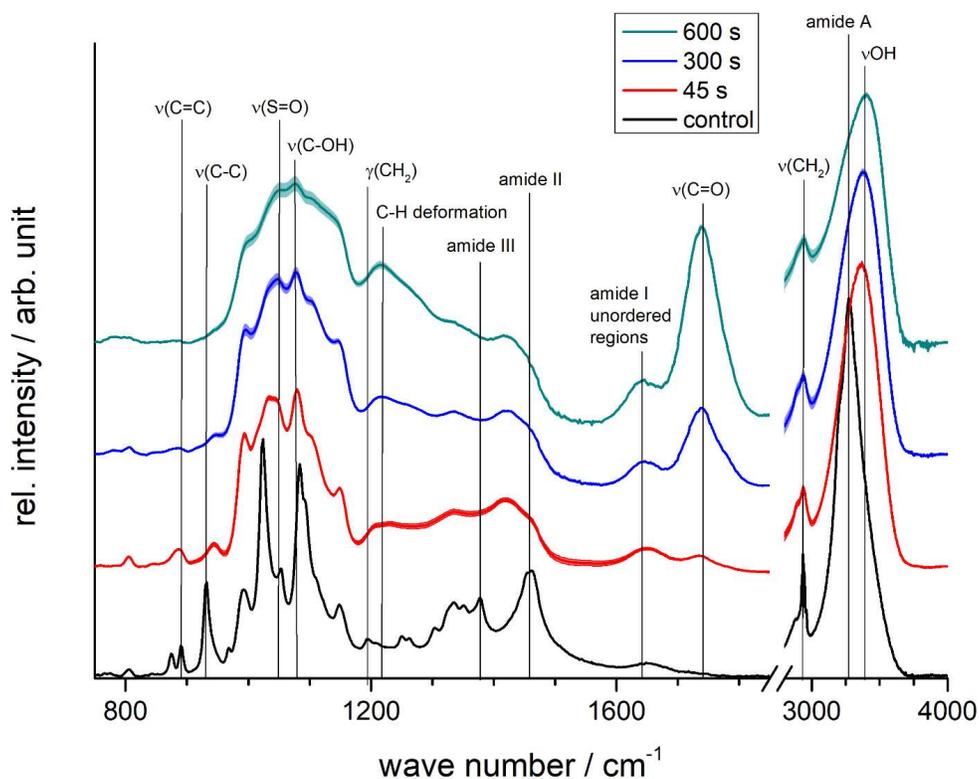


Figure 14. FTIR spectra of plasma-treated hEGF. The mean and standard error (shaded area) for each treatment time are shown. Spectra were stacked with a fixed factor of 0.03 to increase readability.

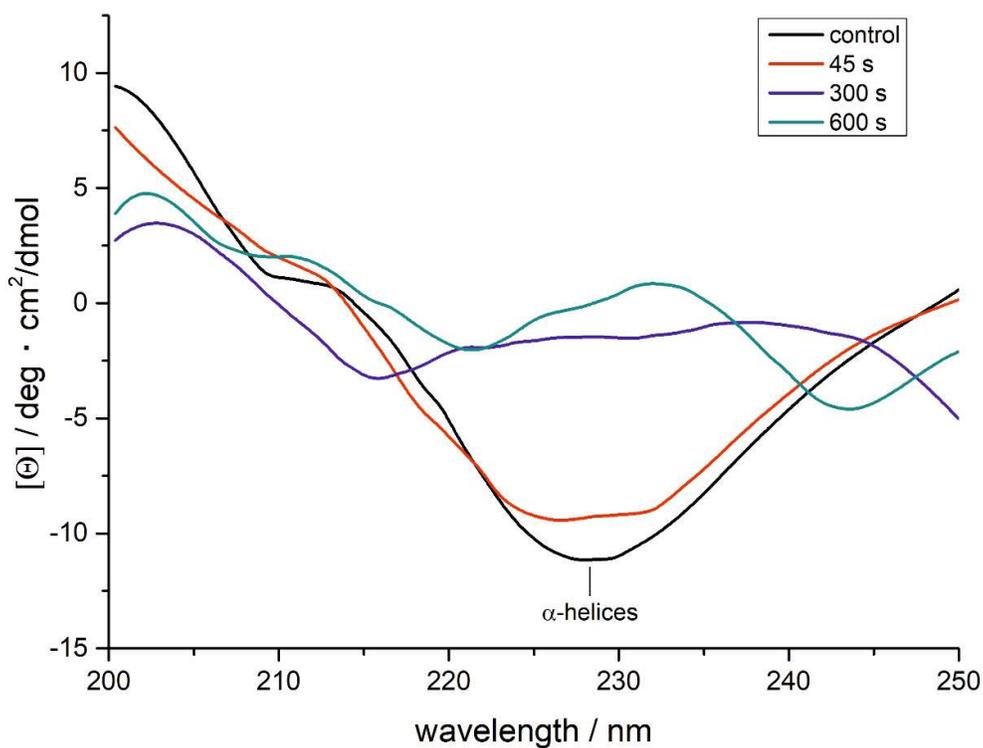


Figure 15. Secondary structure analysis of plasma-treated hEGF by CD spectroscopy.

The experimental investigations showed that CAP treatment of CYGB leads to the formation of a disulfide bond in between the cysteine amino acids (i.e., Cys₃₈ and Cys₈₃), i.e., CYGB_{S-S}. In order to study the effect of this bond on the conformation of CYGB, the MD simulations were carried out. The simulation results showed that there is a negligible shift of the heme group in the modified CYGB_{S-S} compared to native CYGB. Hence, the formation of the disulfide bridge between the cysteine residues does not alter the local orientation of the heme group, which was also reported in literature. However, the simulation results also revealed that the His₁₁₇ residue located nearby the heme group substantially changes its position in modified CYGB_{S-S}. The calculated distance between the heme iron and one of the nitrogen atoms of His₁₁₇ almost doubled in modified CYGB_{S-S}, which is due to the conformational changes caused by the disulfide bond (Figure 16).

