СОДЕРЖАНИЕ

Том 67, номер 2, 2022

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

Кремниевые аналоги L-аминокислот: свойства «кирпичиков» чужой биосферы

М.С. Кондратьев, К.А. Щербаков, А.А. Самченко, О.В. Дегтярева, Е.Л. Терпугов, Н.Н. Хечинашвили, В.М. Комаров 213

Анализ структуры элонгационных комплексов в полиакриламидном геле методом фёрстеровского резонансного переноса энергии

Н.С. Герасимова, А.Н. Коровина, Д.А. Афонин, К.В. Шайтан, А.В. Феофанов, В.М. Студитский 222

Новая интерпретация коэффициента Хилла

И.А. Лавриненко, Г.А. Вашанов, Ю.Д. Нечипуренко 229

Анализ структурной вариабельности геномов льна *Linum usitatissimum* L.

М.А. Дук, А.А. Канапин, А.А. Самсонова, Т.А. Рожмина, М.Г. Самсонова 234

Сборка геномов трех слабовирулентных штаммов *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*

А.А. Канапин, А.А. Самсонова, М.П. Банкин, А.А. Логачев, Т.А. Рожмина, М.Г. Самсонова 240

Влияние постоянного магнитного поля на инфекционный титр черноморских альговирусов

О.А. Степанова, П.В. Гайский, С.А. Шоларь 244

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

Взаимодействие антимикробного пептида лазиоглоссина III с модельными липидными бислоями

С. Саха, П. Ратрей, А. Мишра 250

Ряд катионной селективности каналов, формируемых пероксиредоксином-6 в бимолекулярных фосфолипидных мембранах

П.А. Григорьев 264

Активность сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов крови кролика зависит от характеристик вибрационного воздействия

В.В. Воробьева, О.С. Левченкова, П.Д. Шабанов 267

Нарушение регуляции системы цАМФ в обонятельных нейронах в модели шизофрении, индуцируемой введением (+)-МК-801 крысам

Е.В. Бигдай, А.А. Синегубов 274

Глазной имагинальный диск дрозофилы как модель для обработки изображений эпителиальных тканей

К.Н. Козлов, Е.В. Голубкова, Л.А. Мамон, М.Г. Самсонова, С.Ю. Суркова 283

Математическое моделирование эфферентной регуляции мышечного сокращения

Е.А. Скребенков, О.Л. Власова 289

Математический анализ модели эпидемии COVID-19 с использованием данных эпидемиологических параметров болезней, распространенных в Индии

Д. Пал, Д. Гхош, П.К. Сантра, Г.С. Махапатра 301

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

Краткий обзор современного состояния исследований биологического действия слабых магнитных полей

И.А. Шаев, В.В. Новиков, Е.В. Яблокова, Е.Е. Фесенко 319

О механизме действия микроволн на членистоногих

Б.Л. Ихлов, И.Л. Вольхин, А.Ю. Ощепков 327

Ранние эффекты ионизирующего воздействия протонов высоких энергий на зрительно-моторное поведение обезьян

Л.В. Терещенко, И.Д. Шамсиев, М.А. Кадочникова, Е.А. Красавин, А.В. Латанов 333

Исследование суммарного уровня глутамата и глутамина в зрительной коре человека после короткой активации методом функциональной магнитно-резонансной спектроскопии

А. Яковлев, А. Мажурцев, П. Меньщиков, М. Ублинский, И. Мельников, Д. Куприянов, Т. Ахадов, Н. Семенова 343

Резонансное сканирование и анализ электроэнцефалограммы при определении зрелости корковой ритмики у младших школьников

Л.В. Савчук, С.А. Полевая, С.Б. Парин, А.Т. Бондарь, А.И. Федотчев 354

Оценка взаимодействия между тиреоидными гормонами и тиреотропином при расстройствах функций щитовидной железы на базе популяционного анализа данных с логистической моделью

Т.Р. Ламичхане, С.П. Пант, Б. Ламичхане, С. Паудел, Б.К. Ядав, Х.П. Ламичхане 362

Пулы аминокислот скелетных мышц якутского суслика *Urocitellus undulatus* на разных стадиях гибернации

М.В. Каранова, Н.М. Захарова 371

Уравнение Гинзбурга–Ландау для анализа нелинейной неустойчивости в сердечной ткани

И.В. Елюхина 378

Гибридная модель коллапса промысловой популяции краба *Paralithodes camtschaticus* (Decapoda, Lithodidae) Кадьякского архипелага

А.Ю. Переварюха 386

ДИСКУССИИ

К биофизике эволюции интеллектуальных систем

А.Л. Еремин 409

Contents

Vol. 67, No. 2, 2022

Molecular Biophysics

Silicon Analogs of L-Amino Acids: Properties of "Building Blocks" of an Alien Biosphere

M.S. Kondratiev, K.A. Shcherbakov, A.A. Samchenko, O.V. Degtyareva, E.L. Terpugov, N.N. Khechinashvili, and V.M. Komarov 213

Analysis of Structure of Elongation Complexes in Polyacrylamide Gel with Förster Resonance Energy Transfer Technique

N.S. Gerasimova, A.N. Korovina, D.A. Afonin, K.V. Shaytan, A.V. Feofanov, and V.M. Studitsky 222

New Interpretation of the Hill Coefficient

I.A. Lavrinenko, G.A. Vashanov, and Yu.D. Nechipurenko 229

Analysis of Structural Variation in the Genome of Flax *Linum usitatissimum* L.

M.A. Duk, A.A. Kanapin, A.A. Samsonova, T.A. Rozhmina, and M.G. Samsonova 234

Assembly of Three Weakly Virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* Strains

A.A. Kanapin, A.A. Samsonova, M.P. Bankin, A.A. Logachev, T.A. Rozhmina, and M.G. Samsonova 240

Influence of a Constant Magnetic Field on the Infectious Titer of the Black Sea Algal Viruses

O.A. Stepanova, P.V. Gaisky, and S.A. Sholar 244

Cell Biophysics

Association of Antimicrobial Peptide Lasioglossin-III with Model Lipid Bilayers

S. Saha, P. Ratrey, and A. Mishra 250

Cation Selectivity Sequence of Channels Formed by Peroxiredoxin 6 in Membranes Composed of Phospholipid Bimolecular Leaflets

P.A. Grigoriev 264

Activity of Succinate Dehydrogenase in Rabbit Blood Lymphocytes Depend s on Characteristics of the Vibration-based Impact

V.V. Vorobieva, O.S. Levchenkova, and P.D. Shabanov 267

Dysregulation of the cAMP System in Olfactory Neurons in a Model of Schizophrenia Induced by Administration of (+)-MK-801 to Rats

E.V. Bigdai and A.A. Sinegubov 274

Drosophila Eye Imaginal Disc as a Model for Processing Epithelial Tissue Images

K.N. Kozlov, E.V. Golubkova, L.A. Mamon, M.G. Samsonova, and S.Yu. Surkova 283

Mathematical Simulation of the Efferent Regulation of Muscle Contraction

E.A. Skrebenkov and O.L. Vlasova 289

Mathematical Analysis of a COVID-19 Epidemic Model by using Data Driven Epidemiological Parameters of Diseases Spread in India

D. Pal, D. Ghosh, P.K. Santra, and G.S. Mahapatra 301

Complex Systems Biophysics

A Brief Review of the Current State of Research on the Biological Effects of Weak Magnetic Fields

I.A. Shaev, V.V. Novikov, E.V. Yablokova, and E.E. Fesenko 319

On the Mechanism of Action of Microwaves on Arthropods

B.L. Ikhlov, I.L. Volkhin, and A.Yu. Oshchepkov 327

Early Effects of Cranial Irradiation by High Energy Proton Beams on Oculomotor Behavior in Nonhuman Primates

L.V. Tereshchenko, I.D. Shamsiev, M.A. Kadochnikova, E.A. Krasavin, and A.V. Latanov 333

Study of the Total Glutamate plus Glutamine Concentrations in the Human Visual Cortex Activated Areas Detected by Functional Magnetic Resonance Imaging upon Short Visual Stimulation

A. Yakovlev, A. Manzhurtsev, P. Menshchikov, M. Ublinskiy, I. Melnikov, D. Kupriyanov, T. Akhadov, and N. Semenova 343

Resonance Scanning and Analysis of the Electroencephalogram in Determining the Maturity of Cortical Rhythms in Younger Schoolchildren

L.V. Savchuk, S.A. Polevaya, S.B. Parin, A.T. Bondar, and A.I. Fedotchev 354

Evaluation of Thyroid Hormones-Thyrotropin Interrelationships in Thyroid Dysfunction States from Population-Based Data Analysis with a Logistic Model

T.R. Lamichhane, S.P. Pant, B. Lamichhane, S. Paudel, B.K. Yadav, and H.P. Lamichhane 362

Pools of Amino Acids of Skeletal Muscle in Yakutian Ground Squirrel *Urocitellus undulatus* During Different Hibernation Stages

M.V. Karanova and N.M. Zakharova 371

Ginzburg-Landau Equation for Nonlinear Instability Analysis in Cardiac Tissue

I.V. Elyukhina 378

Simulation of Scenarios of the Deep Population Crisis of the Rapidly Growing Population

A.Yu. Perevaryukha 386

Discussions

To the Biophysics of the Evolution of Intellectual Systems

A.L. Eryomin 409

EDN: YCBGIY
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 213–221

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.3

КРЕМНИЕВЫЕ АНАЛОГИ L-АМИНОКИСЛОТ: СВОЙСТВА «КИРПИЧИКОВ» ЧУЖОЙ БИОСФЕРЫ

© 2022 г. М.С. Кондратьев*, К.А. Щербаков, А.А. Самченко*, О.В. Дегтярева*, Е.Л. Терпугов*, Н.Н. Хечинашвили*, В.М. Комаров***

**Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино Московской области, Институтская ул., 3*

***Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10/8*

E-mail: ma-ko@bk.ru

Поступила в редакцию 20.01.2022 г.
После доработки 20.01.2022 г.
Принята к публикации 24.01.2022 г.

При помощи полуэмпирической квантово-химической методики PM3/PM7 впервые рассчитаны и проанализированы геометрические особенности молекул кремниевых аналогов 20 протеиногенных L-аминокислот и проводится их сравнение с углеродными аминокислотами. Помимо конформационных параметров определены значения энтальпий образования и дипольных моментов изученных соединений. Показано, что длины связей в кремниевых аналогах аминокислот значительно превосходят длины связей в углеродных аминокислотах. В кремниевом аналоге аспартата (как и в углеродном аспартате) возможно образование внутримолекулярной водородной связи. Наименьшей термодинамической стабильностью характеризуются ароматические и гетероциклические аналоги аминокислот, причем вопрос ароматичности в кремниевых соединениях носит иной характер, нежели в соединениях углерода, из-за более длинных межатомных расстояний и более слабого π-сопряжения. На модели полиаланиновой цепи показано, что как в углеродном, так и в кремниевом пептиде глобальный минимум теплоты образования такой молекулы соответствует конформации α-спирали.

Ключевые слова: кремний, кремниевые соединения, аминокислоты, конформеры, энтальпия образования, квантово-химический расчет, альтернативная биохимия.

DOI: 10.31857/S0006302922020016

В гипотезах об альтернативных формах жизни (например, на других планетах) особое внимание уделяется кремнию, как элементу, соединения которого теоретически способны образовывать аналоги сложных органических веществ. Данные взгляды не лишены оснований. Действительно, кремний и углерод принадлежат одному периоду периодической системы элементов и имеют схожее строение валентных электронных оболочек, вследствие чего обладают похожими химическими свойствами [1]. Можно предположить, что кремний способен служить основой для формирования сложных, разветвленных молекул [2, 3]. В связи с этим, особый интерес представляет изучение кремниевых аналогов известных биомолекул. В качестве объекта данного исследования нами были выбраны аналоги 20 протеиногенных аминокислот, их монопептиды и короткие пептиды, в которых все атомы углерода были замещены атомами кремния. Важно отметить, что уже известны как кремний-органические соединения, в которых имеются связи между атомами углерода и кремния [4], в том числе и аминокислоты, имеющие в составе атомы кремния [5, 6], так и аналоги органических соединений, в которых атомы углерода полностью замещены атомами кремния, например, гексасилабензол [7]. Отметим также, что благодаря успехам компьютерной химии в вопросах поиска новых лекарств [8] и новых материалов [9], квантово-химических расчетов термохимии [10], теоретического изучения явлений ароматичности [11], стало возможным применить методы драг-дизайна и квантовой-химии к соединениям, которые ранее не были известны в экспериментах. Даже для самых, казалось бы, хорошо изученных природных L-аминокислот в последние годы получены новые экспериментальные данные, свидетельствующие о процессах их структурных ассоциаций и даже образования подобия кристаллов в растворах под действием видимого света или лазерного излучения [12, 13].

Целью данной работы являлся оценочный расчет геометрических и некоторых термодинамических характеристик молекул-аналогов двадцати протеиногенных аминокислот, их монопептидов и коротких пептидов, в которых все атомы углерода замещены атомами кремния, на уровне полуэмпирического квантово-химического метода PM3/PM7. Основной интерес для нас представлял поиск наиболее стабильных конформеров, нахождение значений длин связей и валентных углов, а также расчет энтальпий образования гипотетических кремниевых молекул. Эти впервые полученные данные были приведены в сравнении с уже известными аналогичными данными по углеродным аминокислотам, монопептидам и пептидам [14]. Проведенный анализ позволил оценить схожесть и различия геометрических характеристик соединений на основе кремния и углерода. Отметим, что все выбранные молекулы были взяты в виде L-стереоизомера, так как у D- и L-форм аминокислот анализируемые в работе соответствующие параметры достоверно не отличаются.

МЕТОДЫ

Для расчетов структурных и термодинамических особенностей указанных аналогов биомолекул использовали полуэмпирическую квантово-химическую MNDO-методику в вариантах параметризаций PM3 [15] и PM7 [16]. Выбор данного вычислительного инструмента был обусловлен тем, что он характеризуется наилучшим соотношением (для интересовавших нас задач) точности расчета и требуемых вычислительных ресурсов. При оптимизации геометрии всех соединений использовалось стократное усиление критериев сходимости и оптимизации (PRECISE), по сравнению со стандартными критериями, используемыми по умолчанию в этих программах [17]. Это позволяло учитывать возможность обнаружения у исследуемых соединений дополнительных устойчивых конформеров. При помощи пакета MOPAC6 и полуэмпирической параметризации PM3 нам удалось получить оптимизированные структуры двадцати протеиногенных аминокислот и их кремниевых аналогов. Для соединений кремния метод PM3 показал недостаточную приемлемость: некоторые валентные углы при оптимизации становились острыми. По этой причине найденные минимумы были пересчитаны в пакете MOPAC 2016 [18] с использованием параметризации PM7, которая, к тому же, в силу своей надежности и гибкости недавно была использована для моделирования ферментативного катализа [19].

Особое внимание при расчетах уделялось усилению критерия достижения глобального минимума поверхности потенциальной энергии исследуемых молекул. Мы стремились получить не только максимальные по значениям теплоты образования оптимизируемых структур, но и отсутствие отрицательных значений частот в рассчитанных спектрах нормальных колебаний найденных конформеров. Этим достигалось исключение из рассмотрения большого числа промежуточных, метастабильных структур. Отметим также, что экспериментально изучаемые нами кремниевые молекулы пока не известны, в литературе также отсутствуют данные о моделировании их другими методами, такими, как *ab initio* (мы опубликуем эти данные позднее).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Аналоги одиночных L-аминокислот. Геометрическая оптимизация и поиск наиболее стабильных конформеров были произведены для аналогов всех двадцати протеиногенных L-аминокислот. К сожалению, какие-либо экспериментальные данные по указанным соединениям отсутствуют ввиду того, что они еще не синтезированы. В связи с этим мы провели сравнение геометрических характеристик кремниевых аналогов аминокислот с таковыми для углеродных, данные по которым были взяты из литературы [20] или получены нами [21].

Данные из табл. 1 демонстрируют, что длины связей в кремниевых аналогах аминокислот заметно превосходят длины связей в углеродных аминокислотах. Особенно это заметно на примере связи Si–Si, длина которой фактически в полтора раза превосходит длину аналогичной связи C–C. Это объясняется тем, что ковалентный радиус атома кремния превосходит ковалентный радиус атома углерода. Ранее нами было показано, что в случае с углеродными полипептидами аспарагиновая кислота способна инициировать спирализацию растущей полипептидной цепи путем образования внутримолекулярной водородной связи (рис. 1) [21]. В ее кремниевом аналоге тоже возможно образование H-связи, однако ее длина составляет 2.1 Å, в то время как в углеродном варианте длина H-связи равна 1.7 Å. Аналогичная картина наблюдается и с остатком глутаминовой кислоты.

Также нами были рассчитаны энтальпии образования кремниевых аналогов всех двадцати L-аминокислот и проведено их сравнение с теплотами образования углеродных аминокислот, которые были вычислены нами ранее, для некоторых из них приведены экспериментальные данные (табл. 2) [22–27].

На основании значений теплот образования кремниевые аналоги аминокислот были разделены на несколько групп:

1) алифатические (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Pro);

Таблица 1. Основные геометрические параметры молекул глицина и аланина

Тип связи	Gly Длина связи (Sellers et al. [20])	Gly Длина связи (наш расчет в PM7 [14])	Ala Длина связи (наш расчет в PM7)	Тип связи	Si–Gly Длина связи (наш расчет в PM7)	Si–Ala Длина связи (наш расчет в PM7)
N–H	1.001	0.998	0.998	N–H	1.014	1.016
N–C	1.457	1.469	1.48	N–Si	1.785	1.792
C–H	1.081	1.109	1.119	Si–H	1.469	1.479
C–C	1.514	1.513	1.526	Si–Si	2.207	2.204
C=O	1.203	1.218	1.218	Si=O	1.422	1.422
C–O	1.364	1.351	1.351	Si–O	1.56	1.558
O–H	0.966	0.952	0.952	O–H	0.97	0.97
$C–C_\beta$	–	–	1.524	$Si–Si_\beta$	–	2.22
Валентный угол	**Gly Величина угла (Sellers et al. [20])**	**Gly Величина угла (наш расчет в PM7 [14])**	**Ala Величина угла (наш расчет в PM7 [14])**	**Валентный угол**	**Si-Gly Величина угла (наш расчет в PM7)**	**Si-Ala Величина угла (наш расчет в PM7)**
$N–C_\alpha–C$	113.28	114.88	112.95	$N–Si_\alpha–Si$	117.7	114.48
$C_\alpha–C=O$	126.41	128.84	128.62	$Si_\alpha–Si=O$	125.73	124.6
$C_\alpha–C–O$	110.62	115.14	112.51	$Si_\alpha–Si–O$	107.4	107.98
C–O–H	112.28	110.03	110.04	Si–O–H	130.1	130.39
Cα–N–H	113.27	110.29	110.38	$Si_\alpha–N–H$	118.57	117.07
$C–C_\alpha–H$	107.87	109.28	108.63	$Si–Si_\alpha–H$	108.72	108.05
H–N–H	110.29	109.24	109.57	H–N–H	108.52	107.97
$H–C_\alpha–H$	107.04	106.43	–	$H–Si_\alpha–H$	108.65	–
$N–C_\alpha–H$	110.27	108.31	106.2	$N–Si_\alpha–H$	106.37	105.86
$N–C_\alpha–C_\beta$	–	–	110.4	$N–Si_\alpha–Si_\beta$	–	106.68
$H–C_\alpha–C_\beta$	–	–	109.46	$H–Si_\alpha–Si_\beta$	–	107.7
$C–C_\alpha–C_\beta$	–	–	109.06	$Si–Si_\alpha–Si_\beta$	–	113.62
Двугранный угол	**Gly Величина угла (Sellers et al. [20])**	**Gly Величина угла (наш расчет в PM7[14])**	**Ala Величина угла (наш расчет в PM7[14])**	**Двугранный угол**	**Si–Gly Величина угла (наш расчет в PM7)**	**Si–Ala Величина угла (наш расчет в PM7)**
$N–Ci_\alpha–C=O$	0	0.14	22.2	$N–Si_\alpha–Si=O$	179.76	6.14
$N–Ci_\alpha–C–O$	180	179.86	157.36	$N–Si_\alpha–Si–O$	0.25	173.78
$Ci_\alpha–C–O–H$	180	180	179.15	$Si_\alpha–Si–O–H$	179.98	179.23
$C–Ci_\alpha–N–H$	63.29	60.21	66.45	$Si–Si_\alpha–N–H$	67.69	56.6
$O–C–Ci_\alpha–H$	57.65	58.2	39.8	$O–Si–Si_\alpha–H$	120.69	68.56
$H–N–Ci_\alpha–C_\beta$	–	–	55.97	$H–N–Si_\alpha–Si_\beta$	–	69.98
$O=C–Ci_\alpha–C_\beta$	–	–	100.99	$O=Si–Si_\alpha–Si_\beta$	–	129.05
$O–C–Ci_\alpha–C_\beta$	–	–	79.43	$O–Si–Si_\alpha–Si_\beta$	–	50.88

Примечание. Длины связей даны в ангстремах, величины углов – в градусах.

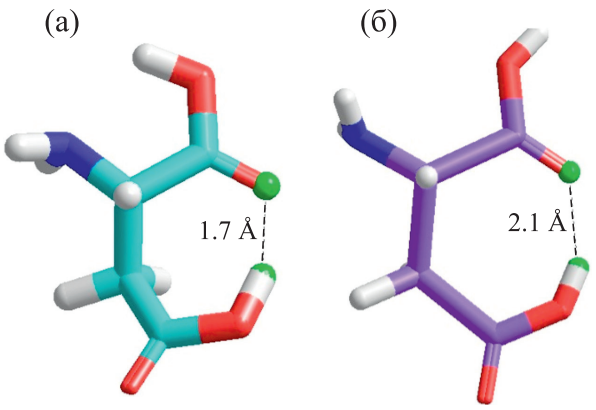


Рис. 1. Структуры аминокислоты аспартата: (а) – углеродная, с внутримолекулярной водородной связью; (б) – кремниевая, с внутримолекулярной водородной связью.

2) ароматические и гетероциклические – Phe, Trp. Заметно, что они отличаются довольно низкими значениями теплот образования. Полученная низкая термодинамическая стабильность у ароматических и гетероароматическмх аминокислот не противоречит известным представлениям об относительно слабой термодинамической устойчивости молекулярных систем с сопряженными связями. Также сюда могут быть отнесены His и Tyr. Однако His обладает значительно более отрицательной теплотой образования, чем Phe и Trp; вероятно, это может быть объяснено содержанием в составе гетероцикла сразу двух атомов азота. Аналогично, теплота образования Tyr заметно выше, чем у Phe и Trp, возможно, это объясняется наличием гидроксильной группы в его боковой группе;

3) содержащие спиртовую группу (–OH) – Ser, Tyr, Thr. Заметно более низкой по модулю теплотой образования, чем Ser и Thr, обладает Tyr. Мы полагаем, что это является следствием наличия в этом соединении массивного ароматического цикла;

4) серосодержащие – Cys и Met;

5) кислые – Glu, Asp;

6) осно́вные – Gln, Asn, Arg, His, Lys. В данном ряду своими высокими теплотами образования выделяются Gln и Asn. Очевидно, это объясняется наличием атомов кислорода в составе их боковых цепей.

На основании указанных данных можно сделать два основных вывода:

1) наличие циклов и гетероциклов в составе боковых цепей кремниевых аминокислот приводит к понижению термодинамической стабильности;

2) наличие атомов кислорода в боковой цепи вызывает увеличение модуля значений теплоты образования.

Стоит отметить, что схожая картина наблюдается и в случае с углеродными аминокислотами [14].

Следующей важной характеристикой молекулярных систем является величина дипольного момента. Значения дипольного момента были рассчитаны нами для кремниевых аналогов всех двадцати протеиногенных L-аминокислот. Также было сделано сравнение данной величины с дипольными моментами углеродных аминокислот, ранее вычисленных нами [14]. Полученные данные представлены в табл. 3.

Табл. 3 демонстрирует, что кремниевые аналоги аминокислот в большинстве случаев обладают более высокими значениями дипольных момен-

Таблица 2. Теоретические и экспериментальные величины энтальпий образования (ΔH^{o}_{f}) двадцати природных L-аминокислот и их кремниевых аналогов

Аминокислота	Углеродная (ккал/моль, PM7)	Кремниевая (ккал/моль, PM7)	Эксперимент (ккал/моль)	Аминокислота	Углеродная (ккал/моль, PM7)	Кремниевая (ккал/моль, PM7)	Эксперимент (ккал/моль)
Gly	–93.3	–143.5	–93.3	Glu	–192.2	–270.4	
Ala	–99.1	–137.8	–99.1	Asp	–185.0	–277.6	
Val	–108.8	–128.3	–108.8	Gln	–150.7	–214.9	
Leu	–114.3	–121.5	–116.3	Asn	–143.0	–270.4	
Ile	–113.5	–120.8		Arg	–83.4	–161.5	
Phe	–72.0	–77.2	–74.8	His	–64.2	–156.3	
Tyr	–116.7	–159.5		Met	–98.92	–160.5	–98.8
Trp	–53.6	–94.84		Pro	–93.8	–144	–87.5
Ser	–138.3	–221.6		Thr	–148.2	–215.4	
Cys	–92.4	–158		Lys	–114.3	–145.7	

Таблица 3. Величины дипольных моментов (в дебаях) для двадцати протеиногенных аминокислот и их кремниевых аналогов, рассчитанные в PM7

Аминокислота	Углеродная (PM7)	Кремниевая (PM7)	Аминокислота	Углеродная (PM7)	Кремниевая (PM7)
Gly	1.1	2.9	Glu	2.2	4.9
Ala	1.2	1.7	Asp	2.00	7.9
Val	1.2	1.5	Gln	4.4	6.4
Leu	1.3	2.2	Asn	3.5	9.3
Ile	1.2	3.0	Arg	2.8	3.1
Phe	1.1	1.3	His	4.3	5.9
Tyr	3.1	4.1	Met	1.1	1.9
Trp	3.9	2.5	Pro	2.4	1.8
Ser	1.6	4.1	Thr	2.2	1.7
Cys	1.8	3.6	Lys	2.3	3.7

тов, чем углеродные (исключением стали лишь Tyr, Pro и Thr). Это говорит о том, что данный класс кремниевых соединений будет обладать более выраженной чувствительностью к электростатическим взаимодействиям, чем их углеродный аналог.

Монопептиды на основе кремния. Монопептиды, или метиламиды N-ацетил-α-аминокислот, являются известными модельными соединениями, на которых ранее изучали конформационное поведение каждого аминокислотного остатка в составе простейшей цепи. Структурно данный класс соединений представляет собой модифицированные одиночные аминокислоты, к N-атому которых присоединена метильная группа через карбонильную, а к карбонильному кислороду присоединен второй метильный остаток – через атом азота (рис. 2) [28].

Данные соединения представляют интерес по причине того, что позволяют сымитировать для каждого конкретного аминокислотного остатка взаимодействие его α-атома, с α-атомами соседних остатков. Всего для углеродных монопептидов выделяют пять устойчивых конформеров: B, H, L, M и R. Конформеры H и M – это структуры

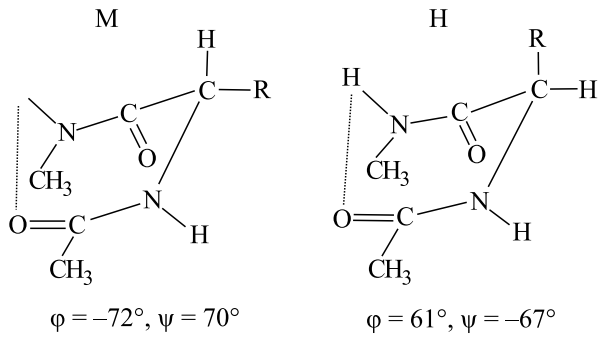


Рис. 2. Примеры углеродных монопептидов.

с внутримолекулярной водородной связью. Конформеры R и B отвечают конформациям правозакрученной α-спирали и β-слоя соответственно, а L – левой α-спирали. Для углеродных монопептидов теплоты образования указанных конформеров распределяются следующим образом [28, 29]:

$$M > B > H > R > L.$$

Нами были построены и оптимизированы структуры двадцати кремниевых аналогов монопептидов аминокислот во всех пяти конформациях. В табл. 4 приведены значения теплот образования для всех двадцати кремниевых монопептидов в B-, H-, L-, M- и R-конформациях.

Анализ и обобщение данных из табл. 4 позволили распределить термодинамическую стабильность конформеров в следующий ряд:

$$H(M) > L(M) > R(B).$$

Иными словами, глобальному минимуму теплоты образования монопептида соответствуют конформеры H или M. На втором месте находятся либо L-, либо M-конформации. Конформеры R и B обладают наименьшими значениями теплот образования. Данный факт может свидетельствовать о том, что для линейных полимеров на основе кремниевых аминокислот наиболее выгодными могут оказываться иные вторичные структуры, отличные от α-спиралей и β-слоев. Этот вопрос требует дополнительного исследования.

Кремниевые аналоги олигопептидов. Следующим объектом нашего исследования стали пептиды, состоящие из двенадцати остатков аланина, и их кремниевые аналоги. Были проведены геометрическая оптимизация и расчет энтальпий образования для данных соединений в конформациях α-спирали и β-шпильки. Полученные структуры представлены на рис. 2 и 3. Расчетные данные представлены в табл. 5 и 6.

Таблица 4. Значения теплот образования различных конформеров кремниевых монопептидов

Si-монопептид	ΔH^{o}_{f} конформера, ккал/моль				
	B	H	L	M	R
Ala	−146.8	−151.8	−148.7	−149.2	−147.3
Arg	−177.4	−182.1	−180.8	−182.1	−177.4
Asn	−236.7	−242.3	−242.6	−238.7	−240.6
Asp	−298.6	−301.7	−301.7	−301.7	−296.3
Cys	−177.8	−181.1	−179.5	−181.6	−177.1
Gln	−229.5	−241.6	−232.6	−238.7	−230.9
Glu	−289.1	−294.6	−291.6	−297.6	−290.2
Gly	−167	−167.1	−167.1	−167	−163.2
His	−174	−182.3	−178.9	−180.4	−173.8
Ile	−141.8	−147.2	−144	−143.8	−141.9
Leu	−141	−147.1	−143.2	−143.3	−141.9
Lys	−161.5	−168.6	−166.2	−163.4	−163.1
Met	−178	−183.9	−180.5	−180.2	−179.2
Phe	−97	−103.3	−103.3	−97.6	−98.7
Pro	−170.4	−167.5	−170.5	−170.5	−167.5
Ser	−243.9	−247.7	−247.2	−245.3	−242.3
Thr	−231.6	−238.2	−236.7	−237	−232.8
Trp	−116.3	−124.9	−120.7	−117.6	−116
Tyr	−179.7	−187	−183.3	−180.2	−181.6
Val	−146.8	−152.8	−148.7	−149.2	−147.3

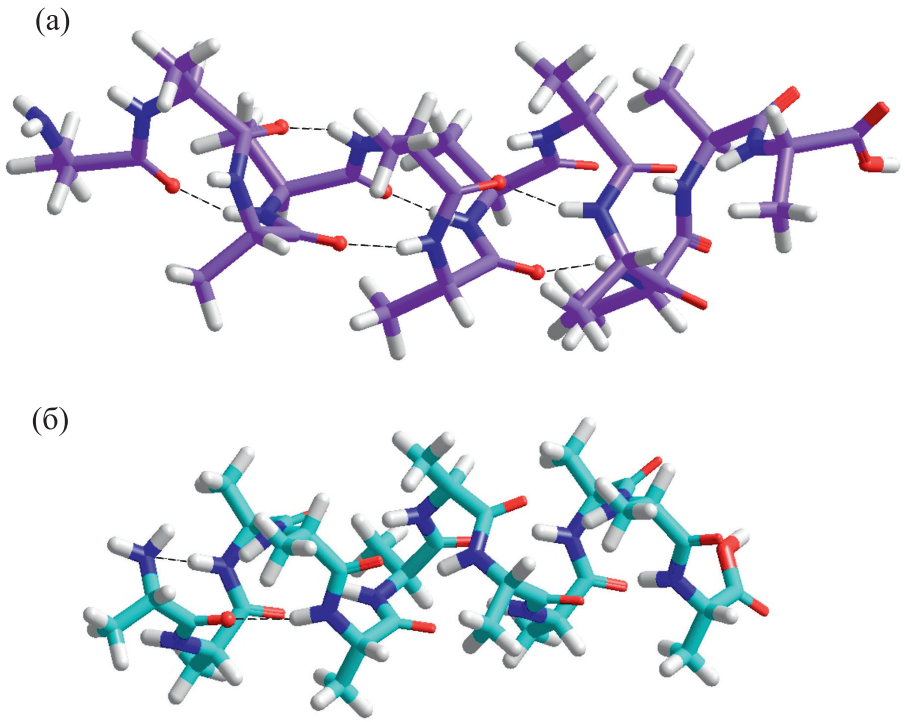


Рис. 3. (а) – PM7-рассчитанная α-спираль из двенадцати остатков кремниевого L-аланина; (б) – PM7-рассчитанная α-спираль из двенадцати остатков углеродного L-аланина.

Таблица 5. Значения торсионных углов кремниевых и углеродных пептидов из двенадцати остатков аланина в конформациях α-спирали и β-цепи (параметризация PM7)

	Величины торсионных углов в градусах										
	ψ1	φ2	ψ2	φ3	ψ3	φ4	ψ4	φ5	ψ5	φ6	ψ6
Углеродная альфа-спираль	–76	–49	–33	–64	–40	–59	–46	–50	–48	–55	–46
Кремниевая бета-цепь	33	–130	144	–105	150	–111	154	–103	150	–119	153
Кремниевая альфа-спираль	–4	–12	–63	–2	–58	–12	–53	–9	–51	–10	–66
Кремниевая бета-цепь	167	–169	175	–145	163	–158	172	–147	166	–154	170
	φ7	ψ7	φ8	ψ8	φ9	ψ9	φ10	ψ10	φ11	ψ11	φ12
Углеродная альфа-спираль	–55	–44	–58	–42	–58	–42	–79	–17	–82	–23	–76
Кремниевая бета-цепь	–105	152	–108	152	–107	152	–107	150	–104	150	–112
Кремниевая альфа-спираль	–47	–50	–63	–49	–53	–40	–92	–12	–115	–14	–27
Кремниевая бета-цепь	–149	167	–150	169	–150	169	–147	168	–153	169	61

Таблица 6. Значения теплот образования и дипольных моментов кремниевых и углеродных пептидов в конформациях α-спирали и β-цепи (параметризация PM7)

	ΔH^o_f, ккал/моль	Дипольный момент, дебаи
Углеродная α-спираль	–716.3	45.2
Углеродная β-цепь	–654.4	9.1
Кремниевая α-спираль	–1094.3	43.5
Кремниевая β-цепь	–1043	30.2

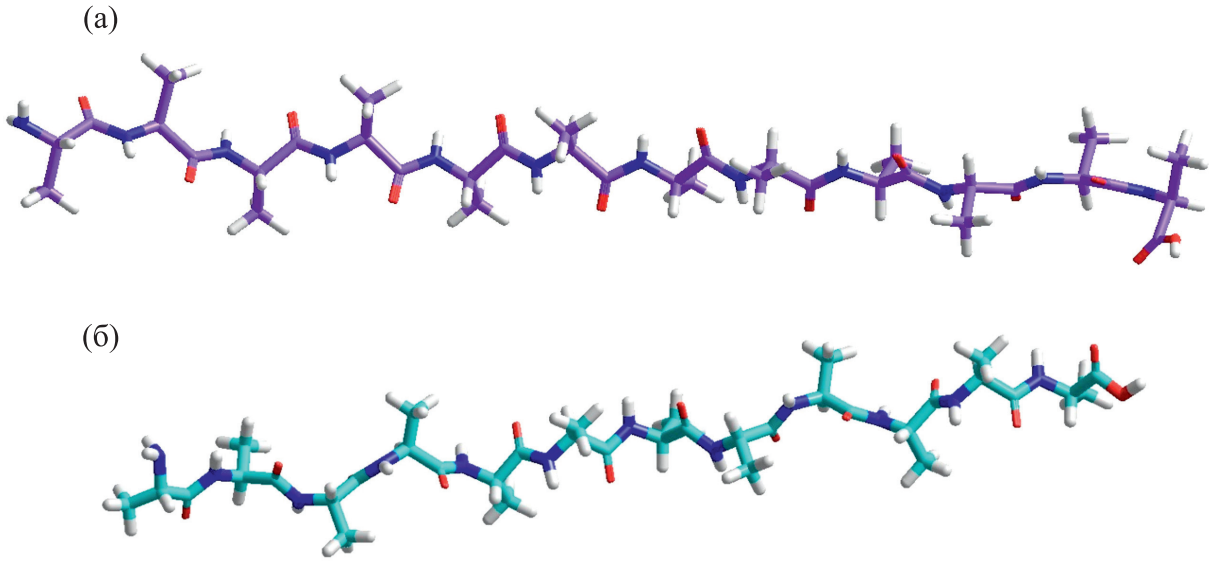


Рис. 4. (а) – PM7-рассчитанная одиночная β-цепь из двенадцати кремниевых остатков Ala; (б) – PM7-рассчитанная одиночная β-цепь из двенадцати углеродных остатков Ala.

При рассмотрении значений двугранных углов было выявлено следующее: в случае с α-спиралями углеродные пептиды показали значения торсионных углов φ и ψ, соответствующие минимумам потенциальной энергии для Ala-остатков, разброс величин углов составил от −50° до −80° по φ и от −17° до −76° по ψ. Для кремниевой аспирали значения двугранных углов значительно отличались. Прежде всего, величины φ и ψ характеризовались более высокой вариабельностью: от −5° до −115° по φ, и от −2° до −65° по ψ.

При рассмотрении одиночных β-цепей были получены следующие значения двугранных углов: для углеродного пептида – от +144° до +150° по ψ и от −105° до −130° по φ, угол ψ первого остатка имел значение в +33°; для кремниевого пептида – от +163° до +170° по ψ и от −145° до −169° по φ, угол φ последнего остатка имел значение в +60°. Как видно, вариабельность значений углов углеродного и кремниевого пептидов приблизительно одинакова.

Приведенные выше данные показывают, что для кремниевых пептидов характерны именно те значения φ и ψ, которые для углеродных пептидов описывают редкие либо вовсе запрещенные конформации. По нашим предположениям, это может быть объяснено тем, что длины связей O- и N-атомов, связанных с кремнием, выше, чем длины связей тех же атомов, связанных с углеродом. В данном случае бóльшая длина связи обеспечивает и бóльшее расстояние между ковалентно несвязанными атомами. Вследствие этого дисперсионные и электростатические взаимодействия могут способствовать притяжению этих атомов (ковалентно несвязанных) и давать значения углов φ и ψ, не характерные для углеродных пептидов.

Из данных, представленных в табл. 6, можно сделать заключение, что конформация α-спирали термодинамически более выгодна как для углеродного, так и для кремниевого пептидов. В обоих случаях α-спираль обладает более высоким значением дипольного момента. Большой интерес для будущих исследований будет представлять моделирование ИК-спектров изучаемых соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенный геометрический и термодинамический анализ свойств кремниевых аминокислот, монопептидов и пептидов и сравнение полученных результатов с уже известными данными по их углеродным аналогам позволили сделать следующие выводы.

1. Длины связей в кремниевых аналогах аминокислот значительно, до полутора раз, превосходят длины связей в углеродных аминокислотах.

2. В кремниевом аналоге Asp (как и в углеродном аспартате) возможно образование внутримолекулярной водородной связи. При этом ее длина составляет 2.1 Å (против 1.7 Å – в углеродном аспартате) – это позволяет предположить, что энергия такой связи будет ниже энергии стандартной водородной связи. Аналогичная картина наблюдается и с остатком глутаминовой кислоты.

3. На основе значений энтальпий образования кремниевые аналоги аминокислот можно разбить на следующие группы: алифатические, ароматические и гетероциклические, содержащие спиртовую группу, серосодержащие, кислые, основные. Наименьшей термодинамической стабильностью характеризуются ароматические и гетероциклические аналоги аминокислот.

4. В большинстве случаев кремниевые аналоги аминокислот обладают более высокими значениями дипольных моментов, чем углеродные.

5. В случае с кремниевыми монопептидами глобальному минимуму энтальпии образования соответствуют H- и M-конформации.

6. Геометрия кремниевых пептидов из двенадцати остатков аланина описывается такими значениями двугранных углов φ и ψ, которые в случае с углеродными пептидами характеризуют редкие или запрещенные конформации.

7. Как в углеродных, так и в кремниевых пептидах из двенадцати остатков аланина глобальный минимум теплоты образования соответствует конформации α-спирали.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. L. Gmelin, Gmelin handbook of inorganic and organometallic chemistry. Silicon: Suppl. Volume (Springer-Verlag, 1991).
2. A. F. Davila and Ch. P. McKay, Astrobiology **14** (6), 534 (2014).
3. M. S. Kondratyev, A. V. Kabanov, A. A. Samchenko, et al., J. Biomol. Structure & Dynamics **31**, 10 (2013).
4. S. Pawlenko, *Organosilicon Chemistry* (Walter de Gruyter, NY, 1986).
5. M. Mortensen, R. Husmann, E. Veri, and C. Bolm, Chem. Soc. Rev. **38**, 1002 (2009).

6. E. Remond, C. Martin, J. Martinez, and F. Cavelier, Chem. Rev. **116**, 11654 (2016).

7. K. Abersfelder, A. J. P. White, H. S. Rzepa, and D. Scheschkewitz, Science **327**, 564 (2009).

8. A. Roy, S. Nair, N. Sen, et al., Methods **131**, 33 (2017).

9. L. M. Yang, X. P. Li, Y. H. Ding, and C. C. Sun, J. Mol. Model. **15** (1), 97 (2009).

10. I. S. Ignatyev, M. Montejo, and J. J. López-González, J. Mol. Model. **19** (12), 5439 (2013).

11. R. Chu, X. Zhang, L. Meng, and Y. Zeng, J. Mol. Model. **23** (12), 335 (2017).

12. E. L. Terpugov, M. S. Kondratyev, and O. V. Degtyareva, J. Biomol. Structure & Dynamics **39** (1), 108 (2021).

13. Е. Л. Терпугов, С. Н. Удальцов и О. В. Дегтярева, Биофизика **66** (5), 856 (2021).

14. К. А. Щербаков, М. С. Кондратьев, А. А. Самченко и др., Биофизика **61** (3), 432 (2016).

15. J. J. P. Stewart, J. Mol. Model. **10** (2), 155 (2004).

16. J. J. P. Stewart, J. Mol. Model. **19**, 1 (2013).

17. J. J. P. Stewart, Quant. Chem. Prog. Exch. **10**, 86 (1990).

18. J. J. P. Stewart, *Stewart Computational Chemistry* (Colorado Springs, CO, USA, 2016).

19. J. J. P. Stewart, J. Mol. Model. **23** (5), 154 (2017).

20. H. L. Sellers and L. Schafer, J. Am. Chem. Soc. 78, 7728 (1978).

21. М. С. Кондратьев, А. В. Кабанов и В. М. Комаров, Компьютерные исследования и моделирование **2** (1), 83 (2010).

22. J. Cox and G. Pilcher, *Thermochemistry of Organic and Organometallic Compounds* (Acad. Press, NY, 1980).

23. S. Ngauv, R. Sabbah, and M. Laffitte, Thermochim. Acta **20**, 371 (1977).

24. R. Sabbah and M. Laffitte, Bull. Soc. Chim. **1**, 50 (1978).

25. R. Sabbah and M. Laffitte, J. Chem. Thermodyn. **10**, 101 (1978).

26. R. Sabbah and C. Minadakis, Thermochim. Acta **43**, 269 (1981).

27. *NIST Chemistry WebBook*, http://webbook.nist.gov

28. Е. М. Попов, *Проблема белка, Т. 3: Структурная организация белка*, под ред. В.Т. Иванова (Наука, М., 1997).

29. М. С. Кондратьев, А. В. Кабанов и В. М. Комаров, Биофизика **52** (3), 401 (2007).

Silicon Analogs of L-Amino Acids: Properties of "Building Blocks" of an Alien Biosphere

M.S. Kondratiev*, K.A. Shcherbakov, A.A. Samchenko*, O.V. Degtyareva*, E.L. Terpugov*, N.N. Khechinashvili*, and V.M. Komarov***

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, Institutskaya ul. 3, 142290 Russia*

***Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Pogodinskaya ul. 10/8, Moscow, 119121 Russia*

For the first time, semi-empirical quantum-chemical methods PM3/PM7 were used to calculate and analyze geometric configuration of singularities for molecules of silicon analogues of 20 proteinogenic L-amino acids given with respect to carbon amino acids. Conformational parameters as well as the values of the enthalpies of formation and dipole moments of the studied compounds were calculated. It is shown that the bond lengths in silicon analogues of amino acids significantly exceed the bond lengths in carbon amino acids. The formation of intramolecular hydrogen bond is possible in silicon analogue of aspartate (the same can be observed in silicon analogue of carbon aspartate). The thermodynamic stability of aromatic and heterocyclic analogues of amino acids is the lowest. "Aromatic analogue" may play a role in silicon compounds different from that in carbon compounds: it is due to longer interatomic distances and weaker π-conjugation. The model of the polyalanine chain was used to show that the global minimum for a given molecule corresponds to the conformation of the α-helix both in carbon and silicon peptide.

