



ГОЛЬЦЕВ

Анатолій Миколайович — академік НАН України, доктор медичних наук, професор, директор Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

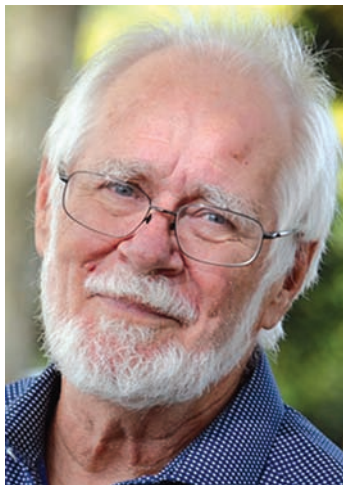
КРІОБІОЛОГІЧНИЙ ПОСТАМЕНТ НОБЕЛІВСЬКОЇ ПРЕМІЇ З ХІМІЇ 2017 р.

У статті обговорено основні результати досліджень лауреатів Нобелівської премії з хімії 2017 р. Жака Дюбоше (Jacques Dubochet), Йоахіма Франка (Joachim Frank) і Річарда Гендерсона (Richard Henderson). Представлено історичну ретроспективу розвитку досліджень з кріоелектронної мікроскопії. Обґрунтовано важливість цього відкриття для сучасної науки. Окреслено основні переваги використання кріоелектронної мікроскопії з високою роздільною здатністю для визначення структури біомолекул у розчині. Розглянуто практичне значення цього методу досліджень для медицини і біотехнології, насамперед у галузі створення нових лікарських препаратів, а також ідентифікації нових хвороб.

Ключові слова: Нобелівська премія з хімії, кріоелектронна мікроскопія, зображення, структура біомолекул, нові лікарські препарати.

Величезного успіху в отриманні точного зображення біомолекул (від голкоподібних структур, якими бактерії атакують клітину, до структури вірусу Зіка) досягли троє вчених, які у 2017 р. стали лауреатами Нобелівської премії в галузі хімії. Найпрестижніша наукова нагорода дісталася Жаку Дюбоше (Jacques Dubochet) з Лозаннського університету (Швейцарія), Йоахіму Франку (Joachim Frank) з Колумбійського університету (США) та Річарду Гендерсону (Richard Henderson) з Лабораторії медичних досліджень молекулярної біології у Кембріджі (Велика Британія). Кожен із них зробив істотний внесок у розвиток потужного методу, за допомогою якого можна отримувати зображення біологічних молекул з точністю до атомних розмірів. І хоча їхні дослідження Нобелівський комітет відніс безпосередньо до галузі хімічних наук з формулюванням «за розроблення кріоелектронної мікроскопії для визначення структури біомолекул з високою роздільною здатністю в розчині», ці результати значною мірою сприяли розвитку одного з найважливіших розділів біологічної науки — структурної біології.

Безсумнівно, зображення — ключ до розуміння будь-якого з процесів, що відбуваються навколо. Наукові відкриття часто залежать від того, наскільки успішною є візуалізація об'єктів.



Жак Дюбоше
(Jacques Dubochet)



Йоахім Франк
(Joachim Frank)



Річард Гендерсон
(Richard Henderson)

Людське око дає можливість сприймати навколишній світ у «макроформі». Мікроскоп, сконструйований близько 300 років тому голландським натуралістом Левенгуком, дозволив ученим зазирнути в мікросвіт різних форм живої матерії і розгледіти структури, які не можна було побачити раніше неозброєним оком. Проте отримання зображення того чи іншого об'єкта за допомогою мікроскопа часто потребує використання барвників або фіксаторів. Крім того, слід враховувати, що в разі малих розмірів біологічних структур для проведення їх досліджень неможливо використовувати оптичні мікроскопи, оскільки їх роздільна здатність обмежена довжиною світлових хвиль.

Для вивчення зразків у твердому (жорсткому) стані застосовують такий метод візуалізації, як рентгенівська кристалографія. Однак цей метод не дає достатньої інформації щодо динаміки процесів, які відбуваються, наприклад, у білках чи ферментах. Альтернативною методикою отримання зображення об'єкта в мікроскопії є просвічування його пучком електронів — техніка, відома як трансмісійна електронна мікроскопія (ТЕМ). Проте ТЕМ-мікроскопія придатна для дослідження об'єктів тільки неживої матерії. Це пов'язано з тим, що аналіз проводиться з використанням потужного електронного пучка, який руйнує тонкі біо-

логічні структури. До того ж процедура електронно-мікроскопічних досліджень виконується в умовах вакууму, що потребує застосування певних способів фіксації біологічних об'єктів (хімічної або кріофіксації) та методів попередньої підготовки зразків.

Отже, перелічені вище методи у переважній більшості випадків не дозволяють інформативно візуалізувати молекулярні механізми, які відбуваються в природних біологічних об'єктах [1–5].