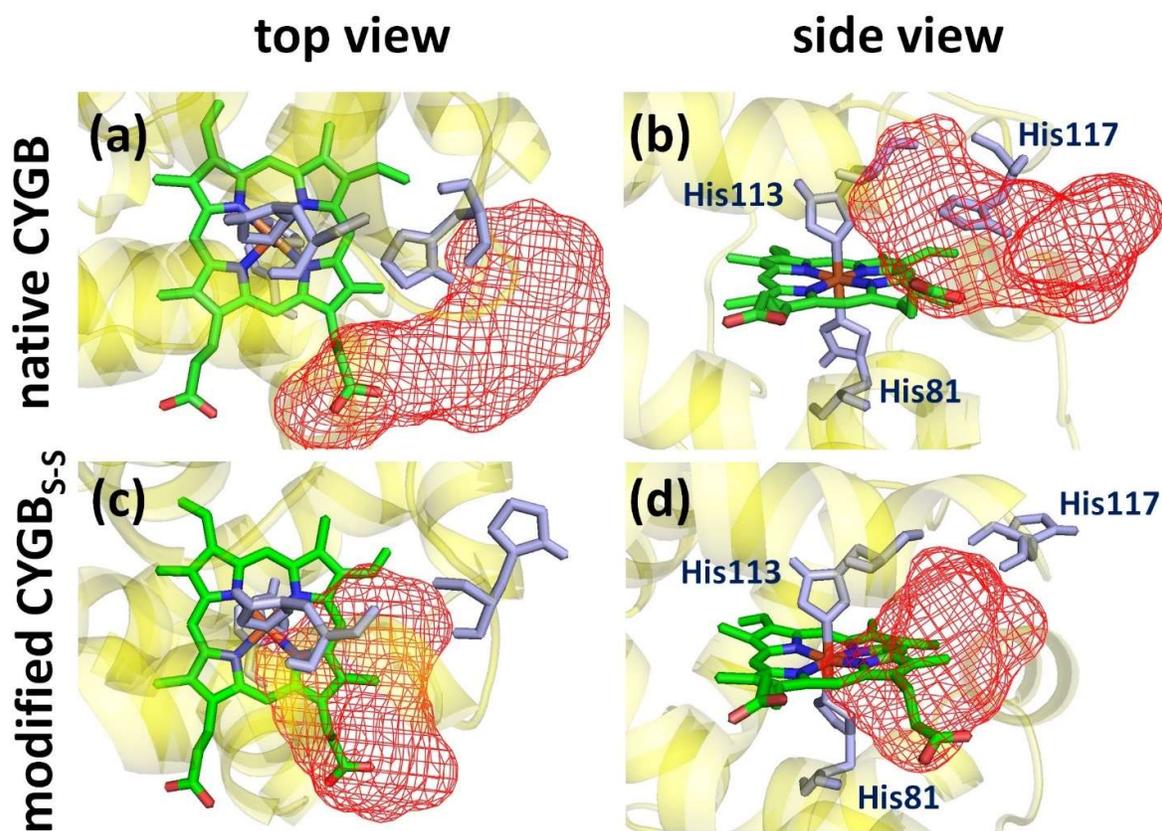


Figure 16. Binding hot spot of native CYGB (a-b) and modified CYGB_{S-S} (c-d) presented as red meshed regions. It is clear that in native CYGB the access to the heme group (green) is more limited than in modified CYGB_{S-S}.

Thus, the formation of the disulfide bond, due to CAP oxidation, affects the CYGB 3D structure, thereby opening the access to the heme group, through gate functioning of His₁₁₇. This, in turn, increases the binding affinity (through involvement of the heme group), which is in line with the experimental observations of this study. This study is of great interest because it provides further support and new insights that

CYGB, on a molecular basis, has the potential to play a role in the cellular response against oxidative stress.

Effect of oxidation on the aggregation of toxic amyloid beta peptide. The aggregation of insoluble amyloid beta ($A\beta$) peptides in the brain is known to trigger the onset of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease. However, the underlying mechanisms to destabilize the $A\beta$ aggregates are still poorly understood. Recent experiments on CAP-induced oxidation of $A\beta$ aggregates have shown promising results in eliminating these toxic aggregates.

Thus, in this research the effect of oxidation on the stability of an $A\beta$ pentamer was investigated, employing MD simulations. The simulation results revealed that the oxidation of $A\beta$ pentamer leads to a higher flexibility and more conformational changes in the structure, thereby increasing the solvent accessibility. This is more obvious in the case of OX3 (15% oxidation) due to the disruption of the salt bridge interaction. Moreover, oxidation results in a decrease of the interpeptide binding free energy (Figure 17), eventually destabilizing the amyloid beta aggregation process.

Hence, this study contributes to a better insight in one of the potential mechanisms for inhibition of toxic $A\beta$ peptide aggregation important for Alzheimer's disease.

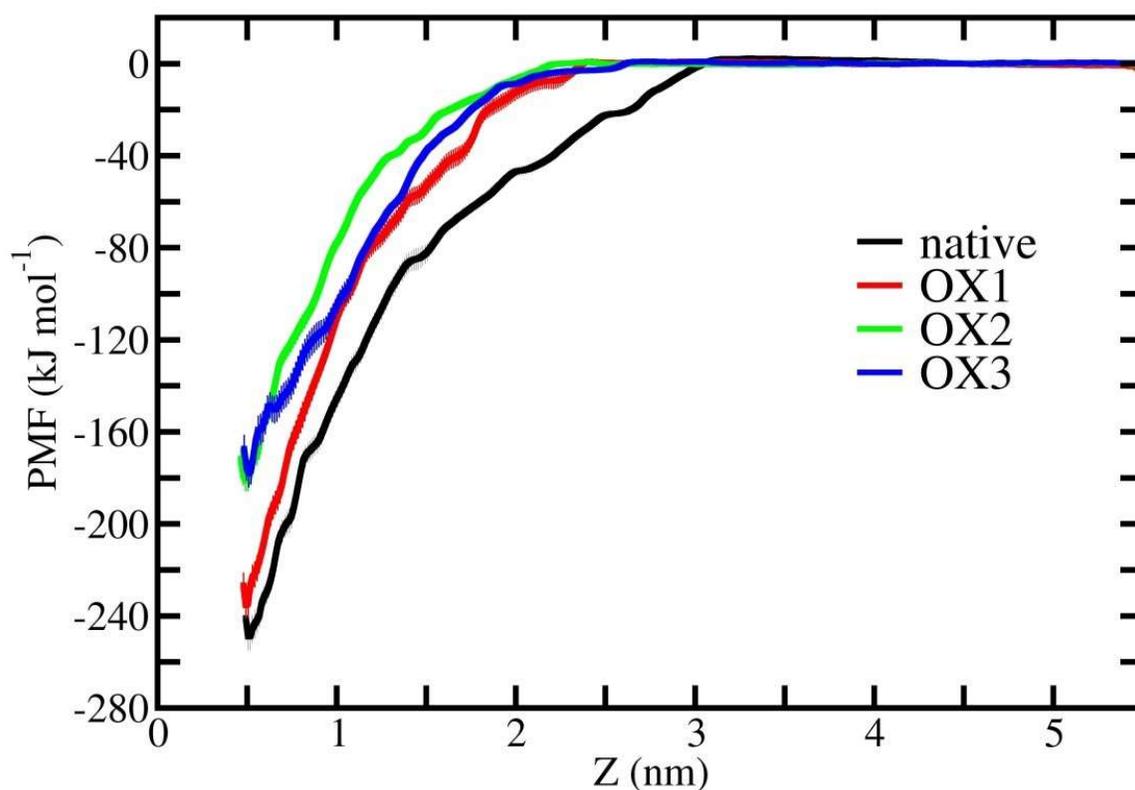


Figure 17. Potential of mean force (PMF) profiles (or FEPs) of the native and oxidized $A\beta$ pentamer structures. OX1, OX2 and OX3 correspond to 3, 9, and 15% oxidized structures, respectively. The binding free energies are calculated from the difference between the minimum and maximum values.