Keywords: silicon, silicon compounds, amino acids, conformers, enthalpy of formation, quantum chemical calculation, alternative biochemistry

EDN: ASHPWW
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 222–228

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.323.7

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ ЭЛОНГАЦИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ МЕТОДОМ ФЁРСТЕРОВСКОГО РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ

© 2022 г. Н.С. Герасимова*, А.Н. Коровина*, Д.А. Афонин*, К.В. Шайтан*, А.В. Феофанов*, В.М. Студитский*, **

**Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1/12*

*** Центр исследований рака Фокс Чейз, Филадельфия, PA 19111-2497, США*

E-mail: shordome@gmail.com

Поступила в редакцию 10.12.2021 г.
После доработки 13.01.2022 г.
Принята к публикации 14.01.2022 г.

Для изучения структурных особенностей остановленных элонгационных комплексов, формирующихся в ходе транскрипции нуклеосом РНК-полимеразой 2, предложено использовать подход, основанный на измерении эффективности фёрстеровского резонансного переноса энергии в полиакриламидном геле после разделения интермедиатов транскрипции методом электрофореза. Флуоресцентно-меченые нуклеосомы были получены путем введения пары флуорофоров (донора и акцептора) в соседние супервитки нуклеосомной ДНК. Остановленные элонгационные комплексы формировали, проводя транскрипцию нуклеосом в присутствии ограниченного набора нуклеозидтрифосфатов. Сравнительный анализ эффективности фёрстеровского резонансного переноса энергии для свободных нуклеосом и полученных на их основе элонгационных комплексов с РНК-полимеразой 2 выявил изменение структуры нуклеосом в составе элонгационных комплексов. Показано, что элонгационные комплексы с одинаковой длиной РНК могут существовать в различных конформационных состояниях.

Ключевые слова: транскрипция, хроматин, нуклеосома, РНКП 2, FRET, элонгационный комплекс

DOI: 10.31857/S0006302922020028

Эукариотическая ядерная ДНК организована с привлечением большого количества ядерных белков в надмолекулярную нуклеопротеидную структуру – хроматин. Минимальной единицей хроматина является нуклеосома, которая состоит из участка ДНК длиной 145-147 п.н., накрученного на октамер белков-гистонов, включающий центральный тетрамер $(H3\text{-}H4)_2$ и два димера H2A-H2B [1]. Нуклеосомная упаковка затрудняет доступ ферментов и белковых факторов к ДНК, поэтому существуют специальные механизмы взаимодействия белков с нуклеосомой, обеспечивающие успешное протекание процессов транскрипции, репликации и репарации эукариотической ядерной ДНК.

Все матричные РНК и большинство клеточных некодирующих регуляторных РНК синтезируются РНК-полимеразой 2 (РНКП 2). Несмотря на то, что хроматин удаляется при активации генов в живых клетках, кодирующие области умеренно транскрибируемых генов остаются упакованными в нуклеосомы [2], таким образом, РНКП 2 встречается с нуклеосомами во время элонгации транскриптов. Нуклеосома представляет собой барьер для РНКП 2 [3–6], для его преодоления транскрипция в хроматине происходит по сложному механизму, включающему формирование внутринуклеосомных петель ДНК и обеспечивающему сохранение тетрамера гистонов $(H3\text{-}H4)_2$ и одного из димеров H2A-H2B на ДНК во время транскрипции [7–9].

Продвижение РНКП 2 вдоль протяженных участков ДНК, организованных в нуклеосомы (более сотен тысяч п.н.), происходит с высокой скоростью (3–4 тысячи п.н. в минуту [10]). Подобная скорость транскрипции наблюдается *in vitro* на ДНК, свободной от гистонов [11, 12].

Сокращения: РНКП 2 – РНК-полимераза 2, ЭК – элонгационный комплекс, FRET – фёрстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer), ПААГ – полиакриламидный гель, ЭК-5 – элонгационный комплекс с расположением активного центра РНК-полимеразы за 5 п.н. до входа в нуклеосомную ДНК.

Это достигается за счет действия белковых факторов. Ключевые данные для понимания механизмов действия факторов позволяют получать структурные исследования [13–16].

В настоящей работе для изучения структурных особенностей элонгационных комплексов (ЭК) РНКП 2 с нуклеосомой применен разработанный ранее метод анализа нуклеосом в полиакриламидном геле методом детекции фёрстеровского резонансного переноса энергии (FRET, Förster resonance energy transfer) [17]. Основным инструментом для детекции структурных перестроек в нуклеосомной ДНК в этих исследованиях были флуоресцентные метки, составляющие пару для наблюдения FRET. Эффективность такого переноса энергии зависит от расстояния между метками. Ранее была показана успешность применения таких нуклеосом для изучения процесса транскрипции с детекцией FRET [18], однако в некоторых случаях анализ невозможен без предварительного разделения комплексов в полиакриламидном геле (ПААГ).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Матрица ДНК. Работу проводили на ДНК с позиционирующей нуклеосому последовательностью 603 [19]: 5'd(CAAGCGACACC**GGCACTGGG**^CCCGGTTCGCGCTCCCTCCTTCCGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGCTTTCACTCGGGCTTCTAAGTACGCTTAGCGCACGGTAGAGCGCAATCCAAGGCTAACCACCGTGCATCGATGTTGGAAGAGGCCCTCCGTCCTGAATTCTTCAAGTCCCTGGGGTACGGATCCGACG)3' (последовательность 603 подчеркнута, сайт узнавания *Tsp*RI выделен полужирным шрифтом, место разрезания сахарофосфатного остова указано знаком ^). Плазмида, содержащая последовательность 603 [19], была любезно предоставлена доктором Дж. Видомом.

Амплификацию фрагментов ДНК проводили методом полимеразной цепной реакции с использованием флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов ProxFw40 (5'd(CAAGCGACACCGGCACTGGGCCCGGTTCGCGCT*CCCTCCTT-CCGTGTGTTGTCGTCTCTCGGGCGTCTAAGTACGCTT)) и ProxRev (5'd(ACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGCACGGT#GGTTAG)) (по 0.5 мкМ каждый) (IDT, Германия), где T* и T# – соответственно Cy3- и Cy5-меченые нуклеотиды. В качестве матрицы использована плазмида с модифицированной последовательностью. Реакцию проводили в буфере для Taq-ДНК-полимеразы, содержащем 3 мМ $MgCl_2$, дезоксирибонуклеотиды (в концентрации 0.2 мМ каждый) и Taq-ДНК-полимеразу (0.05 ед. акт./мкл). Все реактивы производства компании «Евроген» (Россия). Пробы инкубировали 3 мин при 94°C, осуществляли 30 циклов повторения 93°C 10 с, 55°C 10 с, 72°C 15 с и дополнительно выдерживали 3 мин при 72°C в программируемом термостате Veriti Thermal Cycler (Life Technologies, США). Продукты амплификации очищали от компонентов реакции с использованием набора для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard («Евроген», Россия).

Для получения «липкого» конца для лигирования элонгационного комплекса РНКП 2 полученную ДНК инкубировали с ферментом *Tsp*RI в буфере CutSmart (NEB, США). Эффективность реакции определяли методом электрофореза в 8%-м ПААГ (соотношение акриламида и бисакриламида 19 : 1) в денатурирующих условиях в присутствии мочевины в концентрации 8 М в 0.5× буфере TBE (44.5 мМ триса, 44.5 мМ борной кислоты, 1 мМ ЭДТА) в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США). Определение длин одноцепочечных фрагментов ДНК проводили по сигналу флуоресцентной метки с помощью лазерного сканера Amersham Typhoon RGB (Cytiva, Швеция). ДНК-фрагменты, расщепленные эндонуклеазой с эффективностью не менее 95%, очищали методом препаративного электрофореза. Полученные фрагменты ДНК разделяли в ходе электрофореза (4–6 В/см, 2 ч) в 1.5%-м агарозном геле в 0.5× буфере TBE с добавкой 4 М мочевины в камере для горизонтального электрофореза Mini-Sub Cell GT («Bio-Rad Laboratories», США). Концентрацию ДНК измеряли спектрофотометрически с использованием оборудования Nanodrop 2000c UV-Vis CC (Thermo Fisher Scientific, США).

Сборку нуклеосом на анализируемых фрагментах ДНК проводили методом ступенчатого диализа против буферных растворов с понижающейся ионной силой. В качестве источника октамеров гистонов использовали хроматин без линкерных гистонов, выделенный из эритроцитов цыплят согласно протоколу, подробно описанному в работе [20]. Так, в буфере, содержащем 10 мМ трис-HCl, pH 7.5, 0.1% NP-40, 0.2 мМ ЭДТА, 5 мМ бета-меркаптоэтанола и 1 М NaCl, смешивали фрагменты ДНК и хроматин в соотношении 1 : 4 по массе ДНК (например, 2 мкг синтетических фрагментов и 8 мкг хроматина). Диализ проводили при температуре 4°C против буферных растворов, содержащих 10 мМ трис-HCl, pH 7.5, 0.1% NP-40, 0.2 мМ ЭДТА, 5 мМ бета-меркаптоэтанола и хлористый натрий в понижающейся концентрации (1 М в первом буфере, инкубация 1 ч; 0.75 М – 1 ч; 0.5 М – 2.5 ч; 0.01 М – в течение ночи). Анализ продуктов сборки проводили методом электрофоретического разделения в 4.5%-м ПААГ в 0.5× буфере TBE в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, США).

Очистку РНК-полимеразы 2 *Saccharomyces cerevisiae* проводили по методике, описанной в работе [21].

Транскрипцию нуклеосом РНК-полимеразой 2 начинали со сборки элонгационных комплексов РНКП 2 (200 нМ), дуплекса матричной ДНК и РНК и нематричной цепи ДНК при 25°С в течение 15 мин в транскрипционном буфере ТВ40 (20 мМ трис HCl, pH 7.9, 5 мМ $MgCl_2$, 40 мМ KCl и 1 мМ бета-меркаптоэтанола) (номер ТВ обозначает концентрацию KCl, процесс сборки элонгационного комплекса с указанием используемых олигонуклеотидов подробно описан в работе [22]). Полученный ЭК лигировали с нуклеосомным фрагментом (40 нМ) в присутствии 0.2 мг/мл бычьего сывороточного альбумина, 1% полиэтиленгликоля-8000, 0.5 мМ АТФ и ДНК-лигазы бактериофага Т4 в течение 16 ч при 4°С. Добавляли ГТФ и АТФ до концентрации 10 мкМ, ЦТФ до концентрации 2 мкМ и инкубировали 15 мин при 25°С. Таким образом получали ЭК с расположением активного центра РНКП 2 на расстоянии 5 нт до входа в нуклеосомную ДНК (ЭК-5). После добавления всех нуклеозидтрифосфатов в концентрации 400 мкМ и KCl до 150 мМ элонгацию транскрипта продолжали 10 мин при 25°С. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА (pH 8.0) до концентрации 20 мМ. Продукты анализировали электрофоретическим разделением в 4.5%-м ПААГ (соотношение акриламида и бисакриламида 39 : 1) в нативных условиях (в 8 М мочевине) в 0.5× буфере ТВЕ в камере для вертикального электрофореза Mini-PROTEAN Tetra Cell при 4°С. Пробы растворяли в буфере, содержащем 40% сахарозы. Распределение продуктов в геле анализировали с помощью системы детекции флуоресцентного сигнала лазерного сканера Amersham Typhoon RGB (Cytiva, Швеция). Было проведено по три независимых эксперимента. Количественный анализ проводили с использованием программного обеспечения Fiji ImageJ, как описано ранее [17], предел погрешностей определяли как стандартное отклонение значений в выборке.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспериментальная система транскрипции хроматина *in vitro*. В данной работе процесс транскрипции хроматина изучали в экспериментальной системе, состоящей из собранных на коротких фрагментах ДНК одиночных нуклеосом и высокоочищенных белков [19]. Для точного позиционирования октамера гистонов в ДНК была внесена высокоаффинная последовательность 603 [23]. Такие нуклеосомы представляют собой асимметричный барьер для РНКП 2 [24], то есть его высота зависит от ориентации последовательности относительно промотора. Здесь была использована так называемая «пропускающая» транскрипционная ориентация, которая лучше воспроизводит основные свойства транскрипции хроматина РНКП 2 *in vivo*, такие как сохранение тетрамера гистонов H3/H4 на ДНК и потерю части димеров гистонов H2A/H2B [25, 26]. В ходе амплификации в ДНК в составе синтетических олигонуклеотидов (затравок для ПЦР) внесены флуоресцентные метки, которые при сборке нуклеосом оказываются в соседних супервитках ДНК и составляют FRET-пару (Cy3 в качестве донора энергии и Cy5 – в качестве акцептора) (рис. 1а). Такие нуклеосомы позволяют наблюдать за конформационными изменениями в ДНК (рис. 1б), сопутствующими различным процессам, например, транскрипции нуклеосомной ДНК.

Схема эксперимента по транскрипции представлена на рис. 1в. Элонгационный комплекс собирали из РНКП 2, дуплекса матричной ДНК и РНК и нематричной цепи ДНК, лигировали с нуклеосомным фрагментом, добавляли ограниченный набор рибонуклеозидтрифосфатов (АТФ, ЦТФ, ГТФ). Так получали ЭК с расположением активного центра РНКП 2 за 5 нт до входа в нуклеосомную ДНК (ЭК-5). После добавления всех НТФ в концентрации 400 мкМ элонгацию транскрипта продолжали. ЭК разделяли методом электрофореза в ПААГ в нативных условиях и изучали методом «FRET-в-геле» [17].

FRET в свободных нуклеосомах. Согласно схеме эксперимента методом ПЦР были получены фрагменты ДНК, включающие небольшой участок ДНК для лигирования элонгационного комплекса и модифицированную для получения остановленных в определенном положении элонгационных комплексов последовательность 603 (рис. 1а, дорожка «ДНК»). На полученных фрагментах ДНК методом ступенчатого диализа против растворов с понижающейся ионной силой в присутствии донорного хроматина без линкерных гистонов были собраны нуклеосомы (рис. 1а, дорожка «Нуклеосома»). Условия процедуры подбирали так, чтобы минимизировать количество свободной ДНК. В дальнейшей работе использовали только смеси, содержащие не менее 90% мононуклеосом.

Эффективность FRET (E_{FRET}) свободных нуклеосом (рис. 1а и 2а) была определена по методике, описанной в работе [17], и составила 51.4 ± 1.3% (рис. 2б). Полученное значение близко к тому, которое ранее получали этим методом для нуклеосом с тем же расположением флуоресцентных меток и другой структурой линкерной ДНК [17].

Элонгационные комплексы с одинаковой длиной РНК могут иметь различную конформацию. Была проведена транскрипция полученных нуклеосом

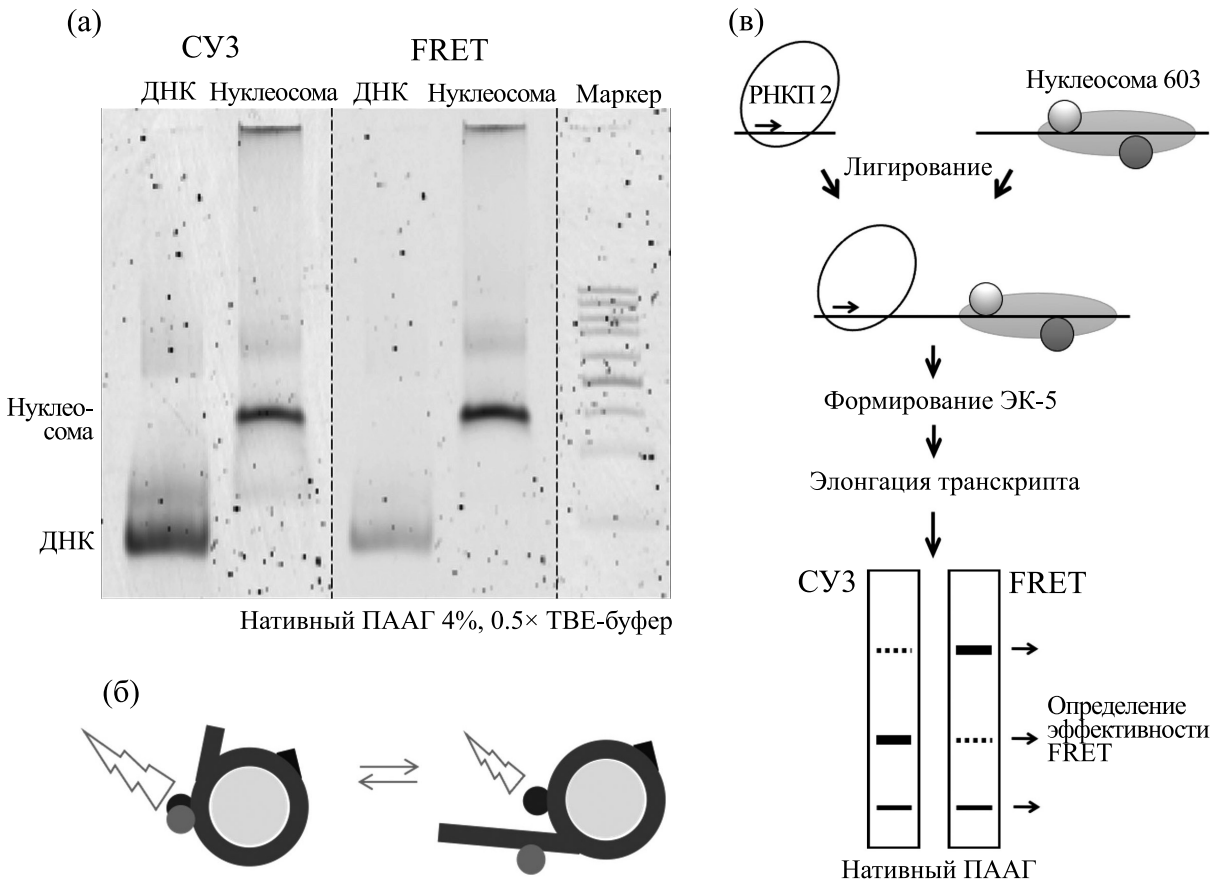


Рис. 1. Экспериментальная система для изучения структурных особенностей элонгационных комплексов, формирующихся в ходе транскрипции нуклеосом РНКП 2. (а) – Получение флуоресцентно-меченых нуклеосом. В соседние супервитки нуклеосомной ДНК введены флуоресцентные метки Cy3 и Cy5, представляющие собой донор-акцепторную пару при фёрстеровском резонансном переносе энергии. В свободной ДНК метки находятся далеко друг от друга, и FRET между ними не происходит (слабый сигнал от ДНК при детекции FRET и высокий при детекции сигнала от Cy3). При формировании нуклеосомы метки оказываются сближенными, и между ними происходит перенос энергии (интенсивности сигналов близки при детекции FRET и Cy3 от нуклеосомы). (б) – Когда под действием какого-либо фактора нуклеосомная ДНК отворачивается от октамера гистонов, происходит расхождение флуоресцентных меток в пространстве и наблюдаемый сигнал FRET снижается. (в) – Схема транскрипционного эксперимента. Элонгационный комплекс собирается из РНКП 2, ДНК-олигонуклеотидов, представляющих собой матричную и нематричную цепи дуплекса ДНК, и затравочного РНК-олигонуклеотида, по последовательности комплементарного матричному ДНК-олигонуклеотиду. К полученному ЭК лигируется нуклеосома. При добавлении ограниченного набора нуклеотидов происходит формирование ЭК-5, в котором активный центр РНКП 2 расположен на расстоянии 5 п.н. до входа в нуклеосому. После добавления всех рибонуклеозидтрифосфатов транскрипция продолжается. На любом этапе реакции продукты могут быть проанализированы методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующим определением эффективности FRET.

РНКП 2 по схеме, приведенной на рис. 1в. После разделения методом ЭФ в 4%-м ПААГ в нативных условиях продукты проанализированы методом «FRET-в-геле». Результаты эксперимента для одной из повторностей приведены на рис. 2а.

При добавлении ограниченного набора рибонуклеотидов – АТФ, ГТФ и ЦТФ – РНКП 2 занимает положение за 5 нт до входа в нуклеосому (рис. 2а, дорожка «ЭК-5»). При формировании ЭК-5 наблюдается два ЭК, обладающих разной электрофоретической подвижностью. Следует отметить, что в связи с использованным в реакции избытком мононуклеосом большое количество их сохранялось в реакционной смеси (рис. 2в, высокие пики на графиках), однако в данном случае за счет разделения ЭК в геле они не влияли на интерпретацию полученных данных. Это является преимуществом применяемого метода.

Обнаружено, что один из двух комплексов не отличается по эффективности FRET от свободной нуклеосомы (51.7 ± 0.8%) и мигрирует с за-

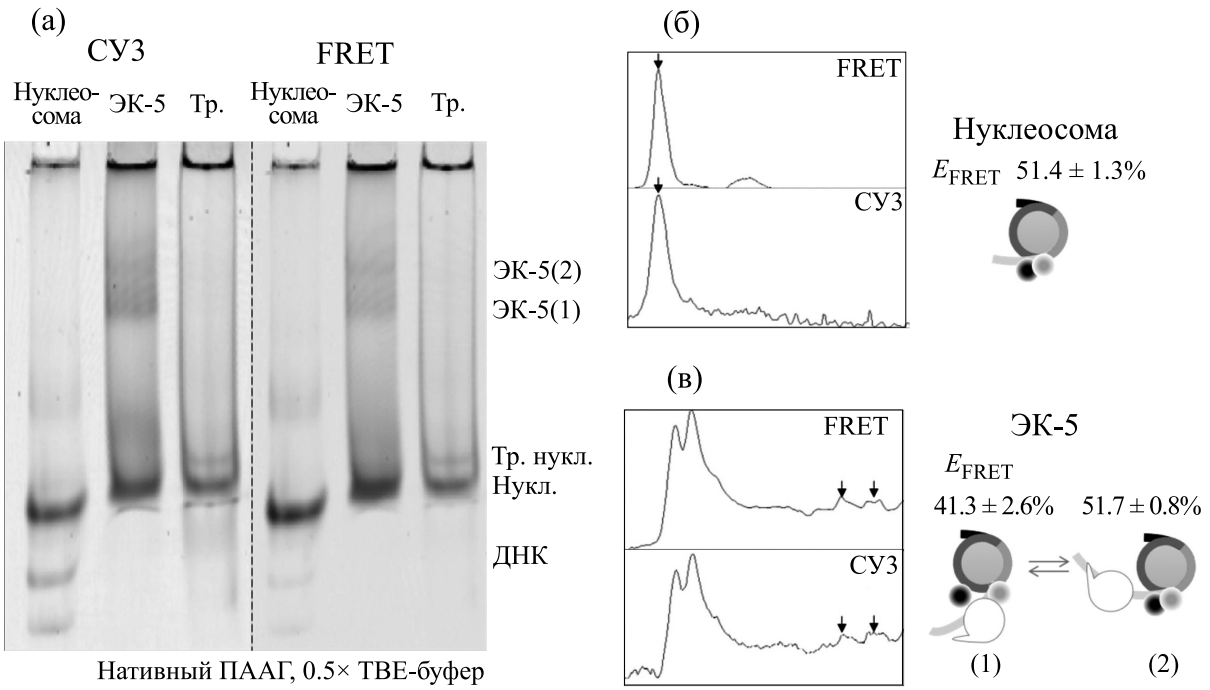


Рис. 2. Изучение структуры элонгационных комплексов (ЭК) методом FRET в полиакриламидном геле. (а) – По схеме, приведенной на рис. 1в, на флуоресцентно-меченых нуклеосомах получены ЭК и разделены методом электрофореза в нативном ПААГ. (б, в) – Интенсивности флуоресцентных сигналов в геле, измеренные с помощью флуоресцентного сканера, были проанализированы с помощью программы ImageJ. Проведен анализ интенсивностей флуоресценции Cy3 и Cy5 при возбуждении флуорофора Cy3, рассчитана эффективность FRET в нуклеосомах и ЭК-5. Справа на рисунке приведена интерпретация полученных данных: схематично показаны предполагаемые структуры двух комплексов ЭК-5 (комплекс 1 и комплекс 2) с указанием среднего значения FRET.

метно меньшей подвижностью, чем нуклеосома. Другой комплекс отличается несколько большей подвижностью и сниженным FRET (41.3 ± 2.6%) (рис. 2, дорожка «ЭК-5»). Предположительно, ЭК-5 может существовать в двух формах – с компактной нуклеосомой и отдаленным расположением РНКП 2 (возможно, с откатом фермента назад по матрице ДНК) и с небольшим отворачиванием проксимального к промотору участка ДНК. Так, достижение положения 5 относительно нуклеосомы может быть связано с отворачиванием ДНК.

При добавлении всех рибонуклеотидов РНКП 2 продолжает элонгацию через нуклеосомную ДНК. Через 10 мин транскрипции происходит эффективное высвобождение нуклеосом из элонгационных комплексов. Процесс также сопровождается образованием свободной ДНК. В таком случае флуоресцентные метки удалены друг от друга, и эффективность FRET падает до исходной, наблюдаемой в свободной ДНК. Через 10 с после начала транскрипции из активных элонгационных комплексов высвобождается 8% свободной ДНК, через 10 мин – 24%. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными о характерных особенностях транскрипции хроматина РНКП 2 *in vitro* [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе для определения структурных особенностей остановленных элонгационных комплексов, формирующихся в ходе транскрипции нуклеосом РНК-полимеразой 2 был использован подход, основанный на измерении эффективности FRET в полиакриламидном геле после разделения интермедиатов транскрипции методом электрофореза. Такой подход может быть успешно применен для анализа длительно живущих элонгационных комплексах, спонтанно образующихся в ходе транскрипции в течение ограниченного времени, а также для остановленных комплексов, образуемых в ходе транскрипции специально сконструированных матриц в присутствии ограниченного набора рибонуклеозидтрифосфатов.

Необходимо отметить, что полученные данные не могут быть использованы для точного

определения расстояния между флуоресцентными метками и построения молекулярных моделей, так как расчет эффективности FRET производится без учета квантовых выходов флуоресценции и влияния белков на эффективность FRET. На основе полученных данных можно сделать выводы относительно изменения конформации нуклеосомной ДНК и соответственно общей структуры ЭК. Так, в настоящем исследовании было обнаружено, что ЭК-5 может существовать в различных конформационных состояниях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследование выполнено с использованием инфраструктурных возможностей Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-44-02013).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. K. Luger, A. W. Mäder, R. K. Richmond, et al., Nature **389**, 251 (1997). DOI: 10.1038/38444
2. G. A. Hartzog, J. L. Speer, and D. L. Lindstrom, Biochim. Biophys. Acta **1577**, 276 (2002).
3. M. G. Izban and D. S. Luse, Genes Dev. **6**, 1342 (1992).
4. M. L. Kireeva, W. Walter, V. Tchernajenko, et al., Mol. Cell **9**, 541 (2002). DOI: 10.1016/j.molcel.2005.02.027.
5. L. S. Churchman and J. S. Weissman, Nature **469**, 368 (2011). DOI: 10.1038/nature09652
6. C. M. Weber, S. Ramachandran, and S. Henikoff, Mol. Cell **53**, 819 (2014). DOI: 10.1016/j.molcel.2014.02.014
7. O. I. Kulaeva, D. A. Gaykalova, N. A. Pestov, et al., Nature Struct. Mol. Biol. **16**, 1272 (2009). DOI: 10.1038/nsmb.1689
8. N. A. Pestov, N. S. Gerasimova, O. I. Kulaeva, and V. M. Studitsky, Sci. Adv. **1**, e1500021 (2015). DOI: 10.1126/sciadv.1500021
9. N. S. Gerasimova, N. A. Pestov, O. I. Kulaeva, et al., Transcription **7**, 91 (2016). DOI: 10.1080/21541264.2016.1182240
10. J. Singh and R. A. Padgett, Nature Struct. Mol. Biol. **16**, 1128 (2009). DOI: 10.1038/nsmb.1666
11. M. G. Izban and D. S. Luse, J. Biol. Chem. **267**, 13647 (1992).
12. B. Cheng and D. H. Price, J. Biol. Chem. **282**, 21901 (2007). DOI: 10.1074/jbc.M702936200
13. H. Ehara, T. Kujirai, Y. Fujino, et al., Science **363**, 744 (2019). DOI: 10.1126/science.aav8912
14. W. Kobayashi and H. Kurumizaka, Curr. Opin. Struct. Biol. **59**, 107 (2019). DOI: 10.1016/j.sbi.2019.07.011
15. T. Kujirai, H. Ehara, Y. Fujino, et al., Science **362**, 595 (2018). DOI: 10.1126/science.aau9904
16. D. A. Gaykalova, O. I. Kulaeva, O. Volokh, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **112**, E5787 (2015). DOI: 10.1073/pnas.1508371112
17. O. V. Chertkov, M. E. Valieva, N. V. Malyuchenko, and A. V. Feofanov, Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. **72**, 196 (2017). DOI: 10.3103/S0096392517040034.
18. K. S. Kudryashova, O. V. Chertkov, D. V. Nikitin, et al., in: Chromatin Protocols (Methods in Molecular Biology, vol. 1288), Ed. by S. Chellappan (Humana Press, New York, 2015), pp. 395–412. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2474-5_23
19. A. Thastrom, P. T. Lowary, H. R. Widlund, et al., J. Mol. Biol. **288**, 213 (1999).
20. W. Walter, M. L. Kireeva, V. Tchernajenko, et al., Methods Enzymol. **371**, 564 (2003). DOI: 10.1016/S0076-6879(03)71042-8
21. M. L. Kireeva, N. Komissarova, D. S. Waugh, and M. Kashlev, J. Biol. Chem. **275**, 6530 (2000).
22. H. W. Chang, F. K. Hsieh, S. S. Patel, and V. M. Studitsky, Methods 1**59–160**, 90 (2019). DOI: 10.1016/j.ymeth.2019.01.016
23. P. T. Lowary and J. Widom, J. Mol. Biol. **276**, 19 (1998). DOI: 10.1006/jmbi.1997.1494
24. V. A. Bondarenko, L. M. Steele, A. Ujvari, et al., Mol. Cell **24**, 469 (2006). DOI: 10.1016/j.molcel.2006.09.009
25. H. W. Chang, O. I. Kulaeva, A. K. Shaytan, et al., Nucl Acids Res. **42**, 1619 (2014). DOI: 10.1093/nar/gkt1120
26. O. I. Kulaeva, D. A. Gaykalova, N. A. Pestov, et al., Nature Struct. Mol. Biol. **16**, 1272 (2009). DOI: 10.1038/nsmb.1689
27. D. A. Gaykalova, V. Nagarajavel, V. A. Bondarenko, et al., Nucl. Acids Res. **39**, 3520 (2011). DOI: 10.1093/nar/gkq1273

Analysis of Structure of Elongation Complexes in Polyacrylamide Gel with Förster Resonance Energy Transfer Technique

N.S. Gerasimova*, A.N. Korovina*, D.A. Afonin*, K.V. Shaytan*, A.V. Feofanov*, and V.M. Studitsky*, **

**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

***Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111-2497, USA*

To study the structural features of elongation complexes formed during nucleosome transcription by RNA polymerase 2, it was proposed to use an approach based on the measurement of the efficiency of Förster resonance energy transfer in polyacrylamide gel after separation of transcription intermediates by electrophoresis. Fluorescently labeled nucleosomes were obtained by introducing a pair of fluorophores (donor and acceptor) into adjacent gyres of nucleosomal DNA. Stalled elongation complexes were formed by transcription of nucleosomes in the presence of a limited set of nucleoside triphosphates. Comparative analysis of the efficiency of Förster resonance energy transfer for free nucleosomes and elongation complexes with RNA polymerase 2 obtained on their basis revealed changes in the structure of nucleosomes in elongation complexes. It was found that elongation complexes with the same RNA length could exist in different conformational states.

Keywords: transcription, chromatin, nucleosome, RNA polymerase 2, FRET, elongation complex

EDN: GLLFHQ
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 229–233

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.2.01:(57.052.2+577.322.23+577.322.54)

НОВАЯ ИНТЕРПРЕТАЦИЯ КОЭФФИЦИЕНТА ХИЛЛА

© 2022 г. И.А. Лавриненко*, Г.А. Вашанов*, Ю.Д. Нечипуренко**

**Воронежский государственный университет, 394018, Воронеж, Университетская пл., 1*
***Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32*
E-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

Поступила в редакцию 27.12.2021 г.
После доработки 04.02.2022 г.
Принята к публикации 07.02.2022 г.

Предложена модификация уравнения Хилла, описывающего процесс кооперативного связывания макромолекулой лиганда. Вводимый нами в это уравнение параметр «относительный коэффициент кооперативности» позволяет обеспечить сопряжение коэффициента Хилла с числом взаимодействующих субъединиц в олигомере. Это позволяет прояснить физический смысл данного коэффициента и объясняет природу его нецелочисленных значений. Нормирование относительного коэффициента кооперативности дает дополнительную возможность сопоставлять такие коэффициенты для олигомеров с различным числом протомеров. Предлагаемый относительный коэффициент кооперативности может быть полезным при решении широкого круга задач, связанных с описанием согласованного взаимодействия элементов на всех уровнях пространственной организации белков, нуклеиновых кислот, их комплексов, а также такого взаимодействия для рецепторов и их медиаторов.

Ключевые слова: кооперативное связывание лигандов, изотерма адсорбции, кривая диссоциации оксигемоглобина, уравнение Хилла, коэффициент Хилла, относительный коэффициент кооперативности

DOI: 10.31857/S000630292202003X

Обратимое связывание кислорода гемоглобином является необходимым условием функционирования кислородтранспортной системы крови [1, 2]. Зависимость степени оксигенации гембелка от парциального давления этого газа графически представляется в виде кривой диссоциации оксигемоглобина [3, 4]. Построенные по ограниченному дискретному набору экспериментальных данных кривые диссоциации оксигемоглобина могут быть в дальнейшем аппроксимированы рядом математических функций [5]. Это необходимо, прежде всего, для нахождения величин полунасыщения гемоглобина кислородом (p_{50}) [6, 7], зарядного напряжения (p_{95}) [8], а также значений параметров, характеризующих уровень оксигенации в артериальной (SaO_2) [9, 10] или венозной (SvO_2) крови [11, 12].

Разработанные к настоящему времени математические модели оксигенации позволяют связывать коэффициенты уравнений с некоторыми параметрами кислородсвязывающих свойств гембелка [13–15]. Для наиболее известных моделей связывания кислорода гемоглобином, построенных на степенных и экспоненциальных зависимостях, нами ранее была проведена оценка аппроксимирующей способности [16].

Однако высокие значения коэффициентов достоверности аппроксимации (r^2) не являются самодостаточными и определяющими при подборе моделей оксигенации. Это объясняется тем, что высокие значения r^2 также можно достичь и посредством интерполирующих полиномов высших порядков, например Лагранжа, Ньютона, Фурье, Чебышёва и др., которые в данном случае не имеют физического смысла [17–19].

Поэтому, несмотря на приближенное описание кислородсвязывающих свойств гемоглобина, уравнение Хилла не утратило своей актуальности в силу минимума необходимых априорных знаний процесса оксигенации [20] (оно широко применяется и для описания других кооперативных процессов). Главным параметром в уравнении Хилла является одноименный коэффициент (h), с помощью которого можно охарактеризовать степень кооперативности процесса оксигенации. Однако несоответствие числа взаимодействующих субъединиц тетрамера (n) нецелочисленному значению h затрудняет понимание физического смысла этого коэффициента [21–23].

В настоящей работе предпринята попытка снять это кажущееся противоречие путем введения в уравнение сопрягающего коэффициента,

проясняющего физический смысл этого уравнения. Заметим, что переосмысление интерпретации коэффициента Хилла может оказаться важным при описании взаимодействия «лиганд–рецептор» [24], а также других кооперативных систем.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве объекта исследования была использована модель Хилла и набор экспериментальных данных, полученных в работе [25]. Оптимизация параметров модели проведена методом наименьших квадратов [26]. Необходимые вычисления выполнены с помощью пакета программ MS Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предложенное Г. Гюфнером в 1890 г. уравнение оксигенации, выведенное из закона действующих масс, не могло описать S-образность кривой диссоциации оксигемоглобина [27]. Поэтому А. Хилл в 1910 г. предложил рассматривать процесс оксигенации как взаимодействие лиганда с макромолекулярным ассоциатом белка, т.е. как химическую реакцию n-го порядка [13]:

$$(\mathrm{Hb})_n + n\mathrm{O}_2 \rightleftharpoons (\mathrm{HbO}_2)_n, \quad (1)$$

$$y = \frac{p^n}{p_{50}^n + p^n}, \quad (2)$$

где Hb – дезоксигемоглобин, O_2 – кислород, HbO_2 – оксигемоглобин, y – степень насыщения гемоглобина кислородом, p – парциальное давление кислорода, p_{50} – давление кислорода при $y = 0.5$ (50% насыщение лигандом) и n – степень агрегации гемоглобина (порядок реакции по лиганду, совпадающий со стехиометрическим коэффициентом этой реакции при выполнении закона действующих масс).

Так как при анализе данных показатель степени n обычно принимал нецелочисленные значения, то физический смысл данного уравнения оказался неясным. Чтобы объяснить нецелочисленные значения своего параметра, Хилл предложил рассматривать n как некоторое усреднение по множеству молекулярных ассоциатов гембелка с различной степенью их агрегации [13, 28].

Однако в 1925 г. Г. Эдером было показано, что молекула гемоглобина представляет собой тетрамер [14]. Хотя это не противоречило представлениям о существовании молекулярных ассоциатов, но и не объясняло, почему коэффициент этого уравнения приобретает значения меньше четырех единиц. Такое несоответствие снова привело к противоречиям в физической трактовке модели Хилла [21–23].

Можно представить пул молекул гемоглобина в виде набора димерных и тетрамерных форм с различной весовой долей, аналогично ассоциатам гембелка. Однако в эритроцитах данный белок находится главным образом в виде тетрамера (99.3–99.4%), что следует из расчетов по данным референтных значений концентрации гемоглобина в клетке (4300–5500 мкмоль/л) [29] и константы диссоциации ($K_{4,2}$ = 0.2 мкмоль/л) при нормальном атмосферном давлении, pH и температуре 7.0 и 37°C соответственно [30]. Из этого следует, что коэффициент Хилла, равный 2.52 (и вычисленный нами по известным данным [25]) должен соответствовать доле тетраметров 25.9%. Это возможно при концентрации белка 0.1 мкмоль/л и явно противоречит приведенным выше значениям.

Тем не менее уравнение Хилла получило широкое распространение, так как наряду с простотой вычисления и хорошей аппроксимирующей способностью [31] позволяет непосредственно находить величину p_{50}, а одноименный коэффициент этого уравнения (в аналогичных публикациях обозначаемый как n_H [32, 33], h [34, 35] или некоторыми другими символами и их сочетаниями [36, 37]) дает некоторую оценку кооперативности составляющих его субъединиц.

Для того чтобы снять противоречие между способностью уравнения Хилла при минимуме параметров хорошо аппроксимировать экспериментальные данные и несоответствием показателя степени этого уравнения целочисленному значению [38], мы предлагаем представить коэффициент Хилла h, как произведение числа взаимодействующих структурных элементов n (в частности, субъединиц гембелка) на коэффициент пропорциональности a, отождествляемый со степенью кооперативного взаимодействия этих элементов:

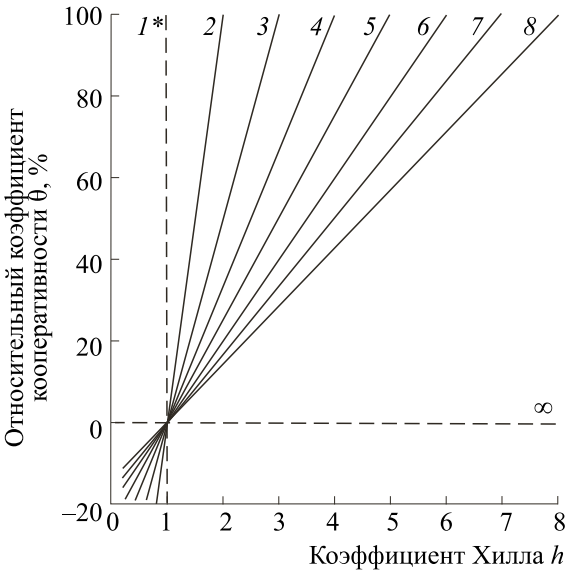
$$y = \frac{p^{an}}{p_{50}^{an} + p^{an}}. \quad (3)$$

Однако при отсутствии кооперативности, которая характеризуется коэффициентом Хилла h равным единице, коэффициент пропорциональности a будет принимать различные значения, зависящие от числа субъединиц n, что затрудняет интерпретацию последнего.

Мы предлагаем произведение an в уравнении Хилла привести к следующему виду:

$$h = an = \theta(n)(n - 1) + 1, \quad (4)$$

где $\theta(n)$ – вводимый нами «относительный коэффициент кооперативности» белка, состоящего из n субъединиц. Тогда $\theta(n) = 0$ указывает на отсутствие кооперативности, и коэффициент Хилла будет равен единице при любых n.



Зависимость относительного коэффициента кооперативности от коэффициента Хилла для макромолекулы, состоящей из n субъединиц. Для молекулы гемоглобина актуальными являются значения $n = 2$ и 4. Обозначения: номера линейных моделей соответствуют количеству субъединиц в составе макромолекулы. Примечание: для $n = 1$ – значение $\theta(n)$ не определено, для $n \to \infty$ и при $h = \text{const}$ получаем $\theta(n) \to 0$.

В конечном варианте в нашей записи уравнение Хилла (при $p > 0$) будет выглядеть следующим образом:

$$y = \frac{p^{\theta(n)(n-1)+1}}{p_{50}^{\theta(n)(n-1)+1} + p^{\theta(n)(n-1)+1}} = \left(1 + \left(\frac{p_{50}}{p}\right)^{\theta(n)(n-1)+1}\right)^{-1}. \quad (5)$$

Для проверки адекватности данной математической модели экспериментальным данным [25] использовали критерий Фишера. Результаты анализа однофакторной регрессии показали следующее: $F_{\text{расч}}$ (103905.36) >> $F_{\text{табл}}$ (3.99, $\alpha = 0.05$), при $r^2 = 99.94\%$, что демонстрирует приведенную модель статистически значимой.

При помощи этого уравнения по приведенным данным для тетрамера гемоглобина мы вычислили значения величин p_{50} и $\theta(4)$, которые составили 28.8 мм рт. ст. и 0.507 соответственно. Таким образом, этот коэффициент может быть использован для описания степени взаимодействия между субъединицами в составе олигомера. Он показывает, насколько «необходимо» взаимодействовать протомерам для текущего «выполнения» макромолекулой своей функциональной задачи, исходя из максимальной возможности, определяемой числом ее субъединиц.

Важным применением $\theta(n)$, на наш взгляд, также может быть сопоставление степени кооперативности, например, для димерных и тетрамерных форм гемоглобина, учитывающее количество взаимодействующих субъединиц. Если диссоциация тетрамера гембелка на его димеры приведет к ожидаемому уменьшению коэффициента Хилла, то по нормированному значению $\theta(n)$ степень кооперативности может остаться прежней. В общем виде нормированное значение $\theta(n)$ можно получить путем приведения к димерной, тетрамерной или любой другой форме белка исходя из зависимостей, представленных на рисунке. Также следует отметить граничные условия. Для молекулы, состоящей из одной субъединицы ($n = 1$), значение $\theta(n)$ не определено (пунктирная линия 1*), так как в этом случае кооперативность отсутствует как физическое явление. Для $\theta(n) = 0$ коэффициент Хилла всегда будет равен единице при любых $n > 1$ (см. рисунок).

Для тех случаев, когда раствор гемоглобина является смесью димерных и тетрамерных форм белка с усредненной величиной n, значение $\theta(n)$ можно получить исходя из вычисленного значения $\bar{n}$ приведенного диапазона (таблица).

Доля тетрамерных форм оксигемоглобина (χ) и среднее арифметическое число субъединиц ($\bar{n}$) в составе макромолекулы в зависимости от концентрации белка (C)

C, моль/л	χ, %	$\bar{n}$
10^{-9}	0.50	2.010
10^{-8}	4.55	2.091
10^{-7}	26.79	2.536
10^{-6}	64.17	3.283
10^{-5}	86.82	3.736
10^{-4}	95.63	3.913
10^{-3}	98.60	3.972
10^{-2}	99.55	3.991

Примечание. Значения приведены для температуры 37°C, pH 7.0 и нормального атмосферного давления.