Ширші можливості візуалізації біомолекул у їх природному стані дає метод кріоелектронної мікроскопії, який ґрунтується на кріофіксації та надшвидкому охолодженні біоматеріалу. Добре відомо, що практично безальтернативним процесом під час заморожування макрооб'єктів біологічного матеріалу є кристалоутворення [6, 7]. Тому паралельно з технічним розвитком кріоелектронної мікроскопії фахівці розв'язували проблему керування процесом кристалоутворення та досліджували механізми взаємодії кристалів льоду з біологічними об'єктами [8, 9]. Одним із найінформативніших методів кріоелектронної мікроскопії був і залишається метод заморожування-сколювання (freeze-fracture method). Він виявився ефективним під час досліджень та фіксації швидкоплинних процесів у клітині, а також

вивчення динаміки поза- і внутрішньоклітинного кристалоутворення [10]. Таким чином, кріоелектронна мікроскопія вперше дала можливість візуалізувати біомолекули в природній конфігурації.

Використання методу кріоелектронної мікроскопії (кріо-ЕМ) дає змогу зменшити випаровування води і захистити біологічний матеріал від радіаційного ушкодження. На початку 1950-х років Умберто Фернандес-Моран оприлюднив результати досліджень щодо можливості заморожування зразків і підготовки тонких кріозрізів для кріо-ЕМ. Слід зазначити, що методи охолодження було також використано для вивчення кристалів білка методом рентгенівської кристалографії, а для запобігання формуванню кристалічного льоду застосовували сахарозу або гліцерин [11, 12]. Дещо пізніше Тейлор і Глейзер [13, 14] показали, що охолодження зразків до кріогенних температур підвищує їх стійкість до радіаційного ушкодження і забезпечує можливість тривалішої експозиції зразка з більш високою інтенсивністю опромінення електронами.

Однак, як зазначалося раніше, під час заморожування вода, як правило, утворює кристалічний лід, який спричинює сильну дифракцію електронів, розмиваючи сигнали, що йдуть від зразка. При цьому з'ясувалося, що утворення кристалів льоду змінює структуру зразка. Тобто доступні дослідникам технології не дозволяли візуалізувати тонку структуру біологічного об'єкта, не кажучи вже про можливість констатувати хоч якісь природні молекулярні механізми.

Поставали нові проблеми і нові питання, вирішення яких потребувало глибокого аналізу історичних подій. Виявилося, що ще в 1940-х роках один із основоположників досліджень у галузі кріобіології Базиль Люїє стикнувся з проблемою формування кристалічного льоду під час охолодження клітин [15]. Б. Люїє зрозумів, що уникнути цього явища можна за допомогою швидкого охолодження біологічного матеріалу. У цьому випадку вода може зберігатися в рідкому аморфному (так званому вітрифікованому) стані.

Однак до 1980 р. питання про те, чи зможе об'ємна вода переходити у вітрифікований твердий стан, все ще залишалося відкритим, оскільки теорія підтверджувала той факт, що необхідна швидкість охолодження є практично недосяжною. Цей феномен було продемонстровано, але тільки для конденсації водяної пари на холодних металевих поверхнях [16]. Дещо оптимістичнішими виявилися результати дослідів Брюгеллера зі співавторами [17], які в 1980 р. показали утворення вітрифікованої води за швидкого охолодження крапельок об'ємної води мікрометрового розміру. Пізніше (у 1981 р.) швейцарський біолог Жак Дюбоше з співавторами зрештою запропонував метод, який дав змогу сформуванню плівки некристалічної води на склі зразка для спостереження під електронним мікроскопом. Воду розпилювали на вуглецеву плівку, встановлену на сітці, після чого сітку швидко занурювали в рідкий етан або пропан, охолоджений до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ рідким азотом [1, 10, 18].

Жак Дюбоше розробив метод склування води: він охолоджував її настільки швидко, що при твердненні вода навколо зразка зберігала структуру, яку мала в рідкому вигляді. Біологічна молекула, укладена в таку «скляну льодинку», зберігала свою природну форму навіть в умовах вакууму.

Показано, що тонкий шар вітрифікованої води може майже однорідно поглинати електрони у кріо-ЕМ. Змінюючи температурні режими, Ж. Дюбоше зі співавторами спостерігали, що аморфна структура води перетворювалася на кристалічну під час нагрівання приблизно до $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$, а склоподібний лід можна було підтримувати навколо зразка протягом тривалого часу за температури менш як $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Повний потенціал методу Дюбоше з підготовки зразків було реалізовано в 1984 р., коли група дослідників продемонструвала електронні мікрофотографії суспензій вірусів, охолоджених з використанням удосконаленого методу, який дозволив отримати тонкі водні шари у вітрифікованому стані [19, 20] (рис. 1). Ж. Дюбоше та його колеги показали, що метод



Рис. 1. Схема методу Ж. Дюбоше швидкого охолодження водних розчинів зразків біологічних об'єктів (схема з сайту nobelprize.org)

підготовки зразка можна широко застосовувати в крио-ЕМ дослідженнях і для інших біологічних частинок. Новий метод підготовки було прийнято науковою спільнотою за основний, і до сьогодні його використовують як у дослідженнях комплексів окремих частинок, так і в криотомографічних дослідженнях окремих об'єктів [21].

