

ФЕРМЕНТАТИВНИЙ СПІН-КАТАЛІЗ У ФЛАВІН-ВМІСНИХ ОКСИДАЗАХ ТА МАГНІТНА ОРІЄНТАЦІЯ ПТАХІВ

Спін-каталіз – це прискорення хімічної реакції за рахунок магнітних спінових взаємодій шляхом зміни повного спіну реакційної системи молекул. У даній роботі розглянуто особливості електронної будови флавіннуклеотидів, що пояснюють магнітну чутливість флавінових протеїнів у криптохромах. Обговорюється наступний тип спін-каталізу: електрон-ядерна спін-спінова взаємодія у радикальній парі створеній у криптохромі з окисненому аніон-радикалу ФАД та триптофан катіону. Всі ці типи магнітних збурень приводять до синглет-триплетних переходів в радикальних парах сформованих флавіннуклеотидами і обумовлюють зовсім різні магніточутливі біологічні явища.

Ключові слова: флавіннуклеотиди, ФАД, криптохроми, спін-орбітальна взаємодія, надтонка структура ЕПР, електрон-ядерна спін-спінова взаємодія

Постановка проблеми. Вчені давно задумувались над питанням, чому птахи здійснюють багатотисячні перельоти з півночі на південь не збиваючись з шляху. Орієнтуватись на місцевості на таких відстанях по згинах рік або контурах гір практично неможливо: як птахи можуть тримати в пам'яті складну карту всієї Земної кулі?

Магнітне поле Землі являє собою напругу, яка охоплює всю земну кулю і ближчий простір навколо неї, тобто надає інформацію про напрямок магнітних силових ліній. Людина використовує її за допомогою компасу для навігації та орієнтації в просторі океану чи літаку в небі. Чи можуть птахи та інші тварини також використовувати магнітне поле Землі для орієнтації у просторі?

Аналіз останніх публікацій. Нині експериментально доведено, що мігруючі птахи визначають напрямок поля, використовуючи специфічне чуття функціонування магнітного компасу, яке ґрунтується не лише на полярності поля (північ-південь), а і на його нахилі. Поєднання успадкованого міграційного напрямку і компасного чуття молодого птаха достатньо для того, щоб під час своєї першої осінньої міграції знайти свій шлях, наприклад, з Верхнього Придніпров'я до Африки. Однак, щоб знайти таке ж саму породу і місце зимування з року в рік, як це роблять дорослі птахи, необхідна справжня навігація, яка вимагає не лише компас, але також і карту. Чуття карти є багатофакторним, і різні сигнали можуть бути використані на різних етапах завдання самонаведення. Однак, магнітна інформація може бути корисною частиною чуття карти, особливо на великих відстанях, і спостерігається все більша кількість доказів того, що нічні перелітні птахи можуть визначати їх приблизне розташування на Землі, використовуючи геомагнітну інформацію. Нині, реакція нічних перелітних птахів на геомагнітні сигнали є досить добре вивченою і багато птахів, як видається, мають як магнітний компас так і магнітну карту. З іншого ж боку, розуміння основних біофізичних механізмів залишається однією з найважливіших проблем сенсорної біології, над якою інтенсивно працюють вчені багатьох країн з використанням самих сучасних теоретичних та експериментальних методів [1-3].

Провідна гіпотеза геомагнітного зондування, на якій ми зосереджуємо увагу, включає в себе магніточутливі хімічні проміжні утворення, відомі також як радикальні пари (РП), а у птахів цей механізм, здається, лежить в основі чуття магнітного компасу. В сучасній біохімії відомо, що РП утворені в дихальному ланцюзі за участю оксидаз є дуже важливими в механізмах біо-активації кисню і ця стадія радикальних пар є чутливою до внутрішніх магнітних взаємодій [4].

Загальна теорія магнітних взаємодій в РП була розвинена при аналізі спінової поляризації ядер і електронів, а також була застосована при поясненні впливу магнітного поля на хімічні реакції за участю радикалів і значний внесок в цю теорію дали Бучаченко А.Л., Сагдеев Р.З., Молін і Саліхов К.М. [5].