CONCLUSIONS

Complementary to experimental studies, computer simulations may also provide fundamental information about the processes occurring at the surface of living cells, which is difficult or even impossible to obtain through experiments. Therefore, in this doctoral work, all three potential mechanisms of noticeable rise of intracellular RONS occurring in cancer cells, i.e., a) RONS-induced modification of the cell membrane leading to increased permeability, b) active transport of RONS through transmembrane channels and c) RONS interaction with specific proteins leading to stress signaling inside the cell, were thoroughly investigated at the atomic level, applying the state-of-the-art computer simulations. As model systems in the simulations, the PLB composed of different types of lipid molecules as well as various types of proteins were used.

The following conclusions were drawn in this doctoral work:

1. Plasma-induced lipid oxidation in the PLB leads to an overall increase in area per lipid and a drop of the bilayer thickness; already 25% of ALD (aldehyde) oxidation leads to an increase of the surface area per lipid and a decrease of the bilayer thickness by around 10%, even when 25% of OX2 (PLB with detached lipid tails) takes place in the PLB; this, eventually results in an increase of the bilayer fluidity;

2. Lipid oxidation also leads to an overall increase of the membrane permeability, thereby affecting the permeation of RONS across the membrane; permeation free energy barrier for hydrophilic ROS (OH, HO₂ and H₂O₂) decreases upon oxidation of the PLB, especially in the case of aldehyde oxidation; in 50% aldehyde oxidized PLB the activation free energy of OH, HO₂ and H₂O₂ for permeation to the bilayer center decreases by 45, 26 and 31%, respectively, compared to the native PLB; hydrophobic RONS (NO, NO₂, N₂O₄, O₂ and O₃) experience significantly lower free energy barriers, and therefore permeate more easily through both native and oxidized PLBs in comparison to hydrophilic ROS;

3. A decrease in the transition free energy barriers of ROS increases the penetration probability of these species into the cell interior to cause oxidation, although the energy barriers still remain relatively high, indicating that there is a need for specific protein channels (e.g., AQP) or pores created by electric field;

4. Synergistic effect of the electric field shows that the lipid oxidation leads to a drop of the average time needed to initiate pore formation as well as the electric field threshold needed for pore formation (i.e., electroporation) in the membrane; e.g., in the case of 0.4 V/nm electric field and 50% aldehyde oxidation, the pore formation time decreases from ~12 to 1.2 ns (i.e., 10 times), whereas in peroxidized PLB a strong effect of oxidation is not observed (i.e., ~12 and 6 ns, 2 times decrease);

5. The pore formation induced by electric field begins with the creation of a single-file water defect in the membrane (i.e., a narrow aqueous channel with the width of a single water molecule), which grows quickly (within a few ns) eventually leading to the pore formation; the created pores facilitate the penetration of reactive plasma species deep into the cell interior, eventually causing oxidative damage;

6. The translocation free energy barrier of PS from the inner leaflet to the outer leaflet can also be decreased by increasing the lipid peroxidation degree; for the native PLB the calculated free energy barrier is 93 kJ/mol, which is within the range of free energy barriers given in literature (i.e., 75-120 kJ/mol); this barrier decreases up to 65 kJ/mol (i.e., 30% decrease) in the case of a 50% peroxidized PLB; this subsequently facilitates the flip-flop of PS, eventually causing cell apoptosis;

7. Under mechanical stress, membrane oxidation reduces the critical areal strain (ϵ_A) and facilitates pore formation, contributing to membrane leakage; in homogeneous membranes (containing either native or oxidized lipid domains), ϵ_A depends on the oxidation product; e.g., in a native POPC bilayer $\epsilon_A=1.17$, which drops to 0.9 (i.e., 23% decrease) in a fully peroxidized POPC membrane; in heterogeneous membranes (containing both native or oxidized lipids) pore formation is easier than in native membranes (i.e., similar to fully oxidized membrane) and pores are formed either at the interface or at the bulk of oxidized domain;

8. The saturation degree of the lipid tail, the type of lipid head group and the fraction of membrane cholesterol, also affect the transport of plasma species into cells; increasing the fraction of DPPE in the membrane leads to an increase of the free energy barrier for H₂O₂ permeation across the DPPC and DOPC membrane systems containing 25% of cholesterol; various physical and chemical processes can play a role in the delivery of RONS into cells, which include lipid oxidation, lipid packing and lipid rafts formation;

9. Permeability coefficient of H₂O₂ across AQP1 is two orders of magnitude higher than across the PLB ($P_{\text{AQP1}} = 2.57 \text{ cm/s}$ and $P_{\text{POPC PLB}} = 6.62 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$, respectively), indicating that the delivery of H₂O₂ into the cell interior should be through AQP;

10. Both hydrophilic (H₂O₂ and OH) and hydrophobic (NO₂ and NO) RONS can all penetrate across AQP1; the permeation free energy barriers for OH and NO (~8 kJ/mol) are lower than that of H₂O₂ and NO₂ (~12 kJ/mol), indicating that these species may have easier access to the pore interior of AQP1 and interact with the amino acid residues; both lipid and protein oxidation slightly increase the free energy barrier for H₂O₂ and NO₂, while for OH and NO, a strong effect of oxidation is not observed;

11. Hydrophilic species enter the cell through AQPs, as they experience a higher barrier through the lipid membrane, especially in the native PLB (i.e., about 10 vs. 22 kJ/mol in the case of H₂O₂), whereas the hydrophobic species most likely permeate through the membrane, where lipid oxidation can take place, as their barrier through AQP is higher (i.e., about 8 vs. 1 kJ/mol in the case of NO);

12. Oxidation of Cys₃₂₇ residue of xCT antiporter results in a free energy barrier for CYC translocation (i.e., 33.9 kJ/mol), which blocks the access of CYC to the substrate binding site of the xCT, thereby inhibiting the xCT antiporter;

13. Oxidation of hEGF makes this protein more flexible, due to its conformational changes and breakage of the disulfide bonds, especially at higher oxidation degrees; e.g., α -helical structure decreases from 11.2% to 7.4%, and β -sheet

conformation (responsible for the structural stability) drops from 10.9% to 0.5%, thereby increasing the percentage of random coils; thus, low oxidation degree has insignificant effect on the binding affinity of hEGF with its receptor (-105.2 vs. -71.2 kcal/mol), whereas highly oxidized hEGF exhibits less interaction (-105.2 vs. -49.5 kcal/mol);

14. Formation of the disulfide bond, due to CAP oxidation, affects the structure of CYGB; indeed, the calculated distance between the heme iron and one of the nitrogen atoms of His₁₁₇ is almost doubled in CYGB_{S-S} (6.63 vs. 13.48 Å); this opens the access to the heme group (through gate functioning of His₁₁₇), thereby increasing the binding affinity, which is in line with the experiments;

15. Oxidation of A β pentamer results in a higher flexibility and more conformational changes in the structure, thereby increasing the solvent accessibility; this is more pronounced in the case of the highest oxidation degree (where β -sheet conformation drops from 73.3% to 64.0%), which is due to the disruption of the salt bridge interaction; subsequently, the inter-peptide binding free energy decreases (from -248.93 to -178.17 kJ/mol), which indicates that A β aggregation becomes less favorable upon oxidation.