Очевидно, що метод вітрифікації (склування) середовища, в якому міститься біологічний об'єкт, став «родзинкою» цього варіанта крио-ЕМ, оскільки він дає змогу бачити не лише структуру (основу) самої молекули білка, а й

його амінокислотні відгалуження, які простягаються поряд і є необхідним компонентом для реалізації хімічних процесів за участю білків. Більше того, тільки за допомогою цього методу відкриваються можливості як для забезпечення «прозорості» самого учасника біохімічного процесу, так і для розвитку цього процесу в динаміці. Останні вдосконалення методики дозволяють реєструвати розвиток біохімічних процесів поетапно. Роблячи знімки однієї й тієї самої системи в різні моменти часу, а потім складаючи їх послідовно, вчені тепер можуть відобразити біологічні процеси у вигляді фільму. Зараз дослідники мають можливість заморозити біологічні молекули не в стаціонарному стані, а безпосередньо під час їх руху, спостерігаючи за характером реалізації їх функції. Відтепер хімічні процеси, які відбуваються в окремій молекулі будь-якої речовини, можна роздивитися в найдрібніших деталях.

Основна проблема досліджень незабарвлених, некристалічних, асиметричних, випадково орієнтованих частинок у розчині полягає у «вирівнюванні» ознак, які погано проявляються на тлі «шумів» приладу [22]. Вирішенням цієї проблеми ще в середині 1970-х років займався німецький, а зараз уже американський біофізик Йоахім Франк. Ці дослідження [22] стали відправною точкою для майбутніх робіт, за які йому фактично й було присуджено Нобелівську премію. Упродовж майже десяти років Й. Франк намагався знайти спосіб, як з дуже «мутних» двовимірних зображень, одержаних на електронному мікроскопі, зробити тривимірне зображення досліджуваної структури. Зрештою йому вдалося розробити метод, оснований на аналізі та порівнянні двовимірних «електронних» зображень, який сьогодні набув значного поширення. Йоахім Франк і його колеги запропонували метод вирівнювання низькодозових зображень окремих молекул з використанням функцій взаємної кореляції [22, 23]. На основі узагальненого аналізу було зроблено висновок щодо можливості виявлення випадково розташованих частинок, використовуючи при цьому дози електронів, які їх не руйнують. Сенс цієї роботи полягав у мож-

ливості усереднити зображення кількох частинок і отримати дані з високою роздільною здатністю [24].

Важливим аспектом досліджень Йоахіма Франка та його колег було також те, що свої розрахунки вони виконували для некристалічних зразків, які складаються з однорідних частинок. Однак біологічні зразки рідко бувають структурно однорідними. У зв'язку з цим постало завдання щодо визначення положення та орієнтації кожної частинки, тобто параметрів, які характеризують їх двовимірне положення в площині та тривимірну орієнтацію. У 1981 р. Йоахім Франк і Марін ван Хеель запропонували метод, який дозволяв сортувати зображення частинок на класи на основі їх орієнтації та структурних особливостей [25, 26] (рис. 2). Загальний метод визначення відносної тривимірної орієнтації з класів двовимірних проєкцій асиметричних частинок було розроблено Й. Франком і М. Радермахером в 1986–1987 рр. [27–29]. Цей метод дістав назву «метод випадкового конічного нахилу».

Значний внесок у розвиток криоелектронної мікроскопії зробили Річард Гендерсон та його колеги [30]. Вони вперше показали можливість отримання за допомогою криоелектронної мікроскопії структури біомолекул з високою роздільною здатністю через усереднення за безліччю копій одного й того самого об'єкта. В їхньому експерименті сигнали виходили від багатьох молекул бактеріородопсину у двовимірному кристалі (рис. 3). Дослідження показали, що за ультранизьких температур радіаційне навантаження може бути обмеженим, що дозволяє достатньою мірою утримувати інформаційний контент для виявлення позицій амінокислотних бічних ланцюгів білка. У подальшому аналогічний підхід було використано для визначення з високою роздільною здатністю структур інших об'єктів, наприклад димеру тубуліну [31] та аквапоринів [32].

У своєму новаторському дослідженні Р. Гендерсон та його колеги для оптимізації якості даних використовували кілька електронних мікроскопів по всьому світу [30]. Вони визначили ряд технічних обмежень для цих мікро-