Еще одним важным применением вводимой нами в рассмотрение величины $\theta(n)$ может быть анализ степени кооперативных взаимодействий гибридов валентности, в частности, гетеротетрамеров гемоглобина, как комбинации α-, β- и других типов субъединиц с различной степенью окисления гемового железа ($2^+/3^+$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена модификация уравнения Хилла, описывающего процесс кооперативного связывания лиганда макромолекулой на примере оксигенации гемоглобина. Мы ввели в рассмотрение параметр $\theta(n)$ – относительный коэффициент кооперативности, который позволяет обеспечить сопряжение вычисляемого коэффициента Хилла с числом взаимодействующих субъединиц в олигомере n и устраняет проблему физического смысла этого коэффициента – объясняет природу его нецелочисленных значений. Нормировка относительного коэффициента кооперативности дает дополнительную возможность сопоставлять эти коэффициенты для олигомеров с разными значениями n.

Таким образом, $\theta(n)$ может быть полезным при решении широкого круга задач, связанных с кооперативными взаимодействиями [39–41]. Развитый нами подход может быть применен для описания изотерм адсорбции (кривых связывания) лигандов разного рода с макромолекулами [42–45], в частности, взаимодействия рецепторов и их медиаторов [46, 47].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы считают своим приятным долгом выразить благодарность А. Бучельникову и А. Заседателеву за плодотворные дискуссии и полезные замечания, а также рецензентам за критический анализ рукописи и ценные замечания.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (тема 121052600299-1).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. F. Schmidt and G. Thews, *Human Physiology* (Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 2013).
2. W. F. Boron and E. L. Boulpaep, *Medical Physiology* (Elsevier Health Sciences, Philadelphia, 2017).
3. R. N. Sladen, Int. Anesthesiol. Clin. **19** (3), 39 (1981). DOI: 10.1097/00004311-198119030-00006
4. E. Antonini, Crit. Care Med. **7** (360), 367 (1979).
5. S. M. Gadrey, C. E. Lau, R. Clay, et al., Physiol. Meas. **40** (11), 115008 (2019). DOI: 10.1088/1361-6579/ab5154
6. Z. Chu, Y. Wang, G. You, et al., Artif. Cells Nanomed. Biotechnol. **48** (1), 867 (2020). DOI: 10.1080/21691401.2020.1770272
7. R. M. Winslow, Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol. **33** (1), 1 (2005). DOI: 10.1081/bio-200046634
8. N. Willis, M. C. Clapham, and W. W. Mapleson, Br. J. Anaesth **59** (9), 1160 (1987). DOI: 10.1093/bja/59.9.1160
9. J.-A. Collins, A. Rudenski, J. Gibson, et al., Breathe **11** (3), 194 (2015). DOI: 10.1183/20734735.001415
10. M. A. Danish, Cureus **13** (2), e13240 (2021). DOI: 10.7759/cureus.13240
11. J. Melius, Am. J. Crit. Care **3** (5), 353 (1994).
12. J.-L. Teboul, O. Hamzaoui, and X. Monnet, Crit. Care **15** (6), 1005 (2011). DOI: 10.1186/cc10491
13. A. V. Hill, J. Physiol. **40**, i (1910).
14. G. S. Adair, A. V. Bock, and H. Field Jr., J. Biol. Chem. **63**, 529 (1925).
15. S. R. Bernard, Bull. Math. Biophys. **22**, 391 (1960). DOI: 10.1007/BF02476722
16. И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов, В. Ю. Сулин и др., Биофизика **66** (6) 1065 (2021). DOI: 10.31857/S000630292106003X
17. H. Bateman and A. Erdelyi, *Higher Transcendental Functions* (McGraw-Hill, New York, 1953), Vol. 2.
18. J. P. Boyd, *Chebyshev and Fourier spectral methods* (Dover Publications, New York, 2001).
19. E. Meijering, Proc. IEEE **90** (3), 319 (2002). DOI: 10.1109/5.993400
20. S. A. Frank, Biol. Direct **8** (1), 1 (2013). DOI: 10.1186/1745-6150-8-31
21. M. L. Coval, J. Biol. Chem. **245** (23), 6335 (1970). DOI: 10.1016/S0021-9258(18)62614-6

22. J.-H. S. Hofmeyr and H. Cornish-Bowden, Bioinformatics **13** (4), 377 (1997). DOI: 10.1093/bioinformatics/13.4.377

23. S. Goutelle, M. Maurin, F. Rougier, et al., Fund. Clin. Pharmacol. **22** (6), 633 (2008). DOI: 10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x

24. J. N. Weiss, FASEB J. **11** (11), 835 (1997).

25. R. M. Winslow, M. Swenberg, R. L. Berger, et al., J. Biol Chem **252**, 2331 (1977). DOI: 10.1016/S0021-9258(17)40559-X

26. F. M. Dekking, C. Kraaikamp, H. P. Lopuhaä, et al., *A Modern Introduction to Probability and Statistics: Understanding Why and How* (Springer-Verlag, London, 2005). DOI: 10.1007/1-84628-168-7

27. G. Hüfner, Arch. Physiol. **31**, 28 (1890).

28. J. T. Edsall, J. Hist. Biol. **5** (2), 205 (1972). DOI: 10.1007/BF00346659

29. A. H. B. Wu, *Tietz clinical guide to laboratory tests* (Elsevier Science, St. Louis, MO, 2006).

30. N. Griffon, V. Baudin, W. Dieryck, et al., Protein Sci **7** (3), 673 (1998). DOI: 10.1002/pro.5560070316

31. N. Kaihnsa, Y. Ren, M. Safey El Din, et al., J. Math. Biol. **81** (4–5), 1169 (2020). DOI: 10.1007/s00285-020-01540-8

32. H. Abeliovich, Biophys. J. **89** (1), 76 (2005). DOI: 10.1529/biophysj.105.060194

33. O. Rapp and O. Yifrach, PLoS One **12** (8), e0182871 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0182871

34. H. Dahl, S. Taudorf, D. M. Bailey, et al., Exp. Physiol. **105** (7), 1063 (2020). DOI: 10.1113/EP088615

35. C. F. S. Bonafe, D. F. L. Neto, E. A. Martínez, et al., Chem. Papers **74** (9), 2861 (2020). DOI: 10.1007/s11696-020-01125-1

36. S. Srinivasan, F. H. Waghu, S. Idicula-Thomas, et al., Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes **1862** (4), 183242 (2020). DOI: 10.1016/j.bbamem. 2020.183242

37. A. Horovitz and T. Mondal, J. Phys. Chem. B **125** (1), 70 (2021). DOI: 10.1021/acs.jpcb.0c09351

38. M. Żebrowska, M. Weippert, and M. Petelczyc, Front. Physiol. **12** (945), (2021). DOI: 10.3389/fphys.2021.695569

39. L. Acerenza and E. Mizraji, Biochim. Biophys. Acta **1339** (1), 155 (1997). DOI: 10.1016/s0167-4838(96)00228-2

40. A. Horovitz, Proc. Roy. Soc. Lond. B: Biol. Sci. **229** (1256), 315 (1986). DOI: 10.1098/rspb.1986.0088

41. T. R. Chay and C. Ho, Proc/ Natl/ Acad/ Sci/ USA **70** (12), 3914 (1973). DOI: 10.1073/pnas.70.12.3914

42. I. M. Klotz, J. Biol. Chem. **279** (1), 1 (2004). DOI: 10.1074/jbc.X300006200

43. H. A. Saroff, Biochemistry **30** (42), 10085 (1991). DOI: 10.1021/bi00106a004

44. Ю. Д. Нечипуренко, *Анализ связывания биологически активных соединений с нуклеиновыми кислотами* (Ин-т комп. исслед. (ИКИ), М. – Ижевск, 2015).

45. D. Leipply and D. E. Draper, Biochemistry **49** (9), 1843 (2010). DOI: 10.1021/bi902036j

46. A. F. Kolodziej, T. Tan, and D. E. Koshland, Jr., Biochemistry **35** (47), 14782 (1996). DOI: 10.1021/bi961481v

47. A. Whitty, Nat. Chem. Biol. **4** (8), 435 (2008). DOI: 10.1038/nchembio0808-435

New Interpretation of the Hill Coefficient

I.A. Lavrinenko*, G.A. Vashanov*, and Yu.D. Nechipurenko**

**Voronezh State University, Universitetskaya pl. 1, Voronezh, 394018 Russia*

***Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova str. 32, Moscow, 119991 Russia*

A modification of Hill's equation describing the process of cooperative binding of a ligand by a macromolecule is proposed. The parameter "relative coefficient of cooperativity" introduced by us into this equation allows us to ensure the conjugation of the Hill coefficient with the number of interacting subunits in the oligomer. This makes it possible to clarify the physical meaning of this coefficient and explains the nature of its non-integer values. Normalization of the relative coefficient of cooperativity gives an additional opportunity to compare such coefficients for oligomers with different numbers of protomers. The proposed relative coefficient of cooperativity can be useful in solving a wide range of problems related to the description of the coordinated interaction of elements at all levels of the spatial organization of proteins, nucleic acids, their complexes, as well as such interaction for receptors and their mediators.

Keywords: cooperative binding of ligands, adsorption isotherm, dissociation curve of oxyhemoglobin, Hill's equation, Hill's coefficient, relative coefficient of cooperativity

EDN: ZCLMKX
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 234–239

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 519.876.5

АНАЛИЗ СТРУКТУРНОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ГЕНОМОВ ЛЬНА *Linum usitatissimum* L.

© 2022 г.
М.А. Дук*, А.А. Канапин*, А.А. Самсонова*, Т.А. Рожмина, М.Г. Самсонова***

**Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29*

***Институт льна – обособленное подразделение Федерального научного центра лубяных культур, 172002, Торжок Тверской области, ул. Луначарского, 35*

E-mail: m.samsonova@spbstu.ru

Поступила в редакцию 07.12.2021 г.
После доработки 07.12.2021 г.
Принята к публикации 12.12.2021 г.

У 100 хорошо секвенированных геномов льна проанализированы два типа структурной изменчивости: вариация присутствия/отсутствия генов и вариация числа копий. Показано, что в геномах рассматриваемых образцов льна в сравнении с референсным геномом наблюдаются делеции последовательностей (участков ДНК), вставки новых последовательностей и увеличение числа копий последовательностей. Функциональная аннотация соответствующих районов в референсном геноме и новых последовательностей показала, что они кодируют белки, участвующие в ответе растения на биотический и абиотический стрессы, в энергетическом обмене, вирусной и транспозонной активности, а также в формировании клеточных мембран. Выявленные функции могут свидетельствовать об адаптации сортов к региональным условиям выращивания посредством структурной изменчивости.

Ключевые слова: лен, геномика, секвенирование, структурная вариабельность

DOI: 10.31857/S0006302922020041

Лен является важной сельскохозяйственной культурой двойного назначения. Семена масличного льна являются ценным источником высококачественных ненасыщенных кислот, лигнанов, легко усваиваемых протеинов, диетической клетчатки, витаминов и минеральных элементов. Лен-долгунец служит основным источником натурального волокнистого сырья, в котором в настоящее время нуждается не только текстильная, но и другие высокотехнологичные отрасли экономики – фармацевтическая промышленность, космос, оборонный комплекс, автомобилестроение [1]. В современных условиях лен-долгунец рассматривается как стратегическая культура России, позволяющая заменить хлопок-сырец, который перешел в разряд импортного сырья.

Детальная характеристика генетического разнообразия льна имеет первостепенное значение для долгосрочной устойчивости и диверсификации производства этой сельскохозяйственной культуры, а также для общего успеха селекционных программ. В последнее время в этой области был достигнут значительный прогресс, в первую очередь благодаря публикациям результатов исследований генетического разнообразия льна из ряда национальных коллекций [2–6]. Коллекция льна, созданная в Федеральном центре лубяных культур (ФЦЛК), является одной из крупнейших в мире и охватывает практически все генетическое разнообразие этой культуры. Помимо современных отечественных и зарубежных сортов ФЦЛК располагает образцами семян ценных селекционных линий, староместных и кряжевых форм, а также дикорастущих видов, большинство из которых уже невозможно обнаружить в природе. Особенно важно подчеркнуть, что коллекция ФЦЛК включает сорта льна из Евразии с большой долей унаследованных русских местных форм, что отличает ее от коллекций, использованных в предыдущих генетических исследованиях.

Ранее мы охарактеризовали генетическое разнообразие в форме однонуклеотидных полиморфизмов у репрезентативной выборки образцов льна из коллекции ФЦЛК [7]. Мы наблюдали значительную дифференциацию популяций мас-

личного льна и льна-долгунца, идентифицировали области генома, маркированные сигналами недавней селекции, и показали, что они заметно отличаются у долгунцов и масличных форм, впервые попытались всесторонне охарактеризовать кряжи – староместные сорта русского происхождения, чтобы пролить свет на их селекционную историю и их связь с современными сортами льна-долгунца. Здесь мы приводим результаты анализа структурной вариабельности геномов образцов коллекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Коллекция из 100 образцов льна была выращена на опытном поле ФЦЛК в Торжке (Тверская обл.) в нее вошли 47 долгунцов, 24 межеумка, 10 крупносемянных образцов и 22 кудряша. Среди образцов обеих групп были представлены местные формы (ландрасы), кряжи (староместные сорта, выведенные российскими крестьянами в XIX веке), современные селекционные сорта и селекционные линии из 30 стран со всех континентов. ДНК из листьев, собранных у образцов, выделяли с помощью набора DNeasy Plant Mini (Qiagen, США).

Секвенирование ДНК было выполнено в BGI с использованием протокола Illumina, генерирующего считывания парных концов длиной 150 п.н. Было получено 9220.83 Гб необработанных данных, содержащих 6147221648 прочтений со средним покрытием 20.6×. Обработанные чтения были выровнены относительно NCBI-сборки референсного генома льна ASM22429v2 с помощью bwa-mem с использованием стандартных параметров [8].

Были проанализированы два типа структурной вариабельности – вариации присутствия/отсутствия генов и участков ДНК, а также вариации числа копий. При анализе вариаций присутствия/отсутствия генов вставки и делеции, наблюдаемые в геномах образцов, были проанализированы отдельно. Для анализа вставок с помощью SAMtools [9] были выбраны прочтения, не выравнивавшиеся на референсный геном льна, и собраны в длинные контиги с помощью программы ABySS [10]. С помощью алгоритма blat [11] контиги были проанализированы на степень совпадения с референсным геномом, для дальнейшего анализа в качестве новых вставок были выбраны прочтения, длина которых составляет более 1000 пар оснований, а совпадение с референсным геномом менее 25%. В выбранных прочтениях были найдены рамки считывания (ORFs), найденные домены сравнивали с актуальной базой данных Pfam [12], то же самое делалось для комплементарных последовательностей выбранных прочтений.

Вариации числа копий генов были найдены с помощью программы CNVnator [13]. Для анализа делеций и увеличения числа копий генов были найдены пересечения их с известными генами льна, а также на основе референсного генома выбраны участки, отсутствующие в образцах; домены, попавшие в эти участки, сравнивали с актуальной базой данных Pfam.

При сравнении с базой Pfam было обнаружено множество доменов, связанных с активностью транспозонов в геноме, которые присутствовали одновременно и среди вставок, и среди делеций, иными словами, не являлись новыми вставками, поэтому для анализа новых вставок подобные домены были исключены из рассмотрения для каждого образца. Для обобщения функций доменов, найденных среди вставок и делеций, было проведено сравнение с базой данных GO (Gene Ontology).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общее число обнаруженных структурных вариантов в 100 образцах льна составило 216863, среди этих вариантов преобладали делеции (209294).

Анализ вариации присутствия/отсутствия. Суммарная длина контигов, не выравнивавшихся на референсный геном, составляла в среднем 8727963.5 п.н. при длине референсного генома 316167074 п.н., т. е. в среднем составляла порядка 3% генома у рассматриваемых образцов.

Функциональная аннотация последовательностей, отсутствующих в референсном геноме, но присутствуюших в индивидуальных образцах («новые вставки») с помошью базы данных Pfam выявила 1786 уникальных белковых доменов на прямой цепи ДНК и 623 на комплементарной цепи. В среднем каждый образец содержал 352 таких домена на прямой цепи ДНК и 74 домена на комплементарной цепи. На рис. 1 показано, какие белковые домены встречаются наиболее часто в среднем на каждый образец. Среди них можно отметить домены белков с антимикробными функциями (MatE, Antimicrobial10); анкириновые повторы, связанные со множеством функций (Ank, Ank_2, Ank_3, Ank_4, Ank_5); домены, необходимые для расщепления фитопатогенов (TAXi_C, TAXi_N); домены, связанные с энергетическим обменом (Polysacc_synt_C, Glyco_transf_61, PC_Esterase); домены вирусных белков (Luteo_Vpg).

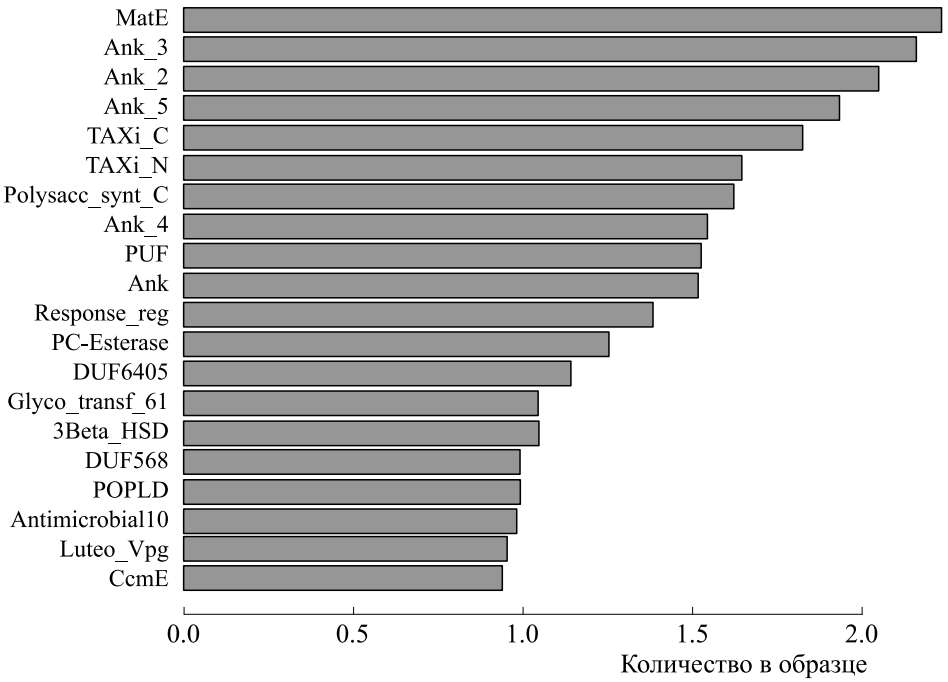


Рис. 1. Функциональная аннотация и среднее число на образец белковых доменов, кодируемых «новыми вставками» последовательностей.

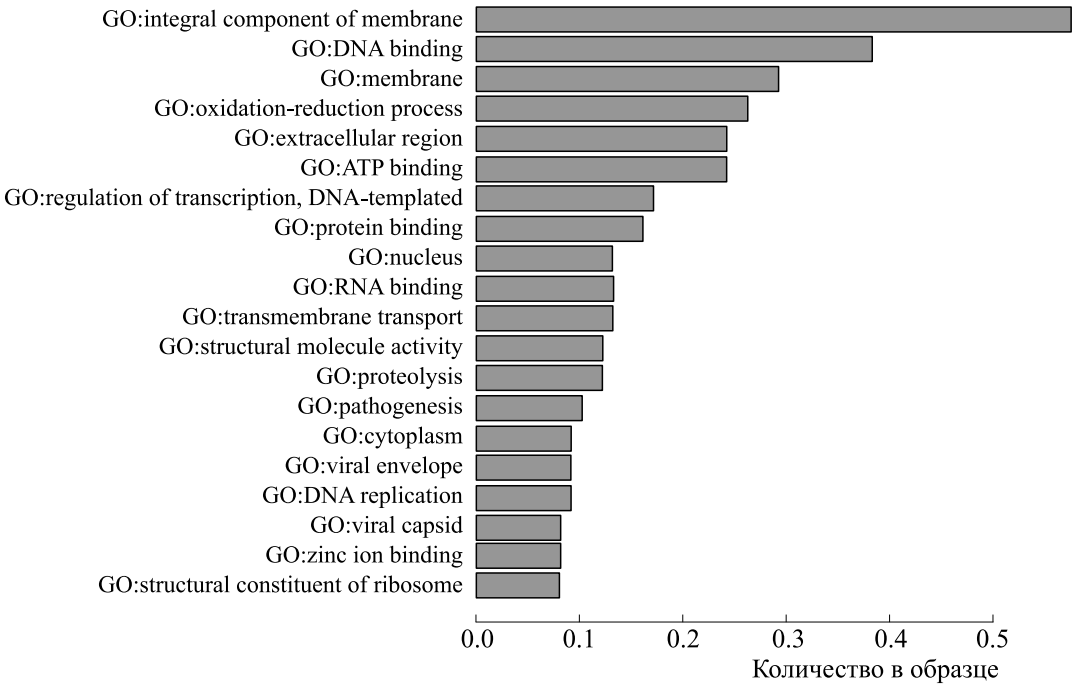


Рис. 2. Функциональная аннотация (по Gene Onthology) всех найденных доменов в новых вставках последовательностей и их среднее число на образец.

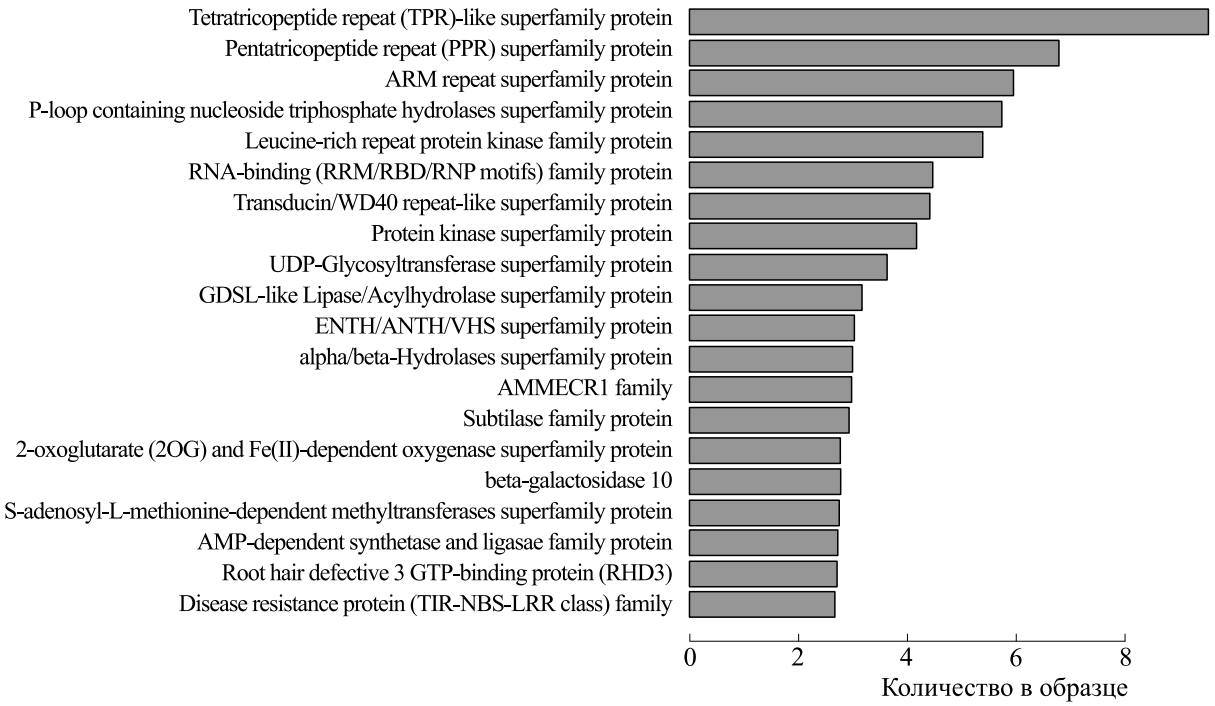


Рис. 3. Гены, наиболее часто пересекающиеся с делециями, объединенные по функциям.

На рис. 2 показан график, обобщающий с помощью GO (Gene Onthology) функции всех найденных доменов в новых вставках последовательностей в геномах образцов. Следует отметить, что наиболее часто встречающиеся домены, показанные ранее на рис. 1, не аннотированы по GO и на рис. 2 не представлены, однако по доменам, аннотированным по GO, также можно сделать вывод, что вставки (т. е. последовательности, присутствующие в образцах, но отсутствующие в референсе) часто кодируют белки, связанные с ДНК-процессами, энергетическим обменом, прочностью клеточных мембран, вирусной активностью.

Анализ вариации числа копий. Случаи уменьшения числа копий (т. е. делеции) и увеличения числа копий были проанализированы по отдельности. При анализе делеций были проанализированы гены, попадающие в такие районы. На рис. 3 показан обобщенный график функций генов, наиболее часто пересекающихся с выявленными делециями у рассматриваемых образцов. Здесь можно отметить белки, связанные с ответом на окислительный и солевой стресс и иммунитетом (TPR, PPR, ARM); белки, связанные с реакцией на засуху и колебания температуры (WD40, TPR, LRR); различные ферменты (протеинкиназы, гидролазы, гликозилтрансферазы, метилтрансферазы), связанные с энергетическим обменом. При анализе увеличения числа копий генов в среднем обнаруживалось 76 подобных случаев на образец. Аннотация таких участков показала, что они содержат гены, связанные с реакцией на абиотический стресс (RING/U-box, PPR, TTR, LRR), различные ферменты, белки, связанные с формированием семян и реакцией на освещенность (рис. 4).

Подводя итог анализу вариаций присутствия/отсутствия генов и участков ДНК и вариаций числа копий, можно отметить, что в геномах рассматриваемых образцов льна в сравнении с референсным геномом наблюдаются делеции последовательностей (участков ДНК), вставки новых последовательностей и увеличение числа копий последовательностей. Функциональная аннотация соответствующих районов в референсном геноме и новых последовательностей показала, что они кодируют белки, участвующие в ответе растения на биотический и абиотический стрессы, в энергетическом обмене, вирусной и транспозонной активности, а также в формировании клеточных мембран. Выявленные функции могут свидетельствовать об адаптации сортов к региональным условиям выращивания посредством структурной изменчивости генома.

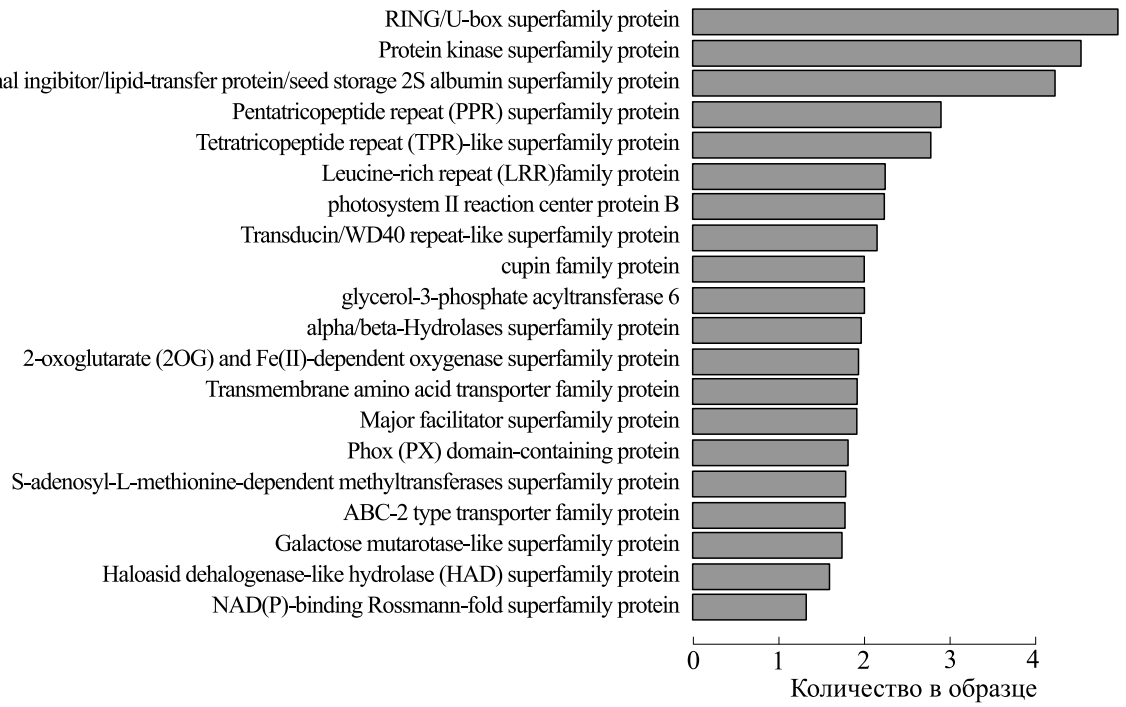


Рис. 4. Гены, наиболее часто пересекающиеся с увеличением числа копий, объединенные по функциям, и их среднее количество в образце.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-16-00030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Т. А. Рожмина, Л. Н. Павлова, Н. В. Мельникова и Л. М. Голубева, Успехи соврем. науки **1** (10), 184 (2017).
2. A. Diederichsen, P. M. Kusters, D. Kessler, et al., Gen. Resources Crop Evol. **60**, 1479 (2012). DOI: 10.1007/s10722-012-9936-1
3. B. J. Soto-Cerda, A. Diederichsen, R. Ragupathy, and S. Cloutier, BMC Plant Biol. **13**, 78, (2013). DOI: 10.1186/1471-2229-13-78
4. F. M. You, J. Xiao, P. Li, et al., Int. J. Mol. Sci. **19** (8), 2303 (2018). DOI: 10.3390/ijms19082303
5. D. Guo, H. Jiang, W. Yan, et al., Front. Plant Sci. **10**, 1682 (2019). DOI: 10.3389/fpls.2019.01682
6. Chandrawati, N. Singh, R. Kumar, et al., Physiol. Mol. Biol. Plants **23**, 207 (2017). DOI: 10.1007/s12298-016-0408-5
7. M. Duk, A. Kanapin, S. Surkova, et al., Front. Plant Sci. **12**, 764612 (2021). DOI: 10.3389/fpls.2021.764612
8. H. Li and R. Durbin, Bioinformatics **25**, 1754 (2009).
9. P. Danecek, J. K. Bonfield, J. Liddle, et al., Gigascience **10** (2), giab008 (2021). DOI: 10.1093/gigascience/giab008
10. G. Robertson, J. Schein, R. Chiu, et al., Nat. Methods **7** (11), 909 (2010). DOI: 10.1038/nmeth.1517
11. W. J. Kent, Genome Res. **12** (4), 656 (2002).
12. J. Mistry, S. Chuguransky, L. Williams, et al., Nucl. Acids Res. **49** (D1), D412 (2021). DOI: 10.1093/nar/gkaa913
13. A. Abyzov, A. E. Urban, M. Snyder, and M. Gerstein, Genome Res. **21** (6), 974 (2011). DOI: 10.1101/gr.114876.110

Analysis of Structural Variation in the Genome of Flax *Linum usitatissimum* L.

M.A. Duk*, A.A. Kanapin*, A.A. Samsonova*, T.A. Rozhmina, and M.G. Samsonova***

**Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia*

***Flax Institute, ul. Lunacharskogo 35, Thorzhok, Tver Region, 172002 Russia*

Two types of structural variation such as presence-absence and copy number variations were analyzed in 100 well-sequenced flax genomes. In this study, we observed deletions of DNA sequences, insertions of new sequences, and copy number amplification in individual flax varieties compared to the reference genome. The functional annotation of the corresponding regions in the reference genome and new sequences showed that they encode proteins involved in the plant response to biotic and abiotic stresses, in energy metabolism, viral and transposon activity, and in the formation of cell membranes. Our analysis demonstrates that identified functions might be indicative of adaptation of varieties to regional growing conditions through structural variation.

Keywords: flax, genomics, sequencing, structural variation

EDN: XWJAKB
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 240–243

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 519.876.5

СБОРКА ГЕНОМОВ ТРЕХ СЛАБОВИРУЛЕНТНЫХ ШТАММОВ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*

© 2022 г. А.А. Канапин*, А.А. Самсонова*, М.П. Банкин*, А.А. Логачев*, Т.А. Рожмина, М.Г. Самсонова***

**Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29*

***Институт льна – обособленное подразделение Федерального научного центра лубяных культур, 172002, Торжок Тверской области, ул. Луначарского, 35*

E-mail: m.samsonova@spbstu.ru

Поступила в редакцию 07.12.2021 г.
После доработки 07.12.2021 г.
Принята к публикации 12.12.2021 г.

Фузариозное увядание – наиболее разрушительное грибковое заболевание, ограничивающее возделывание льна во всех основных странах, выращивающих лен. Его возбудитель – гриб *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*. В работе сообщается о сборках генома трех слабопатогенных штаммов *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, а именно F200, F418 и F365. Геном штамма F418, секвенированного гибридным методом по технологиям PacBio и Illumina, собран в хромосомы на основании данных референсного генома MI39. Эти результаты закладывают прочную основу для сравнительных геномных исследований грибковых патогенов растений, эволюции факторов патогенности и вирулентности, лежащих в основе динамики взаимодействий между хозяином и патогеном, что в конечном итоге предлагает решения для борьбы с этим заболеванием.

Ключевые слова: лен, геномика, секвенирование, фузариозное увядание.

DOI: 10.31857/S0006302922020053

Fusarium oxysporum – это генетически разнообразный видовой комплекс, состоящий из различных специальных форм (formae speciales, f. sp.), которые демонстрируют узкую адаптацию к хозяину и используют широкий спектр экологических ниш [1]. *Fusarium oxysporum* f. sp. включают в себя как непатогенные, так и патогенные штаммы, способные вызывать серьезные заболевания у растений, подвергая опасности производство экономически важных сельскохозяйственных культур [2].

В последние годы были секвенированы многие геномы *Fusarium oxysporum* [3–8]. Безусловно, наиболее точно секвенированный геном *F. oxysporum* – это изолят *Fusarium oxysporum lycopersici* 4287, собранный из фрагментов секвенирования по методу дробовика с последующей привязкой сборок к оптической карте [5].

Fusarium oxysporum f. sp. *lini*, один из наиболее опасных грибковых возбудителей льна, является возбудителем фузариозного увядания. Он проникает в растение через корни и распространяется внутри сосудистого пучка. После прорастания у него развиваются микроконидии, блокирующие поток воды и питательных веществ, что приводит к увяданию растений, пожелтению нижних частей и гибели [9–12]. Грибок продуцирует микотоксины и ферменты, гидролизующие компоненты клеточной стенки (целлюлазы, пектиназы, глюкуронидазы и др.), которые облегчают проникновение в ткани хозяина.

Большинство сортов льна обладают высокой или средней устойчивостью к фузариозному увяданию. Однако быстрое уменьшение генетического разнообразия сортов льна и нескончаемая «гонка вооружений» между растением и патогеном способствуют значительному увеличению риска развития болезней. Кроме того, изменение климата может привести к повышенной агрессивности отдельных рас патогенов и потере устойчивости сортов льна.

Учитывая экономическую важность выращивания льна, вышесказанное требует быстрых действий, включая всестороннюю характеристику популяции патогенов на геномном уровне, что ускоряет создание сортов льна-волокна и масличного с эффективной устойчивостью к патогенам. Ранее мы осуществили секвенировние и

сборку геномов пяти различных высокопатогенных штаммов *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*: MI39, F329, F324, F282, F287. Геном MI39 был секвенирован как по технологии Illumina, так и по технологии PacBio, что позволило выполнить его сборку на уровне хромосом [13]. Здесь мы секвенировали и выполнили сборку геномов еще трех слабовирулентных штаммов *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, F200, F418 и F365.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для выделения ДНК культуры штаммов F200, F418 и F365 были получены на жидкой среде Чапека. ДНК из мицелия выделяли с помощью коммерческого набора NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, Германия), контроль качества ДНК проводили при помощи агарозного гель-электрофореза Sekwenirowanie с использованием флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США) и набора Qubit dsDNA high-sensitivity (Thermo Fisher Scientific, США) по методике производителя. Отсутствие загрязнения выделенной геномной ДНК оценивали с использованием спектрофотометра NanoPhotometer Pearl UV/Vis (IMPLEN, Германия) по соотношению длин волн 260/280 нм.

Секвенирование геномов штамма F200, F365, F418 было выполнено в BGI с помощью платформы Illumina HiSeq400. По данным секвенирования покрытие по образцам составило 30×, а длина парных прочтений – 150 п.н. Также с использованием платформы PacBio RS II System было проведено секвенирование штамма F418 со средним покрытием 100×. Гибридная сборка генома F418 была проведена в три этапа:

1) при помощи программы Canu (версия 1.4), была проведена первичная сборка контигов фрагментов секвенирования PacBio [14];

2) с использованием программы Pilon (версия 1.23), осуществляли корректировку собранных контигов с учетом коротких фрагментов секвенирования Illumina. Доля позиций с низким качеством сборки составила $5.4 \cdot 10^{-5}$ (после коррекции) [15];

3) на базе программы RagTag (версия 2.1) [16], а также на основании данных референсного генома MI39 была проведена сборка корректированных контигов в хромосомы.

Сборку геномов штаммов F365 и F200 проводили в два шага. В рамках первого этапа с помощью программы abyss-pe из пакета ABYSS (версия 2.1.5) были собраны в контиги фрагменты секвенирования Illumina [17]. Дальнейшая сборка была проведена на основе референсного генома MI39 с помощью программы RagTag (версия 2.1) [16]. Программа RagTag значительно лучше аналогичной программы RaGOO [18], использованной ранее при сборке геномов штаммов F329, F324, F282 и F287. Поэтому эти геномы были пересобраны с использованием программы RagTag. Оценку качества сборки генома осуществляли с использованием программы QUAST (версия 5.0.2) [19]. Сравнительный анализ геномных последовательностей различных штаммов с референсной последовательностью MI39 проводился с использованием программы GSAlign (версия 1.0.19) [20]. С использованием программы RepeatMasker была проведена аннотация участков геномов, содержащих повторы. Функциональную аннотацию кодирующих генов, а также их предсказание осуществляли с помощью пакета программ BUSCO (версия 4.0.4) [21]. «Hypocreales_odb10» был использован в качестве параметра «–l», описывающего таксономическую принадлежность организма.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Геном штамма F418, секвенированного гибридным методом по технологиям PacBio и Illumina, собран в хромосомы на основании данных референсного генома MI39 [13]. Сборка остальных геномов штаммов F365 и F200, секвенированных по методу Illumina, также проведена относительно референсного генома MI39. Также проведена пересборка геномов ранее секвенированных штаммов F282, F287, F324, F329.

Гибридная сборка генома F418 с учетом референсного генома MI39 оказалась высоко эффективной, включив в свой состав более 90% контингов. Сборки других геномов, основанные на данных секвенирования только по технологии Illumina, демонстрируют относительно низкую долю повторяющихся последовательностей по сравнению с эталонным геномом MI39. Поскольку ассемблеры обычно генерируют контиги низкого качества из прочтений, соответствуюших повторяющимся участкам генома, недопредставленность повторяющихся областей генома в сборках не удивительна.

Общие данные, характеризующие собранные геномы и качество сборки приведены в таблице. Данные о геномах пяти сильно вирулентных штаммов MI39, F282, F287, F324, F329 внесены в банк данных NCBI GenBank, их идентификаторы – JABJUA000000000, JABJUB000000000, JABJUC000000000, JABJUD000000000, JABJUE000000000 соответственно.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-16-00030).

Статистика сборки геномов штаммов *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*

Тип статистики	Штамм							
	MI39	F418	F200	F282	F287	F324	F329	F365
Технология секвенирования	PacBio, Illumina	PacBio, Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina	Illumina
Покрытие	100 + 200	100 + 200	60	60	60	60	60	60
Число скаффолдов	26	75	2549	3879	3605	3233	3216	3024
Размер генома (п.о.)	69,459,321	54,615,159	72,471,920	73,301,706	73,796,401	77,268,611	74,544,230	60,916,722
Содержание GC (%)	48.08	48.51	48.54	48.49	48.25	48.52	48.26	48.14
N50 (п.о.)	5,280,230	5,107,914	5,379,025	4,622,580	5,437,438	4,568,139	4,601,953	5,207,443
L50	5	5	5	5	5	5	5	5
Максимальная длина контига (п.о.)	9,704,848	9,201,571	8,332,100	7,985,000	8,419,045	7,978,509	8,159,604	7,929,600
Число контигов с длиной > 50 kB	20	27	62	68	70	72	66	78
Аннотация BUSCO (%)	97.9	97.9	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	97.9
Число предсказанных уникальных белков	6682	6701	6474	6434	6437	6474	6431	6307

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. Zhang and L. J. Ma, Adv. Genet. **100**, 179 (2017).
2. D. D. Johnson, G. K. Flaskerud, R. D. Taylor, and V. Satyanarayana, in *Agricultural economics report 396* (Department of Agricultural Economics, North Dakota State University, 1998).
3. A. D. Armitage, A. Taylor, M. K. Sobczyk, et al., Sci. Rep. **8**, 13530 (2018).
4. F. Garcia-Bastidas, N. Ordonez, J. Konkol, et al., Plant Dis. **98**, 694 (2013).
5. L.-J. Ma, H. C. van der Does, K. A. Borkovich, et al., Nature **464**, 367 (2010).
6. S. M. Schmidt, J. Lukasiewicz, R. Farrer, et al., New Phytologist **209**, 307 (2016).
7. S. Seo, A. Pokhrel, and J. J. Coleman, Mol. Plant Microbe Interact. **33**, 138 (2020).
8. A. H. Williams, M. Sharma, L. F. Thatcher, et al., BMC Genomics **17**, 191 (2016).
9. C. B. Michielse and M. Rep, Mol. Plant Pathol. **10**, 311 (2009).
10. C. Olivain, S. Trouvelot, M. N. Binet, et al., Appl. Environ. Microbiol. **69**, 5453 (2003).
11. Т. А. Рожмина и Н. И. Лошакова, С.-х. биология **51** (3), 310 (2016).
12. Т. А. Рожмина, Биология в сельском хозяйстве **4** (17), 10 (2017).
13. A. Kanapin, A. Samsonova, T. Rozhmina, et al., Mol. Plant-Microbe Inter. **33** (9), 1112 (2020). DOI: 10.1094/MPMI-05-20-0130-SC
14. S. Koren, B. P. Walenz, K. Berlin, et al., Genome Res. **27**, 722 (2017).
15. B. J. Walker, T. Abeel, T. Shea, et al., PLoS One **9**, e112963 (2014).

16. M. Alonge, L. Lebeigle, M. Kirsche1, et al., bioRxiv **2021**, 469135 (2021). DOI: 10.1101/2021.11.18.469135
17. J. T. Simpson, K. Wong, S. D. Jackman, et al., Genome Res. **19**, 1117 (2009).
18. M. Alonge, S. Soyk, S. Ramakrishnan, et al., Genome Biol. **20**, 224 (2019).
19. A. Gurevich, V. Saveliev, N. Vyahhi, and G. Tesler, Bioinformatics **29**, 1072 (2013).
20. H. N. Lin and W. L. Hsu, BMC Genomics **21**, 182 (2020). DOI: 10.1186/s12864-020-6569-1
21. M. Seppey, M. Manni, and E. M. Zdobnov, Methods Mol. Biol. **1962**, 227 (2019).

Assembly of Three Weakly Virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* Strains

A.A. Kanapin*, A.A. Samsonova*, M.P. Bankin*, A.A. Logachev*, T.A. Rozhmina, and M.G. Samsonova***

**Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, ul. Polytekhnicheskaya 29, St. Petersburg, 195251 Russia*

***Flax Institute – a separate subdivision of the Federal Scientific Center for Bast Crops, ul. Lunacharskogo 35, Thorzhok, Tver Region 172002 Russia*

Fusarium wilt is the most destructive fungal disease, limiting flax cultivation in all main flax and linseed growing countries. The causative agent is seedbourne and soilborne fungus *F. oxysporum* f. sp. *lini*. Here, we report for the first time genome assemblies of five highly pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini*, namely F200, F418 и F365. Genome of F418 strain sequenced with both Illumina and PacBio RS II technologies was assembled into chromosomes using the MI39 genome assembly as a reference. These results lay a solid foundation for comparative genomics studies of plant fungal pathogens, evolution of pathogenicity and virulence factors underlying the dynamics of host-pathogen interactions, thus eventually offering solutions to Fusarium disease control.