**НАУЧНЫЙ СОВЕТ DSc.02/30.12.2019.FM.65.01
ПО ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЕНЫХ СТЕПЕНЕЙ ПРИ ИНСТИТУТЕ
ИОННО-ПЛАЗМЕННЫХ И ЛАЗЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

**АНТВЕРПЕНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ (БЕЛЬГИЯ)
ИНСТИТУТ ИОННО-ПЛАЗМЕННЫХ И ЛАЗЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ**

ЮСУПОВ МАКСУДБЕК СУЛТАНМУРАТОВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ С БИОМОЛЕКУЛАМИ**

01.04.03 – Молекулярная физика и теплофизика

ПРЕЗЕНТАЦИЯ

**на соискание ученой степени доктора физико-математических наук (DSc)
на основании статей, опубликованных в научных журналах с импакт-фактором 1,0 и
выше, и включенных в международные научные базы данных
(без защиты диссертации)**

(степень доктора философии (PhD) утверждена в 2014 году)

ТАШКЕНТ - АНТВЕРПЕН – 2020

Тема исследования (DSc) зарегистрирована под номером B2020.3.DSc/FM160 в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан.

Работа проводилась в Университете Антверпена и Институте ионно-плазменных и лазерных технологий.

- Научный консультант:** Мирзаев Сирожиддин Зайниевич
доктор физико-математических наук, профессор
- Официальные оппоненты:** Бахрамов Сагдулла Абдуллаевич
доктор физико-математических наук, профессор,
академик Академии наук Республики Узбекистан
- Бенедикт Ян
профессор
Кильский университет имени Кристиана Альбрехта (Германия)
- Расулов Акбарали Махаматович
доктор физико-математических наук, профессор
- Ведущая организация:** Самаркандский Государственный Университет

Презентация состоится «02» 12 2020 г. в 16⁰⁰ часов на заседании Научного совета DSc.02/30.12.2019.FM.65.01 при Институте ионно-плазменных и лазерных технологий (адрес: 100125, г. Ташкент, ул. Дурмон йўли 33.Тел./факс: (99871) 262-32-54, e-mail: info@iplt.uz).



Х.Б. Ашуров
Председатель Научного совета
по присуждению ученых степеней
д.т.н., профессор

И.Дж. Ядгаров
Ученый секретарь Научного совета
по присуждению ученых степеней
д.ф.-м.н.

Б.Е. Умирзаков
Председатель научного семинара при Научном совете
по присуждению ученых степеней
д.ф.-м.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация презентации)

Актуальность и востребованность темы исследования. В последние годы быстро развивается новое междисциплинарное направление, объединяющее достижения физики плазмы, молекулярной физики, биофизики и вычислительной физики – плазменная медицина, занимающаяся фундаментальными и прикладными вопросами взаимодействия холодной атмосферной плазмы (ХАП) и мягких сред, основанная на использовании протекающих в ней физикохимических процессов. Процессы, происходящие под воздействием ХАП на поверхности (или в объеме), вызывают изменения в структуре биомолекулы, что обычно сопровождается изменением гидрофильно-гидрофобных свойств молекул и могут стимулировать появление биологической активности биомолекулы.

В настоящее время в области использования ХАП сложилась ситуация, когда практическая реализация опережает фундаментальные исследования, посвященные пониманию физико-химических закономерностей плазменных процессов. Внешние параметры таких плазменных процессов выбираются в основном, эмпирически. Это связано, во-первых, со сложностью анализа реакций, протекающих в неравновесных условиях, а во-вторых, с тем, что плазма является самосогласованной системой, физические характеристики которой, определяющие ее химическую активность, сами зависят от инициированных плазмой межмолекулярных взаимодействий и химических превращений. В то же время, очевидно, что без понимания механизмов взаимодействия, роли различных активных частиц в реакциях с биомолекулами и без учета влияния химических процессов в плазме на ее свойства, эффективная оптимизация плазменных технологий невозможна. В связи с этим *актуальными задачами являются – исследование механизмов* процессов, определяющих состав активных компонентов холодной плазмы, а также *выявление закономерностей* ее воздействия на биомолекулы.

В мире использование ХАП для лечения рака в настоящее время является одной из наиболее актуальных тем в плазменной медицине. Многие исследования были проведены в этой области, в том числе характеристика и разработка источников плазмы, физика и химия, происходящие в плазме и на обрабатываемой поверхности, биофизические процессы, происходящие, когда генерируемые плазмой частицы вступают в контакт с биомолекулами и эффекты лечения ХАП у живых организмов. Многообещающие результаты были получены в плазменной онкологии как *in vitro*, так и *in vivo*. Эксперименты показали, что ХАП может избирательно нацеливаться на разрушение раковых клеток, тем самым оставляя здоровые клетки меньшими или неповрежденными. Это, в свою очередь, дает преимущество ХАП перед традиционными противораковыми методами. Тем не менее, несмотря на большое количество исследований, основные механизмы, с помощью которых плазма действует избирательно на раковые клетки, все еще остаются неясными и требуют более тщательных фундаментальных исследований.

Сложность области контакта плазмы с живыми клетками, делает ее трудной или невозможной для исследования посредством экспериментов. В этом отношении компьютерное моделирование очень ценно, что обеспечивает понимание процессов на молекулярном уровне, и также позволяет детально изучить основные механизмы. Тем не менее, на сегодняшний день было проведено ограниченное количество симуляционных исследований, посвященных подробному изучению вышеуказанных процессов.

В Узбекистане область плазменной медицины, особенно использование холодной плазмы для лечения рака, является одной из новейших областей исследований плазмы и находится на ранних стадиях развития. В этом отношении исследования с использованием компьютерного моделирования играют важную роль в изучении фундаментальных процессов на молекулярном уровне и в понимании механизмов, лежащих в основе экспериментальных результатов, полученных в этой области. Для этого уже налажена постепенная передача знаний и навыков в области компьютерного моделирования молодым исследователям Узбекистана. В будущем предусматривается налаживание сотрудничества с медицинскими исследовательскими центрами страны для проведения практических исследований в этой области. В настоящее время готовятся научно-исследовательские проекты в этой области. Несомненно, развитие области плазменной медицины в Узбекистане предлагает дешевые и эффективные решения для лечения различных заболеваний. Поэтому увеличение количества исследователей в данной области является одной из приоритетных задач, и для этой цели целесообразно расширить исследования в области плазменной медицины.