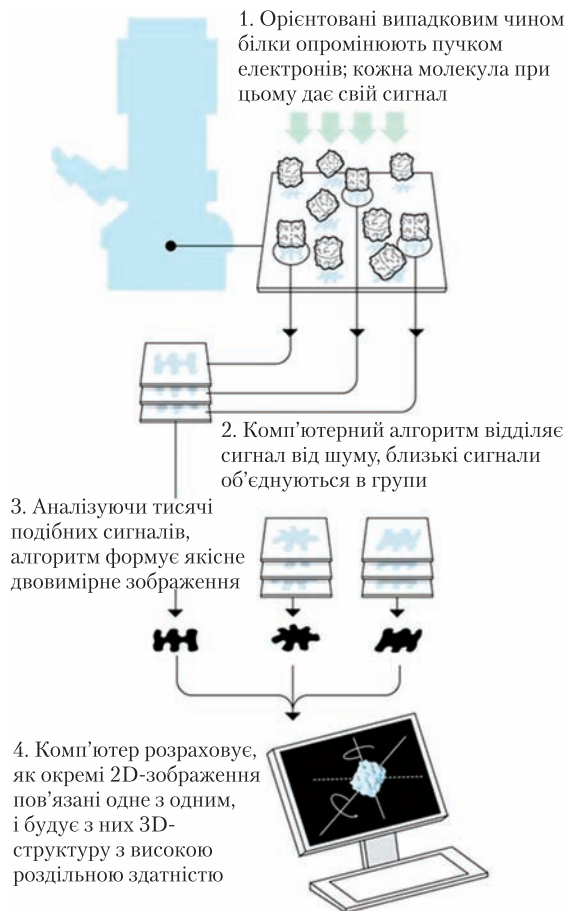


Рис. 2. Схема методу Й. Франка для побудови якісного 3D-зображення молекул (схема з сайту nobelprize.org)

скопів, а також проблеми, пов'язані з підготовкою зразків, які могли обмежувати роздільну здатність. Р. Гендерсон дійшов висновку, що на той час жоден з мікроскопів не був ідеальним. На його думку, конкретні технічні удосконалення та необхідна підготовка зразків полегшили б розроблення загальної методики крио-ЕМ: «Тоді це перетворило б методику, що ми використовуємо, на рутинний і швидкий метод, який можна використовувати на більш складних зразках, у тому числі на некристалічних молекулярних ансамблях» [30]. Автори вважали, що низькоінтенсивне, «щадне» електронне опромінення у фазоконтрастній електронній мікроскопії дозволить визначити двовимірне положення і тривимірну орієнта-

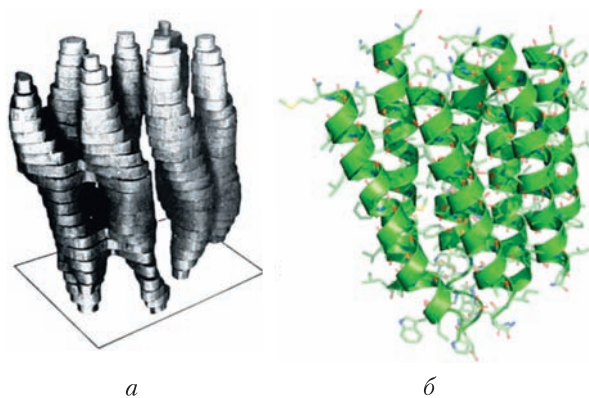


Рис. 3. Структура молекули бактеріородопсину: *a* — перша, доволі груба модель, опублікована Річардом Гендерсоном у 1975 р. в журналі *Nature*. **257**: 28; *b* — модель Р. Гендерсона з атомарною роздільною здатністю, опублікована в 1990 р. в роботі [30]

цію окремих частинок, навіть у разі їх досить великої молекулярної маси. Інформація дала б змогу усереднити ансамблі випадково розподілених частинок, досягаючи тим самим роздільної здатності на рівні атомів.

У сучасному світі удосконалення методів обробки зображень і комп'ютерних програм має велике значення. Наприклад, коли за допомогою нових електронних детекторів було досягнуто більш високої роздільної здатності, алгоритми методу максимальної правдоподібності [33] почали відігравати особливо важливу роль в електронній мікроскопії. Кріо-ЕМ з використанням моночастинок високих енергій — одночастинкова (*single part*) кріоелектронна мікроскопія — унікальна тим, що не потребує кристалізації, використовує дуже малу кількість матеріалу і охоплює широкий діапазон розмірів — від частинок розміром з молекулу гемоглобіну (64 кДа) до дуже великих частинок, розміром аж до кількох мільйонів дальтон. Для визначення структури ще більших за розміром об'єктів, таких як органели чи клітини, використовують кріоелектронну томографію, з тим, щоб у подальшому можна було отримувати інформацію з високою роздільною здатністю від молекул або комплексів безпосередньо в такому біологічному об'єкті, тобто *in situ* [34].

Отже, завдяки розробкам останніх 15–20 років у кріоелектронній мікроскопії значно підвищилася якість (рис. 4) і розширився діапазон розмірів об'єктів для визначення структури в розчині — від клітин і органел до молекулярних комплексів, молекул і атомів, з яких складаються ці молекули. Більш того, кріо-ЕМ дала змогу ідентифікувати біологічний об'єкт не лише в його статичному стані, а й у динаміці. Оскільки підготовка зразка для кріо-ЕМ пов'язана з миттєвим охолодженням розчину, а склад розчину може постійно змінюватися, ми можемо відстежувати стан системи в часі, наприклад вивчати інтегральні мембранні білки у стані, близькому до природного оточення. Інакше кажучи, ті чи інші частинки можуть бути «захоплені» у структурних підстанях або навіть під час дії, скажімо, в момент, коли фермент каталізує хімічну реакцію. Такі дані можуть надавати також і функціональну інформацію, відкриваючи можливості для контролю структурних змін, визначення діапазонів вільної енергії тощо [35–39].