Ключевые слова: flax, genomics, sequencing, Fusarium wilt

EDN: HPBLJU
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 244–249

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОФИЗИКА

УДК 577.35. 57.08. 578.4 (262.5)

ВЛИЯНИЕ ПОСТОЯННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА ИНФЕКЦИОННЫЙ ТИТР ЧЕРНОМОРСКИХ АЛЬГОВИРУСОВ

© 2022 г. О.А. Степанова*, П.В. Гайский, С.А. Шоларь****
**Институт природно-технических систем РАН, Севастополь, 299011, ул. Ленина, 28*
E-mail: solar-ua@ya.ru
***ФИЦ «Морской гидрофизический институт РАН», Севастополь, 299011, ул. Капитанская, 2*
E-mail: gaysky@inbox.ru, sa.sholar@mail.ru

Поступила в редакцию 11.07.2021 г.
После доработки 18.12.2021 г.
Принята к публикации 21.12.2021 г.

Экспериментальным путем изучены изменения инфекционного титра штаммов черноморских альговирусов трех видов микроводорослей (*Tetraselmis viridis* – штамм TvV-S21-1, *Dunaliella viridis* – штамм DvV-S20-1 и *Phaeodactylum tricornutum* – штамм PtV-S20-1) после их пребывания в постоянном однонаправленном магнитном поле с магнитной индукцией 60 мТл. Исследования проводили с помощью разработанной лабораторной установки при продолжительности опытов от 24–72 ч до шести-восьми суток. Зафиксировано снижение инфекционного титра альговирусов после магнитной нагрузки на один-два порядка (в 10–100 раз).

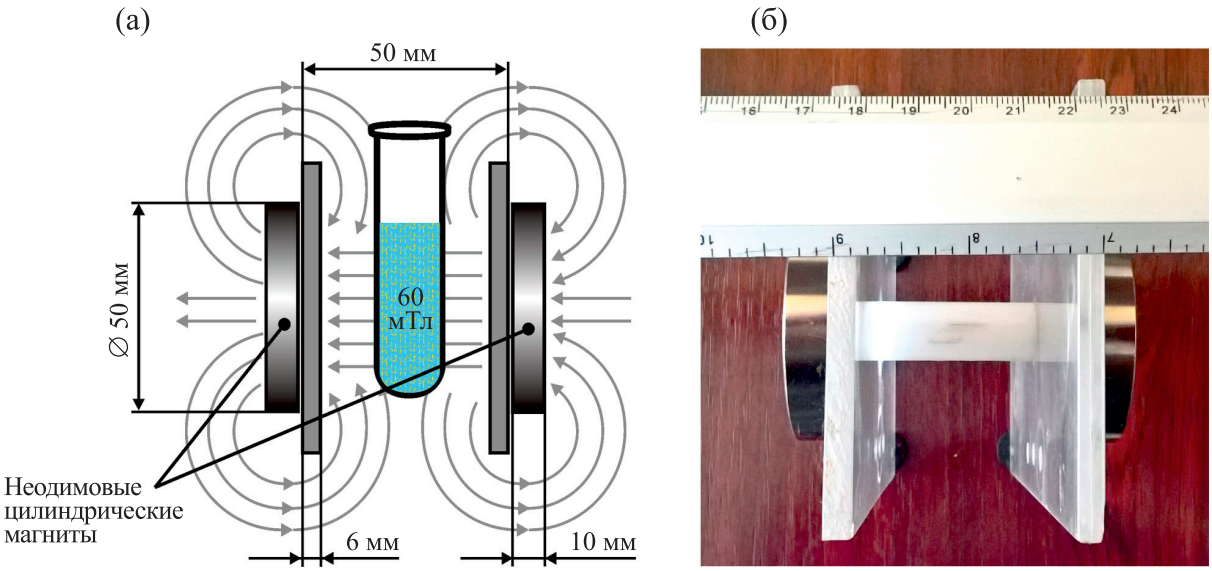
Ключевые слова: черноморские альговирусы микроводорослей Tetraselmis viridis, Dunaliella viridis и Phaeodactylum tricornutum; постоянное однонаправленное магнитное поле; вирусный инфекционный титр.

DOI: 10.31857/S0006302922020065

Бурное развитие с конца XX века молодой науки – морской (водной) вирусологии – обозначило ряд новых направлений, краткое описание которых было представлено в нашей публикации [1]. И хотя значение природных водных (морских) вирусов, самых многочисленных среди гидробионтов, в экологии гидросферы нашей Планеты не подвергается сомнениям, оно изучено пока недостаточно, а актуальность исследований в этом направлении продолжает расти. По мнению ученых, понимание роли вирусов в цикле органического углерода в гидросфере и в процессах функционирования морских пищевых цепей, как и в биоразнообразии одноклеточных гидробионтов – хозяев водных (морских) вирусов – служит основой для оценки стабильности морских экосистем и увеличивает предсказуемость воздействий глобальных изменений на биогеохимические процессы в Мировом Океане [2]. Так, роль вирусов гидросферы в экологии нашей Планеты четко обозначена уже в названии одной из работ канадского ученого – «Морские вирусы – основные (главные) игроки в глобальной экосистеме» [3].

Логично утверждать, что изменения в вирусных сообществах водоемов, которые могут быть вызваны различными биотическими и, в особенности, абиотическими факторами, ввиду масштабности численности и распространенности водных (морских) вирусов будут приводить к непредсказуемым последствиям с учетом их каскадного воздействия на биогеохимические циклы, пищевые сети и метаболический баланс Мирового Океана [4, 5].

Одной из задач в изучении экологии водных вирусов является анализ воздействий экологических факторов на вирусную составляющую гидросферы, в том числе и на ее отдельных представителей [1, 4]. Известно, что в естественных условиях любой биологический объект находится в повсеместном геомагнитном поле, основу которого составляет относительно стабильное постоянное магнитное поле (35 – 65 мкТл), изменения которого (геомагнитные вариации) могут быть вызваны воздействием потока солнечной плазмы (солнечного ветра), усиливающейся в годы повышения активности Солнца [6, 7]. В наших исследованиях была впервые установлена негативная корреляция между численностью морских вирусов черноморского виропланктона и индексом солнечной активности, что, по всей видимости, отражает причинно-следственные связи, обусловленные в том числе действием повышенного в годы активного Солнца ультрафиолетового фона и увеличения значений геомагнитных вариаций на примере геомагнитного индекса A_p [8, 9].



(а) – Схема разработанной на базе лаборатории гидрофизических и биоэлектронных измерительных систем и технологий Центра экологического приборостроения и экоэнергетики Института природно-технических систем лабораторной установки, создающей искусственное постоянное магнитное поле с магнитной индукцией 60 мТл; (б) – фотография лабораторной установки.

По литературным данным известно о влиянии постоянного магнитного и переменного электромагнитного поля на репродукцию вирусов, на чем основаны и некоторые предложения по практическому применению этого физического фактора [10–14]. Поскольку сведений о влиянии магнитного поля на представителей морской вирусной составляющей и в том числе на черноморские альговирусы недостаточно, наши первые исследования были посвящены выявлению факта ответной реакции по оценке инфекционного титра черноморского альговируса микроводоросли *Tetraselmis viridis* (штамм TvV-SI1) на дополнительную магнитную нагрузку в условиях эксперимента [15]. Полученные результаты свидетельствовали о снижении инфекционного титра используемого в опыте штамма альговируса под воздействием магнитной нагрузки.

Целью наших дальнейших исследований, результаты которых представлены в данном сообщении, явилось изучение влияния магнитной нагрузки (постоянного однонаправленного магнитного поля) разной продолжительности на инфекционные титры штаммов альговирусов трех видов черноморских микроводорослей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Влияние однонаправленного постоянного магнитного поля на вирусный титр черноморских альговирусов изучали экспериментальным путем с использованием лабораторной установки, созданной на базе лаборатории гидрофизических и биоэлектронных измерительных систем и технологий Центра экологического приборостроения и экоэнергетики Института природно-технических систем [15].

Основа лабораторной установки – два жестко закрепленных на расстоянии 5 см неодимовых магнитных диска (диаметром 50 мм и высотой 10 мм), между которыми создается постоянное однонаправленное магнитное поле с измеренным значением магнитной индукции 60 мТл. В пространстве между магнитными дисками размещали исследуемые (опытные) образцы изучаемых вирусных суспензий в стеклянных бактериологических пробирках в объеме по 2.0 мл. Пребывание исследуемого материала в магнитном поле составляло от 24–48 ч до 6–8 суток. В качестве контроля (без магнитной нагрузки) были использованы образцы вирусных суспензий, размещенные в условиях освещенности и температуры, идентичных с таковыми в условиях эксперимента.

Схема и фотография разработанной лабораторной установки, создающей искусственное постоянное магнитное поле, представлены на рис. 1.

С учетом того, что в проведенных и описанных ранее экспериментах [15] предполагалось, что в вирусной суспензии возможно содержание инфицированных, но еще не лизированных клеток хозяина (микроводоросли), используемые вирусные суспензии подвергали очистке от крупных частиц (не лизированных клеток) путем ультрафильтрации через нитроцеллюлозные фильтры фирмы Sartorius (Германия) с диаметром пор

Показатели инфекционного титра трех черноморских альговирусов культур микроводорослей *Tetraselmis viridis* (штамм TvV-S21-1), *Dunaliella viridis* (штамм DvV-S20-1) и *Phaeodactylum tricornutum* (штамм PtV-S20-1)

Штамм изучаемого альговируса		Длительность пребывания вирусной суспензии изучаемого штамма альговируса в магнитном поле (опыт) и инфекционный титр в IE/мл				Изменения инфекционного титра в опыте по сравнению с контролем
		24 ч	48 ч	72 ч	6–8 суток	
TvV-S21-1	Опыт	н/и	10^3	10^2	н/и	Снижение в 10 и в 100 раз через 48 и 72 ч
	Контроль	н/и	10^4	10^4	н/и	
DvV-S20-1	Опыт	10^6	н/и	10^5	10^5	Снижение в 10 и в 100 раз через 24, 72 ч и 6–8 суток
	Контроль	10^7	н/и	10^7	10^7	
PtV-S20-1	Опыт	10^6	н/и	10^4	10^4	Снижение в 100 раз через 72 ч и 6–8 суток
	Контроль	10^6	н/и	10^6	10^6	

Примечание: н/и – исследования не проводили.

300 нм. Таким образом, в методическую часть экспериментов, описанных ранее [15], была внесена корректировка. Ультрафильтрацию вирусных суспензий, в дальнейшем используемых как для опытных, так и для контрольных образцов, выполняли с использованием стерильной установки – шприца и фильтродержателя с нитроцеллюлозными фильтрами.

Для титрования (определения инфекционного титра), в основе которого лежит десятикратное разведение опытных и контрольных образцов суспензий альговирусов, как описано в работе [16], применяли три жидкие культуры черноморских микроводорослей: *Tetraselmis viridis* (Rouchijajnen. R.E. Norris, Hori & Chihara, 1980), *Dunaliella viridis* (Teodoresco, 1905) и *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin, 1897). Культуры были получены из отдела экологической физиологии водорослей ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского РАН».

В проводимых экспериментах использовали вирусные суспензии альговирусов из авторской коллекции [16] – альговирус микроводоросли *T. viridis* (штамм TvV-S2I-1), *D. viridis (штамм* DvV-S20-1) и *P. tricornutum* (штамм PtV-S20-1). Морфология, электронные фото и свойства этих черноморских альговирусов, как и данные анализа секвенированных геномов некоторых вирусных штаммов, описаны в работах [16, 17].

Для каждого штамма используемых альговирусов было проведено по два и более экспериментов: два эксперимента для штамма альговируса *T. viridis* и по четыре эксперимента – для штаммов альговирусов микроводорослей *D. viridis* и *P. tricornutum*, так как в период пребывания в магнитном поле в течение шести-восьми суток было выполнено по два эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментов по изучению изменения инфекционного титра черноморских альговирусов микроводорослей *T. viridis* (TvV-S21-1), *D. viridis (*DvV-S20-1) и *P. tricornutum* (PtV-S20-1) представлены в таблице.

Как можно видеть по представленным данным, в контрольных экспериментах для исследований были использованы альговирусы с разными первоначальными инфекционными титрами – 10^4, 10^6 и 10^7 инфекционных единиц в 1 мл (IE/мл) соответственно для штаммов TvV-S21-1, PtV-S20-1 и DvV-S20-1. Такие значения инфекционных титров, используемых в экспериментах с черноморскими альговирусами, приближены к природным значениям в сезоны пика их численности [16]. Ранее было установлено, что в сохраняемых вирусных суспензиях инфекционные титры в условиях комнатной температуры и освещенности, что соответствует этим же условиям в проводимых экспериментах в контроле и идентично условиям в опытах, обычно не меняются в течение одного и более месяцев [16]. Однако после пребывания в магнитном поле в течение 24 ч у альговируса микроводоросли *D. viridis (*штамм DvV-S20-1) выявлено снижение инфекционного титра в 10 раз (на один порядок), а после 72 ч магнитной нагрузки – в 100 раз (на два порядка). Дальнейшее воздействие магнитного поля в пределах шести-восьми суток не вызывало снижения инфекционного титра, который оставался на уровне 10^5 IE/мл, как и после 72 ч воздействия.

Для штамма TvV-S21-1 альговируса микроводоросли *T. viridis* отмечалось снижение инфекционного титра в 10 и 100 раз через 48 и 72 ч соответственно. Определение инфекционного титра после магнитной нагрузки через 24 ч, а также че-

рез шесть-восемь суток для этого альговируса не проводили.

Отсутствие изменений в инфекционном титре было зафиксировано для штамма PtV-S20-1 альговируса микроводоросли *P. tricornutum* через 24 ч пребывания в магнитном поле. Исследования через 48 ч не проводили. Однако через 72 ч магнитной нагрузки наблюдали снижение инфекционного титра у штамма PtV-S20-1 на два порядка (в 100 раз). Такое же значение снижения инфекционного титра (в 100 раз по сравнению с контролем) было и после шести суток.

Таким образом, зафиксировано, что через 24–48 ч пребывания в постоянном магнитном поле с магнитной индукцией 60 мТл инфекционный титр изучаемых черноморских альговирусов снижается на один порядок для DvV-S20-1 и TvV-S21-1 и не изменяется для PtV-S20-1. Более длительное воздействие магнитного поля (72 ч и более) приводит к снижению инфекционного титра на два порядка (для DvV-S20-1 и PtV-S20-1).

Полученные нами результаты, указывающие на роль магнитного поля в снижении инфекционного титра у природных черноморских альговирусов, не противоречат данным других исследователей, выявивших угнетающее воздействие магнитных и электромагнитных полей на вирусную репродукцию [10, 11]. Также учеными зафиксирован тот факт, что некоторые эффекты воздействия магнитного поля с увеличением магнитной индукции могут не отличаться от данных контрольных образцов без магнитной нагрузки [18], что близко соответствует и нашим наблюдениям о неизменности инфекционного титра альговирусов после 72 ч при увеличении продолжительности магнитной нагрузки (шесть-восемь суток).

Влияние магнитных полей на биологические системы и объекты известно со времен Гиппократа, их чудодейственные свойства описаны еще врачами Древнего Китая, Индии и Египта [19]. Накопленные знания о воздействии магнитных и электромагнитных полей на представителей биосферы разной степени организованности – от микроорганизмов и вирусов до высших позвоночных – позволили установить ряд новых для науки фактов. Однако полученные учеными результаты свидетельствуют о необходимости проведения дальнейших исследований, поскольку знания о воздействии магнитных и электромагнитных полей на биологические объекты, в том числе и на вирусы, представляются актуальными и перспективными как в теоретическом, так и в практическом плане [6, 10–15, 18–22].

По мнению исследователей [23–25] магнитное поле может влиять на вероятность образования пероксирадикала в биологических системах, изменение концентрации которого приводит к изменению концентраций активных форм кислорода (АФК), вовлеченных в формирование отклика биологической системы на внешнее магнитное воздействие и запускающих биологические механизмы, приводящие к изменению метаболизма. Известно, что активные формы кислорода являются триггерными молекулами для многих биологических процессов. Управляя их концентрацией посредством слабого внешнего магнитного поля, можно влиять на ключевые звенья метаболизма. Таким образом, перекись водорода и другие активные формы кислорода, которые образуются в результате действия магнитного поля, следует рассматривать как повреждающие факторы на биологическую составляющую, в том числе и на морские вирусы (альговирусы).

Об антивирусной активности микроэлементов в низкой степени окисления есть информация и в недавно опубликованном обзоре [26], где механизм противовирусного действия микроэлементов объясняется подавлением электростатического взаимодействия вируса (его адсорбционной способности) с клеткой путем нейтрализации зарядов на поверхности вируса и клетки. Авторы обзорной статьи предполагают возможность использования микроэлементов в низкой степени окисления для лечения вирусных инфекций, поскольку «многие потенциальные мишени, недоступные для антител и других больших молекул, легко доступны для микроэлементов».

В настоящий момент особый интерес в связи с разразившейся вирусной пандемией Covid-19 представляют исследования о роли магнитных и электромагнитных полей в изменении репродукции вирусов [10–14, 26]. Актуальность получаемых при этом результатов заключается не только в том, что такие знания могут служить основанием для новых научных гипотез, объясняющих активизацию вирусных процессов на нашей Планете, но и содействовать разработке новых методов профилактики и борьбы с вирусными заболеваниями, применяя доступные физические способы угнетения вирусной репродукции [26–28]. Поэтому, исходя из насущной ситуации вирусной пандемии Covid-19 и предполагаемой активизации других вирусных инфекций на нашей Планете [27, 28], проводимые исследования по изучению воздействия магнитной нагрузки на вирусный титр природных морских вирусов (альговирусов) являются актуальными. Они будут продолжены с применением в экспериментах более широкого спектра способов электромагнитного воздействия и более широкого круга альговирусов (вирусов других видов микроводорослей).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальным путем изучено изменение инфекционного титра штаммов черноморских альговирусов трех видов микроводорослей (*Tetraselmis viridis* – штамм TvV-S21-1, *Dunaliella viridis* – штамм DvV-S20-1 и *Phaeodactylum tricornutum* – штамм PtV-S20-1) после их пребывания в постоянном однонаправленном магнитном поле с магнитной индукцией 60 мТл.

ВЫВОДЫ

В ходе проведенных экспериментов установлено следующее:

1. Через 24–48 ч магнитной нагрузки у изучаемых черноморских альговирусов инфекционный титр снижается на один порядок (для DvV-S20-1 и TvV-S21-1), либо не изменяется (для PtV-S20-1);

2. Более длительное воздействие магнитного поля (72 ч и более) приводит к снижению инфекционного титра на два порядка (для DvV-S20-1 и PtV-S20-1);

3. Установлено, что после 72 ч магнитной нагрузки при дальнейшем увеличении ее продолжительности (до шести-восьми суток) отмечается неизменность (стабильность) инфекционного титра альговирусов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания по госбюджетной теме ИПТС № 0012-2019-0003 «Разработка новых средств и измерительных информационных технологий исследований природных вод» и темам ФИЦ МГИ РАН № 0555-2021-0004 «Океанологические процессы» и № 0555-2021-0003 «Оперативная океанология».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. A. Sholar and O. A. Stepanova, Biophysics **66** (2), 182 (2021).
2. Proposal for SCOR WG to investigate the role of viruses in marine ecosystems, in Proc. Sci. Comm. Ocean. Res. (Baltimore, 2005), Vol. 40, pp. 66–70 (Annex 4).
3. C. A. Suttle, Nature Rev. Microbiol. **5**, 801 (2007).
4. О. А. Степанова, Системы контроля окружающей среды, № 12 (32), 99 (2018).
5. R. Danovaro, C. Corinaldesi, A. Dell'anno, et al., FEMS Microbiol. Rev. **35** (6), 993 (2011).
6. В. В. Новиков, Дис. ... д-ра биол. наук (ИБК РАН, М., 2005).
7. Б. М. Владимирский и Н. А. Темурьянц, *Влияние солнечной активности на биосферу-ноосферу* (МНЭПУ, М., 2000).
8. О. А. Степанова и Г. Г. Пантелеева, в сб. *Влияние солнечной активности на биосферу-ноосферу* (Севастополь, 2005), № 12, сс. 632–636.
9. О. А. Степанова, *Отклик вирусной составляющей на факторы среды* (LAP Lambert Acad. Publ., Saarbrücken, 2017).
10. А. Ф. Фролов, Н. И. Головин и И. В. Булгакова, Докл. НАНУ, № 5, 193 (2004).
11. Б. Р. Богомольный, В. П. Барзинский, Т. Л. Гридина и др., Проблеми інноваційно-інвестиційного розвитку, № 6, 165 (2014).
12. Ю. В. Загородный, И. В. Бейко и А. Л. Бойко, Докл. НАНУ, № 5, 130 (1995).
13. https://samaragis.ru/samarskie-uchenye-razrabaty-vajut-sposob-lechenija-kartofelja-ot-virusov
14. S. Niknamian, Clin. Case Rep. Rev. **6**, 2 (2020).
15. О. А. Степанова, П. В. Гайский и С. А.Шоларь, Системы контроля окружающей среды, № 4 (42), 171 (2020).
16. O. A. Stepanova, Russ. J. Mar. Biol. **42** (2), 123 (2016).
17. O. A. Stepanova, A. L. Boĭko, and I. S. Shcherbatenko, Mikrobiolohich. Zh. **75** (5), 76 (2013).
18. V. V. Novikov, E. V. Yablokova, I. A. Shaev, et al., Biophysics **65** (3), 443 (2020).
19. И. В. Сысоева, Медицинские новости, № 4, 21 (2005).
20. R. R. Aslanyan, S. V. Tulsky, A. V. Grygoryan, et al., Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. **64**, 153 (2009).
21. В. М. Евстропов, Д. М. Кочеткова и О. Ю. Столярова, Modern science, № 12 (2), 30 (2019).
22. H. Y. Wang, X. B. Zeng, S. Y. Guo, et al., Bioelectromagnetics **29** (1), 39 (2008).
23. В. О. Пономарев, Дис. ... канд. физ.-мат. наук (ИБК РАН, М., 2009).
24. В. О. Пономарев и В. В. Новиков, Биофизика **54** (2), 235 (2009).
25. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Н. И. Новикова. Актуальные вопросы биологической физики и химии, 3 (1), 23 (2018).
26. В. Г. Каплуненко, Н. В. Косинов и А. В. Скальный, Микроэлементы в медицине **22** (1), 3 (2021).
27. https://supermagnit.net/news/magnitnoe-pole-i-virus-grippa---kakaya-svyaz
28. https://www.business-gazeta.ru/article/485288

Influence of a Constant Magnetic Field on the Infectious Titer of the Black Sea Algal Viruses

O.A. Stepanova*, P.V. Gaisky, and S.A. Sholar****

**Institute of Natural and Technical Systems, Russian Academy of Sciences, ul. Lenina 28, Sevastopol, 299011 Russia*

***Federal Research Center «Marine Hydrophysical Institute of RAS», Kapitanskaya ul. 2, Sevastopol, 299011 Russia*

The change in the infectious titer of strains of the Black Sea algal viruses of three species of microalgae (*Tetraselmis viridis* – strain TvV-S21-1, *Dunaliella viridis* – strain DvV-S20-1 and *Phaeodactylum tricornutum* – strain PtV-S20-1) after their staying in a constant unidirectional magnetic field with a magnetic induction of 60 mTl was studied experimentally. The studies were carried out in a developed laboratory installation with the duration of experiments from 24–72 h to 6–8 days. A decrease in the infectious titer of algal viruses was recorded after magnetic load by 1–2 orders (10–100 times).

Keywords: Black Sea algal viruses of microalgae Tetraselmis viridis, Dunaliella viridis and Phaeodactylum tricornutum, viral infectious titer, constant unidirectional magnetic field

EDN: OAOPJN
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 250–263

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.3

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА ЛАЗИОГЛОССИНА III С МОДЕЛЬНЫМИ ЛИПИДНЫМИ БИСЛОЯМИ

© 2022 г. С. Саха, П. Ратрей, А. Мишра

Факультет материаловедения и инженерии материалов, Индийский Технологический Институт Гандинагара, Паладж, Гандинагар, Гуджарат, Индия

E-mail: s.sarmistha@iitgn.ac.in

Поступила в редакцию 14.09.2021 г.
После доработки 02.11.2021 г.
Принята к публикации 15.12.2021 г.

Лазиоглоссин-III – малый катионный пептид, обнаруженный в яде пчелы Lasioglossum laticeps. Сообщается, что он обладает сильной антимикробной активностью и слабым гемолитическим действием. В данной работе исследована природа взаимодействий лазиоглоссина-III с липидными бислоями в различной ориентации и его проникающая способность с помощью расчетов методом молекулярной динамики. Были проведены молекулярно-динамические расчеты лазиоглоссина-III на поверхности и внутри бислоев из чистых 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина и 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина для определения взаимодействий «мембрана–пептид» и их эффектов. Обнаружено, что лазиоглоссин-III взаимодействовал с обоими типами бислоев с разными скоростями и демонстрировал дестабилизацию на границе раздела фаз «мембрана–вода» относительно стартового состояния пептида. Эти результаты позволяют говорить о наличии специфических взаимодействий между остатками лизина пептида и участками головок липидов, ответственных за общую стабильность пептида в липидных бислоях. Кроме того, результаты указывают на существенно больший угол наклона пептида и более высокую свободную энергию, а также на уменьшение толщины бислоя в случае бислоев 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина в сравнении с 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолином, вызываемые встраиванием пептида.

Ключевые слова: лазиоглоссин-III, ПОФХ, ДМФХ, молекулярная динамика.

DOI: 10.31857/S0006302922020077

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой важный класс элементов врожденной иммунной системы и перспективную альтернативу антибиотикам по отношению к широкому спектру видов бактерий. Это короткие катионные амфифильные пептиды, которые могут проявлять активность против необычайно широкого диапазона микроорганизмов с множественной устойчивостью, включая бактерии, вирусы и грибы [1]. Эффект от АМП против различных патогенных микроорганизимов коррелирует с их различными функциями, относящимися к взаимодействию с клеточными мембранами [2]. Многие группы ученых работают над экспериментальными и модельными (вычислительными) исследованиями механизма встраивания и ориентации АМП в липидных бислоях мембран. Они показали, что такие взаимодействия включают поверхностное состояние и погруженное состояние [3, 4]. Например, некоторые АМП, такие, как CM15, могут взаимодействовать с полярной границей раздела фаз и разрушать пузырьки цвиттер-ионного липида 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (ПОФХ), основного компонента эукариотической мембраны [5, 6]. С другой стороны, пандинин-2, поликатионный АМП, оставался в частично свернутом состоянии на поверхности ПОФХ, а ароматические остатки на его N-конце инициировали процесс встраивания [7]. Взаимодействия АМП с мембранами зависят от их вторичной структуры, заряда, аминокислотного состава и длины пептидной последовательности, а также от состава мембран [8]. В дополнение к этому, доля α-спиралей в АМП прямо коррелирует с высокой антибактериальной активностью, а гибкость пептидной цепи также играет ключевую роль в ослаблении их активности [9].

Лазиоглоссины – новое семейство антимикробных пептидов – изначально были обнаруже-

Сокращения: АМП – антимикробные пептиды, ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин, LL-III – лазиоглоссин III, МД – молекулярно-динамический, ДМФХ – 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолин.

ны в яде диких пчел *Lasioglossum laticeps*. Для них была показана выраженная антимикробная активность против как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов, а также существенно меньшая гемолитическая активность [10]. С помощью флуориметрических экспериментов было выявлено, что лазиоглоссин II может взаимодействовать с поверхностью мембраны додецилфосфохолиновой мицеллы, глубоко погружаясь в нее, что ведет к дестабилизации мембраны [11]. Лазиоглоссин III (LL-III), пептид из 15 аминокислотных остатков, является наиболее изученным представителем семейства лазиоглоссинов. LL-III показал сравнительно высокую антимикробную активность против *Escherichia coli, Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* при низкой гемолитической активности [10]. Недавно были показаны такие свойства LL-III, как солеустойчивость, способность образовывать антимикробную пленку и препятствовать образованию биопленок вследствие мембранолитического действия против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий [12]. Кроме того, синтетическое производное пептида LL-III ингибирует образование биопленки *C. albicans* [13].

Сходным образом N-концевая модификация LL-III остатком цистеина и покрытие им коммерческого силиконового катетера увеличили антимикробную активность против грамположительных и грамотрицательных бактерий [14]. Рекомбинантный пептид LL-III ингибировал микробное разложение пищи и показал выраженные антиоксидантные свойства [15]. Его необычно высокая биологическая активность обусловлена амфифильным N-концевым фрагментом [10]. Он имеет суммарный заряд +6 и приобретает α-спиральную структуру в трифторэтаноле и растворе додецилсульфата натрия [10]. Подобная последовательность аминокислот приводит к возможности взаимодействия с липидным бислоем как одиночных молекул, так и агрегатов пептида. В данной работе исследован механизм связывания LL-III с мембраной методом расчета траекторий молекулярной динамики. Результаты помогут прояснить механизм работы этого пептида и роль особых аспектов его последовательности для дальнейшей разработки высокоэффективных АМП.

Молекулярно-динамические (МД) расчеты обеспечивают эффективную основу для идентификации различных молекулярных взаимодействий на атомном уровне и таким образом дополняют экспериментальные результаты [16]. Поскольку большинство экспериментальных лабораторных подходов не могут обеспечить достаточного разрешения для определения взаимодействий «мембрана–пептид» на атомном уровне, расчеты траекторий МД представляют собой альтернативный подход для решения таких задач. Биофизические эксперименты с использованием методов ядерно-магнитного резонанса и рентгеновской дифрактометрии позволяют сделать вывод о наличии двух состояний АМП – поверхностном состоянии и погруженном в липидный бислой состоянии [17–19]. Весь процесс антимикробного действия пептидов включает связывание с поверхностью, агрегацию или образование трансмембранной тороидальной поры, что предположительно происходит на микросекундной временной шкале [20]. Вычислительное моделирование всего механизма антимикробного действия затруднительно вследствие больших временных промежутков для движения липидов, медленной релаксации липидной фазы и ограничений доступных временных диапазонов. Однако грубое моделирование или усиленное сэмплирование являются оптимальными методами, обычно используемыми в МД-расчетах взаимодействия растворимых веществ с липидными бислоями [21]. В качестве альтернативного подхода мы применили атомистическое моделирование двух ключевых стадий взаимодействия пептида LL-III с различными моделями мембран для выяснения взаимодействий между пептидом и бислоем. Это позволяет анализировать адекватные временные отрезки. В данном контексте были поставлены следующие цели: 1) выявить характер взаимодействия между липидным бислоем и АМП в двух различных состояниях, поверхностном и погруженном; 2) определить эффект АМП на структуру липидного бислоя. В похожих исследованиях взаимодействий «пептид–липид» высказывались предположения, что пептид подходит к бислою в состоянии неупорядоченного клубка, но во время взаимодействия с липидным бислоем сворачивается в α-спиральную структуру на границе раздела фаз «липид–вода» [20, 21]. Таким образом, было проведено моделирование исследованных систем с α-спиральной структурой пептида, когда он взаимодействует с липидным бислоем.

Количество гидрофобных аминокислотных остатков и их распределение определяет взаимодействие пептида с мембраной, что наглядно иллюстрируется в схеме спирального колеса [22]. Было обнаружено, что ориентация пептида внутри поры зависит от гидрофобного несоответствия между гидрофобной длиной порообразующего пептида и гидрофобной толщиной липидного бислоя [23]. Другое исследование показало, что толщина и жесткость бислоя значительно влияют на свободную энергию, необходимую для образования поры [24]. В качестве следующего шага в понимании влияния гидрофобного несоответствия на взаимодействие и динамику АМП в липидном бислое было проведено МД-моделирование пептида LL-III на поверхности и внутри (в трансмембранной ориентации) в цвиттерионных мембранных липидных бислоях – более толстом

из 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолина и более тонком из 1,2-димиристил-*sn*-глицеро-3-фосфатидилхолина (ДМФХ). В данной работе с применением МД-расчетов были проанализированы ориентация и стабильность пептида и характер взаимодействия между пептидом и системами липидных бислоев. Затем были проведены структурный и конформационный анализ, а также расчет параметров упорядоченности для характеристики разрушения модельных мембран, взаимодействующих с пептидом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Стартовые структуры лазиоглоссина III. LL-III (VNWKKILGKIIKVVK) – это катионный антимикробный пептид с суммарным зарядом +5 при нейтральном pH. Атомные координаты пептида моделировались в α-спиральной конформации в программе Visual Molecular Dynamics версии 1.9.141 [25]. Для имитации экспериментальных условий N-конец и C-конец были заряжены. При нейтральных pH боковые цепи лизина в LL-III заряжены. Структура пептида LL-III была получена после минимизации энергии через 1000 шагов скорейшего спуска, после чего следовал расчет МД-траектории длительностью 100 нс в ячейке размером 50×50×50 Å, где наряду с пептидом присутствовали примерно 4000 молекул воды и три противоиона Cl^- для поддержания электронейтральных условий. Последние рамки траекторий были отобраны в качестве стартовых структур для расчета траекторий систем пептид-липидный бислой.

Условия подготовки системы «пептид–липидный бислой». Начальная позиция и ориентация пептида в мембранном бислое были выбраны на основании различных стадий типичного действия АМП. В одной серии траекторий молекула пептида LL-III помещалась в водную фазу так, что центр масс пептида находился примерно в 1 нм от границы раздела фаз «мембрана–вода», при этом ось спирали пептида была параллельна поверхности раздела фаз. Похожую ориентацию придавали пептиду в недавней работе [26]. В другой серии траекторий пептид LL-III помещали в трансмембранную связанную позицию (транспозицию, транс-связанную позицию), пронзая оба листка бислоя. После введения пептида расчет вели по особому протоколу, когда с помощью силы величиной 100 кДж/моль/м^2 в транс-участке бислоя мембраны создавали отверстие, по размеру и форме соответствующее пептиду, в предварительно уравновешенных моделях липидного бислоя. Затем пептид погружали в полученное отверстие, после чего следовала минимизация энергии с позиционными ограничениями [27].

Расчеты траекторий молекулярной динамики. Все вычисления и анализ проводили с использованием пакета программ Desmond 2012 MD (Maestro-Desmond Interoperability Tools, версия 3.1, Schrödinger, Нью-Йорк, США) в силовом поле OPLS-AA (Optimized Parameters for Liquid Simulations All-Atom – Оптимизированные параметры для полноатомного жидкостного моделирования) [28, 29] с моделью воды TIP3P в изотермно-изобарном ансамбле в периодических граничных условиях [30]. Для МД-расчетов предварительно уравновешенные мембраны из 128 молекул липида ПОФХ с 2460 молекулами воды и 128 молекул липида ДМФХ с 128 ионами Na^+ и 3527 молекулами воды были получены из лаборатории П. Тилемана (P. Tieleman, the University of Groningen). Примерно 6400 молекул воды использовали для сольватации систем ПОФХ и ДМФХ при расположении пептида в мембранах, для электронейтральности системы добавлялись противоионы. Для каждой системы проводили три расчета траекторий МД, для каждого из них задавали разные начальные случайные скорости.

Изначальное уравновешивание проводили в течение 500 пс в изотермно-изохорных условиях, при этом тяжелые атомы пептида и фосфатных групп липидных головок были ограничены в окрестности своих референсных координат гармониками с постоянной силой 1000 кДж·моль$^{-1}$·нм$^{-2}$. Стабильная среда поддерживалась при температуре 300 K с помощью термостата с изменением масштаба скорости [31] с раздельным сопряжением для «растворенного вещества» (пептидов и липидов) и «растворителя» (воды и ионов) с временной константой 0.1 пс. Эта температура значительно выше температуры перехода в жидкокристаллическое состояние (268 K для ПОФХ и 297 K для ДМФХ). Эти системы в дальнейшем уравновешивали в течение 1 нс в изотермно-изобарных условиях в термостате Нозе–Гувера [32, 33]. Постоянное давление 1 атм поддерживали полуизотропным баростатом Паринелло–Рамана с временной константой 2.0 пс [34]. Нормаль к бислою (ось *Z*) и плоскость бислоя (плоскость *XY*) сопрягали отдельно, постоянное давление в 1 бар поддерживали во всех направлениях. Затем применяли алгоритм LINCS для ограничения всех длин связей молекул воды. Для дистантных электростатических взаимодействий применяли метод частичных сумм Эвальда с радиусом обрезания 1.2 нм для кулоновских взаимодействий [35]. После уравновешивания ограничения позиций пептида снимали и траекторию МД запускали для каждой системы на 100 нс в изотермно-изобарном ансамбле. Шаг интегрирования был равен 2 фс с сохранением координат, а скорости сохраняли для анализа каждые 20 пс. Полученные в результате траектории использовали для всех анализов. Программу PyMOL, созданную У.Л. ДеЛано (W.L. DeLano) и выпущенную на рынок компанией DeLano Scientific

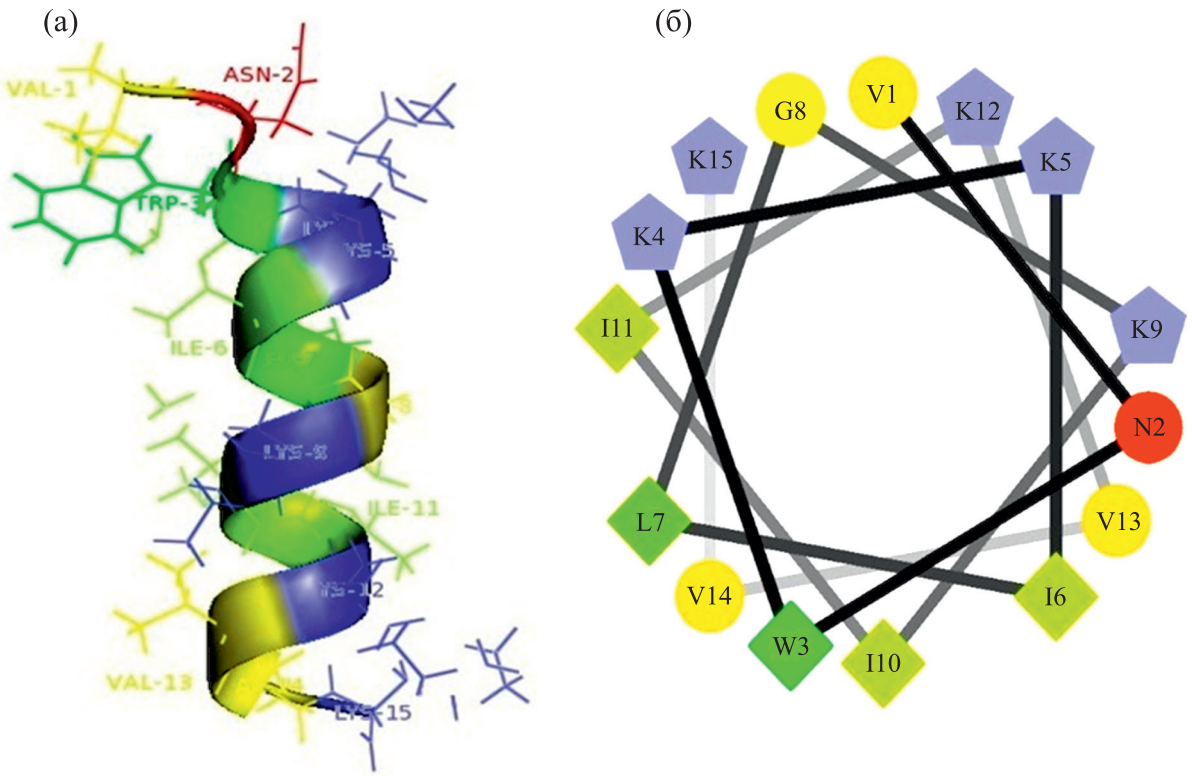


Рис. 1. Структура и схема спирального колеса для пептида LL-III. Пептид изображен в ленточном виде. Для диаграммы «спирального колеса» последовательность аминокислот отображена по часовой стрелке. Гидрофильные остатки изображены кружками, гидрофобные – ромбами, положительно заряженные – пятиугольниками.

LLC (http:// www.pymol.org), использовали для получения всех численных значений. Для каждого из четырех расчетов МД получали три независимые траектории, анализ данных проводили по всем трем независимым траекториям. В то же время результаты расчетов опубликованных ранее работ содержат анализ от одной до трех независимых траекторий. Также проводили временной анализ водородных связей в течение всего периода моделирования. В системах D–H---A–X, где D (донор) – это атом азота положительно заряженных групп пептида и A (акцептор) – атом кислорода остатков глицерина и фосфатных групп головок липидов, контакты с расстояниями D---A менее 3.5 Å и углами между H и A более 120° рассматривали как водородные связи.

Расчеты свободной энергии связывания. Свободную энергию связывания пептидов с мембранными системами рассчитывали через решение уравнения Пуассона–Больцмана по методу MM/PBSA [36]. Свободную энергию связывания оценивали как

$$G_{binding} = \Delta G_{complex} - \Delta G_{ligand},$$

где каждый терм энергии G оценивали как сумму молекулярно-механической энергии в газовой фазе E_{gas} и энергии сольватации G_{sol} по следующему уравнению:

$$G_{total} = E_{gas} + G_{sol},$$

при этом в E_{gas} входит электростатический терм (E_{ele}) и ван-дер-ваальсов терм (E_{vdw}). Более того, энергия сольватации также раскладывается на полярную энергию сольватации G_{ps} и неполярную энергию сольватации G_{nps} согласно следующему уравнению:

$$G_{sol} = G_{ps} + G_{nps}.$$

Неполярная энергия сольватации была рассчитана на основе площади поверхности, доступной для растворителя (solvent-accessible surface area – SASA), согласно уравнению

$$G_{nps} = \gamma\ \mathrm{SASA} + \beta.$$

Коэффициент поверхностного натяжения γ и константу β принимали равными 0,00542 ккал/(моль·Å^2) и 0.92 ккал/моль, согласно литературе [37].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Расчет траекторий лазиоглоссина III в липидных бислоях. Диаграмма Шиффера–Эдмунсона (диаграмма α-спирального колеса) для пептида LL-III показала, что остатки Lys расположены на одной стороне, а гидрофобные остатки Val, Leu,

Ile, Trp – на другой стороне спирали (рис. 1а,б). Изначально взаимодействие LL-III с липидами ПОФХ и ДМФХ моделировалось в поверхностно-связанном состоянии. Чистые мембраны ДМФХ и ПОФХ – цвиттерионы с нейтральным суммарным зарядом. МД-система формировалась с пептидом, параллельным границе раздела фаз «бислой–вода», без прямого контакта с областью головок липида. Кадры финальной конфигурации расчетов МД-траекторий приведены на рис. 2. Во всех случаях три независимых траектории давали сходные результаты.

Рис. 2 демонстрирует структуру пептида LL-III на поверхности липидных бислоев из ДМФХ и ПОФХ через 0, 50 и 100 нс моделирования. Как ожидалось, пептид сперва приближался к полярной поверхности, затем медленно проходил через полярную область и наконец достигал равновесного состояния близко к группе головок липидного бислоя. Мы наблюдали, что через 100 нс пептид LL-III также ориентируется в схожем, практически параллельном направлении к поверхности мембраны из ДМФХ (рис. 2б). Сходным образом LL-III взаимодействует с мембраной ПОФХ на границе раздела фаз «вода–липид» и ориентируется в предпочтительной позиции, в которой остатки лизина взаимодействуют с областью головок липидов (рис. 2д).

Также были проведены расчеты траекторий, когда пептид LL-III полностью погружался в бислой в транс-связанной позиции. Кадры финальной конфигурации расчета динамики пептида из транс-позиции в мембранах из ДМФХ и ПОФХ показаны на рис. 3. Пептид LL-III остается внутри бислоев мембраны в течение всего времени расчета. Кроме того, LL-III находится в очень развернутой и наклоненной ориентации после 100 нс динамики в мембранных бислоях. Больший наклон пептид демонстрирует в бислое ДМФХ (рис. 3б), чем в бислое ПОФХ (рис. 3д), что вполне ожидаемо, поскольку бислои ПОФХ обладают большей гидрофобной шириной, чем бислои ДМФХ.

Стабильность пептида в различных окружениях. Отклонения от изначальной конфигурации в течение динамики в основном происходят у остатков лизина в липофильных хвостах, на что указывает увеличение усредненной по остатку среднеквадратичной флуктуации остова примерно на 0.6 Å (рис. 4). Также из рис. 4 ясно, что усредненная по остатку среднеквадратичной флуктуации остова по своим значениям относительно более стабильна в бислое из ДМФХ, чем в бислое из ПОФХ.

Профили водородных связей взаимодействия «лазиоглоссин III–бислой». Поскольку межмолекулярные взаимодействия играют важную роль во взаимодействии АМП с поверхностью липидного бислоя мембраны, мы также исследовали образование водородных связей в процессе моделирования. Для этого был проведен анализ водородных связей между ними во времени по всем траекториям. В нашем случае атомы остова пептида в поверхностно-связанном состоянии на границе раздела фаз «липид–вода» были более доступны для образования водородных связей, чем в случае полностью погруженного транс-связанного состояния в бислое.