Данное докторское исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в Указе Президента Республики Узбекистан от 7 февраля 2017 года № УП-4947 «О стратегии действий по пяти приоритетным направлениям развития Республики Узбекистан в 2017-2021 гг.» и Постановлении от 14 июля 2018 г. № ПП-3855 «О дополнительных мерах по повышению эффективности коммерциализации результатов научной и научно-технической деятельности», а также в других нормативно-правовых актах, связанных с этой деятельностью.

Цель исследования – получить фундаментальное представление о влиянии холодной атмосферной плазмы на биомолекулы путем выявления механизмов взаимодействия реактивных частиц с биомолекулами, вызываемых плазмой, и, в частности, определить роль реактивных частиц в процессах.

Объектом исследования являются активные формы кислорода и азота, фосфолипидный бислой, состоящий из различных природных и окисленных молекул липидов, природные и окисленные интегральные мембранные белки аквапорин и хСТ, а также модельные системы для сигнальных, глобулярных и волокнуобразных белков.

Предметом исследования являются атомные положения и скорости в модельной системе, их энергии взаимодействия, площадь на липид и толщина бислоя, профили свободной энергии и коэффициента диффузии реактивных частиц через фосфолипидный бислой, а также через аквапорин, коэффициент проницаемости, барьер свободной энергии, электрическое поле, необходимое для образования пор, среднее время образования пор и свободная энергия связывания.

Научная новизна исследования заключается в следующем:

впервые разработан систематический метод исследования взаимодействия активных форм кислорода и азота (АФКА) с головными группами фосфолипидного бислоя (ФЛБ) и последующее влияние окисления головной группы и липидного хвоста на структурные и динамические свойства мембраны с использованием нескольких различных методов моделирования и была достигнута хорошая согласованность между результатами моделирования и полученными экспериментами;

впервые были идентифицированы механизмы молекулярного уровня синергетического воздействия электрического поля и окисления липидов, вызванных ХАП, на образование пор в ФЛБ;

было обнаружено, что окисление липидных хвостов приводит к уменьшению среднего времени, необходимого для инициирования электропорации, а также к более низкому пороговому электрическому полю, необходимому для образования пор в ФЛБ;

впервые были разработаны систематические методы для изучения влияния индуцированного плазмой окисления на процессы, происходящие в ФЛБ, такие как транспорт АФКА, движение 'flip-flop' фосфатидилсерина (ФС), а также механическое напряжение;

было показано, что окисление ФЛБ приводит к общему уменьшению проницаемых барьеров свободной энергии гидрофильной АФК, тогда как гидрофобные АФКА могут значительно лучше проникать как через нативные, так и окисленные ФЛБ;

было установлено, что окисление ФЛБ облегчает транслокацию ФС через ФЛБ и снижает критическую ареальную деформацию, необходимую для образования пор в ФЛБ при механическом воздействии, тем самым способствуя утечке через мембрану;

впервые был разработан детальный метод исследования для изучения процессов проникновения гидрофильных и гидрофобных АФКА через трансмембранный белковый канал аквапорина (АКП);

было высказано предположение, что гидрофильные частицы проникают в клетку через АКП, поскольку они испытывают явно более высокий энергетический барьер для проникновения через липидную мембрану;

было обнаружено, что гидрофобные АФКА проникают в клетку, скорее всего, через мембрану, где может происходить окисление липидов, поскольку их энергетические барьеры через АКП выше;

впервые полный процесс транспортировки цистина через антипортер хСТ наблюдался с использованием нескольких различных методов моделирования;

было показано, что окисление хСТ приводит к свободному энергетическому барьеру для транслокации цистина, тем самым блокируя доступ цистина к месту связывания субстрата;

детально рассмотрено влияние окисления плазмы на свойства трех модельных белков; для этой цели для модификации были выбраны конкретные аминокислоты для создания окисленных форм модельных белков; моделирование проводилось в сочетании с экспериментами, и было получено общее хорошее качественное согласие.

Внедрение результатов исследования. Основная реализация результатов исследований заключалась в цитировании этих результатов другими исследовательскими работами.

Согласно научной базе данных *Web of Science*, полученные результаты моделирования обсуждались в обзорах и использовались при интерпретации и описании экспериментальных или вычислительных результатов более чем 250 работ, опубликованных в журналах с высокими импакт факторами:

результаты взаимодействия образующихся в плазме активных форм кислорода и азота (АФКА) с фосфолипидным бислоем (ФЛБ) и последующее влияние окисления головной группы и липидного хвоста на свойства мембраны, а также синергетический эффект влияния электрического поля и окисления липидов на проницаемость ФЛБ, были использованы для интерпретации и описания полученных результатов в [*Biol. Chem.* 2019; 400: 19 (IF=3.014), *Sci. Rep.* 2019; 9: 4496 (IF=4.011), *J. Chem. Inf. Model.* 2019; 59: 4413 (IF=3.966), *Cells* 2020; 9: 847 (IF=5.656), *Trends Biotechnol.* 2018; 36: 594 (IF=13.747), *J. Am. Chem. Soc.* 2018; 140: 9606 (IF=14.695), *Chem. Rev.* 2019; 119: 5954 (IF=54.301), *Mat. Sci. Eng. R.* 2019; 138: 36 (IF=22.25)];

результаты исследований процессов, происходящих в ФЛБ, вызванных окислением плазмы, таких как транспорт АФКА и 'flip-flop' фосфатидилсерина, были проанализированы и рассмотрены в [*J. Phys. Chem. B* 2018; 122: 10362 (IF=2.923), *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2019; 21: 19327 (IF=3.567), *Cancers* 2020; 12: 269 (IF=6.162), *Nanoscale* 2019; 11: 19497 (IF=6.97), *Cancers* 2019; 11: 1109 (IF=6.162), *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21: 1939 (IF=4.183), *Curr. Opin. Struc. Biol.* 2018; 51: 177 (IF=7.052), *Annu. Rev. Biophys.* 2019; 48: 421 (IF=12.175), *Chem. Rev.* 2019; 119: 5954 (IF=54.301)];

результаты исследований проникновения гидрофильных и гидрофобных АФКА через аквапорин, а также транспорта цистина через хСТ, трансмембранные белковые каналы, рассматривались и обсуждались в [*J. Chem. Inf. Model.* 2018; 58: 2193 (IF=3.966), *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019; 2019: 9062098 (IF=4.868), *Cells* 2019; 8: 1316 (IF=5.656), *Cancers* 2019; 11: 1920

(IF=6.162), *Arch. Biochem. Biophys.* 2020; 681: 108253 (IF=3.559), *Neurochem. Res.* 2020; 45: 1375 (IF=2.782), *J. Membr. Biol.* 2019; 252: 465 (IF=1.746), *Arch. Biochem. Biophys.* 2019; 674: 108114 (IF=3.559), *Cancers* 2020; 12: 269 (IF=6.162)];

результаты исследований влияния окисления плазмы на структурные свойства трех модельных белков, то есть эпидермального фактора роста человека, амилоидного бета-пептида и цитоглобина, были использованы при анализе и интерпретации полученных результатов в [*Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019; 2019: 9062098 (IF=4.868), *Cancers* 2019; 11: 1920 (IF=6.162), *Cancers* 2018; 10: 394 (IF=6.162), *J. Mol. Graph. Model.* 2020; 96: 107535 (IF=1.863), *Sci. Rep.* 2019; 9: 16080 (IF=4.011), *ChemSusChem* 2020; 13: 2072 (IF=7.804), *Molecules* 2019; 24: 2568 (IF=3.06), *Plasma. Process. Polym.* 2018; 15: e1800078 (IF=3.173)].