Тому описані тут розробки, безумовно, заслуговують на найвищу оцінку. Однак особливу увагу привертає можливість впровадження результатів цих робіт у медичну практику. Очевидне порушення гармонійної взаємодії бодіомеостаза та екогостеостаза в останні десятиліття зумовило розширення спектра хвороб людини. Не викликає сумнівів, що в основі успішного лікування будь-якого захворювання лежить передусім розуміння характеру таких змін (причин і механізмів їх розвитку). Фактори, причетні до порушення фізіологічного стану людини, можуть бути різними, наприклад генетично детермінована спадковість, дія агресивних зовнішніх чинників, постійний психоемоційний тиск, вживання неякісних продуктів харчування і, як наслідок, порушення стану облігатної мікрофлори організму тощо. Все це призводить до розбалансованості функціонування так званого «золотого трикутника» забезпечення гомеостазу (здоров'я) людини, зокрема нейроімунно-ендокринного блока [40]. Це спричинює змінення фізіологічного профілю організму і на молекулярно-генетичному рівні зумовлює не-

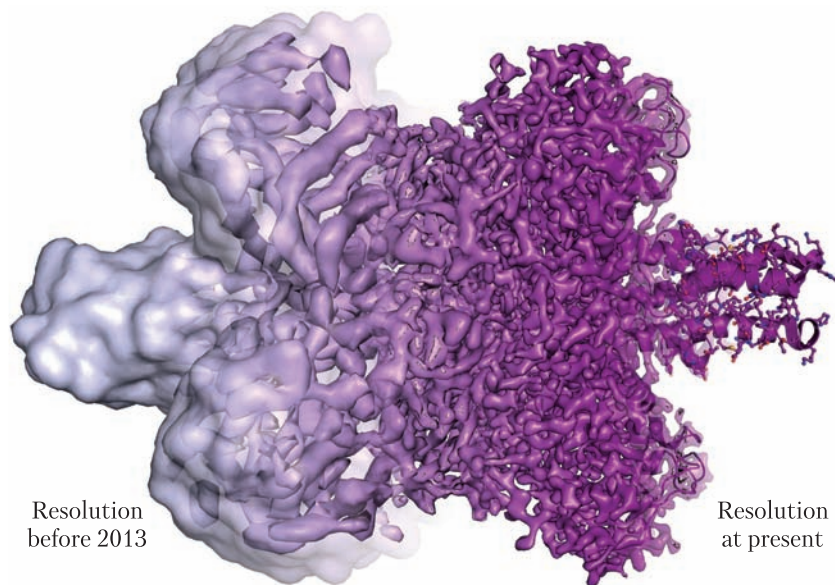


Рис. 4. Роздільна здатність електронного мікроскопа кардинально поліпшилася за останні роки — від зображення безформних плям (ліворуч) до візуалізації білків на атомарному рівні (праворуч) (схема з сайту nobelprize.org)

бажані зміни у формуванні дуже важливих для функціонування організму медіаторних регуляторних молекул (цитокінів).

Комплекси таких біологічно значущих молекул виступають як ліганди до відповідних рецепторів і мають важливе значення в процесі передачі хімічних сигналів. При цьому на тип створеного сигналу суттєво впливає відносна орієнтація двох взаємодіючих молекул. В умовах розвитку вищезазначеного «цитокінового шторму» [41] можуть з'являтися нові форми регуляторних сполук (білки, пептиди, амінокислотні залишки тощо). Не виключена також можливість зміни їх стандартної структури внаслідок так званого *misfolding*, тобто неправильного скручування, згортання. Інакше кажучи, може скластися така ситуація, що фізіологічна регуляторна активність молекули-ліганду може змінитися на патологічну [42]. Наразі доведено значущість зміни структури ряду регуляторних пептидів у розвитку певних патологій (див. табл.) [43].

Зараз уже загально визнано, що збільшення кількості хвороб, таких як хвороба Альцгейме-

ра, Паркінсона, діабет II типу, пріонові захворювання тощо, пов'язане з появою в організмі агрегатів білкового амілоїду в тканинах людини. До того ж частота цих захворювань зростає зі старінням людини, тобто на тлі істотної зміни профілю регуляторних медіаторів [44]. Точні механізми дії таких «білків захворювання»

Зв'язок неправильно згорнутих білків (*misfolding*) з нейродегенеративними захворюваннями

Протеїнопатія	Агрегуючі білки
Хвороба Альцгеймера	Бета-амілоїдний пептид (Ab); Tau
Хвороба Паркінсона	α -синуклеїн
Численні таупатії	Білок Тау (асоційований з мікротрубочками)
Хвороба Гантінгтона	Гантінгтин з тандемними повторами глютаміну
Аміотрофічний латеральний склероз	Супероксид дисмутази 1
Губчасті енцефалопатії	Пріонові білки
Сімейна амілоїдна полінейропатія	Транстиретин (мутантні форми)

достеменно невідомі, але доведено, що є кілька етапів їх існування: від початкового синтезу до деградації. При цьому не слід забувати про можливість біомолекул та їх комплексів екзогенного походження, до яких належать віруси, бактерії та продукти їх життєдіяльності, відігравати роль патогенетичних чинників.