Цитоплазматичні ензими, що окислюють органічні субстрати за допомогою молекулярного кисню (триплетна молекула O_2 , що переноситься гемоглобіном через альвеоли легень із повітря) зазвичай використовують флавоноклеотиди в якості простетичної групи. Саме ці групи здатні активувати триплетний кисень, тобто допомагати йому долати заборону за спіном при окисненні білків, жирів та інших діаманітних органічних речовин [6]. Якщо ці реакції протікають в звичайному, суто діаманітному клітинному середовищі без участі радикально-ланцюгових процесів [7-9], то триплетний стан кисню є прямою перешкодою для окиснення і для активації O_2 необхідне магнітне збурення. З іншого боку, відомо, що флавопротеїди в складі криптохромів проявляють магнітну чутливість під дією світла, характерну для деяких тварин і птахів. Флавінаденіндинуклеотид (ФАД) та інші флавопротеїни можна віднести до самих універсальних коензимів які активні не лише в біологічному окисненні, а і в цілому ряді інших важливих біопроеесів [9]. Ці речовини, побудовані на основі рибофлавіну (вітаміну B_2), вони входять до складу флавопротеїдів, в яких вони міцно зв'язані з білками і здійснюють перетворення з окисленої форми в відновлену і навпаки, залишаючись прикріпленими до однієї і тієї ж молекули білка. Всі молекули, дані на Рис. 1, можна враховувати як моделі активного центру ФАД в ензимах, тому що саме ізоалоксазинове кільце з його розвинутою π -системою [9] визначає окисно відновні та електронні властивості ФАД.

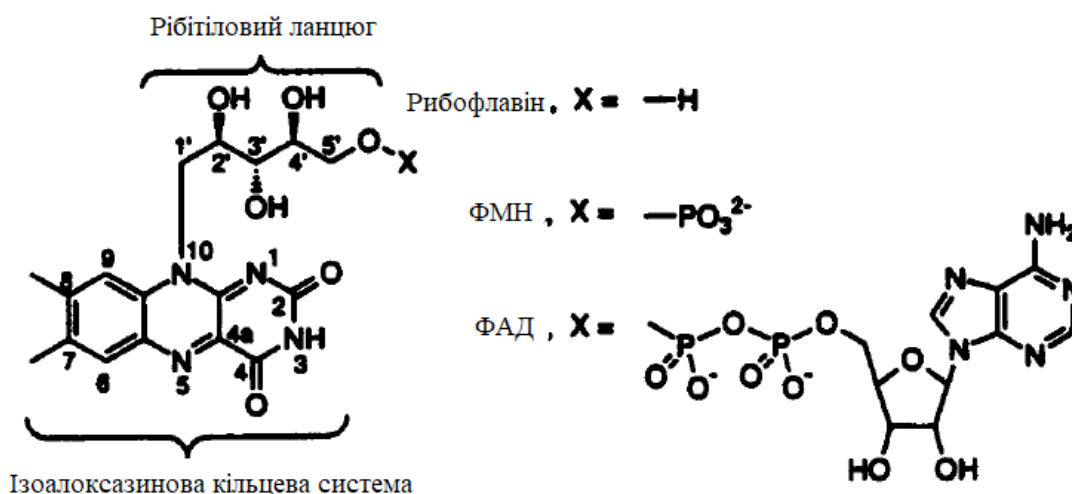


Рис. 1. Модель активного центру ФАД.

Найпростішими флавопротеїдами є оксидази, кожна з яких складається лише з білка і флавіннуклеотиду. Вони окислюють субстрат за рахунок перенесення електрону на кисень і виникнення відносно сильної спін-орбітальної взаємодії в супероксид-іоні, яка індукує триплет-синглетний квантовий перехід в реакційній системі, знімаючи спінову заборону [6-8].

Такий же ФАД входить до складу криптохромів, світлочутливих білків рослин і тварин, які дають клітинам можливість сприймати синє і ультрафіолетове світло. Відомо, що криптохроми під дією світла можуть здійснювати магніторецепцію [1-3] (від англ. magnetoreception) — відчуття, яке надає організму можливість відчувати магнітне поле, що дозволяє визначати напрямок руху, висоту або місцеположення на місцевості.