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
LIST OF PUBLISHED WORKS
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

I бўлим (I part; I часть)

1. Duan J., Ma M., Yusupov M., Cordeiro R.M., Lu X., Bogaerts A. The penetration of reactive oxygen and nitrogen species across the stratum corneum // *Plasma Processes and Polymers*, 2020. -vol.: 17, Issue: 10, -pp.: 1-14, DOI: 10.1002/ppap.202000005 (№ 1. Web of Science; IF=3.17).
2. Cordeiro R.M., Yusupov M., Razzokov J., Bogaerts A. Parametrization and Molecular Dynamics Simulations of Nitrogen Oxyanions and Oxyacids for Applications in Atmospheric and Biomolecular Sciences // *Journal of Physical Chemistry B*, 2020. -vol.: 124, Issue: 6, -pp.: 1082-1089, DOI: 10.1021/acs.jpcc.9b08172 (№ 1. Web of Science; IF=2.92).
3. Oliveira M.C., Yusupov M., Bogaerts A., Cordeiro R.M. Molecular dynamics simulations of mechanical stress on oxidized membranes // *Biophysical Chemistry*, 2019. -vol.: 254, Issue: 1, -pp.: 1-8, DOI: 10.1016/j.bpc.2019.106266 (№ 1. Web of Science; IF=1.74).
4. Ghasemitarei M., Yusupov M., Razzokov J., Shokri B., Bogaerts A. Effect of oxidative stress on cystine transportation by xC⁻ antiporter // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019. -vol.: 674, Issue: 1, -pp.: 1-7, DOI: 10.1016/j.abb.2019.108114 (№ 1. Web of Science; IF=3.56).
5. Van der Paal J., Hong S.-H., Yusupov M., Gaur N., Oh J.-S., Short R.D., Szili E.J., Bogaerts A. How membrane lipids influence plasma delivery of reactive oxygen species into cells and subsequent DNA damage: an experimental and computational study // *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2019. -vol.: 21, Issue: 35, -pp.: 19327-19341, DOI: 10.1039/c9cp03520f (№ 1. Web of Science; IF=3.56).
6. Yusupov M., Razzokov J., Cordeiro R.M., Bogaerts A. Transport of Reactive Oxygen and Nitrogen Species across Aquaporin: A Molecular Level Picture // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. -vol.: 2019, Issue: 1, -pp.: 1-11, DOI: 10.1155/2019/2930504 (№ 1. Web of Science; IF=4.87).
7. Bogaerts A., Yusupov M., Razzokov J., Van der Paal J. Plasma for cancer treatment: How can RONS penetrate through the cell membrane? Answers from computer modeling // *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2019. -vol.: 13, Issue: 2, -pp.: 253-263, DOI: 10.1007/s11705-018-1786-8 (№ 1. Web of Science; IF=2.81).
8. Razzokov J., Yusupov M., Bogaerts A. Oxidation destabilizes toxic amyloid beta peptide aggregation // *Scientific Reports*, 2019. -vol.: 9, Issue: 1, -pp.: 1-7, DOI: 10.1038/s41598-019-41931-6 (№ 1. Web of Science; IF=4.01).
9. Ghasemitarei M., Yusupov M., Razzokov J., Shokri B., Bogaerts A. Transport of cystine across xC⁻ antiporter // *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2019. -vol.: 664, Issue: 1, -pp.: 117-126, DOI: 10.1016/j.abb.2019.01.039 (№ 1. Web of Science; IF=3.56).

10. De Backer J., Razzokov J., Hammerschmid D., Mensch C., Hafideddine Z., Kumar N., van Raemdonck G., Yusupov M., Van Doorslaer S., Johannessen C., Sobott F., Bogaerts A., Dewilde S. The effect of reactive oxygen and nitrogen species on the structure of cytoglobin: A potential tumor suppressor // *Redox Biology*, 2018. -vol.: 19, Issue: 1, -pp.: 1-10, DOI: 10.1016/j.redox.2018.07.019 (№ 1. Web of Science; IF=7.79).
11. Razzokov J., Yusupov M., Cordeiro R.M., Bogaerts A. Atomic scale understanding of the permeation of plasma species across native and oxidized membranes // *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2018. -vol.: 51, Issue: 36, -pp.: 1-9, DOI: 10.1088/1361-6463/aad524 (№ 1. Web of Science; IF=2.83).
12. Yusupov M., Lackmann J-W., Razzokov J., Kumar S., Stapelmann K., Bogaerts A. Impact of plasma oxidation on structural features of human epidermal growth factor // *Plasma Processes and Polymers*, 2018. -vol.: 15, Issue: 8, -pp.: 1-10, DOI: 10.1002/ppap.201800022 (№ 1. Web of Science; IF=3.17).
13. Yusupov M., Yan D., Cordeiro R.M., Bogaerts A. Atomic scale simulation of H₂O₂ permeation through aquaporin: toward the understanding of plasma cancer treatment // *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2018. -vol.: 51, Issue: 12, -pp.: 1-10, DOI: 10.1088/1361-6463/aaae7a (№ 1. Web of Science; IF=2.83).
14. Kumar N., Shaw P., Razzokov J., Yusupov M., Attri P., Uhm H.S., Choi E.H., Bogaerts A. Enhancement of cellular glucose uptake by reactive species: a promising approach for diabetes therapy // *RSC Advances*, 2018. -vol.: 8, Issue: 18, -pp.: 9887-9894, DOI: 10.1039/c7ra13389h (№ 1. Web of Science; IF=3.05).
15. Razzokov J., Yusupov M., Vanuytsel S., Neyts E.C., Bogaerts A. Phosphatidylserine flip-flop induced by oxidation of the plasma membrane: a better insight by atomic scale modeling // *Plasma Processes and Polymers*, 2017. -vol.: 14, Issue: 10, -pp.: 1-6, DOI: 10.1002/ppap.201700013 (№ 1. Web of Science; IF=2.70).
16. Yusupov M., Wende K., Kupsch S., Neyts E.C., Reuter S., Bogaerts A. Effect of head group and lipid tail oxidation in the cell membrane revealed through integrated simulations and experiments // *Scientific Reports*, 2017. -vol.: 7, Issue: 1, -pp.: 1-14, DOI: 10.1038/s41598-017-06412-8 (№ 1. Web of Science; IF=4.12).
17. Yusupov M., Van der Paal J., Neyts E.C., Bogaerts A. Synergistic effect of electric field and lipid oxidation on the permeability of cell membranes // *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 2017. -vol.: 1861, Issue: 4, -pp.: 839-847, DOI: 10.1016/j.bbagen.2017.01.030 (№ 1. Web of Science; IF=3.68).
18. Attri P., Yusupov M., Park J.H., Lingamdinne L.P., Koduru J.R., Shiratani M., Choi E.H., Bogaerts A. Mechanism and comparison of needle-type non-thermal direct and indirect atmospheric pressure plasma jets on the