Використання кріо-ЕМ у запропонованій нобелівськими лауреатами модифікації дозволяє вченим не тільки вивчати та ідентифікувати точну поверхневу архітектуру таких ендотекзогенних «агресивних» сполук (молекул), а й напрацьовувати різні шляхи пошуку їх молекул-антиподів, які будуть комплементарно з ними зв'язуватися та інгібувати їх активність. Це дає змогу по-новому підійти як до розуміння хімічних процесів, які відбуваються у природі взагалі, так і до розроблення відповідних лікарських препаратів. Лікувальне таргетування патогенних сполук визначає основні завдання, пов'язані з розробленням лікарських препаратів та врахуванням динамічної природи білків, залучених до процесу таргетування. Це стосується визначення форми білків (мономери, олігомери або нерозчинні агрегати) певного захворювання, які відповідають за клітинну токсичність; з'ясування, які компоненти катіонного протеостатичного механізму взаємодіють з білками цих хвороб, тощо. Інакше кажучи, потрібно мати точне зображення структури-матриці (молекули), з якої в той чи інший спосіб належить зробити відбиток необхідної форми. Застосування методів, запропонованих Ж. Дюбоше, Й. Франком та Р. Гендерсоном, значно спрощує і полегшує отримання зображень таких біологічних молекул. Використовуючи високу роздільну здатність цього методу, в майбутньому дослідники зможуть не лише отримувати інформацію про структуру молекул, а й спостерігати особливості їх взаємодії і за потреби — коригувати розвиток процесів, що відбуваються всередині клітин або органел.

Учені постійно отримують нові знання про механізми різних захворювань, удосконалюють засоби моделювання стану захворювань *in vitro* та *in vivo*, виявляють нові біомаркери. З використанням запропонованого методу кріо-ЕМ відкривається перспектива розроблення таких терапевтичних засобів, які зможуть запобігти, завадити або затримати прогресування захворювань. Завдяки точній візуалізації структури розширюється коло застосувань нанотехнологій, наприклад створення наномашин, які інактивуватимуть патогенну активність тих чи тих структур.

І насамкінець. Підтвердженням значущості досліджень, які минулого року було відзначено Нобелівською премією, можуть бути яскраві висловлювання видатних науковців. Так, Венкі Рамакришнан, експерт зі структурної біології Лабораторії медичних досліджень молекулярної біології, лауреат Нобелівської премії з хімії 2009 р. (за дослідження в галузі рентгенівської кристалографії), оцінив цю подію як «революцію у структурній біології». Холгер Старк, експерт з кріо-ЕМ, який очолює Інститут біофізичної хімії імені Макса Планка в Геттингені (Німеччина), зазначив, що в останні роки роздільна здатність методу різко підвищилася і дозволяє побачити не тільки контур хребта білка, а й відгалужені гілки амінокислоти. Тобто науковці вже мають необхідні дані для розуміння хімічної дії білка, і це, безумовно, сприятиме створенню нових ліків. Баррі Фуллер, професор хірургічних наук у медичній школі Університетського коледжу Лондона, підкреслив, що «ця технологія спрямована на виявлення біомолекул у життєвому процесі, «замороженому» в часі. Знання про конфігурації та стабільність біомолекул за наднизьких температур може прискорити досягнення вчених у галузі кріобіології, спрямовані на вітрифікування тканин та органів людини для наступного їх зберігання протягом тривалого часу».

REFERENCES

[СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ]