Как было проиллюстрировано моделированием динамики, боковая цепь лизина пептида LL-III в транс-связанной позиции обычно взаимодействует в среднем с двумя прилежащими молекулами ДМФХ и ПОФХ на протяжении всей траектории. Аминокислотные остатки пептидов обычно формируют Н-связи с карбонилами сложных эфиров, фосфатными группами и молекулами воды на границе раздела фаз «мембрана–вода».

Представленные результаты также позволяют говорить о снижении количества водородных связей «вода–пептид» с соответствующим увеличением количества водородных связей «ПОФХ–пептид», во что вносят значительный вклад остатки лизина. Это также подтверждается расчетом среднего количества молекул, образующих водородные связи с пептидом, указывающим, что количество молекул фосфатидилхолина, образующих водородные связи, больше, чем таковых молекул воды (табл. 1) в поверхностно-связанном состоянии в случае обоих типов мембранных бислоев. Показано, что в обоих случаях остатки лизина присутствуют в середине липидного бислоя в гидрофобной области. Однако Lys4, Lys12 и Lys15 выступают из гидрофобной области, и пептид наклоняется после 100 нс моделирования динамики. Выступание Lys15 из гидрофобной области, как было показано, помогает предпочтительным взаимодействиям с липидами противоположного листка [38].

Профили структур мембранных бислоев по взаимодействию «пептид–бислой». Погружение и проникновение пептидов ведет к нарушению структуры липидов. Для дальнейшего исследования различий во взаимодействии пептида с липидами, характеристика липидов проводилась на основе их близости к пептиду LL-III. Липид характеризуется как «образующий ассоциат» (ассоциированный), если он расположен на удалении менее 5 Å от пептида в любой временной точке моделирования. Все другие липиды характеризуются как «не образующие ассоциат» (неассоциированный) [20]. Количество ассоциированных и не ассоциированных липидов в каждом листке в различных траекториях приведено в табл. 2. Тенденция наличия ассоциированных и не ассоциированных липидов в каждом листке сходна для

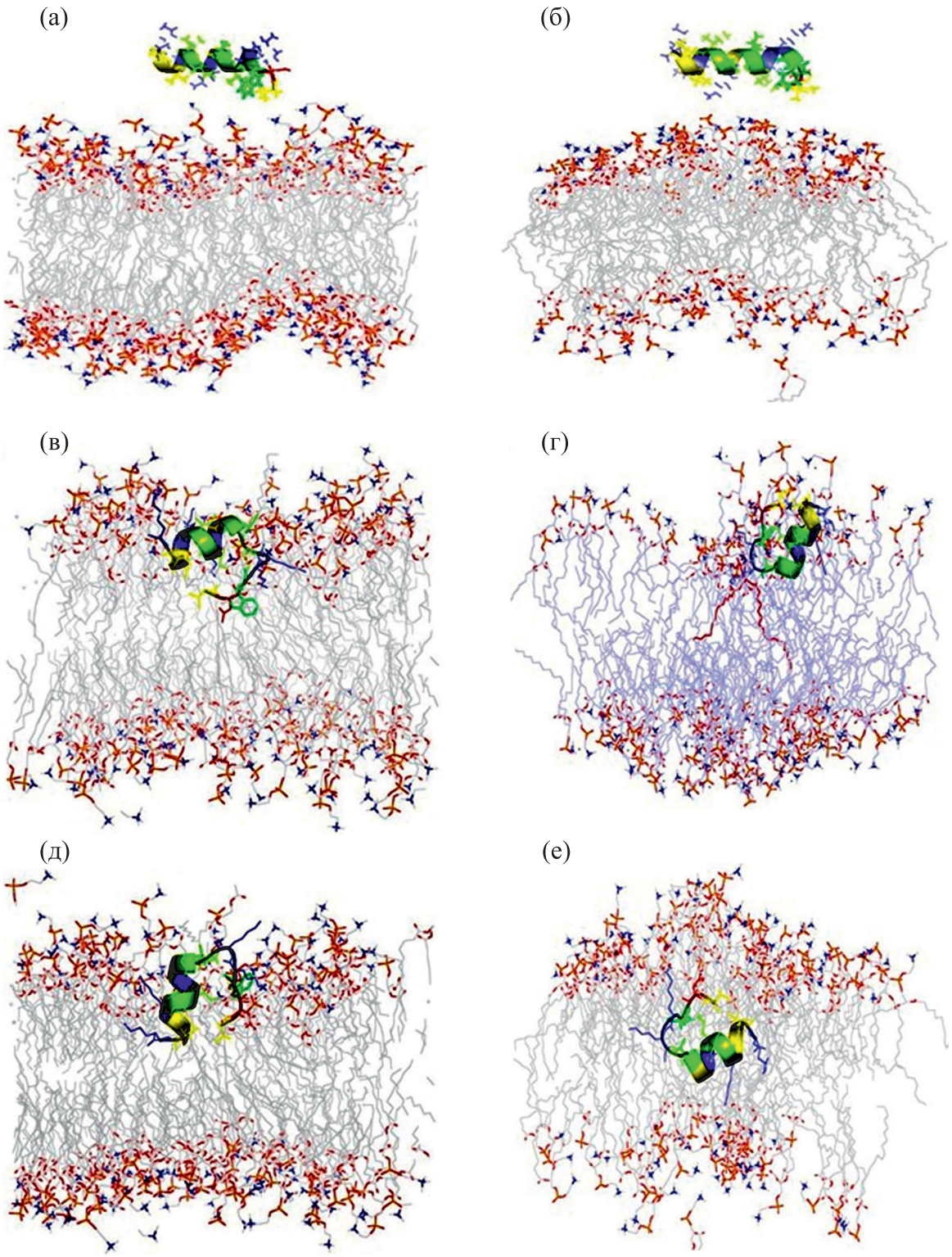


Рис. 2. Характерные снимки траекторий динамики систем поверхностно-связанного пептида в бислоях ДМФХ и ПОФХ: (а), (в), (д) – позиция пептида в точках 0, 50 и 100 нс на оси времени в бислое ДМФХ; (б), (г), (е) – позиция пептида в тех же временных точках в бислое ПОФХ. Пептид показан в ленточном виде и окрашен соответственно схеме спирального колеса. Молекулы воды удалены для наглядности.

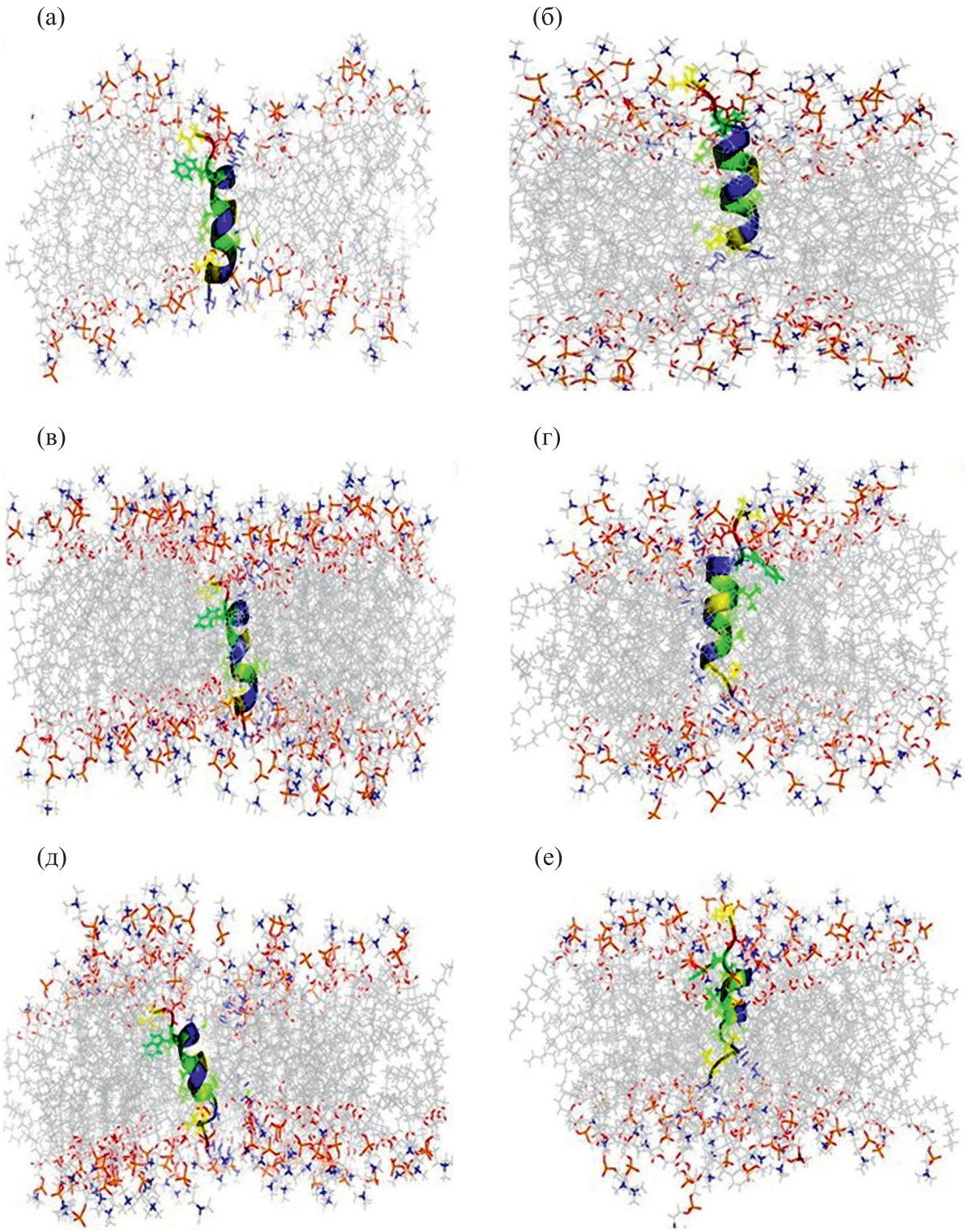


Рис. 3. Характерные снимки траекторий динамики транс-связанного пептида в бислоях ДМФХ и ПОФХ: (а), (в), (д) – положение пептида в точках 0, 50 и 100 нс на оси времени в бислое ДМФХ; (б), (г), (е) – позиция пептида в тех же временных точках в бислое ПОФХ. Пептид показан в ленточном виде и окрашен соответственно схеме спирального колеса. Молекулы воды удалены для наглядности.

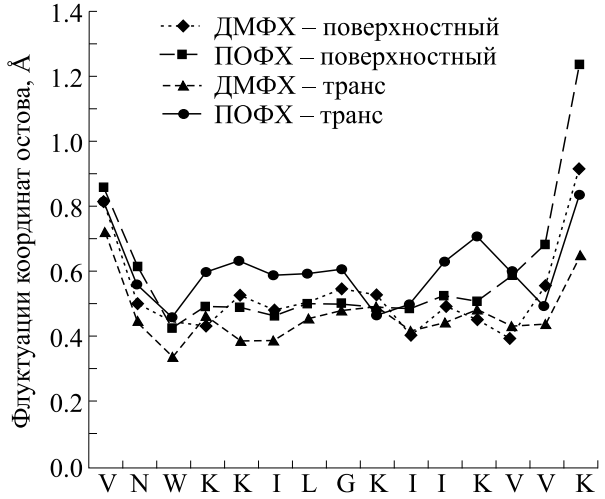


Рис. 4. Среднеквадратичные флуктуации координат остова в пересчете на остаток для поверхностно-связанного и транс-связанного пептида на траекториях соответствующих систем в течение 100 нс МД-расчета.

модельных липидных бислоев ДМФХ и ПОФХ. Ассоциированные липиды находятся ближе к центру бислоя в сравнении с неассоциированными. В целом липидные бислои демонстрируют присутствие локальных изгибов.

При моделировании пептидов в трансмембранном связанном состоянии количество ассоциированных липидов было больше, чем не ассоциированных, что неудивительно. Для понимания общего влияния пептида на липидный бислой был построен график (рис. 5) позиций центров масс фосфатных групп липидов, образующих и не образующих ассоциаты, в течение 100 нс, причем центр масс пептида был взят за референсную точку (черный). Для пептидов в поверхностно-связанном и транс-связанном положениях в бислое ДМФХ нет явной разницы в относительном положении фосфатов ассоциированных и неассоциированных липидов в нижнем листке (рис. 5). Однако как в бислое ДМФХ, так и в бислое ПОФХ все другие листки демонстрируют выраженную разницу в позиции ассоциированных липидов относительно нормали к мембране по сравнению с неассоциированными липидами (рис. 5). Таким образом, из рис. 5 можно заключить, что ассоциированные липиды в верхнем листке ДМФХ и обоих листках ПОФХ ближе к центру масс пептида, чем неассоциированные липиды.

Рис. 6 показывает параметры упорядоченности миристиловых и пальмитиловых цепей ассоциированных липидов верхнего листка бислоя при моделировании пептида в поверхностно-связанном состоянии. Пальмитиловые цепи демонстрируют увеличение параметра упорядоченности в области головок липидов (номера атомов углерода 0–5), затем следует крутое снижение по следованию алкильных хвостов. Наиболее вероятно, что это изменение вызвано водородным связыванием остатков лизина с молекулами липидов, что уменьшает подвижность головок ли-

Таблица 1. Среднее количество молекул, образовавших водородные связи с пептидом

Бислой и позиция	Количество молекул воды, образующих водородные связи	Количество молекул ФХ, образующих водородные связи
ДМФХ – поверхностно-связанный	13.10 ± 0.14	21.80 ± 0.25
ПОФХ – поверхностно-связанный	14.30 ± 0.21	23.10 ± 0.30

Примечание. Все значения приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

Таблица 2. Количество ассоциированных и неассоциированных липидов в системах мембранных бислоев

Бислой и позиция	Листок бислоя	Ассоциированные липиды	Неассоциированные липиды
ДМФХ – поверхностно-связанный	Верхний	36.20 ± 1.91	28.00 ± 0.58
ПОФХ – поверхностно-связанный	Верхний	38.00 ± 2.04	26.00 ± 0.94
ДМФХ – транс-связанный	Верхний	23.00 ± 1.85	41.00 ± 2.62
	Нижний	27.00 ± 1.65	37.00 ± 1.52
ПОФХ – транс-связанный	Верхний	25.00 ± 1.12	39.00 ± 2.15
	Нижний	29.00 ± 1.70	35.00 ± 1.70

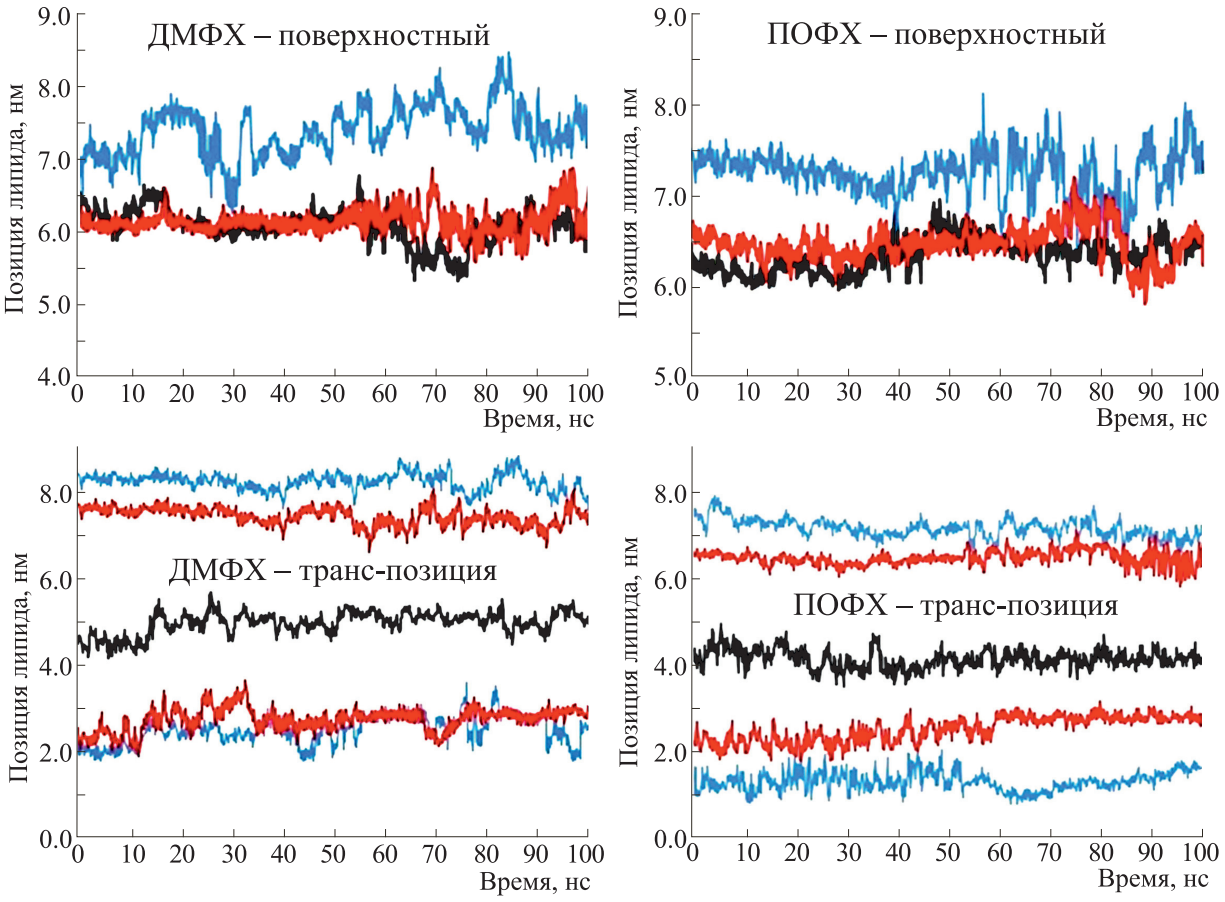


Рис. 5. Позиция асссоциированного (вблизи пептида, красный) и неассоциированного (вдали от пептида, синий) липидов в верхнем и нижнем листках бислоя на протяжении всего времени динамики. Позиция пептида, взятая как референсное значение, обозначена черным цветом.

пидов и таким образом увеличивает упорядоченность. Интересно, что в случае пептидов в поверхностно-связанном состоянии изначально имеется подъем степени упорядоченности атомов углерода миристиловых групп, но общая упорядоченность значительно снижена. В случае пептида в трансмембранной ориентации, пальмитиловые, олеиловые и миристиловые цепи ассоциированных липидов (рис. 6) показывают намного большую неупорядоченность, чем соответствующие липиды в поверхностно-связанном состоянии на тех же временных интервалах динамики. Также это воздействует на другие структурные характеристики бислоя, такие как толщину (рис. 7). Толщину мембраны анализировали по расчету проекции расстояния между центрами атомов фосфатов в двух листках бислоя на ось Z [39]. Наблюдалось, что снижение толщины мембраны для бислоя ДМФХ существенно выше в сравнении с бислоем ПОФХ. Также видно, что снижение более выражено, когда пептид находится в транс-связанном состоянии, чем когда он находится в поверхностно-связанном состоянии.

Поскольку пептид LL-III приобретает наклон после 100 нс расчета динамики в трансмембранной ориентации, мы также проанализировали угол наклона пептида в обеих моделях липидного бислоя. LL-III демонстрирует более выраженный наклон в бислое ДМФХ по сравнению с ПОФХ, что также может быть подтверждено из позиции и ориентации пептида в липидном бислое. Поскольку для точной количественной оценки угла наклона пептида в липидных бислоях требуется даже большее время, стандартные ошибки угла наклона в наших вычислениях довольно значительны. Расчеты МД показали, что ось спирали пептида LL-III наклонена под углом 11.80 ± 3.9° относительно нормали в бислоях ПОФХ, что можно сравнить с наклоном 19.60 ± 5.6° в бислоях ДМФХ (табл. 3). Толщина бислоя ДМФХ от карбонила до карбонила составляет около 23 Å, в то время как ПОФХ имеет толщину 27 Å, что может быть причиной более сильного наклона пептида в мембране из ДМФХ, чем из ПОФХ [40]. Интересно, что пептид LL-III почти сохранял свою ориентацию в бислое ПОФХ с малым углом наклона.

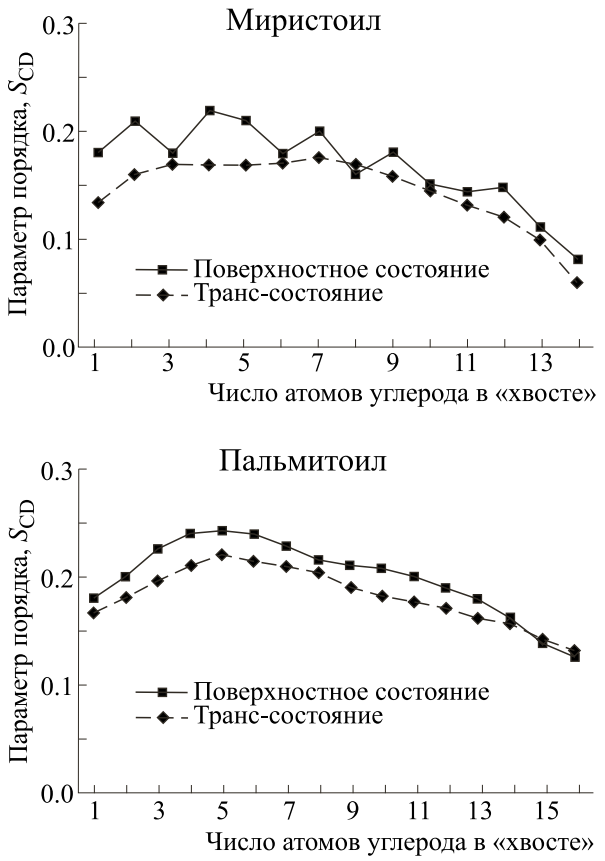


Рис. 6. Параметры упорядоченности липидных хвостов (вблизи пептида) верхнего листка бислоя в траекториях динамики пептида в поверхностно-связанном состоянии в липидных бислоях.

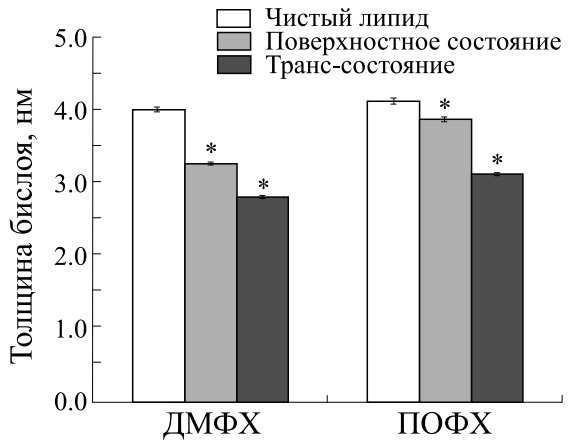


Рис. 7. Толщина бислоя в исследованных системах из ДМФХ и ПОФХ. Проводили по три независимых повторности расчетов. Все значения приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего; * – $p < 0.05$ относительно чистых бислоев ДМФХ/ПОФХ без пептида.

Профили свободных энергий взаимодействия «молекула–бислой». Для получения более детальной информации о взаимодействии пептидов в поверхностно-связанном состоянии в обоих типах бислоев нами с помощью утилиты g_mmpbsa были рассчитаны полные свободные энергии связывания и их различные слагаемые для взаимодействия пептида и модельного мембранного бислоя, перечисленные в табл. 5. Было обнаружено, что энергия связывания пептида LL-III в состоянии связывания с поверхностью липидного бислоя из ДМФХ (–124.41 ± 10.48 ккал/моль) была значительнее, чем энергия связывания пептида в поверхностно-связанном состоянии с бислоем из ПОФХ (–103.42 ± 8.95 ккал/моль; табл. 4). Таким образом, пептид LL-III намного более стабилен в бислое ДМФХ, чем в бислое ПОФХ. Было обнаружено, что как ΔE_{ele} (–148.58 ± 11.15 ккал/моль), так и ΔE_{vdw} (–189.68 ± 14.35 ккал/моль) предпочтительны для стабильности пептида LL-III в поверхностно-связанном состоянии с липидным бислоем ДМФХ (табл. 4).

Таблица 3. Средние углы наклона в липидных бислоях с пептидом LL-III в трансмембранной ориентации

Траектории (100 нс)	Угол наклона, град
ДМФХ	19.6 ± 5.6
ПОФХ	11.8 ± 3.9

Примечание. Все значения приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Многие антимикробные пептиды с катионными аминокислотными остатками функционируют по механизму взаимодействия с мембраной [41], включающему транслокацию через клеточные мембраны [42], разрушение липидного бислоя, текучесть модельных мембранных везикул [43]. Активность АМП обусловлена амфифильностью их последовательностей, и таким образом они приобретают хорошо упорядоченную α-спиральную структуру на границе мембраны [44]. Точный механизм, по которому пептид LL-III проникает в мембрану, еще предстоит выяснить. Понимание механизма взаимодействия АМП с мембраной на молекулярном уровне интересно с точки зрения биофизических задач. Поскольку активность LL-III может регулироваться взаимодействием с поверхностью раздела фаз «липид–вода», как и в случае других сшитых АМП, стоит продолжать исследования молекулярного механизма взаимодействия и переориентации этих пептидов в липидных бислоях. В данной работе для определения сложных взаимодействий между пептидом LL-III и липидными бислоями были

Таблица 4. Свободные энергии связывания в системах LL-III-мембрана, рассчитанные методом MM/PBSA

Энергия (ккал/моль)	ДМФХ – поверхностно-связанный	ПОФХ – поверхностно-связанный
ΔE_{ele}	−148.58 ± 11.15	−121.18 ± 10.85
ΔE_{vdw}	−189.68 ± 14.35	−164.57 ± 12.62
ΔE_{gas}	−338.26 ± 15.40	−285.75 ± 14.06
ΔG_{nps}	−28.63 ± 4.28	−32.59 ± 5.09
ΔG_{ps}	242.48 ± 13.53	214.92 ± 12.12
ΔG_{sol}	213.85 ± 11.16	182.33 ± 10.75
$\Delta G_{binding}$	−124.41 ± 10.48	−103.42 ± 8.95

Примечание. Все значения приведены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

применены расчеты траекторий МД. Для этого было проведено четыре различных расчета: LL-III в поверхностном и транс-связанном состоянии с липидными бислоями из ПОФХ и ДМФХ, с длительностью траекторий по 100 нс. В частности, определялся характер взаимодействия пептида с мембраной, а также структура и сворачивание пептида в мембранных бислоях.

Тем не менее, поскольку для LL-III показана способность сильно взаимодействовать с мембранами, он не проникал насквозь через бислои, а его локализация ограничивалась верхним монослоем липида в поверхностно-связанном состоянии в случае бислоя из ДМФХ. Такой расчет противоречит предыдущим исследованиям АМП [45, 46]. Однако, например, моделирование таких АМП, как магаинин и меллитин, показало образование неупорядоченных тороидальных пор в бислоях из фосфатидилхолинов в течение 10 нс [45, 46]. АМП осуществляют образование пор через промежуточное состояние, при котором глубоко погруженный пептид образует сильные взаимодействия с молекулами растворителя и головками липидов, в результате чего образуется пора. Таким образом, результаты МД-расчетов для транс-погруженного состояния показывают, что стабильность пептида LL-III в наблюдаемой позиции и ориентации может быть вызвана межмолекулярными взаимодействиями остатков лизина с полярными участками головок липидов мембранных бислоев. Сходные взаимодействия также ответственны за заякоривание пептида LL-III в состоянии, связанном с поверхностью, в обоих типах липидных бислоев. Подобная тенденция согласуется с недавней работой [47], в которой было показано, что остатки лизина выступают из середины бислоя к доступному противоположному листку. Если принимать во внимание поведение связанного с поверхностью состояния пептида в ПОФХ, то более высокая частота взаимодействия может быть вызвана тем, что олеильный хвост бислоя ПОФХ имеет меньший параметр упорядоченности, что приводит к более высокой проницаемости и меньшим ограничениям на проникновение. В случае ДМФХ миристиловые хвосты короче, чем олеиловые и пальмитиловые, что ведет к уменьшению толщины, однако, поскольку эти хвосты полностью насыщенны, параметр упорядоченности ДМФХ оказывается выше ПОФХ, что ведет к более упорядоченной структуре и большим затруднениям проникновения через мембрану.

Пептид LL-III в поверхностно-связанном состоянии демонстрировал более высокую дестабилизацию вторичной структуры, чем пептид в транс-связанном состоянии. Это согласуется с предыдущими теоретическими [48] и экспериментальными исследованиями *in vitro* [49], которые демонстрировали, что стабильность вторичной структуры зависит от способности боковых цепей закрывать водородные связи остова. Вдобавок чрезвычайно важно сравнивать структурные флуктуации структуры, усредненной по времени, без начальной структуры для каждой траектории. Согласно среднеквадратичным флуктуациям координат атомов по траекториям, пептид ясно демонстрирует большую структурную подвижность в бислое ПОФХ, чем в бислое ДМФХ. Амплитуда среднеквадратичных флуктуаций выше и составляет от 0.3 до 1.2 Å. В целом значения среднеквадратичных флуктуаций подтверждают, что пептид более стабилен в окружении ДМФХ, чем в окружении ПОФХ, в котором наблюдается неупорядоченное расположение остатков лизина пептида.

Когда пептид переходит в транс-позицию, большое индольное кольцо гидрофобного остатка Trp3 медленно проникает в район гидрофобного хвоста липида. В то же время, положительно заряженная боковая цепь Lys4 все еще взаимо-

действует с головкой липида, что нарушает взаимодействие типа катион-π между остатками Trp3 и Lys4. Такие характеристики пептида LL-III могут адекватно объяснить образование водородных связей пептидом LL-III. Эти результаты подтверждают данные предыдущих расчетов с другими АМП, такими, как гедистин [50] или магаинин-2, чьи взаимодействия с бислоем ПОФХ были рассчитаны на траектории 20 нс [51]. Остатки лизина могут занимать границу раздела фаз «липид–вода» как наиболее термодинамически предпочтительную позицию. Обнаружено, что боковые группы лизина занимают поверхность раздела фаз, в то время как полярные остатки тирозина обладают селективностью к участку вблизи карбонилов липидов [52]. Таким образом, мы можем предположить механизм, по которому пептид погружается в модельные липидные бислои. N-концевой остаток лизина пептида LL-III в изначальном поверхностно-связанном состоянии может высвобождаться из верхнего листка и погружаться во внутренний листок, переходя в трансмембранное состояние [53]. Однако для того, чтобы окончательно делать такой вывод, необходимо провести более детальный анализ. Более того, другие остатки лизина и тирозина пептида также вносят вклад, предоставляя водородные связи для погружения пептида в бислой мембраны [53]. Результаты нашей работы согласуются с предыдущим исследованием, проведенным с мембраноактивным антимикробным пептидом в различных липидных бислоях [53]. Далее, тенденция наличия молекул липида, входящих и не входящих в ассоциат с белком, в обеих липидных бислойных системах отражает, что липиды, стремящиеся в ассоциат, находятся ближе к центру бислоя, чем не стремящиеся. В целом липидные бислои демонстрируют наличие локальных изгибов.

Экспериментальные и вычислительные исследования показали, что АМП, включая магаинин, мелитин и другие, нарушают позицию углеродных атомов липидных хвостов как в поверхностном состоянии, так и в погруженном в мембрану [45]. Относительную упорядоченность липидных хвостов можно получить из параметра упорядоченности $S_{CD} = 3/2(\cos^2\theta - 1)$, где θ – угол между связью CD и нормалью к мембране [54]. Общая тенденция, полученная из расчетов упорядоченности, была такова, что у входящего во взаимодействие липида параметр упорядоченности уменьшается с течением траектории более сильно, когда пептид находится в транс-связанном состоянии, чем когда он находится в поверхностно-связанном состоянии. Мы можем сделать вывод, что ассоциированные липиды более возмущены, когда пептид находится в трансмембранной ориентации, чем когда он в поверхностно-связанном состоянии, для обеих моделей бислоя, а это означает большую дестабилизацию мембранного бислоя. Вышеприведенные результаты расчетов согласуются с ранними вычислениями, проведенными на MB21 и укороченном дермасептине S3 [55]. Более того, наблюдаемое утоньшение липидной мембраны из-за пептида согласуется и с другими расчетами [56, 57]. Наивысшая степень деформации структуры наблюдалась в бислое ДМФХ, в котором толщина мембраны уменьшалась по мере приближения к пептиду, доказывая нарушение структуры мембраны пептидом [53].

Тренды наклонов в расчетах выраженно согласуются с другими расчетными и экспериментальными данными [58]. Стоит отметить, что гидрофобное несоответствие может значительно влиять на мембранную ориентацию, наклон, конформацию пептида [38, 59, 60]. Более ранние исследования также показали, что АМП, такие как меллитин, в бислоях ДМФХ наклонены на угол до 9° в течение нескольких нс во время моделирования динамики [55]. Однако в нашем случае более высокие углы наклона пептидов относятся к более длительным временам траекторий. Эти результаты указывают на значительно больший наклон в бислоях ДМФХ, чем в бислоях ПОФХ, что, вероятно, вызвано большей гидрофобной шириной бислоев ПОФХ, чем бислоев ДМФХ, и, следовательно, неравенство между гидрофобной длиной LL-III и гидрофобной шириной бислоя больше в случае бислоев ДМФХ [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы наблюдали амплитуду изменений, происходящих при связывании и погружении пептида LL-III в мембранные бислои. Наши результаты убедительно показали более значительный наклон в бислоях ДМФХ, что согласуется с более ранним вычислительным исследованием, указывавшим на сходные изменения углов пептидов за 100 нс траектории [51]. Результаты определения свободной энергии также согласуются с более ранними данными по пептидам – производным бета-дефензина человека [37]. Мы полагаем, что наши результаты обеспечат весомое основание для дальнейших экспериментальных исследований пептида LL-III, а их комбинация позволит прояснить многие вопросы структуры, сворачивания и мембранной ассоциации.

ВЫВОДЫ

Мы применили метод молекулярной динамики для идентификации критически важных взаимодействий между мощным АМП LL- III и мембранными бислоями, а также для исследования

возможного механизма антимикробного действия. Наши результаты показывают, что:

1) остатки лизина пептида LL-III образуют водородные связи с атомами кислорода головок липидов в течение всего времени расчета траектории динамики;

2) пептид LL-III, будучи ориентирован на границе раздела фаз «липид–вода», связывался с головками липидов;

3) когда пептид был ориентирован трансмембранно, он оставался в таком состоянии в течение всего времени расчета, что может быть вызвано заякориванием остатков лизина на наружном листке липидного бислоя;

4) ориентация пептида в бислоях также приводит к дестабилизации структуры бислоя, на что указывали параметры порядка упаковки липидных хвостов;

5) ориентация пептида в ДМФХ приводила к большему углу наклона, чем в бислое ПОФХ.

Таким образом, данное исследование внесло вклад в понимание влияния толщины бислоя на характер взаимодействия АМП с мембранами. Однако необходимы дальнейшие экспериментальные исследования для выявления механизма дестабилизации мембран из смешанных липидов пептидом LL-III.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Совет научных и промышленных исследований (Нью-Дели, Индия) за предоставление финансовой поддержки постдокторанту С. Сахе, а также Индийский технологический институт Гандинагара – за предоставленные вычислительные мощности.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

ЭТИЧЕСКАЯ ДЕКЛАРАЦИЯ

Данная статья не содержит результатов каких-либо исследований, проведенных на животных кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Zasloff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 5449 (1987).
2. A. Catte, M. R. Wilson, M. Walker, et al., Soft Matter **14**, 2796 (2018).
3. H. W. Huang, Biochemistry **39**, 8347 (2000).
4. K. J. Hallock, D. K. Lee, and A. Ramamoorthy, Biophys. J. **84**, 3052 (2003).
5. W. F. D. Bennett, C. K. Hong, Y. Wang, et al., J. Chem. Theor. Comput. **12**, 4524 (2016).
6. D. E. Schlamadinger, Y. Wang, J. A. McCammon, et al., J. Phys. Chem. B. **116**, 10600 (2012).
7. J. L. Velasco-Bolom, G. Corzo, and R. Garduño-Juárez, J. Biomol. Struct. Dyn. **36**, 2070 (2018).
8. M. Hong and Y. Su, Prot. Sci. **20**, 641 (2011).
9. L. Liu, Y. Fang, and J. Wu, Biochim. Biophys. Acta **1828**, 2479 (2018).
10. V. Cerovsky, M. Budesnsk, O. Hovorka, et al., ChemBioChem **10**, 2089 (2009).
11. S. Bandyopadhyay, M. Lee, J. Sivaraman, et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. **430**, 1 (2013).
12. B. Mishra, A. Basu, R. Saravanan, et al., RSC Adv. **3**, 9534 (2013).
13. Vaňková, P. Kašparová, N. Dulíčková, et al., FEMS Yeast Res. **20**, foaa020 (2020).
14. B. Mishra, A. Basu, R. R. Y. Chua, et al., J. Mater. Chem. B **2**, 1706 (2014).
15. A. Tanhaeian, M. B. H. Najafi, P. Rahnama, et al., Int. J. Pep. Res. Ther. **26**, 1021 (2020).
16. T. Hansson, C. Oostenbrink, and W. van Gunsteren, Curr. Opin. Struct. Biol. **12**, 190 (2002).
17. K. Hristova, C. E. Dempsey, and S. H. White, Biophys. J. **80**, 801 (2001).
18. T. Wieprecht, O. Apostolov, and J. Seelig, Biophys. Chem. **85**, 187 (2000).
19. K. J. Hallock, D. K. Lee, J. Omnaas, et al., Biophys. J. **83**, 1004 (2002).
20. B. S. Perrin and R. W. Pastor, Biophys J. **111**, 1248 (2016).
21. C. Neale, C. Madill, S. Rauscher, et al., J. Chem. Theor. Comput. **9**, 3686 (2013).
22. A. Grau-Campistany, E. Strandberg, P. Wadhwani, et al., Sci. Rep. **5**, 09388 (2015).
23. A. Tuerkova, I. Kabelka, T. Králová, et al., Elife **9**, e47946 (2020).
24. Y. Hu, S. K. Sinha, and S. Patel, Langmuir **31**, 6615 (2015).
25. W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, J. Mol. Graph. **14**, 33 (1996).
26. C. M. Shepherd, H. J. Vogel, and D. P. Tieleman, Biochem. J. **370**, 233 (2003).
27. A. Ramamoorthy, S. K. Kandasamy, D. K. Lee, et al., Biochemistry **46**, 965 (2007).
28. K. J. Bowers, E. Chow, H. Xu, et al., in *Proc. ACM/IEEE Conf. on Supercomputing (SC06)* (Association for Computing Machinery, Tampa, FL, 2006).
29. A. Maciejewski, M. Pasenkiewicz-Gierula, O. Cramariuc, et al., J. Phys. Chem. B. **118**, 4571 (2014).

30. J. Aittoniemi, H. de Wet, F. M. Ashcroft, et al., PLoS Comput. Biol. **6**, e1000762 (2010).
31. G. Bussi, D. Donadio, and M. Parrinello, J. Chem. Phys. **126**, 014101 (2007).
32. S. Nosé, J. Chem. Phys. **81**, 511 (1984).
33. W. G. Hoover, Phys. Rev. A **31**, 1695 (1985).
34. M. Parrinello and A. Rahman, J. App. Phys. **52**, 7182 (1981).
35. U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, et al., J. Chem. Phys. **103**, 8577 (1995).
36. P. A. Kollman, I. Massova, C. Reyes, et al., Acc. Chem. Res. **33**, 889 (2000).
37. M. D. Ghafari, I. Rasooli, and K. Khajeh, Int. J. Pept. Res. Ther. **26**, 2039 (2020).
38. U. Harzer and B. Bechinger, Biochemistry **39**, 13106 (2000).
39. S. Saha, E. Panieri, S. Suzen, and L. Saso, J. Membr. Biol. **253**, 57 (2020).
40. M. Bak, R. Schultz, T. Vosegaad, et al., J. Magn. Reson. **154**, 28 (2002).
41. L. T. Nguyen, E. F. Haney, and H. J. Vogel, Trends Biotechnol. **29**, 464 (2011).
42. M. Zorko, and U. Langel, Adv. Drug Delivery Rev. **57**, 529 (2005).
43. W. C. Wimley, and K. Hristova, J. Membr. Biol. **239**, 27 (2011).
44. L. Yang, T. A. Harroun, T. M. Weiss, et al., Biophys. J. **81**, 1475 (2001).
45. D. Sengupta, H. Leontiadou, A. E. Mark, et al., Biophys. Acta Biomembr. **1778**, 2308 (2008).
46. A. D. Cirac, G. Moiset, J. T. Mika, et al., Biophys. J. **100**, 2422 (2011).
47. J. A. Killian and G. von Heijne, Trends Biol. Sci. **25**, 429 (2000).
48. A. E. Garcia and K. Y. Sanbonmatsu, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 2782 (2002).
49. T. Ghosh, S. Garde, and A. E. Garcia, Biophys. J. **85**, 3187 (2003).
50. G. Xu, M. Wu, L. Wang, et al., Biochim. Biophys. Acta **1788**, 2497 (2009).
51. S. K. Kandasamy and R. G. Larson, Biophys. J. **90**, 2326 (2006).
52. K. M. Sanchez, G. Kang, B. Wu, et al., Biophys. J. **100**, 2121 (2011).
53. M. Jafari, F. Mehrnejad, and F. Doustdar, PLoS One **10**, e0187216 (2017).
54. J. A. Lundbæk, S. A. Collingwood, and O. S. Andersen, J. Roy. Soc. Interface **7**, 373 (2010).
55. C. M. Shepherd, H. J. Vogel, and D. P. Tieleman, Biochem. J. **370**, 233 (2003).
56. K. J. Hallock, D-K. Lee, J. Omnaas, et al., Biophys J. **83**, 1004 (2002).
57. A. Catte, M. R. Wilson, M. Walker et al., Soft Mat. **14**, 2796 (2018).
58. M. Bachar and O. M. Becker, Biophys. J. **78,** 1359 (2000).
59. T. M. Weiss, P. C. van der Wel, J. A. Killian, et al., Biophys. J. **84**, 379 (2003).
60. S. H. Park and S. J. Opella, J. Mol. Biol. **350**, 310 (2005).

Association of Antimicrobial Peptide Lasioglossin-III with Model Lipid Bilayers

S. Saha, P. Ratrey, and A. Mishra

Department of Materials Science and Engineering, Indian Institute of Technology Gandhinagar, Palaj, Gandhinagar, Gujarat, India

Lasioglossin-III is a small cationic peptide identified in the venom of the *Lasioglossum laticeps* and is reported to have a potent antimicrobial property with low hemolytic activity. Presently, we explore the nature of interactions and permeability of lasioglossin-III in different orientations to lipid bilayers using molecular dynamics simulations. We performed molecular dynamics simulations of lasioglossin-III at the surface and interior of the pure DMPC and 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine bilayers to determine the membrane-peptide interactions and their effects. lasioglossin-III was found to interact with both the lipid bilayers at different rates and showed destabilization at the membrane/ water interface with respect to starting state of the peptide. These results suggest the specific interactions between the lysine residues of the peptide with the lipid head group regions, responsible for the overall stability of the peptide in the lipid bilayers. In addition, the results indicate a consistently higher tilt and binding free energy with a decrease in bilayer thickness of DMPC bilayers than in the 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine bilayers due to the peptide insertion.

Keywords: lasioglossin-III, POPC, DMPC, molecular dynamics simulations

EDN: QUCRPM
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 264–266

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.321

РЯД КАТИОННОЙ СЕЛЕКТИВНОСТИ КАНАЛОВ, ФОРМИРУЕМЫХ ПЕРОКСИРЕДОКСИНОМ-6 В БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

© 2022 г. П.А. Григорьев

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: greegorjev@mail.ru

Поступила в редакцию 30.11.2021 г.
После доработки 10.12.2021 г.
Принята к публикации 12.12.2021 г.

Пероксиредоксин-6 – фермент, защищающий клетку от действия пероксидов, а также, в зависимости от локализации в клетке, участвующий в метаболизме фосфолипидов клеточных мембран. Также было показано, что пероксиредоксин-6 формирует катионные каналы в липидных бислойных мембранах. В данной работе изучена сравнительная проницаемость этих каналов для одно- и двухвалентных катионов. Полученный ряд проницаемостей имеет вид: $P_{Ca^{2+}} : P_{K^+} : P_{Na^+} = 8.5 : 5.0 : 1.0$.

Ключевые слова: пероксиредоксин-6, ионные каналы, катионная селективность.