- degradation of dyes // *Scientific Reports*, 2016. -vol.: 6, Issue: 1, -pp.: 1-14, DOI: 10.1038/srep34419 (№ 1. Web of Science; IF=4.26).
19. Bogaerts A., Khosravian N., Van der Paal J., Verlackt C.C.W., Yusupov M., Kamaraj B., Neyts E.C. Multi-level molecular modelling for plasma medicine // *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2016. -vol.: 49, Issue: 5, -pp.: 1-19, DOI: 10.1088/0022-3727/49/5/054002 (№ 1. Web of Science; IF=2.59).
 20. Park J.H., Kumar N., Park D.H., Yusupov M., Neyts E.C., Verlackt C.C.W., Bogaerts A., Kang M.H., Uhm H.S., Choi E.H., Attri P. A comparative study for the inactivation of multidrug resistance bacteria using dielectric barrier discharge and nano-second pulsed plasma // *Scientific Reports*, 2015. -vol.: 5, Issue: 1, -pp.: 1-14, DOI: 10.1038/srep13849 (№ 1. Web of Science; IF=5.23).
 21. Khosravian N., Bogaerts A., Huygh S., Yusupov M., Neyts E.C. How do plasma-generated OH radicals react with biofilm components? Insights from atomic scale simulations // *Biointerphases*, 2015. -vol.: 10, Issue: 2, -pp.: 1-9, DOI: 10.1116/1.4904339 (№ 1. Web of Science; IF=2.11).
 22. Van der Paal J., Verlackt C.C., Yusupov M., Neyts E.C., Bogaerts A. Structural modification of the skin barrier by OH radicals: a reactive molecular dynamics study for plasma medicine // *Journal of Physics D: Applied Physics*, 2015. -vol.: 48, Issue: 15, -pp.: 1-12, DOI: 10.1088/0022-3727/48/15/155202 (№ 1. Web of Science; IF=2.77).
 23. Bogaerts A., Yusupov M., Van der Paal J., Verlackt C.C.W., Neyts E.C. Reactive Molecular Dynamics Simulations for a Better Insight in Plasma Medicine // *Plasma Processes and Polymers*, 2014. -vol.: 11, Issue: 12, -pp.: 1156-1168, Special Issue: SI, DOI: 10.1002/ppap.201400084 (№ 1. Web of Science; IF=2.45).

II бўлим (II part; II часть)

24. Yusupov M., Mirzaev S. Computer simulations of plasma interaction with cell membrane: toward understanding the anticancer effect of cold atmospheric plasma // *Доклады Академии наук.-Ташкент*, 2020. - №3, - с.13-17 (01.00.00. №5).
25. Yusupov M., Bogaerts A. Impact of lipid and protein oxidation on the transport of hydrophilic and hydrophobic RONS through aquaporin // *BioExcel Summer School on Biomolecular Simulations*, June 30-July 5, 2019, Program and Book of abstracts, p. 83-84, poster presentation, Pula, Italy.
26. Bogaerts A., Heirman P., Razzokov J., Van Boxem W., Van der Paal J., Yusupov M. Modelling for plasma oncology // *6th International Workshop on Plasma for Cancer Treatment*, April 1-3, 2019, Program and Book of abstracts, p. 19, plenary talk, Antwerp, Belgium.
27. Yusupov M., Bogaerts A. Effect of lipid and protein oxidation on the permeation of H₂O₂ (hydrophylic) and NO (hydrophobic) species across aquaporin // *6th International Workshop on Plasma for Cancer Treatment*,

- April 1-3, 2019, Program and Book of abstracts, p. 84, poster presentation (P-II-26), Antwerp, Belgium.
28. Duan J., Yusupov M., Lu X., Bogaerts A. On the penetration of various RONS generated by a cold plasma jet across skin tissues: experiments and simulations // 6th International Workshop on Plasma for Cancer Treatment, April 1-3, 2019, Program and Book of abstracts, p. 72, poster presentation (P-I-14), Antwerp, Belgium.
 29. Van der Paal J., Hong S-H., Yusupov M., Gaur N., Oh J-S., Szili E., Bogaerts A. How the cell membrane composition influences plasma-induced cellular effects // 6th International Workshop on Plasma for Cancer Treatment, April 1-3, 2019, Program and Book of abstracts, p. 64, poster presentation (P-I-42), Antwerp, Belgium.
 30. Razzokov J., Yusupov M., Bogaerts A. Will oxidation stimulate or destabilize amyloid fibril formation? Answers from atomic scale simulations // 6th International Workshop on Plasma for Cancer Treatment, April 1-3, 2019, Program and Book of abstracts, p. 63, poster presentation (P-I-6), Antwerp, Belgium.
 31. Razzokov J., Yusupov M., Bogaerts A. Permeation of RONS and glucose across native and oxidized membranes: answers from molecular dynamics simulations // 3rd Strasbourg Workshop on Membrane Biophysics, December 3-4, 2018, Program and Book of abstracts, p. 19, poster presentation, Strasbourg, France.
 32. Yusupov M., Razzokov J., Bogaerts A. Plasma-induced oxidation of the lipid bilayer: Insights from molecular level modeling // 3rd Strasbourg Workshop on Membrane Biophysics, December 3-4, 2018, Program and Book of abstracts, p. 17, invited talk, Strasbourg, France.
 33. Razzokov J., Yusupov M., Bogaerts A. Effect of oxidation on the stability of amyloid protofibril // 5th International Conference "Dynamics of Systems on the Nanoscale", October 8-12, 2018, Program and Book of abstracts, p. 86-87, oral presentation (Fr-I-3), Potsdam, Germany.
 34. Yusupov M., Lackmann J-W., Razzokov J., Stapelmann K., Bogaerts A. Plasma oxidation of human epidermal growth factor: Combined computational and experimental study // 7th International Conference on Plasma Medicine, June 17-22, 2018, Book of abstracts, p. 76, oral presentation, Philadelphia, USA.
 35. Razzokov J., Yusupov M., Bogaerts A. Transport of reactive oxygen and nitrogen species across native and oxidized phospholipid membrane // 7th International Conference on Plasma Medicine, June 17-22, 2018, Book of abstracts, p. 31, oral presentation, Philadelphia, USA.
 36. Razzokov J., Yusupov M., Bogaerts A. Possible Mechanism of Glucose Uptake Enhanced by Cold Atmospheric Plasma: Atomic Scale Simulations // Plasma, 2018. -vol.: 1, Issue: 1, -pp.: 119-125.
 37. Bogaerts A., Van Boxem W., Van der Paal J., Verlackt C., Yusupov M. Modeling for a better understanding of plasma medicine // 25th International