1. Robards A.W., Sleytr U.B. *Low temperature methods in biological electron microscopy* (Practical methods in electron microscopy). (Amsterdam–New York–Oxford: Elsevier, 1985).
2. Author's certificate USSR No. 399937. Kabylyakov V.A., Kapreliantz A.S., Pushkar N.S. et al. An electron microscope-analyzer of a translucent type, for example, of biological objects. 1973.
[А.с. СССР № 399937. Кабыляков В.А., Капрельянц А.С., Пушкарь Н.С. и др. Электронный микроскоп-анализатор просвечивающего типа, например биологических объектов. 1973.]
3. Author's certificate USSR No. 557288. Pankov E.Ya., Kapreliantz A.S., Zhuravlev V.S., Chemeris I.I., Kabylyakov V.A. Method for processing biological samples for cryo-ultratomy. 1977.
[А.с. СССР № 557288. Панков Е.Я., Капрельянц А.С., Журавлев В.С., Чемерис И.И., Кабыляков В.А. Способ обработки биологических образцов для криоультратомии. 1977.]
4. Author's certificate USSR No. 690360. Kaprelyants A.S., Zhuravlev V.S., Repin N.V. Cryo-ultratome. 1979.
[А.с. СССР № 690360. Капрельянц А.С., Журавлев В.С., Репин Н.В. Криоультратом. 1979.]
5. Author's certificate USSR No. 1157597. Repin N.V., Skornyakov B.A., Khramtsov V.P., Vaysman A.L. Device for fracturing biological objects in vacuum. 22.01.1985.
[А.с. СССР № 1157597. Репин Н.В., Скорняков Б.А., Храмов В.П., Вайсман А.Л. Устройство для скалывания биологических объектов в вакууме. 22.01.1985.]
6. Itkin Yu.A., Bronshtein V.L., Rozanov L.F. Study of the effect of ice structure on dehydration process and intracellular crystallization during freezing of cell suspension. *Kriobiologiya i Kriomeditsina (Cryobiology and Cryomedicine)*. 1977. (3): 35.
[Иткин Ю.А., Бронштейн В.Л., Розанов Л.Ф. Изучение влияния структуры льда на процесс обезвоживания и внутриклеточную кристаллизацию при замораживании клеточной суспензии. *Криобиология и криомедицина*. 1977. Вып. 3. С. 35–41.]
7. Repin N.V. Study of extra- and intracellular crystallization in human erythrocytes under different cooling conditions. *Kriobiologiya (Cryobiology)*. 1986. (3): 31.
[Репин Н.В. Изучение вне- и внутриклеточной кристаллизации в эритроцитах человека при различных условиях охлаждения. *Криобиология*. 1986. № 3. С. 31–36.]
8. Zinchenko A.V., Mank V.V., Ovcharenko F.D., Repin N.V., Skornyakov B.A. Structure and phase states of water-glycerol solutions. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. 1982. Ser. B. (8): 38.
[Зинченко А.В., Манк В.В., Овчаренко Ф.Д., Репин Н.В., Скорняков Б.А. Строение и фазовые состояния водно-глицериновых растворов. *Доп. АН УРСР*. 1982. Сер. Б, № 8. С. 38–42.]
9. Yurchenko T.N., Kozlova V.F., Skornyakov B.A., Strona V.I., Repin N.V. *Influence of cryoprotectants on biological systems*. (Kyiv: Naukova Dumka, 1989).
[Юрченко Т.Н., Козлова В.Ф., Скорняков Б.А., Строна В.И., Репин Н.В. *Влияние криопротекторов на биологические системы*. К.: Наук. думка, 1989.]
10. Repin N.V. To the question about two-step rapid freezing method. Estimation of aqueous membrane permeability in erythrocytes at temperature exposure stage. *CryoLetters*. 2009. (4): 251.
11. Haas D.J. X-ray studies on lysozyme crystals at -50°C . *Acta Cryst. B*. 1968. **24**: 604.
12. Haas D.J., Rossmann M.G. Crystallographic studies on lactate dehydrogenase at -75°C . *Acta Cryst.* 1970. **26**: 998.
13. Taylor K.A., Glaeser R.M. Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science*. 1974. **186**(4168): 1036.
<http://dx.doi.org/10.1126/science.186.4168.1036>
14. Taylor K.A., Glaeser R.M. Electron microscopy of frozen hydrated biological specimens. *J. Ultrastruct. Res.* 1976. **55**(3): 448. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5320\(76\)80099-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-5320(76)80099-8)
15. Schmidt P.J., Basile J. Luyet and the beginnings of transfusion cryobiology. *Transfus. Med. Rev.* 2006. **20**(3): 242.
<https://doi.org/10.1016/j.tmr.2006.03.004>
16. Dowell L.G., Rinfret A.P. Low-temperature forms of ice as studied by X-ray diffraction. *Nature*. 1960. **188**(4757): 1144. <http://dx.doi.org/10.1038/1881144a0>
17. Brüggeller P., Mayer E. Complete vitrification in pure liquid water and dilute aqueous solutions. *Nature*. 1980. **288**(5791): 569. <http://dx.doi.org/10.1038/288569a0>
18. Repin N.V., Skornyakov B.A. Methodological features and technical support of the method of freeze-fracturing. *Kriobiologiya i Kriomeditsina (Cryobiology and Cryomedicine)*. 1982. **10**: 89.