Мета статті. Для радикальних пар, які містяться в криптохромі птахів розрахувати спінову густину в окремих радикалах – аніон-радикалі ФАД і катіон-радикалі триптофану. На цій основі оцінити електронно-ядерні надтонкі взаємодії (НТВ) типу контактної взаємодії Фермі. Використовуючи теорію Хорі [1] оцінити вплив магнітного поля на орієнтацію птахів через нейронні мережі.

Матеріал та методи

При виконанні поставленої мети дослідження було використано метод 3D-візуалізації з використанням розрахункового програмного комплексу HyperChem 7.51 для квантового-хімічного моделювання ФАД і триптохрому за методом РМ3 [9], та програмний комплекс Gaussian для оптимізації молекули ФАД за обмінно-кореляційним функціоналом B3LYP в базисі 6-31G (d) [7].

Результати та обговорення

Для того щоб реакції з утворенням діаманітних продуктів могли здійснюватися вчасно, необхідний переверт одного з спінів на стадії РП, тобто триплет-синглетний (Т-S) квантовий перехід. Такий перехід індукується спін-орбітальною взаємодією (СОВ), тобто магнітною взаємодією, обумовленою орбітальним і спіновим рухом електронів. При цьому електрон з π_x орбіталі «стрибає» на π_y МО кисню, створюючи на мить орбітальний магнітний момент, який впливає на спін (матричний елемент СОВ між Т-S станами) і перевертає його [6-9]. Такі процеси в оксидазах йдуть без участі зовнішнього магнітного поля.

Магнітне поле Землі (5-10 Гс) не може суттєво впливати на реакції за участю радикальних пар, якщо у будь-якому радикалі відсутні надтонкі спінові взаємодії. Це не є серйозним обмеженням: майже кожен біологічно важливий радикал має один або декілька атомів водню та азоту в сусідстві з неспареним електроном. Важливо усвідомлювати, що неспарений електрон у радикалі зазвичай магнітно взаємодіє з декількома ядрами одночасно, частково через те, що він є делокалізованим, тобто розмазується над частиною молекули і частково через те, що електронно-ядерні спін-спінові взаємодії можуть бути суттєвими на відстанях до 4 Å. Наприклад, на рис. 2 показано форму молекулярних орбіталей, що містять неспарені електрони у флавінових та триптофанових радикалах, утворених фотоіндукованим електронним перенесенням в криптохромах. Неспарений електрон має значну ймовірність знаходитись близько майже до всіх атомів вуглецю та азоту, які утворюють ароматичні ізоалоксозини та індолі групи радикалів флавіну та триптофану. Фіолетові та зелені поверхні, зосереджені на кожному з атомів водню та азоту, чим більшою та менш сферичною є поверхня, тим сильніші та більш виражена анізотропія надтонкої взаємодії. В [1-3] доведено вплив слабого магнітного поля на Т-Сквантові переходи в таких РП з урахуванням надтонких взаємодій.

В табл. 1 наведено значення зарядів на атомах та спінову густину в відповідних аніон та катіон радикалах. Сума зарядів в табл. 1 зліва і справа дорівнює -1 та $+1$. Такі заряди на атомах добре пояснюють силу міжмолекулярних взаємодій, що спостерігається при координації радикалів в білковій оболонці криптохрому. Як видно з табл. 1 в аніон-радикалі ФАД спостерігається сильна поляризація зарядів (плюси на атомах С15, С13 і N11; в той же час атоми кисню карбонільних груп мають великі негативні заряди). Атом N12 також має величезний мінус ($-0.387e$). При цьому спінова густина на ньому надзвичайно мала. Оскільки в криптохромі розглядається аніон окисленого ФАДу ми бачимо, що атом нітрогену N8 має величезну спінову густину, як і атоми С2, С4 і С6 бензольного кільця.