- Conference on Numerical Simulation of Plasmas, September 18-20, 2017, Program and Book of abstracts, p. 1, invited talk, Leuven, Belgium.
38. Yusupov M., Yan D., Keidar M., Bogaerts A. Understanding the role of aquaporins in the selective anti-cancer capacity of cold atmospheric plasmas // “iPlasmaNano-VIII” conference, July 2-6, 2017, Book of abstracts, p. 92, poster presentation (P-II-27), Antwerp, Belgium.
 39. Bogaerts A., Yusupov M., Van der Paal J. Plasma for cancer treatment: how can RONS penetrate through the cell membrane? // “iPlasmaNano-VIII” conference, July 2-6, 2017, Book of abstracts, p. 66, invited talk, Antwerp, Belgium.
 40. Yusupov M., Bogaerts A. Atomic scale simulations for plasma medicine: Behavior of oxidized cell membranes // 2017 International Forum on Functional Materials, June 27-29, 2017, Book of abstracts, p. 157, invited talk (Invited-B20, P00014), Jeju, Korea.
 41. Van der Paal J., Yusupov M., Verheyen C., Neyts E.C., Bogaerts A. Effect of cholesterol and lipid peroxidation on the permeability of ROS through a phospholipid bilayer // 6th International Conference on Plasma Medicine, September 4-9, 2016, Book of abstracts, p. 309, poster presentation (P3-64-10), Bratislava, Slovakia.
 42. Yusupov M., Van der Paal J., Biscop E., Bogaerts A. Effect of electric field on pore formation in model systems for lipid membrane and skin barrier: A molecular dynamics study // 6th International Conference on Plasma Medicine, September 4-9, 2016, Book of abstracts, p. 103, oral presentation (O-69), Bratislava, Slovakia.
 43. Park J H., Yusupov M., Neyts E.C., Verlaack C.C W., Bogaerts A., Kumar N., Choi E.H., Attri P. Effect of cold atmospheric plasma and nanosecond pulsed plasma on protein folding and deactivation of drug resistance bacteria: Experimental and computational outlook // 6th International Conference on Plasma Medicine, September 4-9, 2016, Book of abstracts, p. 99, oral presentation (O-65), Bratislava, Slovakia.
 44. Yusupov M., Van der Paal J., Neyts E.C., Bogaerts A. Properties of oxidized lipid bilayers: A multi-level modeling approach // International Conference on Electrical Discharges with Liquids, March 13-17, 2016, Book of abstracts, p. 22, invited talk, Kocaeli (Izmit), Turkey.
 45. Yusupov M., Van der Paal J., Neyts E.C., Bogaerts A. Plasma-induced oxidation of the phospholipid bilayer: Insights from atomistic simulations // 19th Gaseous Electronics Meeting, February 14-17, 2016, Book of abstracts, p. 9, invited talk, Geelong, Australia.
 46. Yusupov M., Neyts E.C., Bogaerts A. Atomic scale simulations for a better insight in plasma interaction with the phospholipid bilayer // 4th Young Professionals Workshop on Plasma Medicine, September 21-24, 2015, Book of abstracts, p. 22, oral presentation, Rostock, Germany.
 47. Yusupov M., Van der Paal J., Neyts E.C., Bogaerts A. Understanding plasma-induced structural modification of the phospholipid bilayer: insight from atomistic simulations // 1st World Congress on Electroporation and Pulsed

- Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies, September 6-10, 2015, Book of abstracts, p. 69, poster presentation (Mon-D2-P6), Portorož, Slovenia.
48. Yusupov M., Van der Paal J., Verlackt C.C., Khosravian N., Neyts E.C., Bogaerts A. Plasma interaction with phospholipid bilayer: molecular dynamics simulations // 22nd International Symposium on Plasma Chemistry, July 5-10, 2015, Book of abstracts, p. 1-3, poster presentation (P-III-10-35), Antwerp, Belgium.
 49. Neyts E.C., Yusupov M., Verlackt C.C.W., Bogaerts A. Molecular Dynamics Simulations of Plasma-Biomolecule Interactions // International Workshop on Diagnostics and Modelling in Plasma Medicine, May 23-24, 2014, Book of abstracts, p. 18, plenary talk (2-1P), Nara, Japan.
 50. Verlackt C.C., Yusupov M., Neyts E.C., Bogaerts A. Atomic scale simulations of plasma interactions with the bacterial membrane and biofilm // International Workshop on Diagnostics and Modelling in Plasma Medicine, May 23-24, 2014, Book of abstracts, p. 53, poster presentation (P17), Nara, Japan.
 51. Verlackt C.C.W., Yusupov M., Van der Paal J., Neyts E.C., Bogaerts A. Reactive Molecular Dynamics Simulations for the Interaction of Reactive Oxygen Species with Biomolecules // 5th International Conference on Plasma Medicine, May 18-23, 2014, Book of abstracts, p. 136, oral presentation (22-BO10), Nara, Japan.
 52. Yusupov M., Verlackt C.C., Neyts E.C., Bogaerts A. Modeling of the behavior of reactive oxygen species in a liquid water layer of interest for plasma medicine // 5th International Conference on Plasma Medicine, May 18-23, 2014, Book of abstracts, p. 250, poster presentation (19-P12-02), Nara, Japan.
 53. Yusupov M., Neyts E.C., Bogaerts A. A reactive molecular dynamics study for plasma medicine applications // Symposium on Fundamentals of plasma-surface interactions, November 8, 2013, Book of abstracts, p. 41-42, poster presentation, Antwerp, Belgium
 54. Yusupov M., Neyts E.C., Van der Paal J., Aernouts S., Bogaerts A. A reactive molecular dynamics study for plasma medicine applications // 21st International Symposium on Plasma Chemistry, August 4-9, 2013, Book of abstracts, p. 1-4, poster presentation, Cairns, Australia.
 55. Yusupov M., Neyts E.C., Bogaerts A. Investigation of plasma-bacteria cell wall interaction by atomic-scale simulations // High-Tech Plasma Processes - 12th European Plasma Conference, June 24-29, 2012, Program and Book of abstracts, Invited talk IV, Bologna, Italy.
 56. Yusupov M., Neyts E.C., Bogaerts A. Molecular dynamics simulation of plasma-bacteria cell wall interaction // 4th International Conference on Plasma Medicine, June 17-21, 2012, Book of abstracts, p. 146, poster presentation (P101), Orléans, France.