DOI: 10.31857/S000630292202089

Пероксиредоксины защищают клетки от пероксидов и участвуют во внутри и внеклеточной сигнализации. Особый интерес представляет пероксиредоксин-6 (Prx6), который восстанавливает гидроперекиси и обладает фосфолипазной активностью [1].

При изучении взаимодействия Prx6 с бислойной фосфолипидной мембраной было показано, что этот фермент формирует в мембране катионселективные ионные каналы, и было предположено, что механизм клеточной активности Prx6 включает функцию формирования ионных каналов в липидном матриксе клеточных мембран (рис. 1) [2]. Определенный интерес представляет дальнейшее изучение свойств этих каналов. В предлагаемой работе представлены результаты исследования ряда катионной селективности Prx6-каналов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Был использован рекомбинантный пероксиредоксин-6 человека, методика выделения которого детально описана в работе [2].

Бимолекулярные липидные мембраны формировали на круглом, диаметром 0.3 мм, отверстии в тефлоновом цилиндрическом стаканчике. Был применен раствор фосфатидилхолина (Sigma, США) в гептане (10 мг/мл).

Токи мембран измеряли в режиме фиксации напряжения электрометром, собранным на основе микросхемы К544УД1А.

Для оцифровки, записи и анализа сигнала с выхода электрометра использовали цифроаналоговый преобразователь NI USB-6009 (National Instruments, США) и программу Strathclyde Electrophysiology Software WinEDR v. 3.2.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характерное возрастание тока мембраны при встраивании в нее Prx6-каналов в растворах KCl и $CaCl_2$ показано на рис 1. Наблюдаемое неравенство амплитуд последовательных токовых ступенек объяснимо тем, что встраиваемые кластеры каналов содержат разное количество одиночных ионных каналов.

Приведенные ниже уравнения Нернста для мембранного потенциала одновалентных ионов (1) и двухвалентных ионов (2) показывают, что Prx6-каналы проницаемы только для катионов. Действительно, потенциал нулевого тока, равный –25 мВ при трехкратной трансмембранной разнице концентраций KCl, соответствует идеальной селективности каналов для катионов K^+ (рис. 2а), тогда как при двукратном градиенте

Сокращение: Prx6 – пероксиредоксин-6.

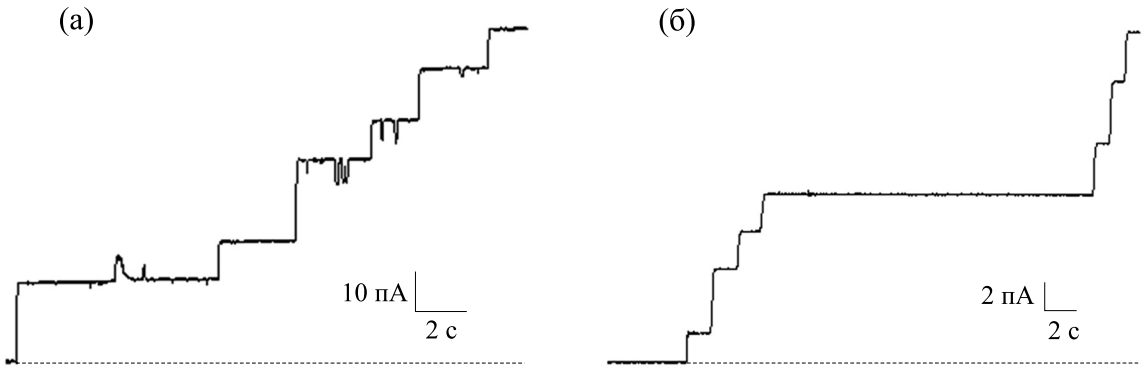


Рис. 1. Нарастание тока мембраны с Prx6-каналами. Условия: (а) – 200 мМ KCl (по обе стороны мембраны), $V = 30$ мВ, калибровки: 10 пА и 2 с; (б) – 10 мМ $CaCl_2$ (по обе стороны мембраны), $V = 30$ мВ, калибровки: 2 пА и 2 с.

$CaCl_2$ потенциал нулевого тока равен –8 мВ (рис. 2б), т. е. каналы проницаемы только для ионов кальция.

$$V\,(\text{мВ}) = 60\log(K_0^{+}/K_i^{+}), \quad (1)$$

$$V\,(\text{мВ}) = 30\log(Ca_0^{2+}/Ca_i^{2+}). \quad (2)$$

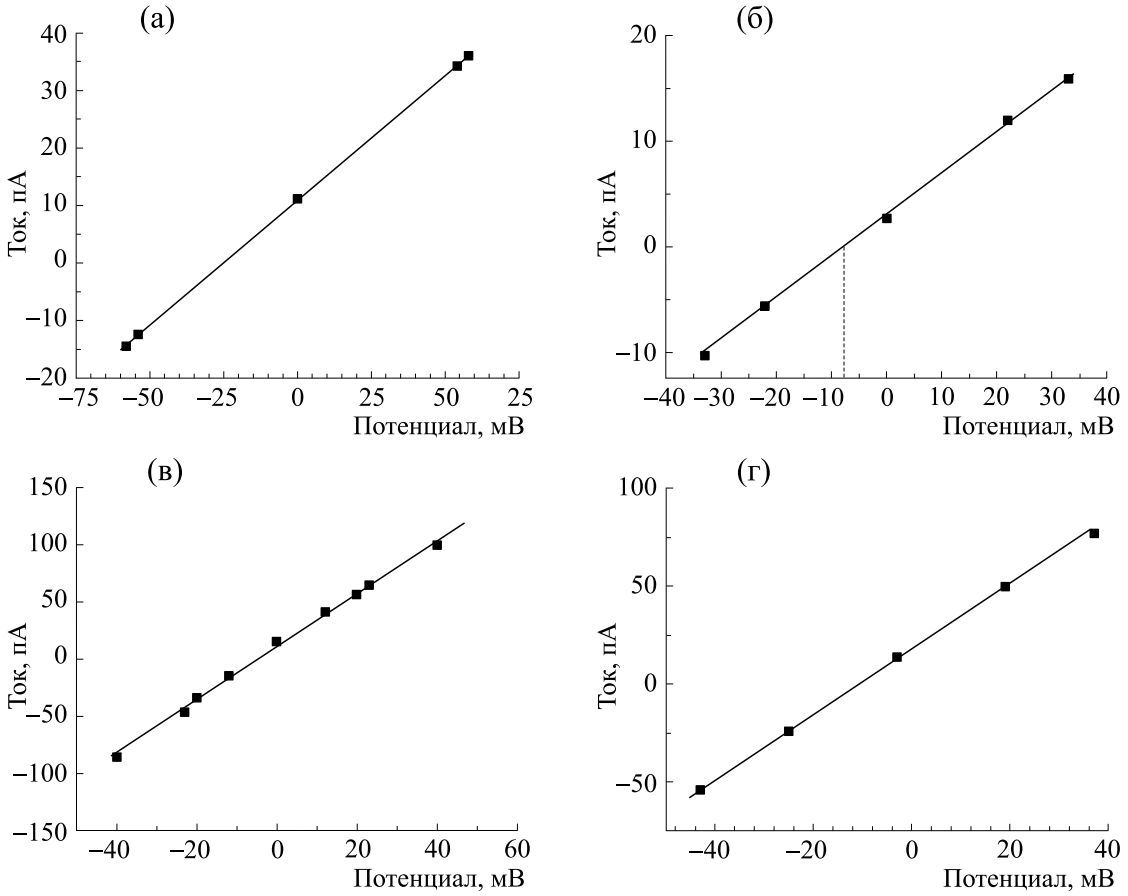


Рис. 2. Вольт-амперные характеристики Prx6-каналов: (а) – при трехкратном трансмембранном градиенте концентраций KCl (300 : 100 мМ), потенциал нулевого тока равен –25 мВ; (б) – при двукратном градиенте концентрации $CaCl_2$ (20 : 10 мМ), потенциал нулевого тока равен –8 мВ; (в) – при 100 мМ KCl + 300 мМ NaCl с одной стороны мембраны и 100 мМ KCl – с другой стороны мембраны, потенциал нулевого тока равен –12 мВ; (г) – при 50 мМ KC1 + 20 мМ $CaC1_2$ с одной стороны мембраны и 50 мМ KC1 + 37 мМ $CaC1_2$ – с другой стороны мембраны, потенциал нулевого тока равен –15 мВ.

Для определения соотношения проницаемостей канала: $P_{Ca^{2+}} : P_{Na^+}$ и $P_{C^{2+}} : P_{K^+}$ использовали данные, представленные на рис. 2в и 2г, применяя уравнение Гольдмана (3) и формулу (4) из работы [3].

$$V\,(\text{мВ}) = 60 \log[(P_{K^+}[K_0] + P_{Na^+}[Na_0])/(P_{K^+}[K_i] + P_{Na^+}[Na_i])], \quad (3)$$

$$V_0 = (P_{K^+}V_{K^+} + P_{Ca^{2+}}V_{Ca^{2+}}) / (P_{K^+} + P_{Ca^{2+}}), \quad (4)$$

где P_{K^+} – калиевая проводимость канала, $P_{Ca^{2+}}$ – кальциевая проводимость канала, V_0 – потенциал нулевого тока, V_{K^+} – калиевый потенциал, $V_{Ca^{2+}}$ – кальциевый потенциал.

На рис. 2в показано, что потенциал нулевого тока при условиях, когда с одной стороны мембраны электролит содержит 100 мМ KCl + 300 мМ NaCl, а с другой стороны мембраны – 100 мМ KCl, равен –12 мВ. Решение уравнения для этих параметров дает отношение $P_{K^+} : P_{Na^+} = 5.0$.

Значение $P_{Ca^{2+}} : P_{K^+} = 1.7$ было определено из формулы (4) для условий, когда с одной стороны мембраны электролит содержал 50 мМ KC1 и 20 мМ $CaC1_2$, а с другой стороны мембраны – 50 мМ KC1 и 37 мМ $CaC1_2$ (одинаковые концентрации для KC1 и разные по $CaC1_2$). Параметры формулы для этих условий равны: V_0 = 15 мВ (рис. 2г), $V_{Ca^{2+}}$ = 8 мВ и V_{K^+} = 0 (получены как решения уравнений Нернста (1) и (2)).

В итоге суммарное соотношение проницаемостей Prx6-канала для катионов кальция, калия и натрия имеет вид $P_{Ca^{2+}} : P_{K^+} : P_{Na^+} = 8.5 : 5.0 : 1.0$ при условии, что $P_{Ca^{2+}} : P_{K^+} = 1.7$ и $P_{K^+} : P_{Na^+} = 5.0$, и нормировке на $P_{Na^+} = 1.0$.

Видно, что Prx6-канал является в основном кальциевым каналом. Это особенно интересно в связи с появлением ряда работ, в которых показан синергизм действия кальция и пероксиредоксинов в клеточных реакциях. Так, например, показано, что кальций влияет на олигомеризацию пероксиредоксинов [5] и что пероксиредоксины взаимодействуют с активатором кальциевых каналов – белком STIM1 плазматической мембраны [6].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. М. Г. Шарапов, В. И. Новоселов и В. К. Равин, Молекуляр. биология **43** (3), 505 (2009).
2. П. А. Григорьев, М. Г. Шарапов и В. И. Новоселов, Биофизика **60** (4), 696 (2015).
3. C. A. Lewis, J. Physiol. **286**, 417 (1979).
4. M. A. B. Morais, P. O. Giuseppe, T. A. C. B. Souza, et al., J. Biol. Chem. 292 (17), 7023 (2017).
5. K. Ch. Tam, E. Ali, J. Hua, et al., Cell Calcium, **74**, 14 (2018).

Cation Selectivity Sequence of Channels Formed by Peroxiredoxin 6 in Membranes Composed of Phospholipid Bimolecular Leaflets

P.A. Grigoriev

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

Peroxiredoxin 6 is an enzyme that protects against cellular damage by peroxides and participates in phospholipid metabolism in the cell's membranes depending on its location. It has also been shown that peroxiredoxin 6 forms cation channels in the lipid bilayer membranes. In this study, we evaluated the relative selectivity of these channels for monovalent and divalent cations. The resulted selectivity sequence is $P_{Ca^{2+}} : P_{K^+} : P_{Na^+} = 8.5 : 5.0 : 1.0$.

Keywords: peroxiredoxin 6, ion channels, cation selectivity

EDN: OGKSEO
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 267–273

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 577.3

АКТИВНОСТЬ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ КРОЛИКА ЗАВИСИТ ОТ ХАРАКТЕРИСТИК ВИБРАЦИОННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

© 2022 г. В.В. Воробьева*, О.С. Левченкова, П.Д. Шабанов***

**Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 1*
***Смоленский государственный медицинский университет МЗ РФ, 214019, Смоленск, ул. Крупской, 28*
E-mail:v.v.vorobeva@mail.ru

Поступила в редакцию 12.04.2021 г.
После доработки 27.04.2021 г.
Принята к публикации 19.01.2022 г.

Изучена активность сукцинатдегидрогеназы лимфоцитов периферической крови кролика на фоне различных режимов общей вертикальной вибрации с амплитудой 0.5 мм и частотой 8 и 44 Гц по 60 мин ежедневно в течение 7, 21 и 56 сеансов. По мере накопления вибрационной дозы через 21 и 56 сеансов депрессия удельной активности фермента достигала 20–30% ($p < 0.05$), а коэффициент вариации возрастал на 20–60% ($p < 0.01$). Коэффициент асимметрии популяционного распределения в большей мере зависел от частотной характеристики вибрации и принимал значения 0.86 ± 0.1 и 0.7 ± 0.1 после 56 сеансов вибрации с частотой 8 и 44 Гц соответственно. Резерв клеток с типичной активностью сохранялся при вибрации с частотой 8 Гц и истощался при вибрации с частотой 44 Гц, отражая процесс снижения адаптационных возможностей энергетического статуса всей популяции лимфоцитов и организма в целом, предположительно вследствие вибрационно-обусловленной тканевой гипоксии.

Ключевые слова: вибрация, сукцинатдегидрогеназа, лимфоциты, митохондрии, биоэнергетическая гипоксия, цитохимия, формазан.

DOI: 10.31857/s0006302922020090

Воздействуя на все органеллы клетки, вибрация вызывает вибрационно-опосредованные цитопатии и мембранопатии, играющие важную роль в патогенезе гипоксии при вибрационной болезни [1]. Митохондрии также чувствительны к энергии вибрационных колебаний и изменяют свои структурные характеристики. Наблюдаются набухание, просветление матрикса, реакция крист, разрушение наружных и внутренних мембран, изменение формы и появление большого количества мелких митохондрий [2].

Вибрационное воздействие ведет к целому ряду биохимических нарушений, негативно влияющих на систему гомеостаза и энергетического обмена органов и тканей [3]. Во время вибрации под влиянием катехоламинов стимулируется α- и β-рецептор-аденилазный комплекс, активизируются ключевые ферменты гликолиза, гликогенолиза, липолиза. Нарушается углеводно-энергетический обмен миокарда и других органов [3], накапливаются промежуточные недоокисленные продукты обмена: пировиноградная, молочная, α-кетоглутаровая кислоты. Наблюдаются сдвиги в азотистом метаболизме тканей: отмечаются изменения общего и остаточного азота, креатина, креатинина [1]. Биохимические нарушения тесно связаны с активизацией прооксидантной системы [4, 5], нейрогуморальных [6] и нейрорефлекторных механизмов гипоксии [7, 8], прямым повреждающим действием вибрации [9], ведущим к дистрофическим и некротическим морфогистологическим проявлениям [10, 11].

В ходе исследования воздействия общей вибрации на систему энергопродукции миокарда экспериментальных животных (кролики) полярографическим методом [10] была выявлена активация электронтранспортной функции флавинадениндинуклеотид-зависимого фермент-субстратного комплекса на фоне снижения активности НАД-зависимого звена дыхательной цепи митохондрий миокарда [12]. Как известно, активизация амиталрезистентных метаболических потоков [13] выполняет компенсаторную роль в условиях стресса [14], способствует сохранению синтеза АТФ на цитохромном участке дыхательной цепи [12, 15] и свидетельствует о разви-

Сокращение: СДГ – сукцинатдегидрогеназа.

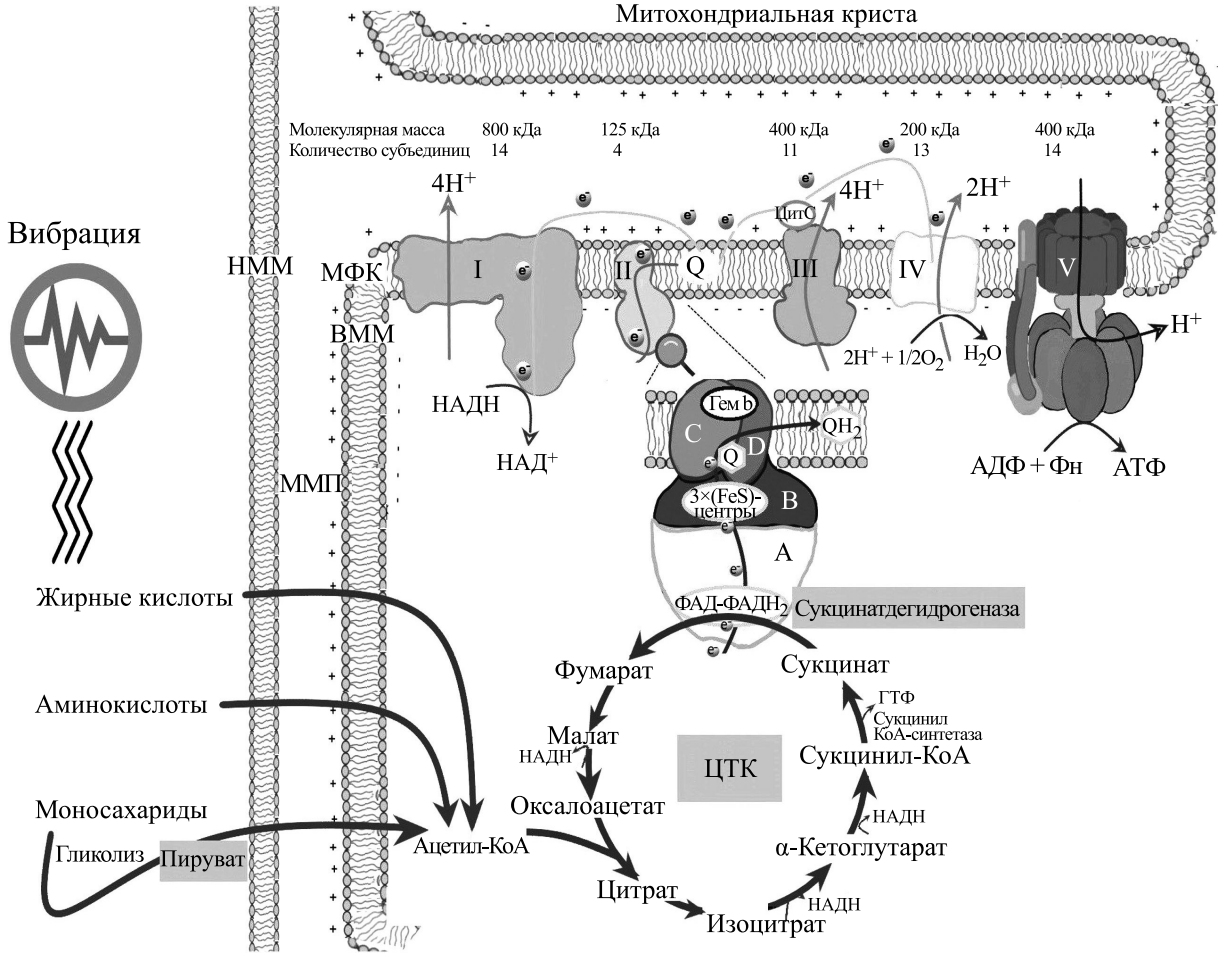


Рис. 1. Схематичное изображение воздействия вибрации на митохондрии и структура сукцинатдегидрогеназы, связывающей окислительное фосфорилирование с циклом трикарбоновых кислот (циклом Кребса): A, B, C и D – субъединицы СДГ; A – субъединица СДГ, включающая флавинадениндинуклеотид и центр связывания с сукцинатом; B – субъединица СДГ, представленная тремя железо-серными центрами; ВММ – внутренняя мембрана митохондрий; ММП – межмембранное пространство; МФК – митохондриальный ферментный комплекс; НММ – наружняя мембрана митохондрий; ФАД – флавинадениндинуклеотид; Фн – неорганический фосфат; ЦТК – цикл трикарбоновых кислот; Q – убихинон, QH_2 – восстановленный убихинон.

тии фазы I биоэнергетической (тканевой) гипоксии [16, 17]. Гипоксическое снижение парциального давления кислорода сопровождается полным восстановлением пиридиннуклеотидов (НАДН и НАДФ), подавлением переноса электронов на участке НАДН–CoQ [12] и снижением интенсивности окисления НАДН-зависимых субстратов [10, 17]. Феномен переключения каталитического окисления с таких энергетических субстратов как НАДН и НАДФ в митохондриальноферментном комплексе I на окисление восстановленных флавинадениндинуклеотидов на уровне митохондриальноферментного комплекса II дыхательной цепи является универсальным механизмом энергетического обеспечения широкого диапазона адаптивных реакций [12, 18, 19] и возможен благодаря метаболизму янтарной кислоты [20–23]. В ходе реакции образования свободного сукцината в цикле трикарбоновых кислот в присутствии сукцинил-КоА-синтетазы осуществляется субстратное фосфорилирование с образованием гуанозинтрифосфата. После образования сукцината вступает в действие гетеротетрамерный мембранно-протеиновый комплекс, состоящий из четырех субъединиц и частично расположенный во внутренней мембране митохондрий – сукцинатдегидрогеназа (СДГ), который окисляет сукцинат до фумарата (рис. 1) и одновременно обеспечивает функцию флавинадениндинуклеотид-зависимого митохондриальноферментного комплекса II электронтранспортной цепи [24–26].

С целью изучения активности СДГ можно использовать цитохимический метод исследования ферментов митохондрий в лимфоцитах крови,

показавший высокую чувствительность к физиологическим изменениям в организме и применяемый для выявления биологического действия как физических, так и фармакологических агентов [27]. Лимфоциты входят в состав гомеостатической информационной системы и оперативно реагируют на действие неблагоприятных факторов различной природы [27, 28]. Перестройка биоэнергетики лимфоцитов может быть оценена количественно в клетке и на клеточно-популяционном уровне по изменчивости активности сукцинатдегидрогеназы [27, 29, 30]. Исходя из предположения, что вибрационное воздействие, как филогенетически чуждое организму, будет оказывать дизрегулирующее действие на энергетический обмен лимфоцитов и систему сложных функциональных связей в их популяции, целью настоящего исследования было изучение энергетического статуса лимфоцитов крови кроликов на фоне различных режимов вибрационного воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты были проведены на 75 кроликах-самцах породы Шиншилла массой 2.05–3.00 кг в возрасте трех-четырех месяцев.

Действие общей вертикальной вибрации с амплитудой 0.5 мм осуществляли с помощью промышленной установки УВ 70/200 (производства машиностроительного объединения «Маяк», Киров, Россия). Ежедневно в течение 7, 21 или 56 суток (без выходных) проводили сеансы общей вибрации с частотой 8 и 44 Гц по 60 мин в утренние часы с 9.00 до 11.00 в осенне-зимний период. Выбор частоты вибрации был обусловлен тем фактом, что максимальный ответ на вибрационный стресс у кроликов реализуется на частоте 63 Гц [31].

Метод количественного цитохимического анализа активности дегидрогеназ основан на способности *n*-нитротетразолия фиолетового при окислении определенных типов субстратов восстанавливаться и образовывать в клетках периферической крови нерастворимые окрашенные пигменты в виде гранул формазана [32–34].

Для определения активности СДГ лимфоцитов периферической крови использовали готовые цитохимические наборы (производитель ООО НПФ «Либрус», Москва, Россия), в состав которых входит сукцинат натрия, *n*-нитротетразолий фиолетовый, калий-фосфатный буфер и ЭДТА. Реакцию проводили на стандартных свежих мазках крови, которую осторожно отбирали из краевой вены уха кролика за 60 мин до тестирующего воздействия. Мазки высушивали при температуре 18°С в течение 30 мин, фиксировали в 60%-м растворе ацетона, насыщенного ЭДТА (pH 5.30 ± ± 0.05) при комнатной температуре в течение 30 с. После фиксации препарат троекратно промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе при комнатной температуре. Стекла опускали в стакан с приготовленным раствором *n*-нитротетразолия фиолетового, помещали в водный термостат и инкубировали при температуре 37°С в течение 60 мин.

После инкубации мазки промывали дистиллированной водой и докрашивали ядра насыщенным 0.5%-м раствором метиленового зеленого на ацетатном буфере (pH 5.00 ± 0.05) в течение 10 мин. Затем стекла вновь промывали и высушивали при комнатной температуре. Готовые мазки микроскопировали под водной иммерсией (400×) на микроскопе Meopta (Чехословакия).

Об активности СДГ в клетке судили по количеству гранул формазана, образовавшихся в процессе ферментативного восстановления *n*-нитротетразолия фиолетового. Для определения активности фермента в популяции лимфоцитов подсчитывали количество гранул в 50 клетках и дифференцировали клетки на три группы. Лимфоциты, содержащие до 9 гранул, считали клетками с низкой активностью; от 10 до 19 гранул – клетками умеренной активности; от 20 гранул и более – клетками с высокой активностью.

Энергетический статус лимфоцитов оценивали комплексно как ряд популяционных характеристик, отражающих в совокупности состояние энергетического гомеостаза организма. Для количественной оценки использовали показатели ферментного статуса клеток белой крови: Q – средняя активность СДГ, V – коэффициент вариации, A – коэффициент асимметрии, E – коэффициент эксцесса [35].

Об активности фермента в лимфоцитах крови судили по средней величине Q, которую вычисляли по формуле (1):

$$Q = \frac{\sum_{i=1}^{N} X_i}{N}, \tag{1}$$

где X – число гранул в каждой i-й клетке, N – число клеток.

Коэффициент вариации V характеризовал рассеивание вариантов относительно среднего значения, отражая разнородность клеточной популяции по активности фермента и популяционную изменчивость (разнородность клеточной популяции по активности СДГ):

$$V = \frac{S}{Q} * 100\%. \tag{2}$$

Коэффициент асимметрии A характеризует распределение клеток крови по уровню активности СДГ относительно средней величины. Коэф-

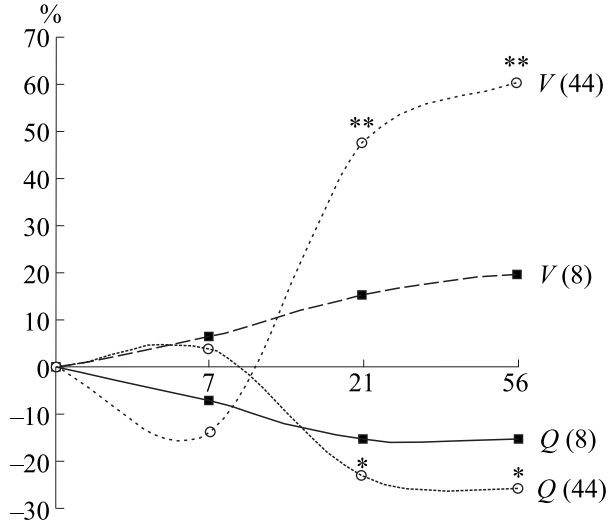


Рис. 2. Влияние параметров вибрации на удельную СДГ-активность (Q) и популяционную изменчивость (V) лимфоцитов периферической крови кроликов. По оси абсцисс – количество сеансов вибрации, по оси ординат – диапазон и направленность сдвигов показателей к уровню интактных животных, %; 7, 21 и 56 – количество сеансов вибрации; 8 и 44 – частота вибрации в Гц; * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$ по сравнению с группой «Интактный контроль» по U-критерию Манна–Уитни.

фициент асимметрии имеет отрицательный знак ($A < 0$), если увеличено количество клеток с высокой активностью:

$$A = \sqrt{\frac{\sum (X_i - Q)^3}{NS^3}}. \quad (3)$$

Коэффициент эксцесса E характеризует избыток или недостаток клеток со средней, то есть типичной активностью фермента. Функциональное состояние покоя характеризуется эксцессом, приближенным к нулю. Избыток клеток со средней активностью имеем при положительном эксцессе, недостаток – при отрицательном эксцессе.

$$E = \sqrt{\frac{\sum (X_i - Q)^4}{NS^4}} - 3. \quad (4)$$

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы STATISTICA for Windows 10.0 с использованием непараметрического U-критерия Манна–Уитни для сравнения независимых выборок ($p \leqslant 0.05$). Данные представлены в виде: среднее ± стандартное отклонение ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови интактных животных. Значения средней активности Q СДГ лимфоцитов интактных кроликов колебались в пределах 9.8–12.2 гранул на клетку.

Клеточные элементы в популяции значительно варьировали по уровню активности фермента. Коэффициент вариации V, характеризующий популяционную изменчивость, составлял 51–58%. Популяция лимфоцитов в данной группе животных была сбалансирована, и количество клеток с высокой активностью фермента уравновешивалось клетками с низкой активностью. Об этом свидетельствовали значения коэффициента асимметрии (A), который у интактных животных составлял 0.5 ± 0.1. Коэффициент эксцесса (E), характеризующий избыток или недостаток клеток со средней (типичной) активностью СДГ, составлял –0.42 ± 0.2 и отражал высокий уровень резерва типичных лимфоцитов в популяции. Совокупность показателей Q, V, A и E характеризовала оптимальный энергетический статус популяции лимфоцитов у интактных кроликов и отражала сбалансированность процессов обеспечения энергетического гомеостаза для реализации адаптационных возможностей организма животных в целом.

Активность сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови кролика на фоне воздействия общей вибрации. По мере увеличения количества сеансов вибрации удельная СДГ-активность клеток Q уменьшалась, а вариабельность этого параметра V – возрастала (рис. 2). Если через 7 сеансов вибрации, независимо от частоты, наблюдали лишь незначительные отклонения показателей от уровня интактных животных, то через 21 и 56 сеансов депрессия удельной активности фермента достигала 20–30% ($p < 0.05$), а коэффициент вариации возрастал на 20–60% ($p < 0.01$). По мере суммации эффектов вибрации нарастал энергетический дефицит в лимфоцитах и их популяционная изменчивость (рис. 2).

Действие вибрации, независимо от частоты, нарушало соотношение количества клеток с низкой и высокой активностью фермента в сторону преобладания пула с низкой активностью. Коэффициент асимметрии популяционного распределения A возрастал на 40–70% ($p < 0.01$) и принимал значения 0.7 ± 0.1 и 0.86 ± 0.1 после 56 сеансов вибрации с частотой 44 и 8 Гц соответственно (таблица).

Параметры распределения клеток четвертого порядка E также откликались на вибрационное воздействие (таблица). При 7 и 21 сеансе вибрации с частотой 8 Гц значения E значимо не отличались от исходных значений, тогда как при экспозиции вибрации на протяжении 56 сеансов они увеличивались, что свидетельствовало о появлении избытка пула клеток со средней активностью СДГ («гипернормальность»).

Изменение коэффициента асимметрии *A* и эксцесса *E* сукцинатдегидрогеназного статуса лимфоцитов при действии разных режимов общей вибрации

Количество сеансов вибрации	Частота вибрации, Гц			
	8		44	
	A	*E*	*A*	*E*
Интактный контроль	0.5 ± 0.1	–0.42 ± 0.2	0.5 ± 0.1	–0.42 ± 0.2
7	0.63 ± 0.34	–0.28 ± 0.81	0.67 ± 0.36	–0.4 ± 1.9
21	0.71 ± 0.3	0.2 ± 0.76	0.67 ± 0.17	–0.53 ± 0.4
56	0.86 ± 0.2*	0.73 ± 0.56*	0.7 ± 0.14*	–0.6 ± 0.3*

Примечание. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение ($M \pm SD$); * – $p < 0.05$ при сравнении с группой «Интактный контроль» по *U*-критерию Манна–Уитни.

При вибрации с частотой 44 Гц резерв клеток с типичной активностью снижался. Падение коэффициента эксцесса указывало на возникновение существенного дефицита клеток с типичной (средней) ферментативной активностью и, вероятно, отражало исчерпание резервных возможностей энергетического статуса всей популяции клеток и организма в целом.

Таким образом, суммирование эффектов вибрации в зависимости от ее частоты и длительности сопровождалось нарастанием энергетического дефицита в лимфоцитах. «Гипернормальность» популяции лимфоцитов при длительной низкочастотной (56 сеансов, частота 8 Гц) вибрации, на наш взгляд, свидетельствовала о согласованном включении и клеточных и популяционных механизмов компенсаторных перестроек энергопродукции в процессе адаптации. При длительной высокочастотной вибрации (56 сеансов, частота 44 Гц) компенсаторные механизмы оказались близки к исчерпанию, энергетические адаптивные ресурсы снижались.

Преобладание пулов клеток с низкой активностью на фоне наиболее длительного высокочастотного вибрационного воздействия (56 сеансов, частота 44 Гц) свидетельствовало о вибрационно-опосредованной дизрегуляции межклеточных взаимодействий лимфоцитов на фоне депрессии энергетического обмена экспериментальных животных [35].

Механизм, запускающий изменение активности СДГ лимфоцитов, предположительно связан с развитием тканевой гипоксии, возникающей при вибрационном воздействии [10, 17] и приводящей к реализации адаптивной роли СДГ, впервые отмеченной М.Н. Кондрашовой в 1973 г. Так как в системе II фермент-субстратного комплекса сукцинатдегидрогеназа доминирует по своим кинетическим и энергетическим характеристикам [36], то изменение активности данного фермента подтверждает выводы о ведущей адаптивной роли сукцинатоксидазной биоэнергетики, в том числе на фоне вибрации и обозначает мишень для фармакологического воздействия [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено исследование влияния общей вертикальной вибрации с амплитудой 0.5 мм и частотой 8 и 44 Гц на протяжении 7, 21 и 56 сеансов на активность сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах крови кроликов.

Доказано, что общая вибрация влияет на внутриклеточные и клеточно-популяционные характеристики энергетического статуса лимфоцитов. Характер и выраженность изменений показателей средней активности *Q*, вариации *V*, эксцесса *E* и асимметрии *A* зависят от частоты и длительности вибрации. Более «глубокая» дизрегуляция энергетического статуса лимфоцитов, выявленная *in vivo* (усиление депрессии средней активности СДГ и проявления рассогласованности клеточно-популяционных характеристик), проявилась на фоне более интенсивного режима вибрации (56 сеансов, частота 44 Гц), аналогично другим видам стрессирующего воздействия [38].

Так как регуляция энергетического обмена на уровне СДГ прежде всего сопряжена с активностью системы ферментов флавинадениндинуклеотид-зависимого звена дыхательной цепи, обеспечивающего поступление энергетических эквивалентов в клетку при энергодефиците на фоне функционального напряжения, то динамика СДГ позволяет косвенно судить о течении патологического процесса как на субклеточном, так и на организменном уровне [35].

Изменение СДГ лимфоцитов крови под действием фактора вибрации можно поставить в один ряд с другими воздействиями, влияющими на активность фермента, такими как физическая

нагрузка, ионизирующее излучение, химические и лекарственные соединения [29], световое излучение ближнего инфракрасного диапазона [27], температура, острая гипоксия [12].

Энергетический статус лимфоцитов следует рассматривать как интегральный показатель биологической энергетики целостного организма и системы сложных межклеточных взаимодействий в их популяции, который может быть полезен для оценки эффективности и безопасности фармакологических средств, например, антигипоксантов [39–41] с целью коррекции вибрационно-опосредованных нарушений органов и тканей [1, 42].

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 10-04-00473 и 13-04-00186).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты были проведены в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (приказ Минздрава России № 199н от 01.04.2016) и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей ETS 123 (от 18.03.1986) с приложением А от 15.06.2006.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Т. М. Сухаревская, А. В. Ефремов, Г. И. Непомнящих и др., *Микроангиопатии и висцеропатии при вибрационной болезни* (Новосибирск, 2000).
2. Н. Н. Сарбаева, Бюл. эксперим. биологии и медицины **7**, 486 (1987).
3. В. В. Воробьева и П. Д. Шабанов, Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии **14** (1), 46 (2016). DOI: 10.17816/RCF14146-62
4. Е. Л. Смирнова, Е. Л. Потеряева и Н. Г. Никифорова, Справочник врача общей практики, № 1, 25 (2015).
5. Е. Л. Потеряева, Е. Л. Смирнова и Н. Г. Никифорова, Медицина труда и промышленная экология, № 6, 19 (2015).
6. В. С. Рукавишников, Г. М. Бодиенкова, С. И. Курчевенко и др., Медицина труда и промышленная экология, № 1, 17 (2017).
7. А. В. Мелентьев, П. В. Серебряков и А. В. Жеглова, Медицина труда и промышленная экология, № 9, 19 (2018).
8. Н. Л. Якимова, В. А. Панков, А. В. Лизарев и др., Медицина труда и промышленная экология **59** (5), 284 (2019).
9. Л. М. Сааркоппель, В. А. Кирьяков и О. А. Ошкодеров, Медицина труда и промышленная экология, № 2, 6 (2017).
10. В. В. Воробьева и П. Д. Шабанов, Биофизика **64** (2), 337 (2019). DOI: 10.1134/S0006302919020121
11. В. А. Кирьяков, Н. А. Павловская и А. В. Сухова, Медицина труда и промышленная экология, № 12, 22 (2010).
12. М. В. Васин и И. Б. Ушаков, Биофизика **63** (2), 237 (2018). DOI: 10.1134/S0006350918020252
13. B. Chance and G. Hollunger, J. Biol. Chem. **236** (5), 1534 (1961).
14. А. И. Григорьев и А. Г. Тоневицкий, Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова **95** (10), 1041 (2009).
15. В. В. Воробьева и П. Д. Шабанов, Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии **17** (3), 59 (2019). DOI: 10.17816/RCF17359-70
16. Л. Д. Лукьянова, Сигнальные механизмы гипоксии (РАН, М., 2019).
17. V. V. Vorobieva and P. D. Shabanov, Bull. Exp. Biol. Med. **167** (5), 621 (2019). DOI: 101007/s10517-019-04583-0
18. T. Wittenberger, H. C. Schaller, and S. Hellebrant, J. Mol. Biol. **307**, 799 (2001).
19. М. Н. Кондрашова, Т. В. Сирота, А. В. Темнова и др., Биохимия **62** (2), 154 (1997).
20. W. He, Nature **429**, 188 (2004).
21. H. A. Praetorius and J. Leipziger, Ann. Rev. Physiol. **72**, 377 (2010).
22. G. Burnstock and A. Verkhratsky, Acta Physiol. **195** (4), 415 (2009).
23. F. Weihai, J.-P. Frederick, and S. Miro, Nature **429**, 188 (2004).
24. D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*, 6th Edition (W. H. Freeman and Company, New York, 2013).
25. А. Ленинджер, *Основы биохимии*, в 3-х т. (Мир, М., 1985).
26. B. Moosavi, E. A. Berry, and X. Zhu, Cell. Mol. Life Sci. **76** (9), 4023 (2019). DOI: 10.1007/s00018-019-03200-7
27. Н. В. Хундерякова, А. В. Захарченко, М. В. Захарченко и др., Биофизика **60** (6), 1104 (2015).
28. В. В. Соколов, Р. П. Нарциссов и Е. К. Иванов, *Цитохимия ферментов в профпатологии* (Медицина, М., 1975).

29. Н. Н. Федотчева, М. Н. Кондрашова, Е. Г. Литвинова и др., Биофизика **63** (5), 933 (2018). DOI: 10.1134/S0006302918050125

30. В. В. Соколов и Л. А. Иванова, Лабораторное дело, № 10, 11 (1982).

31. T. Ishitake, Kurume Med. J. **37**, 235 (1990).

32. Р. П. Нарциссов, Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии **54** (5), 85 (1969).

33. Р. П. Нарциссов, Педиатрия, № 4, 101 (1998).

34. Н. В. Хундерякова, автореф. дис. ... канд. биол. наук (Пущино, 2007).

35. В. В. Воробьева и П. Д. Шабанов, *Фармакология экстремальных состояний*, под ред. П. Д. Шабанова, в 12 томах (Информнавигатор, Санкт-Петербург, 2015), т. 6. Вибрация и вибропротекторы.

36. М. Н. Кондрашова, *Молекулярные механизмы клеточного гомеостаза* (Наука, Новосибирск,1987).

37. J. Rutter, D. R. Winge, and J. D. Schiffman, Mitochondrion **10**, 393 (2010).

38. М. В. Васин и Л. В. Королева, в сб. *Митохондриальная патология* (М., 1999).

39. В. В. Воробьева и П. Д. Шабанов, Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова **95** (8), 857(2009).

40. О. С. Левченкова и В. Е. Новиков, Вестн. РАМН **71** (1),16 (2016).

41. V. E. Novikov, O. S. Levchenkova, E. N. Ivantsova, and V. V. Vorobieva, Rev. Clin. Pharmacol. Drug Therapy **17** (4), 31(2019). DOI: 10.17816/RCF17431-42

42. L. Wang, Z. Wang, Q. Liu, et al., J. Bone Mineral Metabolism **38**, 491 (2020). DOI: 10.1007/s00774-020-01092-3

Activity of Succinate Dehydrogenase in Rabbit Blood Lymphocytes Depend s on Characteristics of the Vibration-based Impact

V.V. Vorobieva*, O.S. Levchenkova, and P.D. Shabanov***

**Institute of Experimental Medicine, ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia*

***Smolensk State Medical University, ul. Krupskoy 28, Smolensk, 214019 Russia*

The aim of this study was to investigate the effects of whole-body vertical vibration on succinate dehydrogenase activity in rabbit peripheral blood lymphocytes at 0.5 mm amplitude and different exposure frequencies (8 Hz and 44 Hz) performed daily for 7, 21 and 56 days (60 min). As the vibration dose became greater 21 and 56 sections after vibration exposure, depression in the specific activity of the enzyme was 20-30% ($p < 0.05$), and the variation coefficient increased by 20–60% ($p < 0.01$). The asymmetry coefficient of the population distribution largely depended on the vibration frequency and was 0.86 ± 0.1 and 0.7 ± 0.1 after 56 sections of vibration exposure at frequencies of 8 Hz and 44 Hz, respectively. The cells with normal activity remained in the store after exposure to 8 Hz frequency and were depleted after exposure to 44 Hz frequency thereby reflecting the process of reduction of the adaptive capabilities of the energy status of the lymphocyte population and the whole body, presumably due to vibration-mediated tissue hypoxia.

Keywords: vibration, succinate dehydrogenase, lymphocytes, mitochondria, bioenergetic hypoxia, cytochemistry, formazan

EDN: HBSSZW
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 274–282

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 573

НАРУШЕНИЕ РЕГУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ цАМФ В ОБОНЯТЕЛЬНЫХ НЕЙРОНАХ В МОДЕЛИ ШИЗОФРЕНИИ, ИНДУЦИРУЕМОЙ ВВЕДЕНИЕМ (+)-МК-801 КРЫСАМ

© 2022 г. Е.В. Бигдай, А.А. Синегубов
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6
E-mail: artem_sinegubov@aol.com

Поступила в редакцию 06.12.2021 г.
После доработки 06.12.2021 г.
Принята к публикации 19.01.2022 г.

Одним из ключевых патогенетических звеньев шизофрении является нарушение хода развития нервной системы. Сходные изменения наблюдаются в рамках модели данной патологии, индуцируемой введением антагонистов NMDA-рецепторов на ранних стадиях развития. В работе продемонстрировано, что в данной модели шизофрении проявляются функциональные изменения в одном из крупных очагов постнатального нейрогенеза – обонятельном нейроэпителии. Обонятельные сенсорные нейроны модельных животных обладают сниженной чувствительностью к активатору аденилатциклазы и нарушениями регуляции ее активности со стороны кальмодулин-зависимых сигнальных путей.

Ключевые слова: обоняние, шизофрения, нейрогенез, NMDA

DOI: 10.31857/S0006302922020107

Шизофрения – сложное психическое заболевание, клеточные и молекулярные субстраты которого до конца не изучены. Современные представления о патофизиологии этого заболевания особое внимание уделяют глутаматэргической системе, в первую очередь связанной с функционированием NMDA-рецепторов. Накопленные данные позволяют говорить о данной патологии как о болезни развития нервной системы, при которой ведущим звеном патогенеза является аномальный ход нейрогенеза [1].

Циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) играет очень важную роль в различных типах клеток, включая нейроны, поскольку влияет на развитие клеточного цикла, и при повышении его внутриклеточного содержания подавляет митогенную передачу сигналов через фосфорилирование протеинкиназой А фактора Raf. Доказана роль циклического аденозинмонофосфата в механизме формирования наркотической зависимости, обусловленной аномальной его регуляцией в нейронах коры головного мозга, полосатого тела и голубого пятна. Показана роль цАМФ-зависимых транскрипционных факторов в механизме развития алкоголизма [2].