- [Репин Н.В., Скорняков Б.А. Методические особенности и техническое обеспечение метода замораживания-скальвания. *Криобиология и криомедицина*. 1982. Вып. 10. С. 89–92.]
19. Dubochet J., Adrian M., Chang J.-J., Homo J.-C., Lepault J., McDowell A.W., Schultz P. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* 1988. **21**(2): 129. <http://dx.doi.org/10.1017/S0033583500004297>
 20. Adrian M., Dubochet J., Lepault J., McDowell A.W. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature*. 1984. **308**(5954): 32. <http://dx.doi.org/10.1038/308032a0>
 21. Beck M., Baumeister W. Cryo-electron tomography: can it reveal the molecular sociology of cells in atomic detail? *Trends Cell Biol.* 2016. **26**(11): 825. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2016.08.006>
 22. Frank J. Averaging of low exposure electron micrographs of non-periodic objects. *Ultramicroscopy*. 1975. **1**(2): 159. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3991\(75\)80020-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3991(75)80020-9)
 23. Saxton W.O., Frank J. Motif detection in quantum noise-limited electron micrographs by cross-correlation. *Ultramicroscopy*. 1977. **2**: 219. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3991\(76\)91385-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3991(76)91385-1)
 24. Frank J., Goldfarb W., Eisenberg D., Baker T.S. Reconstruction of glutamine synthetase using computer averaging. *Ultramicroscopy*. 1978. (3): 283. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3991\(78\)80038-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3991(78)80038-2)
 25. van Heel M., Frank J. Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy*. 1981. (6): 187. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3991\(81\)90059-0](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3991(81)90059-0)
 26. Frank J., van Heel M. Correspondence analysis of aligned images of biological particles. *J. Mol. Biol.* 1982. (161): 134. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90282-0](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(82)90282-0)
 27. Radermacher M., Wagenknecht T., Verschoor A., Frank J. A new 3D reconstruction scheme applied to the 50s ribosomal subunit of *E. coli*. *J. Microsc.* 1986. (141): RP1. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.1986.tb02693.x>
 28. Radermacher M., Wagenknecht T., Verschoor A., Frank J. Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *J. Microsc.* 1987. (146): 113. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.1987.tb01333.x>
 29. Radermacher M. Dreidimensionale Rekonstruktion bei kegelförmiger Kippung im Elektronenmikroskop. Thesis, Technical University, Munich, 1980. http://www.uvm.edu/%7Emraderma/thesis/M_Radermacher_PhD_Thesis.pdf
 30. Henderson R., Baldwin J.M., Ceska T.A., Zemlin F., Beckmann E., Downing K.H. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 1990. (213): 899. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80271-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80271-2)
 31. Nogales E., Wolf S.G., Downing K.H. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*. 1998. (391): 199. <http://dx.doi.org/10.1038/34465>
 32. Murata K., Mitsuoka K., Hiral T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A., Fujiyoshi Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*. 2000. (407): 599. <http://dx.doi.org/10.1038/35036519>
 33. Scheres S.H.W., Gao H., Valle M., Herman G.T., Eggermont P.P.B., Frank J., Carazo J.M. Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nature Methods*. 2007. (4): 27. <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth992>
 34. Oikonomou C.M., Jensen G.J. Cellular electron cryotomography: toward structural biology in situ. *Annu. Rev. Biochem.* 2017. (86): 873. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044741>
 35. Rubinstein J.L. Cryo-EM captures the dynamics of ion channel opening. *Cell*. 2017. (168): 341. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.011>
 36. Fischer N., Konevega A.L., Wintermeyer W., Rodnina M.V., Stark H. Ribosome dynamics and tRNA movement by time-resolved electron cryomicroscopy. *Nature*. 2010. (466): 329. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09206>
 37. Hite R.K., MacKinnon R. Structural titration of Slo2.2, a Na^+ -dependent K^+ channel. *Cell*. 2017. (168): 390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.030>
 38. Zhao J., Benlekhir S., Rubinstein J.L. Electron cryomicroscopy observation of rotational states in a eukaryotic V-ATPase. *Nature*. 2015. (521): 241. <http://dx.doi.org/10.1038/nature14365>
 39. Dashti A., Ben Hail D., Mashayekhi G., Schwander P., des Georges A., Frank J., Ourmazd A. Conformational dynamics and energy landscapes of ligand binding in RyR1. *bioRxiv*, 2017. <http://dx.doi.org/10.1101/167080>
 40. Goltsev A.N., Popova K.N., Sirous M.A. Cryopreservation as optimizing factor in therapeutic effect of products of embryofetoplacental complex (PEFPC). Part 1. Pathology of autoimmune genesis as assessment model of therapeutic effect of PEFPC application. *Probl. Criobiol.* 2006. **16**(3): 326.

[Польцев А.Н., Попова К.Н., Сироус М.А. Криоконсервирование – фактор оптимизации терапевтического эффекта продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса (ПЭФПК). Часть 1. Патология аутоиммунного

- генеза как модель оценки терапевтического эффекта применения ПЭФПК. *Проблемы криобиологии*. 2006. Т. 16, № 3. С. 326–340.]
41. Grischenko V.I., Goltsev A.N. Transplantation of the products of embryofetoplacental complex. From understanding of mechanism of the effect to increasing the efficiency of application. *Probl. Cryobiol.* 2002. (1): 54.
[Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения. *Проблемы криобиологии*. 2002. № 1. С. 58–54.]
42. Meng X.-Y., Zhang H.-X., Mezei M., Cui M. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr. Comput. Aided Drug Des.* 2011. **7**(2): 146. <http://dx.doi.org/10.2174/157340911795677602>
43. Sweeney P., Park H., Baumann M., Dunlop J., Frydman J. et al. Protein misfolding in neurodegenerative diseases: implications and strategies. *Transl. Neurodegener.* 2017. **6**: 6. <http://dx.doi.org/10.1186/s40035-017-0077-5>
44. Vozianov A.F., Butenko A.K., Zak K.P. *Cytokines. Biological and antitumour properties*. (Kyiv: Naukova Dumka, 1998).
[Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. *Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства*. К.: Наук. думка, 1998.]

Стаття надійшла 25.01.2018

A.M. Goltsev

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv)

CRYOBIOLOGICAL PEDESTAL OF THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY FOR 2017

The article explained the core messages of the research of the Nobel Prize winners in chemistry for 2017 Jacques Dubochet, Joachim Frank, and Richard Henderson. The development of cryo-electron microscopy research was presented in historical retrospective. There was substantiated the importance of this discovery for the current scientific community. The main advantages of using a high-resolution cryo-electron microscopy for determining the structure of biomolecules in solution were outlined. The review considered the practical importance of this research for medicine and biotechnology, namely in designing novel therapeutic drugs and identification of new diseases.

Keywords: Nobel Prize, cryo-electron microscopy, image, structure of biomolecule, novel drugs.