Таблиця 1

Значення зарядів на атомах та розподіл спінової густини у радикалі флавін аніону (зліва) та радикалі триптофан катіона (справа)

№ п/п	q, (e)	$\rho(r), e \cdot a_0^{-3}$
O1	-0.4321	0.053
C2	-0.0900	0.494
C3	-0.0948	-0.413
C4	-0.1083	0.485
C5	-0.1370	-0.387
C6	-0.1324	0.386
C7	-0.0455	-0.364
N8	-0.0293	0.479
C9	-0.3601	0.104
C10	0.0914	0.027
N11	0.1835	0.113
N12	-0.3874	0.027
C13	0.2998	0.001
N14	-0.0819	-0.017
C15	0.3443	-0.007
C16	-0.0538	0.043
C17	-0.0483	-0.052
C18	-0.1312	-0.003
O21	-0.4592	0.024

№ п/п	q, (e)	$\rho(r), e \cdot a_0^{-3}$
C1	-0.0908	0
N2	-0.0036	0.001
C3	0.2240	-0.002
C4	-0.0855	0.026
C5	-0.1122	-0.052
C6	0.0705	0.557
C7	-0.1979	-0.098
N8	0.5610	0.377
C9	-0.2751	-0.021
C10	-0.1262	-0.203
C11	0.0361	0.26
C12	-0.0523	-0.071
C13	-0.0495	0.093
C14	0.0318	0.11
O15	-0.3542	0.001
N16	-0.0482	0.015
C17	-0.0983	0.002

Навпаки, інші атоми цього кільця несуть негативну спінову густину, тобто неспарений спін розмазаний в аніоні таким чином, що доля спіну «вверх і вниз» розподілена майже рівномірно. З точки зору впливу магнітного поля всі ці атоми важливі для індукування T-S переходу в радикальній парі. Тоді в катіон-радикалі триптофану звертає на себе увагу величезна спінова густина на атомі N8 (табл. 1), а також великий позитивний заряд на ньому. Саме він та 13-ий ізотоп C6 створюють сильні магнітні збурення за рахунок надтонкої взаємодії, які в кінцевому рахунку впливають на C-T перехід в РП. Це якісно показано на Рис. 2, на якому фіолетовий та зелений кольори відображають хвильові функції неспарених електронів з протилежними знаками.

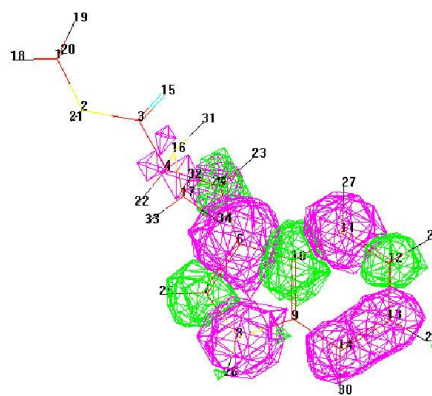
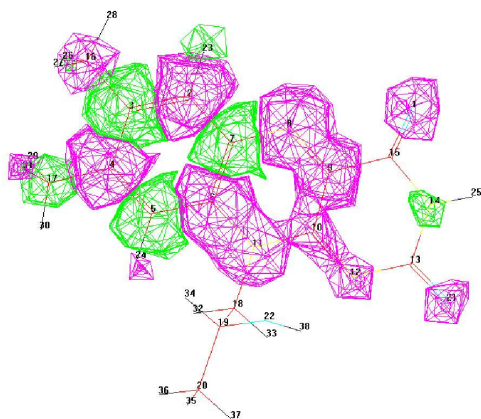


Рис. 2. Зображення молекулярних орбіталей з одним неспареним електроном у радикалі флавін-аніону та радикалі триптофан-катиона та використана в роботі нумерація атомів.

В обох випадках, електрони розмазані нерівномірно по всій ароматичній частині радикалу. Для спрощення обрахунків замість довгих побічних ланцюгів у ФАД було використано насичену групу $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$.