Исследования на трансгенных животных установили, что цАМФ-сигнализация важна для обучения и памяти, как для ее приобретения, так и для потери контекстной памяти [3]. Сигнальный путь цАМФ вовлекается в регуляцию нейрогенеза, выживаемости нейронов и синаптической связи, которые участвуют в патогенезе депрессии [4].

Синтез цАМФ изменен при ряде нейропсихических расстройств, включая шизофрению. Так, в тромбоцитах у пациентов с шизофренией обнаружено снижение его продукции [5]. При исследовании остроты обоняния у пациентов с шизофренией с помощью одорантов, трансдукция которых вовлекает внутриклеточный цАМФ, было показано, что внутриклеточные сигнальные пути цАМФ разрегулированы при шизофрении, и разрегулированная цАМФ-сигнализация может вносить вклад в патогенез шизофрении [6].

При использовании вестерн-блот-анализа и посмертных образцов из хорошо охарактеризованной коллекции пожилых пациентов с шизофренией было показано, что белки и фосфопротеины, содержащие митоген-активированную протеинкиназу и цАМФ-связанные сигнальные пути аномально экспрессируются в передней по-

Сокращения: цАМФ – циклический аденозинмонофосфат, PDE – фосфодиэстераза, ACIII – аденилатциклаза III, OCH – обонятельный сенсорный нейрон, ЦНС – центральная нервная система, IBMX – 3-изобутил-1-метилксантин, CaM – кальмодулин.

ясной извилине и дорсолатеральной префронтальной коре при шизофрении. Ассоциированный с митоген-активированной протеинкиназой путь активирует факторы транскрипции, влияющие на обучение, память, пролиферацию клеток и апоптоз [7–9].

Следует отметить, что концентрация цАМФ изменяется при шизофрении не только в цитозоле различных клеток, но и во внеклеточном пространстве. Уровни цАМФ уменьшаются в обонятельной слизи у этих пациентов, и измерения обонятельной остроты и циклических нуклеотидов в носовой слизи предлагаются для выявления патологии у пациентов, которые жалуются на потерю обоняния [10].

Помимо цАМФ при шизофрении изменяется активность протеинкиназы А. Это один из ключевых ферментов цАМФ-сигнального пути, который обеспечивает многочисленные клеточные реакции, зависящие от фосфорилирования белков. Следовательно, дисфункции в различных компонентах передачи сигналов цАМФ могут быть вовлечены в патогенез шизофрении [11].

Как известно, концентрация внутриклеточного цАМФ регулируется посредством таких клеточных механизмов, как активация аденилатциклазы, гидролизующей АТФ с образованием цАМФ, и фосфодиэстеразы (PDE), понижающей концентрацию цАМФ в цитозоле. Обнаружено одиннадцать изоформ этого фермента. Так, PDE4 специфически гидролизует цАМФ и широко экспрессируется во многих типах клеток и тканях, включая нервные клетки.

В 1970-х годах была разработана концепция «циклической нуклеотидной системы» как мощного инструмента, расширяющего возможности для исследования лекарств. Эта система помимо цАМФ включает аденилатциклазы и фосфодиэстеразы. При этом большое внимание было сосредоточено на цАМФ-PDE и цГМФ-PDE, которые рассматривались как мишени для разработки новых лекарств, в частности, для улучшения когнитивных функций. Были разработаны специфические ингибиторы PDE4 для многих заболеваний, среди которых болезнь Альцгеймера, когнитивные нарушения, болезнь Паркинсона, депрессия и шизофрения [12]. По мнению авторов, профилактика и лечение этих заболеваний требует понимания изменений механизмов внутриклеточной передачи сигналов, связанных с нарушением регуляции изофермента PDE, а также других компонентов сигнальной системы цАМФ.

Показано, что PDE вовлекается в процесс нарушения регуляции внутриклеточной сигнальной системы цАМФ при шизофрении. В этом сигнальном пути участвует DISC1 – белок, кодируемый одноименным геном. Предполагается, что функциональные изменения во взаимодействии между DISC1 и PDE4 будут влиять на катаболизм митохондриального цАМФ с сопутствующим физиологическим и психиатрическим исходом. Объединяющая связь между шизофренией и биполярным аффективным расстройством, а также между DISC1 и PDE4 может происходить на когнитивном уровне обучения и памяти и на молекулярном уровне передачи сигналов цАМФ [13]. Не случайно PDE4 является неотъемлемым компонентом механизмов действия различных классов антидепрессантов [12].

В регуляции уровня цАМФ в клетках помимо PDE участвует второй механизм – активность аденилатциклаз. У млекопитающих клонировано и охарактеризовано по крайней мере девять близко родственных изоформ аденилатциклаз, каждая из которых кодируется разными генами на разных хромосомах.

Отдельные изоформы аденилатциклаз предложены в качестве инструментов для исследования специфических механизмов, вовлекающихся в реакции клеток различного типа на их стимуляцию. Например, аденилатциклаза I предложена как детектор для исследования механизмов стимуляции с участием αs субъединицы G-белка и кальций/кальмодулина, а аденилатциклаза II – для исследования механизмов стимуляции, в которые вовлекаются αs субъединица и βγ-димер G-белка или PKC; аденилатциклаза V или аденилатциклаза VI были предложены в качестве детекторов для ингибирования, в механизме которого принимает участие кальций (или NO для аденилатциклазаы VI) [15].

В настоящее время внимание к себе стала привлекать аденилатциклаза III (ACIII). Впервые ее обнаружили в обонятельном нейроэпителии, где она локализуется в обонятельных жгутиках сенсорных нейронов и является важным компонентом механизма обонятельной трансдукции. Однако помимо основного компонента в механизме обонятельной трансдукции ACIII играет незаменимую роль в постнатальном созревании обонятельных сенсорных нейронов (OCH) и поддержании ультраструктуры обонятельных жгутиков у мышей в течение всего взрослого периода [16].

Вместе с тем ACIII экспрессируется и в других типах клеток, локализуясь в так называемых первичных ресничках, и играет там важную роль. Так, длина этих ресничек строго контролируется, поскольку укорочение их вызывает такие тяжкие последствия, как поликистоз почек или гидроцефалия. Регуляторную роль в нормальном цилиогенезе выполняет ACIII-цАМФ-сигнальный путь [17]. Он обнаруживается в первичных ресничках в фибробластах, синовиоцитах, астроцитах, а также в плазматической мембране первичных ресничек почти всех нейронов в мозге взрослых мышей

и может использоваться в качестве их маркера [18].

Известно, что от астроцитов в субвентрикулярной зоне первичная ресничка вытягивается в полость желудочка, заполненную спинномозговой жидкостью, и служит механизмом, с помощью которого эти ненейронные клетки определяют химический состав окружающей их среды. Тот факт, что некоторые астроциты экспрессируют ACIII-положительные реснички, указывает на то, что в них цАМФ участвует в качестве вторичного мессенджера для воздействия на клеточные процессы. Эти данные обеспечиваются дополнительным механизмом, который может влиять на роль астроцитов в регуляции синаптической передачи в нервной системе [18].

ACIII локализуется также в ресничках клеток сосудистого сплетения в мозге. Сосудистые сплетения – это структуры, обнаруженные в боковых, третьем и четвертом желудочках головного мозга; их основные функции – производство и гомеостазис спинномозговой жидкости. Некоторые клетки сосудистого сплетения имеют небольшие пучки подвижных ресничек, другие же клетки – единственную первичную ресничку. Разрушение этих ресничек связано с повышенным содержанием хлора в спинномозговой жидкости в сочетании с гидроцефалией. Интересно, что повышенный уровень хлоридов в спинномозговой жидкости сочетается с повышенной внутриклеточной концентрацией цАМФ в эпителии сосудистого сплетения. Таким образом, нарушение регуляции ACIII-опосредованной передачи сигналов цАМФ в эпителиальных клетках может быть причиной возникновения гидроцефалии [19].

Активность аденилатциклазы в первичных ресничках нейронов центральной нервной системы (ЦНС) может иметь решающее значение для некоторых форм обучения и памяти. ACIII является ключевым медиатором передачи сигналов цАМФ в первичных ресничках мозга. Поскольку она экспрессируется в первичных ресничках нейронов гиппокампа, исследовали $ACIII^{-/-}$ мышей на наличие нескольких форм обучения и памяти показали, что $ACIII^{-/-}$ у мышей наблюдается нарушение обучаемости и памяти на временное диссоциативное пассивное избегание. Так как ACIII экспрессируется исключительно в первичных ресничках, это означает, что сигналы цАМФ, которые генерируются внутри первичных ресничек, способствуют некоторым формам обучения и памяти, включая потерю контекстуальной обусловленности страха [4].

У мышей с генетическим нокаутом аденилилциклазы ACIII в обонятельном эпителии уменьшается продукция цАМФ, что приводит к депрессии и вызывает тревогу. Эти состояния связаны с подавлением дофаминергической системы и экспрессии GluN2B-субъединицы NMDA-рецепторов в гиппокампе [5]. Таким образом, нарушения в ЦНС, связанные с функционированием дофаминергической и глутаматэргической системами являются результатом отсутствия или потери ACIII в обонятельном эпителии. ACIII в основном обонятельном эпителии играет жизненно важную роль в патофизиологии депрессии и тревожного состояния.

ACIII в первичных ресничках нейронов регулирует морфологию дендритов, подтверждая тот факт, что потеря ACIII ведет к атрофии нейронов. Общегеномное ассоциативное исследование у людей недавно выявило причастность аденилилциклазы III к большому депрессивному расстройству в результате потери синапсов и соответственно изменения нейрональной активности в лимбической и корковой областях. Более того, уровень экспрессии ACIII в крови считается биомаркером депрессии у людей. Исследование на мышах продемонстрировало, что потеря ACIII у них приводит к снижению нейрональной активности, изменению режима сна и поведению, подобному депрессии, предоставляя убедительные доказательства, подтверждающие, что ACIII является геном-кандидатом [20]. Это исследование также предполагает новую стратегию борьбы с депрессией, направленную на внутриклеточную сигнальную систему цАМФ, в частности, в ресничках нейронов.

Значительное снижение экспрессии ACIII обнаружено в обонятельном сенсорном эпителии у больных шизофренией [21].

Признание проблем, связанных с нарушением регуляции системы цАМФ при шизофрении, послужило поводом для разработки кандидатных молекулярных подходов в определении причин, лежащих в основе патологии развития при шизофрении [22]. Существует множество доказательств того, что, по крайней мере, когнитивные и негативные симптомы шизофрении являются результатом дисфункции глутаматергической системы. Литературные данные свидетельствуют о дефиците функции NMDA-рецепторов при шизофрении, что является одной из основных причин этого заболевания [23].

NMDA-рецепторы на нейронах гиппокампа и церебрального кортикального слоя участвуют в процессах обучения и памяти, вовлекая в этот процесс цАМФ-зависимую PDE4 [4]. Вместе с тем показано, что активация NMDA-рецепторов вызывает повышение концентрации цАМФ в области CA1 гиппокампа посредством активации аденилатциклаз, что свидетельствует о том, что метаболизм циклического АМФ играет важную роль в индукции зависимой от NMDA-рецепторов долговременной потенциации в области CA1 гиппокампа [22]. Поэтому ослабление функции

NMDA-рецепторов при шизофрении может инициировать нарушение регуляции системы цАМФ в нейронах ЦНС через снижение активности ACIII и служить одним из молекулярных механизмов, лежащих в основе этого заболевания [23].

Следует отметить, что важную информацию о функционировании этого фермента в нейронах ЦНС в норме и при дисфункции NMDA-рецепторов может дать изучение активности ACIII в ОСН, поскольку появляется все больше свидетельств того, что обонятельная дисфункция является эндофенотипом шизофрении, таким образом, биологические основы обонятельной дисфункции могут дать ключ к патофизиологическим механизмам, влияющим на нейроны в различных областях мозга [27]. Учитывая многие известные клеточные и молекулярные сходства в нейрогенезе, дифференцировке и созревании между обонятельным эпителием и центральной нервной системы, исследование регуляции внутриклеточной цАМФ сигнализации в ОСН полезно для понимания аномального развития нервной системы при шизофрении [28].

Однако, как видно из выше изложенного, ферментативная активность ACIII определялась либо посредством биохимического анализа в изолированных и суспендированных мембранных препаратах обонятельных жгутиков [29], либо при оценке уровня ее экспрессии в обонятельном эпителии у пациентов с шизофренией, либо по концентрации цАМФ в тромбоцитах и обонятельной слизи у этих пациентов. Нам не удалось обнаружить данные, полученные при прямой стимуляции ACIII в норме и при патологии.

Поэтому в данной работе мы попытались ответить на вопрос, изменяется ли активность самой ACIII без влияния на нее сопряженного с ней G-белка при шизофрении.

Для этого мы исследовали прямую стимуляцию ACIII, минуя ее рецептор-сопряженную активацию, в изолированных обонятельных сенсорных нейронах ОСН крыс линии Вистар в контроле и в модели шизофрении, индуцируемой введением (+)-МК-801.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали изолированные обонятельные сенсорные нейроны крыс линии Вистар, полученных из ЦКП «Биоколлекция» Института физиологии РАН. Как известно, ОСН представляют модель клеток, полученных из обонятельного эпителия, в качестве модельной системы для изучения молекулярных механизмов, участвующих в шизофрении и других нервно-психических расстройствах. Недавние исследования патофизиологии шизофрении с использованием этой модели позволили получить представление о связанных с шизофренией изменениях в развитии нервной системы, реакции на стресс и путях регуляции экспрессии генов [30].

Обонятельные клетки в первичной культуре являются функционально зрелыми, экспрессирующими рецепторные и внутриклеточные механизмы не только для обонятельной трансдукции (в частности, ACIII), но и для нейромедиаторных путей, участвующих в психоневрологических расстройствах, таких как биполярная депрессия или шизофрения [24].

Животных, предварительно анестезированные с применением эфира, подвергали цервикальной дислокации. Препарирование обонятельных завитков I–IV проводили на льду при постоянном орошении аэрированным буферным раствором следующего состава: 150 мМ NaCl, 20 мМ HEPES, 5 мМ D-глюкозы, 5 мМ KCl, pH 7.4. Изолированные фрагменты обонятельного эпителия с подлежащей соединительной тканью инкубировали в буферном растворе с добавлением 1% фракции V бычьего альбумина и 1 мг/мл коллагеназы типа IV в течение 15 мин при 37°C. Раствор декантировали и ткань дополнительно дважды промывали буферным раствором без добавок.

Суспензию диссоциированных клеток готовили путем тритурирования с использованием полированных в пламени горелки стеклянных пипеток в буферном растворе (145 мМ NaCl, 20 мМ HEPES, 5 мМ D-глюкозы, 5 мМ KCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7.4) с добавлением 1% (w/v) фракции V бычьего альбумина для обеспечения более равномерного окрашивания препарата, поскольку липофильные флуоресцентные красители склонны к образованию эмульсии в водных растворах. Полученную суспензию смешивали с 1 мМ стоковым раствором флуоресцентного красителя Фура-2-ацетоксиметилового эфира (Fura-2 AM) в безводном диметилсульфоксиде до конечной концентрации 5 мкМ. Суспензию помещали на предварительно обработанные поли-l-лизином стекла и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Остатки неосажденной суспензии однократно отмывали от стекол буферным раствором.

Активность ACIII в ОСН в ответ на стимуляцию оценивали посредством прижизненной флуоресцентной микроскопии по изменению интенсивности свечения Fura-2 AM, характеризующей изменение содержания ионов кальция в цитозоле ОСН. Для этого препарат помещали в открытую камеру объемом 500 мкл на предметный столик микроскопа МИКМЕД-2 (ЛОМО, Россия), оснащенного камерой, дихроичным зеркалом и светофильтрами для выделения полосы возбуждения люминесценции 380 нм и эмиссии 510 нм. Регистрацию сигнала проводили с помощью программы VirtualDub 2.1.

Для прямой стимуляции ACIII применяли форсколин. Его высокие концентрации обнаруживаются исключительно в нейронах, что позволяет отделить в ходе анализа нейрональную фракцию от всех прочих клеток в смешанной первичной культуре из обонятельного нейроэпителия. Помимо форсколина применение ацетоксиметиловых эфиров дополнительно позволяет выявить нейрональные клетки в смеси других типов клеток, так как он относительно селективно метаболизируется в них. Чтобы получить реакцию на стимуляцию только ACIII, исключив активность PDE, применяли смесь из 15 мкМ форсколина, специфического активатора аденилатциклаз, и 100 мкМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX) – эффективного блокатора Ca^{2+}/кальмодулин-зависимой PDE в обонятельных нейронах [31]. Таким образом, наблюдаемые изменения концентрации внутриклеточного кальция будут обусловлены накоплением цАМФ и последующей активацией циклонуклеотид-зависимых Ca^{2+}-каналов.

Роль механизмов регуляции аденилатциклазной системы оценивалась с помощью LY294002 и кальмидазолия хлорида – ингибиторов соответственно фосфоинозитид-3-киназы и кальмодулина. Применяемые в опыте концентрации подбирали эмпирически.

Эксперименты проводили на модели шизофрении, индуцируемой введением (+)-MK-801. (+)-MK-801 представляет собой антагонист NMDA-рецептора, который является основой для глутаматной модели шизофрении, а индуцируемая им социальная изоляция крыс является признанной моделью негативных симптомов шизофрении [32].

Протокол введения препарата основывался на литературных данных, в которых была продемонстрирована способность (+)-MK-801 индуцировать персистирующие изменения в поведении и развитии нервной системы при системном введении в ранний постнатальный период. Инъекции производились с частотой один раз в сутки подкожно в дозировке 0.5 мг на килограмм в течение первой недели жизни. В качестве контрольной группы выступали животные из того же помета, получавшие 0.9% раствор NaCl равного объема [33].

Обработку полученных изображений и квантификация уровней флуоресценции проводили с помощью программы FIJI (NIH, США). Для этого каждую отдельную клетку отмечали как ROI (region of interest). Для каждого отдельного ROI измеряли средний уровень интенсивности сигнала и выражали его в единицах, представляющих собой отношение интенсивности в данный момент времени к усредненной интенсивности сигнала в отсутствие стимуляции. Для статистической обработки данных применяли статистический пакет STATISTICA Base. Статистическую значимость полученных данных оценивали с помощью дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Визуальные наблюдения за крысами, которым вводили (+)-MK-801, выявили характерные для шизофрении негативные симптомы. В частности, животные были социально изолированы. В отличие от контрольной группы крысы, получавшие препарат, проводили значительное количество времени на удалении от матери и при принудительном отделении от общей группы не возвращались назад. Таким образом, эти результаты дают основание для заключения о том, что изменения во внутриклеточной сигнализации, которые мы ожидаем получить в ОСН от животных в модели шизофрении в нашей работе, позволят говорить о клеточных и молекулярных механизмах, которые лежат по крайней мере в основе негативной симптоматики.

Активность ACIII оценивали по изменению интенсивности флуоресценции Fura-2 в ответ на стимуляцию. Уменьшение сигнала свидетельствовало о нарастании концентрации внутриклеточного кальция. Результаты наших исследований выявили, что под действием смеси форсколина (15 мкМ) и 3- IBMX (100 мкМ) во всех случаях наблюдалось уменьшение флуоресценции в клетках контрольной группы на 18.5 ± 3.6% (n = 48; p = 0.05), а у экспериментальных животных – на 16.4 ± 4.1% (n = 54; p = 0.05). Следовательно, при активации ACIII совместно с ингибированием PDE концентрация цитозольного кальция в ОСН увеличивалась как в контрольной, так и в экспериментальной группе животных. Как видно, в экспериментальной группе реакция на стимуляцию ACIII форсколином, увеличивающим ее активность, статистически значимо была меньше, чем в контроле. Вероятно, это обусловлено ослаблением активации фермента в нейронах в группе животных с измененной функцией NMDA-рецепторов.

Известно, что кальмодулин (CaM) модулирует активность ряда компонентов пути обонятельной трансдукци. Показано, что обонятельные жгутики содержат кальмодулин. Поэтому мы предположили, что изменения в системе внутриклеточной сигнализации могут частично объяснить различия в реакциях на стимуляцию ACIII в обеих группах.

Для этого выполняли преингибирование кальмодулина в течение 15 мин с помощью кальмидазолия хлорида (100 мкМ), с последующей стимуляцией смесью форсколина (15 мкМ) и IBMX (100 мкМ). Оказалось, что, как и в предыдущей

серии, интенсивность флуоресценции под действием стимулирующей ACIII смеси падала, свидетельствуя о накоплении Ca^{2+} в цитозоле ОСН. Однако на фоне ингибирования CaM амплитуда сигнала в обеих группах была выше, чем при сохранении его активности. Так, в контрольной группе она достигала 21.14 ± 3.7% (n = 61; p = 0.05), а в экспериментальной – 17.9 ± 4.1% (n = 45; p = 0.05).

Следовательно, меньшая реакция обонятельных сенсорных нейронов на смесь раздражителей в первой серии экспериментов обусловлена, вероятно, ингибирующим действием CaM, которое распространяется и на клетки животных, инъецированных (+)-MK-801.

Другим ферментом, опосредующим ингибирование пути обонятельной трансдукции, является фосфоинозитид-3-киназа. Мы предположили, что она может модулировать активность аденилатциклазы III в ОСН. Для проверки нашего предположения мы перед стимулированием в течение 15 мин предварительно ингибировали клетки в LY294002 (100 мкМ). Реакцию на стимул регистрировали от 43 клеток контрольных и 49 клеток экспериментальных животных. Результаты анализа показали, что на фоне ингибирования фосфоинозитид-3-киназы интенсивность флуоресценции под действием стимуляции смесью раздражителей статистически значимо не изменялась в обеих группах по сравнению с той, которая регистрировалась в отсутствие ингибитора. Таким образом, фосфоинозитид-3-киназа не влияла на активность сигнального пути цАМФ в обонятельных сенсорных нейронах как в контрольных, так в опытных образцах.

ОБСУЖДЕНИЕ

Введение антагонистов NMDA-рецепторов грызунам является одной из наиболее продуктивных моделей шизофрении, используемой на доклиническом этапе разработки препаратов. Ее характерной чертой является высокое сходство нейробиологических изменений с таковыми у больных и наличие в спектре эффектов так называемых «негативных симптомов», составляющих облигатные диагностические критерии для шизофрении. Наиболее полно они проявляются в случае хронического и субхронического введения и не угасают в течение длительного времени после прекращения действия препарата [1]. Первая неделя жизни крыс является критическим периодом в развитии обонятельного эпителия и синаптических связей с нейронами обонятельной луковицы. Исходя из предположения, что (+)-MK-801 может нарушать процесс развития обонятельной системы, препарат вводили именно в данный период.

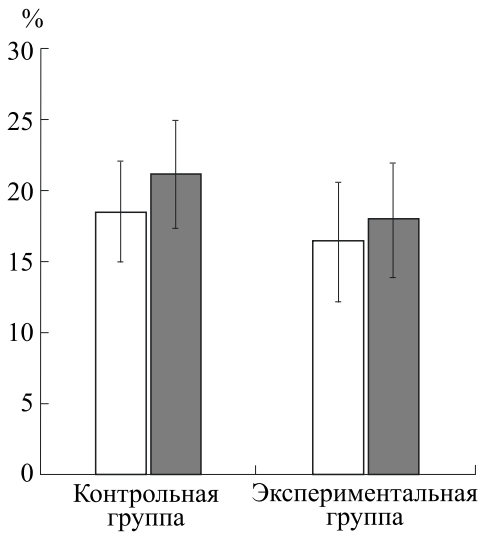
Результаты анализа полученных данных показали, что при прямой стимуляции ACIII форсколином повышается концентрация ионов Ca^{2+} в ОСН обеих групп. Как известно, активированная ACIII осуществляет гидролиз АТФ, продуцируя цАМФ. В условиях ингибирования PDE концентрация цАМФ в цитозоле увеличивается еще больше. Рост содержания цитозольного Ca^{2+} при этом достигается за счет его входа через циклонуклеотид-зависимые (CNG) Ca^{2+}-каналы, экспрессируемые в обонятельных жгутиках разных животных, включая крыс [28].

Однако, как следует из наших результатов, реакция ОСН на смесь форсколина и IBMX была значимо меньше в обонятельных сенсорных нейронах от крыс, инъецированных антагонистом NMDA-рецепторов. В этих клетках меньше аккумулировалось кальция под действием смеси раздражителей в результате, вероятно, инактивации Ca^{2+}-тока. Можно предположить, что подавление любой из ступеней каскада передачи сигнала может способствовать этому процессу. Мы в наших опытах стимулировали напрямую ACIII, минуя мембранные рецепторы.

Следовательно, более слабую флуоресценцию, наблюдаемую нами в ОСН, стимулируемых смесью форсколина и IBMX у опытных животных, можно объяснить ослабленной активацией ACIII при шизофрении, инициируемой введением MK-801. Наше предположение согласуется с данными, полученными на ОСН у пациентов с шизофренией. В них падала активность сопряженного с ACIII G-белка и значительно уменьшалась экспрессия ACIII, приводя к небольшой продукции цАМФ [28].

Вероятно, аномальная активность ACIII в нашей работе является результатом подавленной функции NMDA-рецепторов, которые активирует ACIII в нейронах ЦНС и обонятельных сенсорных нейронах у крыс, получавших инъекции (+)-MK-801. Такое предположение основывается на том, что NMDA-рецепторы экспрессируются не только в нейронах ЦНС, но и в ОСН [21]. А при шизофрении, как известно, функция NMDA-рецепторов ослаблена, что является одной из основных причин этого заболевания [36]. Поэтому разрегуляция внутриклеточной сигнальной системы цАМФ в нейрональной ткани, наблюдаемая при шизофрении, вероятно, объясняется недостаточной активацией ACIII посредством NMDA-рецепторов, вызывая уменьшение потока Ca^{2+} в цитозоль через CNG-каналы и снижение возбудимости ОСН, которую наблюдают у пациентов с шизофренией.

Однако следует отметить, что в общий кальциевый ток вносят вклад ионы, входящие через NMDA-рецепторы, проницаемые для Ca^{2+}. Вы-



Изменение флуоресценции обонятельных нейронов под действием стимула в контрольной и экспериментальной группах: светлые столбики – IBMX + форсколин, темные столбики – IBMX + форсколин + кальмидазолия хлорид.

ше было сказано, что под действием (+)-МК-801 уменьшается вероятность их открытых состояний и, как следствие, их проницаемость для Ca^{2+}. Возможно, и этот фактор обусловливает более слабый флуоресцентный сигнал ОСН в ответ на стимуляцию, а значит, меньшую концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} в ОСН крыс, инъецированных (+)-МК-801. И в этом случае уменьшение входящего тока кальция в нейроны будет вносить вклад в изменение возбудимости ОСН.

Полученные нами данные позволяют предположить, что подавление функции NMDA-рецепторов при шизофрении вызывает подавление активности нейронов ЦНС по двум механизмам, приводящим к падению концентрации цитозольного кальция: с одной стороны – через разрегуляцию системы цАМФ, а с другой – благодаря ослаблению собственной функции NMDA-рецепторов.

Известно, что в регуляции активности ACIII, не зависимой от сопряженного с ней G-белка, в обонятельных рецепторных нейронах и нейронах ЦНС участвует кальмодулин, который активирует аденилатциклазу III [29]. В Ca^{2+}/CaM-зависимую активацию ACIII вовлекаются также NMDA-рецепторы.

Чтобы проверить роль CaM в регуляции клеточного ответа на стимуляцию форсколином и IBMX, ОСН предварительно ингибировали кальмидозолием. Мы ожидали, что ингибирование CaM, снижая активность Ca/CaM-зависимой ACIII, будет уменьшать реакцию ОСН на стимуляцию. Однако результаты выявили противоположную реакцию на смесь форсколина с IBMX как в контрольной, так и в опытной группе животных. Анализ наших результатов выявил достоверное увеличение реакции на стимул в обеих группах по сравнению с той, которая наблюдалась при сохранении активности CaM (см. рисунок).

Увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле может обусловливаться не только активацией ACIII, но и ингибированием PDE. Как указано выше, в своих экспериментах стимуляцию ACIII форсколином мы осуществляли вместе с IBMX – ингибитором Ca/CaM-зависимой PDE, особенно эффективным в ОСН [30]. Ca^{2+} может активировать Ca^{2+}/CaM-зависимую PDE, тем самым снижая локальную концентрацию cAMP. Однако на Ca^{2+}-зависимое ингибирование этой PDE не влияют ингибиторы кальмодулина [39]. Следовательно, снижая активность ACIII, мы сохраняем влияние IBMX на PDE. Казалось бы, на фоне ингибирования Ca^{2+}/CaM-зависимой PDE в отсутствие синтеза цАМФ посредством ACIII трудно ожидать высокой продукции цАМФ, активирующей CNG-зависимые каналы и, вследствие этого, более высокий флуоресцентный сигнал на стимуляцию ОСН. Но полученные результаты расходятся с нашими ожиданиями.

В ОСН кальмодулин активирует также 3',5'-циклонуклеотид-зависимые фосфодиэстеразы [31]. Возможно, ингибирование кальмодулина в наших опытах снижает активность цАМФ-зависимой PDE, вызывая повышение содержания цАМФ в цитозоле. Показано, что из всех изоформ цАМФ гидролизуют только PDE4, PDE7 и PDE8, причем PDE4, которая вовлекается в регуляцию цАМФ при шизофрении, распространена в большинстве клеток, включая обонятельные нейроны [32]. Вместе с Ca/CaM-зависимой PDE они повышают концентрацию кальция выше исходной, что мы наблюдаем в наших опытах.

NMDA-рецепторы являются каналами, чьи физиологические свойства также регулируются внутриклеточным Ca^{2+}, способным ингибировать активность NMDA-рецепторного канала. В Ca^{2+}-зависимой регуляции NMDA-рецептора также участвует CaM, связывание с которым вызывает четырехкратное снижение вероятности открытия канала. Этот Ca^{2+}/CaM-зависимый механизм играет важную роль в защите от эксайтотоксической смерти клеток [33].

Ca^{2+}/CaM ингибирует NMDA-рецепторные каналы, вызывая снижение концентрации цитозольного Ca^{2+}. При ингибировании CaM его блокирующее действие на NMDA-рецепторы пре-

кращается, вызывая ток Ca^{2+} через этот канал и повышение цитозольного Ca^{2+} в ответ на активацию ACIII, что мы и видим в наших опытах. Но такой механизм работает при нормальном функционировании NMDA-рецепторов. В группе животных, инъецированных (+)-MK-801, этот рецептор заблокирован. Следовательно, можно было ожидать уменьшения реакции на стимуляцию ОСН. Однако мы зарегистрировали ее увеличение при ингибировании CaM. Вероятно, в нервных клетках, принадлежащих группе крыс с моделью шизофрении, Ca/CaM-зависимая PDE вместе с цАМФ-зависимой PDE при их ингибировании повышают концентрацию кальция выше исходной.

Таким образом, можно предположить, что при шизофрении поддерживается более низкая концентрация Ca^{2+} в нервных клетках, чем у здоровых людей, в результате более низкой активности ACIII, регулируемой NMDA-рецепторами, и совместной активности фосфодиэстераз, снижающих концентрацию цАМФ, продуцируемой посредством ACIII, в результате чего падает Ca^{2+}-ток, снижая нейрональную активность.

Результаты, полученные в данной работе, дают основания полагать, что в модели шизофрении, индуцируемой введением (+)-MK-801, ингибирующего NMDA-рецепторы в нейронах ЦНС, а также в ОСН, снижается активность внутриклеточной сигнальной системы трансдукции, сопряженной с активностью аденилатциклаз. Суммарное снижение содержания кальция в цитозоле нейрональных клеток, обусловленное как ингибированием NMDA-рецепторов, так и ослаблением активности аденилатциклаз будет вызывать снижение нейрональной активности, подобную той, которую наблюдали у мышей с потерей ACIII [34]. Это, в свою очередь, снизит эффективность синаптической передачи, синаптической пластичности, образование синапсов, в которых глутаматные NMDA-рецепторы/каналы играют важную роль [35].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с применением животных проведены в соответствии с локальными этическими стандартами, принятыми в ИФ РАН и согласованными с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (СЕД №123).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. E.-J. Choi, Zh. Xia, and D. R. Storm, Biochemistry **31**, 6492 (1992).
2. J. Bradley, D. Reuter, and S. Frings, Science **294**, 2176 (2001).
3. J. Bradley, W. Bönigk, K.-W. Yau, and S. Frings, Nat. Neurosci. **7** (7), 705 (2004).
4. J. Hanoune and N. Defer, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **41**, 145 (2001).
5. Z. Wang, T. Phan, and D. R. Storm, J. Neurosci. **31** (15), 5557 (2011).
6. X. Liu, Y. Zhou, S. Li, et al., J. Affective Disorders **268**, 28 (2020).
7. B. I. Turetsky and P. J. Moberg, Am J Psychiatry **166** (2), 226 (2009).
8. Kyosseva S. Int Rev Neurobiol **59**, 201 (2004).
9. A. J. Funk, R. E. McCullumsmith, V. Haroutunian, and J. H. Meador-Woodruff, Neuropsychopharmacology **37**, 896 (2012).
10. N. Ma, T. Abel, and P. J. Hernandez, Learn. Mem. **16**, 367 (2009).
11. D. Tardito, G. B. Tura, L. Bocchio, et al., Neuropsychopharmacology **23** (2), 217 (2000).
12. T. Keravis and C. Lugnier Brit. J. Pharmacol. **165**, 1288 (2012).
13. J. K. Millar, B. S. Pickard, S. Mackie, et al., Science **310**, 1187 (2005).
14. A. R. Kuzel, M. Lodhi, and M. Rahim, Cureus **9** (11), e1878 (2007).
15. Z. Zhang, D. Yang, et al., Front. Cell. Neurosci. **11** (1) (2017).
16. Y. Ou, Y. Ruan, M. Cheng, et al., Exp. Res. **15**, 2802 (2009).
17. M. C. Antal, K. Beanardais, B. Samama, et al., PLoS One **12** (1), e0170756 (2017). DOI: 10.1371/journal.pone.0170756
18. G. A. Bishop, N. F. Berbar, J. Lewis, et al., J. Comp. Neurol. **505**, 562 (2007).
19. X. Chen, J. Luo, Y. Leng, et al., Biol. Psychiatry **80** (11), 836 (2006).
20. K. E. Borgmann-Winter, H.-Y. Wang, R. Ray, et al., Schizophrenia Bull. **42** (2) 377 (2016).
21. C. S. Weickert and D.R. Weinberger, Schizophrenia Bull. **24** (2), 303 (1998).
22. L. S. Pilowsky, R. A. Bressan, J. M. Stone, et al., Mol. Psychiatry **11**, 118 (2006).
23. D. Chetkovich and J. D. Sweatt, J. Neurochem. **61**, 1933 (1999).
24. K. E. Borgmann-Winter, N. E. Rawson, H.-Y. Wang, et al., Neuroscience **158** (2), 642 (2009).
25. S. E. Arnold, L. Y. Han, P. J. Moberg, et al., Arch. Gen. Psychiatry **58**, 829 (2001).
26. R. R. H. Anholt and A. M. Rivers, Biochemistry, **29** (17), 4049 (1990).

27. J. C. Neill, S. Barnes, S. Cook, et al., Pharmacology & Therapeutics **128**, 419 (2010).
28. S. C. Shirley, C. J. Robinson, K. Dickinson, et al., Biochem. J. **240**, 605 (1986).
29. R. H. Kramer and S. A. Siegelbaum, Neuron **9**, 897 (1992).
30. C. B. Klee, T. H. Crouch, and P. G. Richman, Ann. Rev. Biochem. **49**, 489 (1980).
31. M. Conti, D. Mika, and W. J. Richter, Gen. Physiol. **143** (1), 29 (2003).
32. M. D. Ehlers, S. Zhang, J.P . Bernhardt, R. L. Huganir, Cell **84**, 745 (1996).
33. J. Lavoie, A. Sawa, K. Ishizuka, Curr. Opin. Psychiatry **30** (3), 176 (2007).
34. I. B. Levitan, Neuron **22**, 645 (1999).

Dysregulation of the cAMP System in Olfactory Neurons in a Model of Schizophrenia Induced by Administration of (+)-MK-801 to Rats

E.V. Bigdai and A.A. Sinegubov

Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, St. Petersburg, 199034 Russia

One of the key features of schizophrenia are neurodevelopmental abnormalities. Those can be reproduced in rodent model of schizophrenia by perinatal exposure to NMDA-receptor antagonists. Here we show that in this model (+)-MK-801 induces functional abnormalities in well-known neurogenic niche – olfactory neuroepithelium. Olfactory sensory neurons of model animals had lower activity of adenylyl cyclase associated with differences in calmodulin-dependent regulation of canonical olfactory signaling.

Keywords: sense of smell, schizophrenia, neurogenesis, NMDA

EDN: XPUSDH
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 283–288

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 57.087.1

ГЛАЗНОЙ ИМАГИНАЛЬНЫЙ ДИСК ДРОЗОФИЛЫ КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ОБРАБОТКИ ИЗОБРАЖЕНИЙ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ

© 2022 г. К.Н. Козлов*, Е.В. Голубкова, Л.А. Мамон**, М.Г. Самсонова*, С.Ю. Суркова***

**Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,*
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29
***Санкт-Петербургский государственный университет,*
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7/9
E-mail: surkova_syu@spbstu.ru

Поступила в редакцию 14.01.2022 г.
После доработки 14.01.2022 г.
Принята к публикации 21.01.2022 г.

Для получения точной информации по характеру экспрессии генов на основе конфокальных изображений нужно четко выявлять границы отдельных клеток. Помимо этого, анализ формы клеток необходим для понимания морфогенетических процессов, таких как растяжение, сжатие и формирование складок тканей. Показательной модельной системой, иллюстрирующей такие процессы, является имагинальный зачаток глаза (глазной имагинальный диск) плодовой мушки дрозофилы. В данной работе мы разработали ряд процедур количественного анализа клеточной структуры глазного диска на основе использования флуоресцентного мечения эпителиального слоя различными маркерами. Все методы обработки изображений реализованы в созданной авторами программе ProStack. Описанные в статье методы могут быть адаптированы для количественной оценки формы клеток и анализа экспрессии генов в других эпителиальных тканях.

Ключевые слова: обработка изображений, эпителиальные клетки, имагинальный глазной диск, дрозофила

DOI: 10.31857/S0006302922020119

Пласты эпителиальных клеток выстилают многие органы и полости тела. В частности, однослойный эпителий характерен для многих отделов пищеварительного тракта, почечных канальцев, протоков желез. Получение конфокальных изображений высокого разрешения позволяет выявить патологии, связанные с изменением экспрессии генов, а также детектировать нарушения формы, размеров и структуры клеток в ходе развития.

Для извлечения точной информации по характеру экспрессии генов нужно четко определять границы отдельных клеток, составляющих слой эпителия. Очень часто в ходе морфогенеза соседние клетки могут выполнять принципиально разные функции. При этом на клетки могут действовать одни и те же диффундирующие морфогены, однако в каждой клетке будут экспрессироваться свои транскрипционные факторы.

Показательной модельной системой, иллюстрирующей такие процессы, является имагинальный зачаток глаза (глазной имагинальный диск) плодовой мушки дрозофилы. Глазной диск представляет собой эпителиальную структуру, состоящую из двух слоев. Интерес представляет слой, называемый disc proper [1]. Это однослойный столбчатый эпителий, который в ходе развития личинки дрозофилы третьего возраста преобразуется в четкую структуру будущих фоторецепторов посредством генных взаимодействий и морфологических преобразований [2, 3]. Спецификация фоторецепторов происходит в постериорно-антериорном направлении посредством прохождения морфогенетической борозды (МБ), эпителиального впячивания вдоль диска (рис. 1). Недифференцированные эпителиальные клетки в антериорной части диска после прохождения МБ дифференцируются в различные типы фоторецепторов и других клеток, составляющих омматидий – светочувствительную единицу глаза. В антериорной области перед фронтом МБ происходит апикальное сужение клеток, которое контролируется геном *hedgehog (hh)* [4]. Широкий градиент *hh* способствует движению МБ, а также дифференцировке будущих фоторецепторов.

Сокращения: МБ – морфогенетическая борозда, Fas III – фасциклин III, DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол.

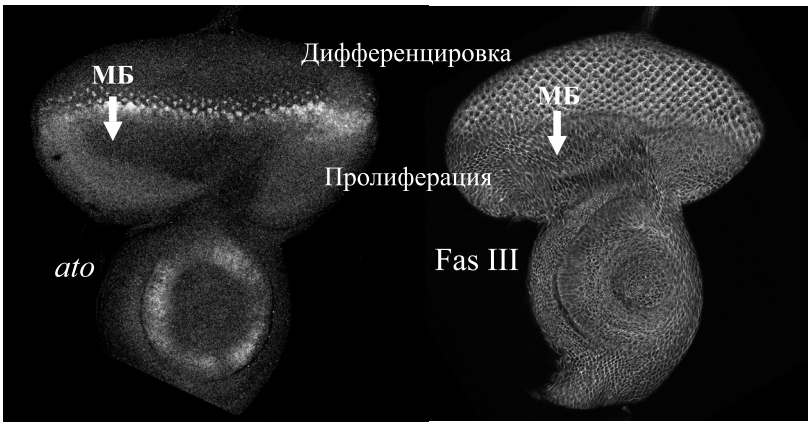


Рис. 1. Примеры конфокальных изображений экспрессии генов в глазном имагинальном диске. Показана экспрессия пронейрального гена *ato* и маркера латеральных клеточных стенок Fas III. Направление, в котором проходит дифференцировка, показано белой стрелкой. МБ – морфогенетическая борозда, движущаяся в постериорно-антериорном направлении. На изображениях в области дифференцировки видно формирование структурированного паттерна фоторецепторов.

При этом лишь некоторые клетки экспрессируют пронейральный ген *atonal (ato)* – это будущие фоторецепторы R8 (рис. 1). Генная сеть, регулирующая ген *ato*, задает четкое пространственное расположение этих клеток, что в дальнейшем определяет упорядоченный паттерн сложного глаза [5].

В данной работе мы суммируем методы обработки изображений глазного диска дрозофилы, разработанные нами для решения различных задач. Как описано выше, в ходе дифференцировки глазного диска его клетки меняют форму и взаимное расположение. Для анализа механизмов спецификации фоторецепторов в глазном диске важно, во-первых, определить границы клеток и их форму, а также, во-вторых, определить значения уровней экспрессии генов в каждой клетке с высокой точностью. Все процедуры обработки изображений реализованы в разработанной авторами программе ProStack [6] и могут быть адаптированы для анализа морфогенеза других эпителиальных тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Флуоресцентное окрашивание белкового продукта фасциклин III (Fasciclin III, Fas III) проводили у личинок *D. melanogaster* третьего возраста методом непрямой иммунофлуоресценции с помощью первичных антител anti-Fas III (Developmental Studies Hybridoma Bank, NIH, США) и вторичных антител Alexa Fluor 405 (Invitrogen, США). F-актин [7] метили с помощью фаллоидина, конъюгированного с FITC (Fluorescein Isothiocyanate labeled Phalloidin, Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Экспрессию генов на уровне мРНК оценивали методом цепной реакции гибридизации *in situ* ([8], см. подробный протокол в работе [9]). После флуоресцентного мечения глазные имагинальные диски заключали на стекла в среду ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher). Для окрашивания ядер использовали ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Leica TSC SP5 (Leica Microsystems, Германия) и микроскопа Zeiss 700 (Carl Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для извлечения количественной информации из наборов изображений развивающегося глаза дрозофилы был разработан ряд методов, включающих определение контуров и формы клеток, а также извлечение количественной информации по экспрессии генов в каждой клетке.

Обработку изображений проводили с помощью разработанной авторами программы ProStack, ранее применявшийся для обработки изображений эндоцитарных везикул в клетках HeLa и эмбриона дрозофилы на стадии бластодермы [6, 9–11].