Таблиця 2

Значення енергій усіх зайнятих орбіталей молекули ФАД

№ п/п	E(a.o.)	E(eV)	№ п/п	E(a.o.)	E(eV)	№ п/п	E(a.o.)	E(eV)	№ п/п	E(a.o.)	E(eV)	№ п/п	E(a.o.)	E(eV)
1	-19.127	-520.449	2	-19.114	-520.086	3	-14.430	-392.633	4	-14.376	-391.174	5	-14.373	-391.102
6	-14.328	-389.853	7	-10.314	-280.654	8	-10.304	-280.379	9	-10.302	-280.311	10	-10.272	-279.491
11	-10.262	-279.229	12	-10.250	-278.895	13	-10.242	-278.675	14	-10.235	-278.490	15	-10.223	-278.159
16	-10.220	-278.098	17	-10.215	-277.954	18	-10.211	-277.829	19	-10.205	-277.670	20	-1.060	-28.838
21	-1.036	-28.194	22	-1.031	-28.048	23	-0.962	-26.175	24	-0.943	-25.658	25	-0.904	-24.594
26	-0.880	-23.936	27	-0.805	-21.908	28	-0.795	-21.620	29	-0.763	-20.760	30	-0.738	-20.092
31	-0.725	-19.720	32	-0.685	-18.650	33	-0.663	-18.054	34	-0.628	-17.078	35	-0.624	-16.971
36	-0.600	-16.328	37	-0.575	-15.656	38	-0.558	-15.171	39	-0.526	-14.318	40	-0.512	-13.936
41	-0.504	-13.715	42	-0.488	-13.282	43	-0.475	-12.932	44	-0.463	-12.605	45	-0.460	-12.521
46	-0.459	-12.480	47	-0.456	-12.406	48	-0.431	-11.725	49	-0.425	-11.566	50	-0.422	-11.488
51	-0.420	-11.428	52	-0.416	-11.320	53	-0.414	-11.255	54	-0.409	-11.128	55	-0.398	-10.842
56	-0.378	-10.294	57	-0.375	-10.202	58	-0.369	-10.028	59	-0.353	-9.618	60	-0.316	-8.605
61	-0.301	-8.198	62	-0.280	-7.622	63	-0.273	-7.421	64	-0.267	-7.260	65	-0.266	-7.246
66	-0.252	-6.866	67	-0.231	-6.278									

В табл. 2, 3 наведено значення енергій зайнятих та вакантних орбіталей, відповідно, для молекули ФАД, розраховані методом теорії функціоналу густини (ТФГ). Перші зайняті молекулярні орбіталі (МО) дають енергії рентгенівського поглинання молекулою ФАД; вони приведені вперше і можуть бути використовані для аналізу рентгенівських спектрів ФАД.

Таблиця 3

Значення енергій нижчих вакантних орбіталей молекули ФАД

№ п/п	E(a.o.)	E(eV)	№ п/п	E(a.o.)	E(eV)	№ п/п	E(a.o.)	E(eV)	№ п/п	E(a.o.)	E(eV)	№ п/п	E(a.o.)	E(eV)
68	-0.105	-2.856	69	-0.039	-1.069	70	-0.015	-0.400	71	0.015	0.397	72	0.042	1.140
73	0.069	1.887	74	0.081	2.202	75	0.100	2.733	76	0.109	2.957	77	0.116	3.143

Верхня зайнята МО (з оберненим знаком) дає потенціал іонізації ФАД (6,27 eV), що добре узгоджується з експериментом. В свою чергу нижча вакантна МО визначає електронну спорідненість молекули (2,86 eV). Саме ця енергія виділяється при утворенні аніон-радикалу. З табл. 3 видно, що енергія наступної вакантної орбіталі ($E_{69} = -1,07$ eV) лежить набагато вище, що і пояснює легкість утворення радикалу. Значення енергій МО молекули ФАД важливі для експериментальної перевірки ряду спектральних і електрохімічних властивостей цього, дуже вагомого, біологічного коферменту ряду ензимів. Оскільки метод ТФГ більш точний ніж метод РМЗ ми привели результати енергій МО, тому що вони підтверджують результати розрахунку РМЗ для валентних орбіталей ФАД.

Враховуючи спінову густину в аніон- і катіон-радикалах РІ криптохрому, нами розраховані константи надтонкої взаємодії для всіх ядер обох радикалів. На основі теорії

РП [1-3, 5] проведено оцінку швидкості Т-С переходу в розділеній парі радикалів аніону ФАД та катіону триптофану. Наші розрахунки підтверджують загальну картину кінетики спінових переходів в слабкому магнітному полі, яку запропоновано в роботі [1].

Висновки

1. Квантово-хімічні розрахунки ФАД підтверджують теорію ферментативного спін-каталізу в оксидазах за рахунок специфічної структури молекулярних орбіталей цієї молекули і її окислених і відновлених форм.

2. Вперше наведено розрахунки всіх молекулярних орбіталей ФАД на основі теорії функціоналу густини, включаючи енергії рентгенівських і валентних електронів, що підтверджує справедливість використання наближення РМЗ для цієї молекули.

3. Розраховані аніон ФАД та катіон триптофану з оптимізацією геометрії і аналізом розподілу зарядів на атомах і спінової густини.

4. Заряди на атомах пояснюють силу міжмолекулярних взаємодій при координації радикалів в білковій оболонці криптохрому.

5. Спінова густина на атомах нітрогену створює великі значення надтонких магнітних електрон-ядерних взаємодій, що визначає достатню константу швидкості синглет-триплетного переходу навіть в слабкому магнітному полі Земної кулі.

Література

1. Hore P. J., Mouritsen H. The Radical-Pair Mechanism of Magnetoreception / P. J. Hore, H. Mouritsen // *Annu Rev Biophys*, – 2016. – Vol. 45. – P. 299-344.
2. Solov'yov I. A., Chandler D. E., Schulten K. Exploring the possibilities for radical pair effects in cryptochrome / I. A. Solov'yov, D. E. Chandler, K. Schulten // *Plant Signal Behav*, – 2008. – Vol. 3(9). – P. 676-677.
3. Solov'yov I. A., Mouritsen H., Schulten K. The Radical-Pair Mechanism of Magnetoreception / I. A. Solov'yov, H. Mouritsen, K. Schulten // *Biophysical Journal*, – 2010. – Vol. 99. – P. 40-49.
4. Минаев Б. Ф. Спин-катализ в процессах фото- и биоактивации молекулярного кислорода / Б. Ф. Минаев // *Укр. біохім. журн.* – 2009. – Т. 81, № 3. – С. 22–45.
5. Бучаченко А. Л., Молин Ю. Н., Сагдеев Р. З., Салихов К. М., Франкевич Е. Л., Магнитно-спиновые эффекты в химических реакциях / А. Л. Бучаченко, Ю. Н. Молин, Р. З. Сагдеев, К. М. Салихов, Е. Л. Франкевич // «Успехи физических наук». – 1987. – Т. 151, № 1, С. 173-174.
6. Minaev. B. F. Spin effects in reductive activation of O₂ by oxidase enzymes / B. F. Minaev // *RIKEN Rev.* – 2002. – Vol. 44. – p. 147-149.
7. R. Prabhakara, E. M. Siegbahna, B. F. Minaev A theoretical study of the dioxygen activation by glucose oxidase and copper amine oxidase / R. Prabhakara, E. M. Siegbahna, B. F. Minaev // *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics.* – 2003. – Vol. 1647, Issues 1–2. – p. 173-178.
8. Б. Ф. Минаев, Электронные механизмы активации молекулярного кислорода / Минаев Б. Ф., Усп. хим., – 2007. – Т. 76. – Вып. 11. – с. 1059–1083.
9. Минаев Б. Ф. Модели электронного строения флавопротеидов и механизм действия оксидаз / Б. Ф. Минаев, В. А. Минаева, В. Н. Лещенко // *Біополімери і клітина.* – 2004. – Т. 20, № 3. – с. 224–232.

References

1. Hore P. J., Mouritsen H. (2016) The Radical-Pair Mechanism of Magnetoreception. *Annu Rev Biophys.* 45. 299-344.
2. Solov'yov, I. A., Chandler, D.E., Schulten, K. (2008) Exploring the possibilities for the radical pair effects in cryptochrome. *Plant Signal Behav.* 3(9). 676-677.
3. Solov'yov I. A., Mouritsen H., Schulten K. (2010) The Radical-Pair Mechanism of Magnetoreception. *Biophysical Journal.* 99. 40-49.
4. Minaev, B. F. (2009) Spin-catalysis in the processes of photo- and bioactivation of molecular oxygen. *Ukr. biohim. Jurnal [Ukrainian biochemical journal]*. 81. 3. 22-45.[in Rus].
5. Buchachenko A. L., Molin Y. N., Sagdeev R. Z., Salikhov K.M., Frankevich E.L. (1987) Magnetic spin effects in chemical reactions. *Uspehi Fizicheskikh Nauk [Successes of physical sciences]*. 151. 1. 173-174.[in Rus].
6. Minaev. B. F. (2002) Spin effects in reductive activation of O₂ by oxidase enzymes. *RIKEN Rev.* 44. 147-149.
7. R. Prabhakara, E. M. Siegbahna, B. F. Minaev (2003) A theoretical study of the dioxygen activation. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics.* 1647. 1-2. 173-178.
8. B. F. Minaev (2007) Electronic mechanisms of molecular oxygen activation. *Uspehi himii [Successes of*

chemistry]. 76. 11. 1059-1083. [in Rus].

9. Minaev B. F. (2004) Models of the electronic structure of flavoproteins and the mechanism of action of oxidases. *Biopolimeri i klitina [Biopolymers and cell]*. 20. 3. 224-232.[in Rus].

Summary. Panchenko O.O., Minaev B. F. Enzymatic spin-catalysis in flavin-containing oxidases and magnetic orientation of birds

Introduction. The magnetic field of the Earth covers the entire globe and the closest space around it, which makes it possible to provide information about the direction of magnetic flux lines. Humans use it with a compass to navigate and orient in the space of the ocean or airplane in the sky. Can birds and other animals also use the magnetic field of the Earth for orientation in space?

Purpose. To calculate spin density in individual radicals - anion radicals FAD and cation-radical tryptophan for radical pairs which are contained in cryptochromes of birds. On this basis, to evaluate the electron-nuclear hyperfine interactions of the Fermi contact type. To estimate the influence of magnetic field on the birds orientation through the neural net using the Hori theory.

Methods. The 3D visualization method of the HyperChem-7.51 calculation software for quantum-chemical modeling of FAD and tryptophan by the PM3 method and the Gaussian software for optimizing the FAD molecule by the exchange-correlation functional B3LYP/6-31G (d) were used.

Results. The values of charges and spin density on atoms in the corresponding anion- and cation- radicals are calculated. Such atomic charges clearly explain intermolecular interactions that occurs when the radicals are coordinated in the protein shell of the cryptochrome.

Taking into account the spin density in the anion- and cation-radicals of the cryptochrome RP, we have calculated the constants of the hyperfine interactions for all the nuclei of both radicals. Based on the theory of RP, an estimation of the T-S transition rate in a divided pair of radicals of an anion FAD and a tryptophan cation was performed. Our calculations confirm the general picture of the kinetics of spin transitions in the weak magnetic field proposed in the paper [1].

Conclusion. Quantum-chemical calculations of FAD confirm the theory of enzymatic spin-catalysis in oxidases due to the specific structure of the molecular orbitals of this molecule and of its oxidized and reduced forms. Similar calculations are applied for the cryptochrome radical pair.

The calculated atomic charges explain the strength of intermolecular interactions when the radicals are coordinated in the protein shell of the bird's eyes cryptochrome.

Spin density at nitrogen atoms creates large values of hyperfine magnetic electron-nuclear interactions, which determines a sufficient rate constant value of the singlet-triplet transition, even in the weak magnetic field of the Earth.

Keywords: flavinucleotides, FAD, cryptochromes, spin-orbit interaction, hyperfine EPR structure, electron-nuclear spin-spin interaction.

Черкаський національний університет імені Богдана Хмельницького

Одержано редакцією 19.02.2018

Прийнято до публікації 11.06.2018