Создание маски клеточной структуры на основе экспрессии различных маркеров. На первом этапе строилась бинарная маска всей области глазного диска для приведения всех изображений трехмерного набора к единой ориентации. Далее для определения точных границ и формы клеток осуществлялось построение масок клеточной структуры. Точные данные о границах клеток и их взаимном расположении позволяют правильно оценить уровни экспрессии генов в каждой клетке. Ниже описаны особенности сегментации изобра-

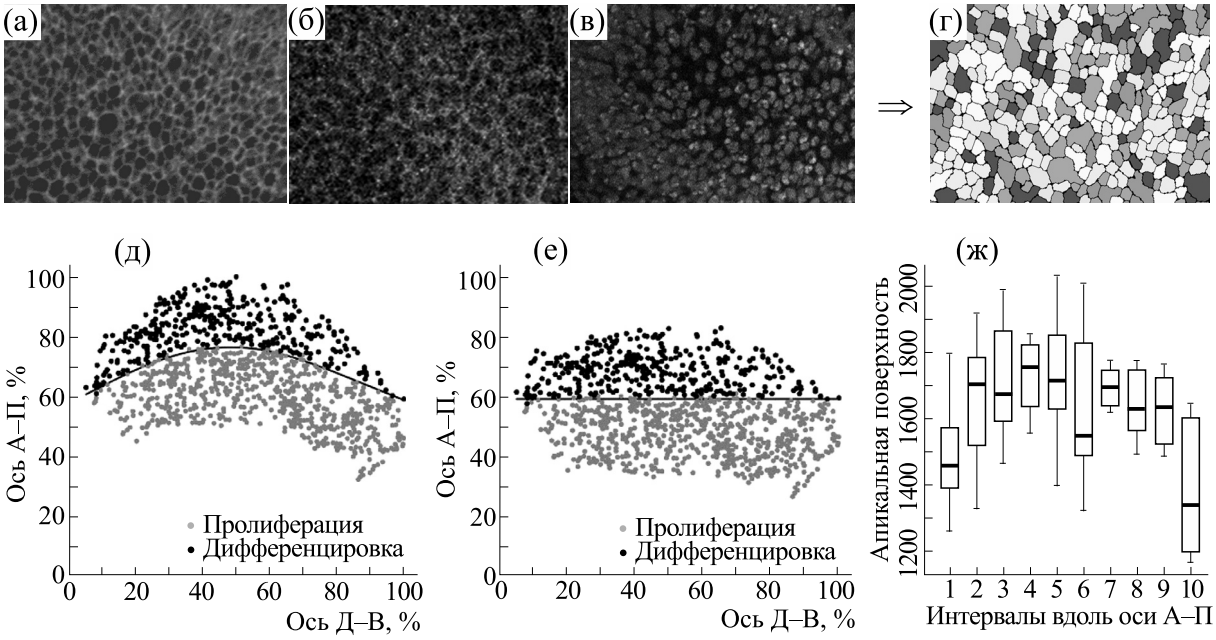


Рис. 2. Построение масок клеточной структуры и анализ формы клеток с помощью мечения глазного диска различными маркерами. Показаны примеры конфокальных изображений клеток глазных дисков, окрашенных Fas III (а), фаллоидином (б) и DAPI (в). В результате обработки в каждом случае получаются изображения контуров клеток (г). Различные оттенки серого на рисунке (г) обозначают клетки, имеющие разную форму (разное число сторон). После анализа формы и положения каждой клетки в глазном диске производится аппроксимация морфогенетической борозды квадратичными сплайнами и пространственная регистрация всех полученных изображений (д, е). Для выявления степени апикального сужения клеток в зависимости от их пространственного положения относительно МБ данные вдоль антериорно-постериорной оси разделены на десять интервалов и для каждого рассчитана средняя площадь поверхности клеток (ж).

жений эпителиальных клеток на основе мечения различными маркерами.

Мечение глазных дисков фасциклином III. Fas III – это мембранный гликопротеин, который в ходе развития личинки дрозофилы экспрессируется в нейронах и имагинальных дисках, где может служить маркером латеральных клеточных стенок [12, 13]. В глазном диске Fas III хорошо выявляет границы клеток [14] (рис. 1). Однако при таком методе окрашивания изображения области дифференцировки зачатка глаза (рис. 2а) различаются в апикально-базальном направлении. На апикальных оптических срезах лучше видны границы всего омматидия, а на базальных срезах – границы отдельных клеток, составляющих омматидий. При этом в области пролиферации границы клеток одинаково четко видны на всех срезах. В ходе обработки экспериментальные изображения в градациях серого подвергаются преобразованию выравнивания гистограммы, затем размер изображения увеличивается для более точного определения границ объектов. Метод морфологической реконструкции [15], применяется к исходному и инвертированному изображению, максимум между результирующими изображениями используется для определения границ объектов [11].

Мечение актинового цитоскелета при помощи фаллоидина. Данный тип окрашивания широко применяется в биологии и применительно к нашей задаче позволяет выявлять клетки глазного диска, однако их контуры обозначены нечетко (рис. 2б). В этом случае метод морфологической реконструкции, упомянутый выше, наиболее эффективен.

Использование ДНК-маркера 4',6-диамидино-2-фенилиндола. Этот тип окрашивания (рис. 2в) может быть успешно применен сразу по нескольким причинам. Во-первых, при анализе экспрессии генов на уровне белка транскрипционные факторы, такие как Ato, локализуются в клеточном ядре. Следовательно, 4',6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) может дать наиболее четкое представление о характере локализации таких белков. Во-вторых, в случаях загибов и деформации клеточных стенок, обусловленных фиксацией и заключением препаратов глазных дисков в среду перед микроскопией, окрашивание ядер помогают разделить области соседних клеток. Помимо этого, мечение DAPI позволяет восстановить клеточную структуру в отсутствие других маркеров. В этом случае изображения ядер клеток подвергаются выравниванию интенсивности внутри объектов с помощью

медианной фильтрации и последовательности морфологических преобразований расширения и сужения с несколькими структурными элементами. Дальнейшее сглаживание включает локальное выравнивание гистограммы и морфологическое размыкание. Применение преобразования водоотлива позволяет восстановить границы областей, примыкающих к объектам-ядрам. Данные области после коррекции границ путем морфологической реконструкции инвертированного изображения определяются как клетки.

Гексагональная сетка. В случае невозможности определить границы клеток с использованием биологического маркера строится искусственная клеточная структура, отражающая биологически обусловленную гексагональную форму клеток [16]. С помощью наложения этой структуры на изображения глазного диска извлекается информация по уровням экспрессии каждого гена.

Анализ формы клеток. Одним из инструментов анализа клеточных перестроек в ходе морфогенеза является создание вершинных моделей (vertex models). Вершинные модели связывают изменения формы клеток, обусловленные внутриклеточными процессами, с растяжением, сжатием и формированием складок тканей, что в итоге определяет форму всего организма [17].

Имагинальные диски дрозофилы представляют собой удобную модельную систему для такого анализа [18]. В ходе спецификации фоторецепторов глазного диска основным морфогенетическим процессом является движение МБ вдоль эпителиального пласта. Для определения степени апикального сужения клеток в зоне МБ требуется выявлять точную площадь апикальной поверхности клеток и количество соседних клеток.

Был разработан алгоритм для определения количества сторон многоугольника, наилучшим образом описывающего форму клетки с заданной погрешностью. Из геометрического центра пикселей клетки с шагом в один градус проводили радиус-вектор до границы клетки, в результате чего получали табличную функцию с 360 отсчетами. Количество сторон многоугольника вычисляли как число максимумов этой функции, которое определяли как количество перемен знака ее конечно-разностной производной при условии отличия значения в найденной точке от соседних не меньше, чем на величину заданной погрешности. Таким образом, клетки были классифицированы как имеющие от трех до девяти сторон (рис. 2г).

Для выявления степени апикального сужения клеток в зависимости от их пространственного положения относительно МБ использовали набор количественных данных для выборки глазных дисков (на рис. 2ж показаны усредненные данные для семи дисков).

Вначале проводили пространственную регистрацию данных так, чтобы МБ, а также антериорные и постериорные полюса всех дисков совпадали по координате. Для этого МБ аппроксимировали квадратичными сплайнами (рис. 2д,е). Области пролиферации и дифференцировки разделяли на пять интервалов каждую, что составило по 10 интервалов на каждый диск. Интервал № 1 включал антериорный полюс диска, а интервал № 10 – постериорный полюс. Ось y на графиках, показанных на рис. 2ж, соответствует антериорно-постериорной оси и перпендикулярна МБ. Соответственно каждый интервал включает клетки, y-координата центроида которых попадает в этот интервал. На этом этапе мы пренебрегаем x-координатой (вдоль дорсо-вентральной оси) и для каждого глазного диска получаем среднюю площадь апикальной поверхности клеток для каждого интервала. На рис. 2ж мы видим, что апикальная поверхность клеток сокращается в интервале № 6, что соответствует антериорной области перед МБ. Сужение в интервалах № 1 и № 10 обусловлено погрешностями экспериментальных изображений по краям дисков.

Извлечение количественных данных по экспрессии генов. Перед сегментацией изображений картин экспрессии генов на уровне мРНК вначале изображения, представленные в градациях серого, проходят несколько этапов улучшения, таких как удаление дробового шума, медианную фильтрацию с несколькими структурными элементами, локальное выравнивание гистограммы, морфологическое размыкание. Далее проводится детекция частиц, включающих одну или несколько молекул, путем определения контуров по методу Кэнни с последующим заполнением, разделением через преобразование расстояния и пороговую фильтрацию [16]. Особое внимание уделяется контролю качества сегментации, что включает цензурирование частиц по размеру и интенсивности, отслеживание частиц на нескольких срезах и определение уровня фонового сигнала.

Количественные данные по экспрессии генов на уровне мРНК получают путем анализа интенсивности, локализации и количества частиц в каждой клетке. Для изображений, полученных методом иммунофлуоресцентного окрашивания, рассчитывают средний уровень флуоресценции в каждой клетке и позицию ее центроида.

Положение МБ определяют на основе экспрессии маркеров клеточной структуры либо генов, ответственных за дифференцировку глазного диска (например, в позиции перекрывания областей экспрессии *hairy (h)* и *ato*). Форма МБ аппроксимируется сплайнами, при этом число степеней свободы и другие параметры подбирают так, чтобы кривая визуально совпадала с позицией МБ на изображениях. Для пространственной

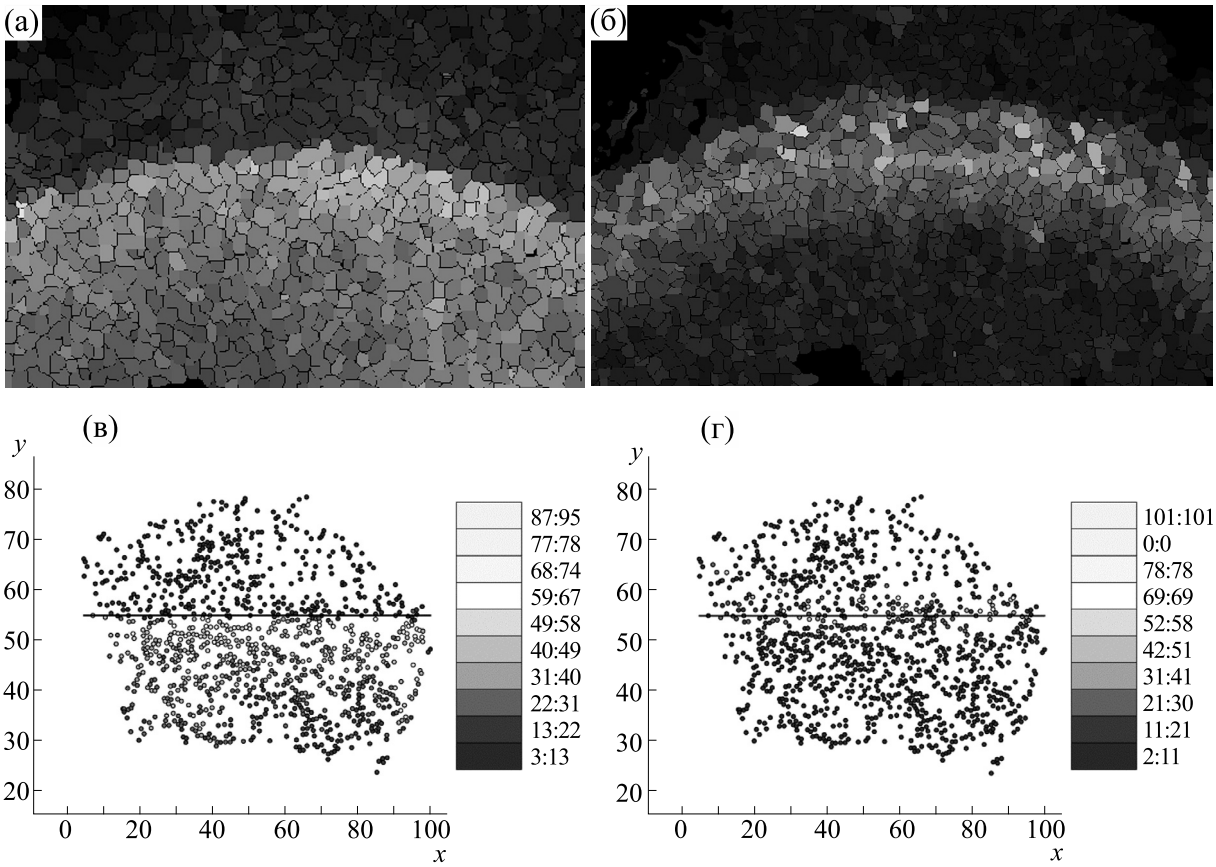


Рис. 3. Получение количественных данных по экспрессии генов. Показаны средние уровни экспрессии *h* (а,в) и *ato* (б,г) в каждой клетке, представленные в виде реконструированных изображений (а,б) и графиков (б,г).

регистрации наборов изображений всех глазных дисков производится выпрямление МБ путем аффинного преобразования (рис. 3).

На рис. 3 представлены количественные данные по экспрессии *h* (рис. 3а,в) и *ato* (рис. 3б,г), усредненные в каждой клетке, в виде реконструированных изображений (рис. 3а,б) и графиков (рис. 3б,г).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие дрозофилы является широко используемой моделью для изучения процессов пролиферации и дифференцировки клеток. Этот модельный объект позволяет исследовать характер экспрессии генов как в фиксированных, так и в живых тканях. Как известно, многие ключевые регуляторы морфогенетических процессов, такие как Hedgehog и Notch, были впервые выявлены у дрозофилы.

В этой работе нами разработаны и реализованы процедуры анализа клеточной структуры эпителиальной ткани на примере динамического процесса дифференцировки фоторецепторов в развивающемся имагинальном глазном диске дрозофилы.

Количественный анализ проводили с использованием ряда маркеров клеточных стенок и ядер. На основе этого оценивали форму и расположение клетки, а также извлекали точную информацию по уровням экспрессии генов. Так как экспрессия каждого из маркеров имеет свои особенности, наиболее точное построение масок клеточных структур достигается путем окрашивания глазных дисков одновременно и маркером клеточных стенок, и DAPI.

В публикациях, посвященных механизмам формирования паттерна в имагинальных дисках, методы обработки изображений нередко нацелены либо на получение данных по экспрессии генов высокого разрешения, либо на детальное изучение динамики клеточной структуры [16, 18]. Анализ формы клеток в сочетании с получением точных данных по экспрессии генов позволяет всесторонне исследовать механизмы формирования паттерна. Описанные в статье методы могут быть адаптированы для количественной оценки

клеточной структуры и анализа экспрессии генов в других эпителиальных тканях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Изображения картин экспрессии генов были получены в Центре коллективного пользования «Хромас» СПбГУ (Санкт-Петербург, Россия) и в Центре микроскопии Университета Южной Калифорнии (Лос-Анджелес, США).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-01047-а).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Smith-Bolton, Adv. Wound Care **5** (6), 251 (2016). DOI: 10.1089/wound.2014.0547
2. J. Y. Roignant and J. E Treisman, Int. J. Devel. Biol. **53**, 795 (2009). DOI: 10.1387/ijdb.072483jr
3. J. E. Treisman, WIREs Dev. Biol. **2** (4), 545 (2013). DOI: 10.1002/wdev.100
4. D. Corrigall, R. F. Walther, L. Rodriguez, et al., Devel. Cell **13** (5), 730 (2007). DOI: 10.1016/j.devcel.2007.09.015
5. B. J. Frankfort and G. Mardon, Development **129**, 1295 (2002).
6. K. Kozlov, A. Pisarev, J. Kaandorp, et al., in *Abstr. Book of the 9th Int. Conf. Syst. Biol.* (Goteborg, 2008), p. 191.
7. V. DesMarais, R. J. Eddy, V. P. Sharma, et al., BioTechniques **66**, 113 (2019). DOI: 10.2144/btn-2018-0112
8. H. M. Choi, V. A. Beck, N. A. Pierce, et al., ACS Nano **8**, 4284 (2014). DOI: 10.1021/nn405717p
9. S. Surkova, A. Sokolkova, K. Kozlov, et al., Devel. Biol. **448**, 48 (2019). DOI: 10.1016/j.ydbio.2019.01.006
10. S. Surkova, E. Golubkova, Manu, et al., Devel. Biol. **376**, 99 (2013). DOI: DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.01.008
11. K. Kozlov, V. Kosheverova, R. Kamentseva, et al., J. Bioinform. Comput. Biol. **15**, 1750008 (2017). DOI: 10.1142/S0219720017500081
12. P. M. Snow, A. J. Bieber, and C. S. Goodman, Cell **59**, 313 (1989). DOI: 10.1016/0092-8674(89)90293-6
13. A. Gavish, A. Shwartz, A. Weizman, et al., Nat. Commun. **7**, 10461 (2016). DOI: 10.1038/ncomms10461
14. S. Surkova, J. Görne, S. Nuzhdin, et al., Devel. Biol. **476**, 41 (2021). DOI: 10.1016/j.ydbio.2021.03.005.
15. L. Vincent, IEEE Trans. Image Process. **2**, 176 (1993). DOI: 10.1109/83.217222
16. S. Ali, S. A. Signor, K. Kozlov, et al., Evolution & Development **21**, 157 (2019). DOI: 10.1111/ede.12283
17. S. Alt, P. Ganguly, and G. Salbreux, in *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B, Biological Sciences* **372**, 20150520 (2017). DOI: 10.1098/rstb.2015.0520
18. L. Sui, S. Alt, M. Weigert, et al., Nature Commun. **9**, 4620 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-06497-3

Drosophila Eye Imaginal Disc as a Model for Processing Epithelial Tissue Images

K.N. Kozlov*, E.V. Golubkova, L.A. Mamon**, M.G. Samsonova*, and S.Yu. Surkova***

**Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Polytekhnicheskaya ul. 29, St. Petersburg, 195251 Russia*

***St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

Extraction of quantitative information on gene expression from confocal images requires the precise detection of boundaries of the individual cells. In addition, the cell shape analysis is essential for understanding morphogenetic processes such as tissue stretching, contraction and folding. Drosophila eye imaginal disc is a widely used model system illustrating such processes. In this work, we developed a number of methods for quantitative analysis of the eye disc cellular structure based on the fluorescent tissue labeling with different markers. All image processing procedures are implemented in the ProStack package developed by the authors. The methods described here can be adapted for cell shape quantification and gene expression analysis in other epithelial tissues.

Keywords: image processing, epithelial cells, eye imaginal disc, Drosophila

EDN: ABSHYE
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 289–300

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 51-76

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭФФЕРЕНТНОЙ РЕГУЛЯЦИИ МЫШЕЧНОГО СОКРАЩЕНИЯ

© 2022 г. Е.А. Скребенков*, О.Л. Власова*, **

**Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29*

E-mail: skrebenkovea@gmail.com

***Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6*

E-mail: olvlasova@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.12.2021 г.
После доработки 17.01.2022 г.
Принята к публикации 18.01.2022 г.

Рассматривается реализация гипотезы популяционного кодирования в простой нейромеханической модели, в которой входом является активность кодирующих направление движения нейронов. Входная активность преобразуется популяцией модельных интернейронов «интегрировать-и-сработать», затем трансформируется в уровень активации мышцы, которая, в свою очередь, действует на простую механическую модель с одним суставом. Механическое движение моделируется на фиксированном промежутке времени, конечное положение является выходом модели. Модель позволяет оценить необходимое преобразование входной активности для достижения кодируемого направления движения. Для множества начальных угловых положений механической системы определены зависимости популяционной активности интернейронов от кодируемого направления, оценена сложность реализации этих зависимостей синаптическими соединениями кодирующих нейронов с гомогенной популяцией интернейронов. Для единственного начального углового положения механической системы подобраны параметры, позволяющие провести преобразование входной активности в соответствующее движение.

Ключевые слова: моторные нейроны, биомеханика, моторный контроль, нейромеханическое моделирование.

DOI: 10.31857/S0006302922020120

Управление произвольными движениями в живых системах – сложный, иерархически организованный процесс. Различные нейрофизиологические механизмы отвечают за комплексную интеграцию сенсорной и приобретенной из опыта информации при планировании и реализации целенаправленного движения. Исследование этих механизмов представляет как фундаментальный, так и практический интерес. Изучение кодирования и преобразования двигательной информации вносит вклад в понимание общих принципов функционирования нервной системы [1]. Более прикладные исследования, связанные с мозг-компьютерными интерфейсами, нейропротезированием и технологиями нейрореабилитации, также нуждаются в более ясном понимании данных механизмов [2, 3].

Многочисленные исследования установили связь между активностью нейронов первичной моторной коры и некоторыми механическими параметрами сопутствующего движения [4–6]. Было неоднократно показано, что активность нейронов первичной моторной коры кодирует направления движения кисти [6–8].

Интерпретация результатов этих исследований подразумевает, что у каждого такого нейрона есть определенная настройка на направление движения. Активность отдельного нейрона (частота возникновения потенциалов действия) зоны двигательной коры, ответственной за кисть, тем выше, чем ближе направление движения (в декартовой системе окружающей среды) кисти к направлению, которое этот нейрон «предпочитает» (preferred direction [6]). Если направление движения очень близко к «предпочитаемому» направлению нейрона, проявляется максимальная активность. Кроме корреляции с направлением движения более поздние исследования показали отображение других кинематических переменных, таких как линейные и угловые скорости и ускорения, в активности нейронов [3, 7, 8].

Методология этих работ подразумевает поиск корреляций между активностью нейронов, кодирующих механические параметры, и непосредственно движением. Вследствие этого неясными остаются промежуточные этапы преобразования кодируемой информации, а именно, как высокоуровневые параметры движения, закодированные в активности нейронов, трансформируются в активность спинальных мотонейронов и впоследствии в активацию мышц. При помощи математических моделей [9–12], объединяющих биомеханическую составляющую и нейронную активацию, было показано, что корреляции такого типа могут быть просто следствием устройства скелетно-мышечного аппарата. Также необходимо отметить, что, несмотря на высокую значимость этих результатов, они не позволяют понять, как кодирующие нейроны взаимодействуют, как формируется кодируемое направление.

В работе, посвященной проблеме согласования кодирования различных параметров движения [13], был проведен обстоятельный анализ кодирующих способностей нейронов моторной коры, в частности, исследовались нейроны, активность которых коррелировала с общим направлением свободного движения, нейроны, кодирующие конечное положение в пространстве таких движений и конечную суставную конфигурацию. Представленные результаты говорят о наличии различных по своей настройке нейронов, которые вносят вклад в общую активность.

Хотя подобные исследования, несомненно, проливают свет на функциональную роль нейронов моторной коры, вместе с тем остается невыясненным вопрос о дальнейшем преобразовании активности на более низких уровнях моторной инфраструктуры. Мы предполагаем, что можно применить математическое моделирование для анализа преобразования сигнала при передаче информации в нейромеханических системах. Объединение моделирования процессов на различных уровнях возникновения движения позволит сопоставить нейронную активность каждого уровня и механическое движение.

Насколько известно нам, описанные в литературе работы, объединяющие моделирование нейронов и механической системы, посвящены в основном вопросам устройства центральных генераторов паттерна либо интеграции афферентных сигналов от рецепторов. Входная активность если и рассматривается в таких работах, имеет чисто регуляторный характер, не рассматривается активность нейронов, кодирующих какие-либо признаки движения [14–18].

Нами разработана простая нейромеханическая модель, входом которой является активность кодирующих направление движения нейронов, а выходом – соответствующее механическое движение. Модель состоит из популяции нейронов, моделируемых уравнениями «интегрировать-и-сработать», модели динамики мышечной активации и простой биомеханической модели. Целью данной работы является разработка составной нейромеханической модели для исследования механизмов трансформации активности моторных нейронов, определение условий и ограничений такой модели. В данной работе рассматривается простое движение при заданном направлении, в расчет не принимаются переходные процессы, планирование движения цепочки активаций для сложных движений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модель кодирующих нейронов. Согласно экспериментальным данным [19], каждый нейрон генерирует потенциал действия тем чаще, чем ближе кодируемое направление к предпочитаемому этим нейроном направлению. Иными словами, каждый нейрон как бы «настроен на свое направление», выражаемое углом в двумерной системе координат. Совокупная активность нейронов с различными «предпочитаемыми направлениями» образует таким образом популяционный вектор, который определяет общее направление верхней конечности (рис. 1а). Каждый кодирующий нейрон моделируется генератором спайков постоянной частоты. Частота генерации спайков кодирующих нейронов рассчитывается по формуле:

$$v_i = a_i + b_i \cos(q - q_{0i}),$$

где v_i – частота спайков i-го кодирующего нейрона; a_i и b_i– коэффициенты i-го кодирующего нейрона; q – кодируемое направление (рис. 1б); q_{0i} – предпочитаемое направление нейрона.

В моделировании было использовано $N = 400$ кодирующих нейронов. Предпочитаемые направления генерировались случайно, согласно нормальному распределению со средним q_{mean} и стандартным отклонением q_{std} (табл. 1).

Коэффициенты a и b также генерировались случайно по нормальному закону со значениями среднего и отклонения, взятыми произвольно, на основании значений из работы [19]. Случайно выбирались значения b и I – модуляции нейрона. Значения для a рассчитывалось по формуле: $a = I \cdot b$. Значения среднего и отклонения приведены в табл. 1.

Популяция интернейронов. Потенциалы действия, генерируемые «кодирующими нейронами», являются входным сигналом для импульсной нейронной сети, состоящей из N_{int} нейро-

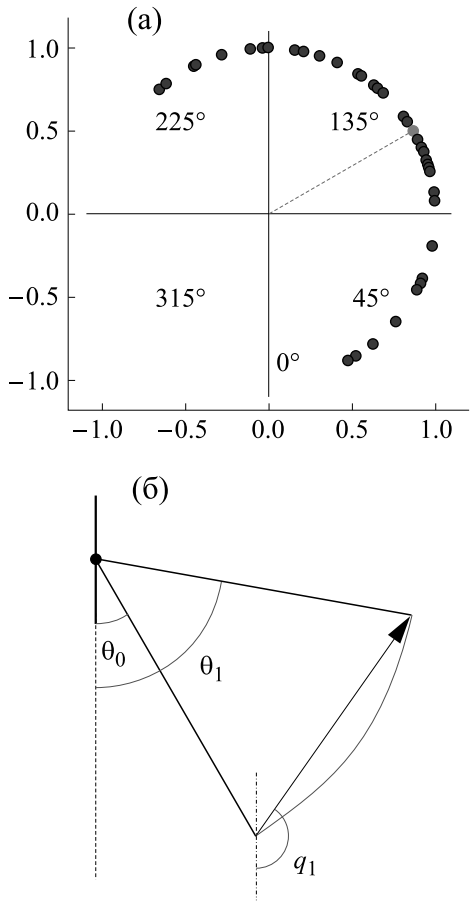


Рис. 1. (а) – Пример распределения «предпочитаемых направлений» кодирующих нейронов, показаны направления отдельных нейронов, выраженные углом; отмечено значение $\theta_{mean} = 120°$; (б) – принцип работы кодирующих нейронов. Показан вектор движения; q_1 – кодируемое направление, выраженное через угол для этого движения.

нов-интеграторов с утечкой. Состояние нейрона-интегратора описывается уравнением:

$$du/dt = -(u - E_l)/\tau_m,$$

где u – потенциал мембраны нейрона; E_l – потенциал утечки; τ_m – временная константа.

Значения параметров уравнения представлены в табл. 2.

Кодирующие нейроны случайным образом и с высокой вероятностью ($p_{ci} = 0.8$) соединены синапсами с популяцией интернейронов. Потенциал действия пресинаптического, i-го кодирующего нейрона вызывает изменение мембранного потенциала u_j постсинаптического интернейрона на величину w_{ci}. Интернейроны связаны между собой синаптически с вероятностью $p_{ii} = 0.8$, изменение потенциала на постсинаптическом нейроне происходит на величину w_{ii} (табл. 2).

Динамика мышечной активации. Популяционная активность интернейронов в свою очередь является входом для модели динамики активации мышцы. Моделирование активации основано на подходе, использованном в работе [20], с внесением модификаций, связанных с использованием входа от популяции нейронов. Уровень активации мышцы зависит от концентрации ионов Ca^{2+}, связанных с сократительными филаментами, а скорость изменения этой концентрации пропорциональна свободному Ca^{2+} саркоплазмы и концентрации доступных для связывания филаментов. Скорость изменения концентрации свободного Ca^{2+} в свою очередь зависит от наличия действия стимула, который возникает в результате потенциала действия, полученного от популяции интернейронов. Вывод уравнений на базе первоначальных предпосылок представлен в оригинальной работе [20]. Система уравнений, связывающая потенциалы действия и уровень активации мышцы выглядит следующим образом:

$$\begin{cases} \dfrac{dCa}{dt} = (k_4 Ca_f - k_3 Ca)(1 - Ca_f) + k_1 (C - Ca - Ca_f) + k_2 Ca (C - S - Ca - Ca_f) \\ \dfrac{dCa_f}{dt} = -(k_4 Ca_f - k_3 Ca)(1 - Ca_f) \end{cases},$$

Таблица 1. Параметры активности кодирующих нейронов

q_{mean}	140°
q_{std}	50°
b_{mean}	20 Гц
b_{std}	7.5 Гц
I_{mean}	0.9
I_{std}	0.45

Таблица 2. Параметры «интегрировать-и-сработать» нейронов

N_{int}	100
E_l	−70 мВ
τ_m	5 мс
w_{ci}	1.6 мВ
w_{ii}	0.05 мВ

где Ca – безразмерная концентрация свободного кальция; Ca_f – безразмерная концентрация кальция, связанного с сократительными филаментами; k_3 – константа скорости связывания свободного кальция с сократительными филаментами; k_4 – константа скорости высвобождения кальция, связанного с сократительными филаментами.

Максимальное значение $Ca_f = 1$ соответствует максимальной активации мышцы. Присутствие стимула для высвобождения Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума описывается линейным дифференциальными уравнением:

$$\frac{dstim}{dt} = -\frac{stim}{\tau_s},$$

где $stim$ – уровень стимуляции; τ_s – временная константа угасания стимуляции.

Потенциал действия синаптически соединенного интернейрона вызывает изменение переменной $stim$ на величину $\Delta stim$. Скорости изменения концентрации Ca^{2+} в присутствии и в отсутствие стимула выражаются системами уравнений:

$$k_1 = \begin{cases} k_{10}, & stim > 0.01 \\ 0, & \text{иначе} \end{cases},$$

$$k_2 = \begin{cases} k_{20}, & stim < 0.01 \\ 0, & \text{иначе} \end{cases},$$

где k_{10} – константа скорости высвобождения кальция из саркоплазматического ретикулума; k_{20} – константа скорости связывания свободного кальция.

Параметры, использованные для моделирования динамики мышечной активации, представлены в табл. 3.

Механическая модель. Завершающий компонент модели – ее механическая часть. Механическая модель позволяет получить результат вышеописанного моделирования нейронов в виде движения, генерируемого простой механической системой. Входным для этого этапа является переменная Ca_f, отражающая уровень активации мышцы. Моделируемая механическая система образуется сегментом с равномерно распределенной массой, проксимальный конец которой соединен при помощи шарнира с неподвижной осью. На сегмент действует сила тяжести и сила мышцы, которая генерирует усилие в зависимости от уровня активации (рис. 2).

Для моделирования динамики движения сегмента было использовано уравнение:

$$\theta = \frac{T - mgr\sin\theta}{i + mr^2},$$

где θ – собственный угол; T – момент внешних сил; m – масса сегмента; g – ускорение свободного падения; r – расстояние до центра тяжести сегмента; i – момент инерции сегмента; T – совокупный момент внешних сил.

Таблица 3. Параметры уравнений мышечной активации

C	2
S	6
k_{10}	50 Гц
k_{20}	10 Гц
k_3	100 Гц
k_4	35 Гц
τ_s	5 мс

Для имитации физиологического диапазона движений при расчете совокупного момента были учтены силы трения. Момент силы трения действует на сегмент в диапазоне $\theta < 15°$ и равен $T_{fric} = d\theta \cdot 200$. Совокупный момент является суммой $T = T_{mus} + T_{fric}$. Длина мышечно-сухожильной единицы и плечо действия силы сокращения на сегмент рассчитываются по формулам:

$$l_{lmt} = \sqrt{p_o^2 + p_i^2 - 2p_o p_i \cos\theta},$$

$$d = \frac{p_o p_i \sin\theta}{l_{lmt}},$$

где p_o – расстояние от шарнира до точки крепления мышцы к оси; p_i – расстояние от шарнира до точки крепления мышцы к сегменту.

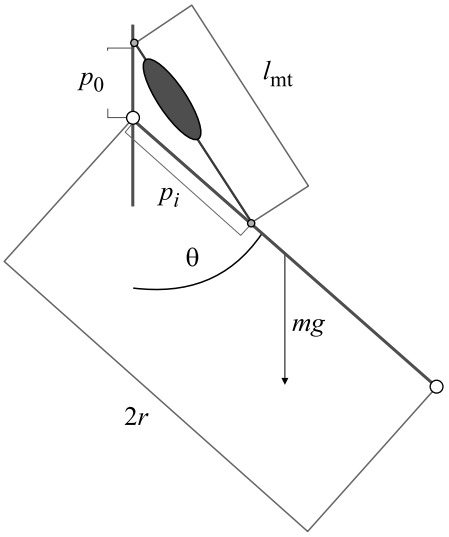


Рис. 2. Схема механической модели, состоящей из вращающегося сегмента, на который действует сила, генерируемая мышцей, и сила тяжести.

Таблица 4. Параметры уравнений механической системы

m	2.4 кг
g	9.8 м/с^2
r	0.15 м
i	$m \cdot l^2/3$
p_i	0.1 м
p_o	0.02 м

Таблица 5. Параметры уравнений мышечного сокращения

α	0
F_{m0}	575 Н
l_{t0}	0.01 м
l_{m0}	0.1 м
V_{mmax}	10 м/с
γ	0.45

Использованные значения параметров уравнения механического движения представлены в табл. 4.

Для моделирования динамики мышечного сокращения используется классическая трехкомпонентная модель Хилла. Мышца состоит из трех элементов: последовательного пассивного, представляющего сухожилие, параллельного пассивного, представляющего соединительно-тканные оболочки, и сократительного, представляющего мышечные волокна (рис. 3). Используется допущение, что механическое напряжение в последовательных элементах одинаково, а при объединении параллельных суммируется в общее.

При этом допущении длины элементов модели и силы, действующие на элементы модели, описываются следующими уравнениями:

$$l_{lmt} = l_t + l_m\cos\alpha,$$

$$F_m = F_{ce} + F_{pe}$$

$$F_t = F_{se} = F_m\cos\alpha,$$

где l_{lmt} – длина мышечно-сухожильной единицы; l_t – длина сухожилия, последовательного пассивного элемента; l_m – длина мышцы (без сухожилия); α – угол перистости; F_m – сила, генерируемая мышцей, сократительным и параллельным пассивным элементами; F_t – сила, действующая на сухожилие, последовательный пассивный элемент.

Сила, возникающая в активном элементе (параллельном пассивном и сократительном), зависит от длины мышцы и скорости сокращения:

$$F_m\left(Ca_f, l_{ce}, \dot{l}_{ce}\right) = \left[f_l\left(l_m\right) f_v\left(\dot{l}_m\right) Ca_f + F_{pe}\left(l_m\right)\right] F_{m0},$$

где f_l – нормированная зависимость силы сокращения от длины мышечного волокна; f_v – нормированная зависимость силы сокращения от скорости изменения длины мышечного волокна.

Эта зависимость позволяет выразить скорость сокращения мышцы через обратную функцию для $f_v(v)$ [21]:

$$\dot{l}_m = (0.25 + 0.75) \cdot V \left.\frac{\bar{F}_m - Ca_f \cdot f_{lce}}{b}\right|_{m_{max}},$$

где b – константа уравнения Хилла [22].

F_m может быть найдена при помощи F_{se}, которая зависит от длины сухожилия l_{lmt}. Зависимость силы сокращения от длины сократительного элемента моделируется гауссианой с центром в точке оптимальной длины:

$$f_{l,ce} = \exp(-\left(l_m - 1\right)^2 / \gamma\right),$$

где γ – коэффициент формы [21].

Значения параметров уравнений мышечного сокращения представлены в табл. 5.

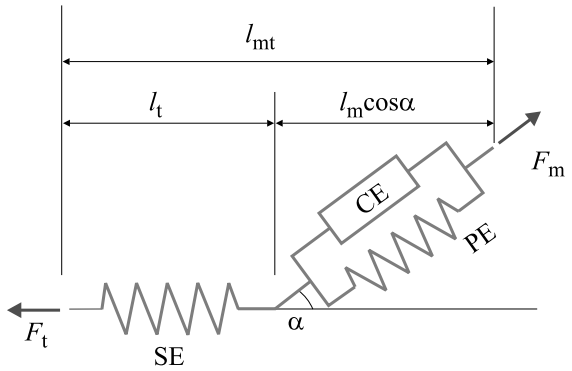


Рис. 3. Трехкомпонентная модель Хилла: SE – последовательный пассивный элемент, представляет сухожилие мышцы; PE – параллельный пассивный элемент, представляет соединительную ткань брюшка мышцы; CE – сократительный элемент, представляет миоциты, активно генерирующие усилие.

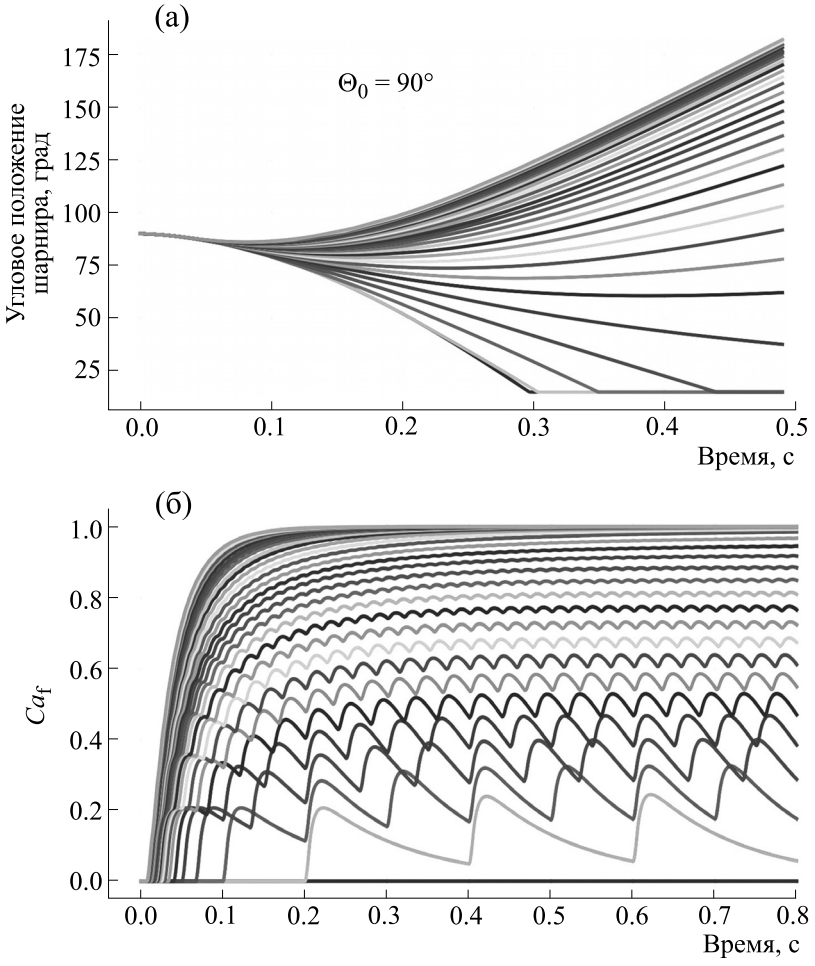


Рис. 4. Пример моделирования механического действия при начальном угловом положении в 90°: (а) – угловое положение; (б) – динамика активации мышцы, показаны разные частоты активации модели кальциевой динамики.

Численное моделирование компонентов модели до механической проводили на промежутке времени в 800 мс, для моделирования механического движения использовали первые 500 мс результатов, предполагая, что кодируется направление движения, которое достигается за это время.

Численное моделирование проводили при помощи языка программирования Python 3.8 и дополнительных библиотек. Моделирование потенциалов действия кодирующих нейронов, активности популяции «интегрировать-и-сработать» нейронов и динамики кальция выполняли при помощи библиотеки Brian 2 [23]. Для реализации механической части модели использовали библиотеку SciPy [24], а для модели мышечного сокращения была взята версия М. Дуарте и Р. Ватанабе [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ зависимости механического движения от частоты активации кальциевой динамики. Для сопоставления уровней активации кальциевой динамики и результирующих угловых положений сустава модели было проведено моделирование механического движения при различных начальных углах и различных уровнях активации мышцы. Механическое действие и кальциевая динамика для единственного начального положения показаны на рис. 4. На вход модели кальциевой динамики через одиночный синапс подавали потенциалы действия постоянной частоты, используя значение параметра Δstim = 1. Диапазон частот потенциалов действия, подававшихся на вход, [0, 150] Гц с шагом 5 Гц, расчеты проведены для набора начальных положений θ_0 = {15°, 45°,

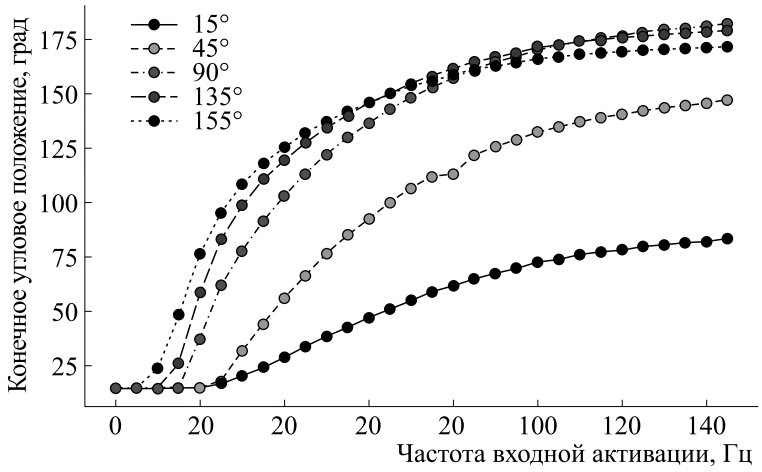


Рис. 5. Результаты действия различных частот на динамику мышечной активации, наборы точек соответствуют различным начальным угловым положениям системы.

90°, 135°, 155°}. Результат механического действия системы, выраженный конечным собственным углом для разных начальных положений, представлен на рис. 5.

Кривые, представляющие результаты такого анализа, показывают нелинейное соотношение между частотой воздействия на модель кальциевой динамики и конечным угловым положением механической системы. Также следует отметить, что значительно отличается поведение механической системы в соответствии с равным шагом начальных угловых положений, так кривые, отражающие поведение системы при начальных угловых положениях θ_0 = {90°, 135°, 155°} довольно близки между собой, и значительно отличаются от них и между собой кривые для θ_0 = 15° и θ_0 = 45°. Эти же данные используются для сопоставления направления движения, то есть направления от начального к результирующему угловому положению, и уровня активации мышцы, который необходим для реализации такого направления движения (рис. 6).

Разбиение кривых на пары соответствует разделению движения на сгибание и разгибание, для разных стартовых позиций присутствует проблема значимых различий в кривых. Также следует

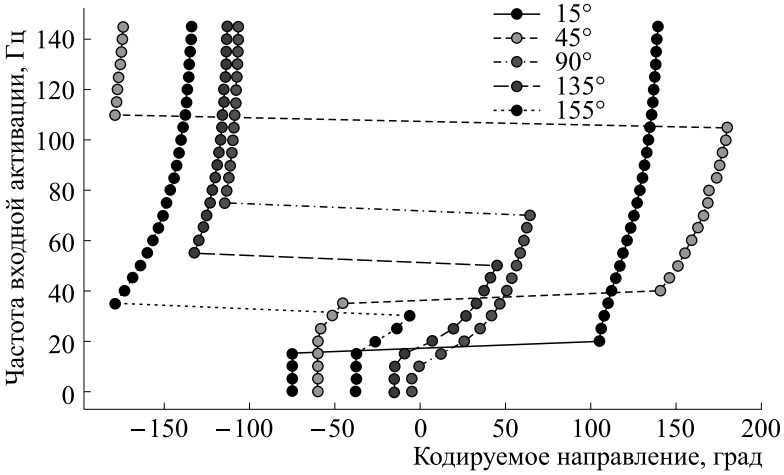


Рис. 6. Результаты действия различных частот на динамику мышечной активации; выраженная через кодируемое направление зависимость необходимой частоты активации модели кальциевой динамики и механической модели от кодируемого направления.

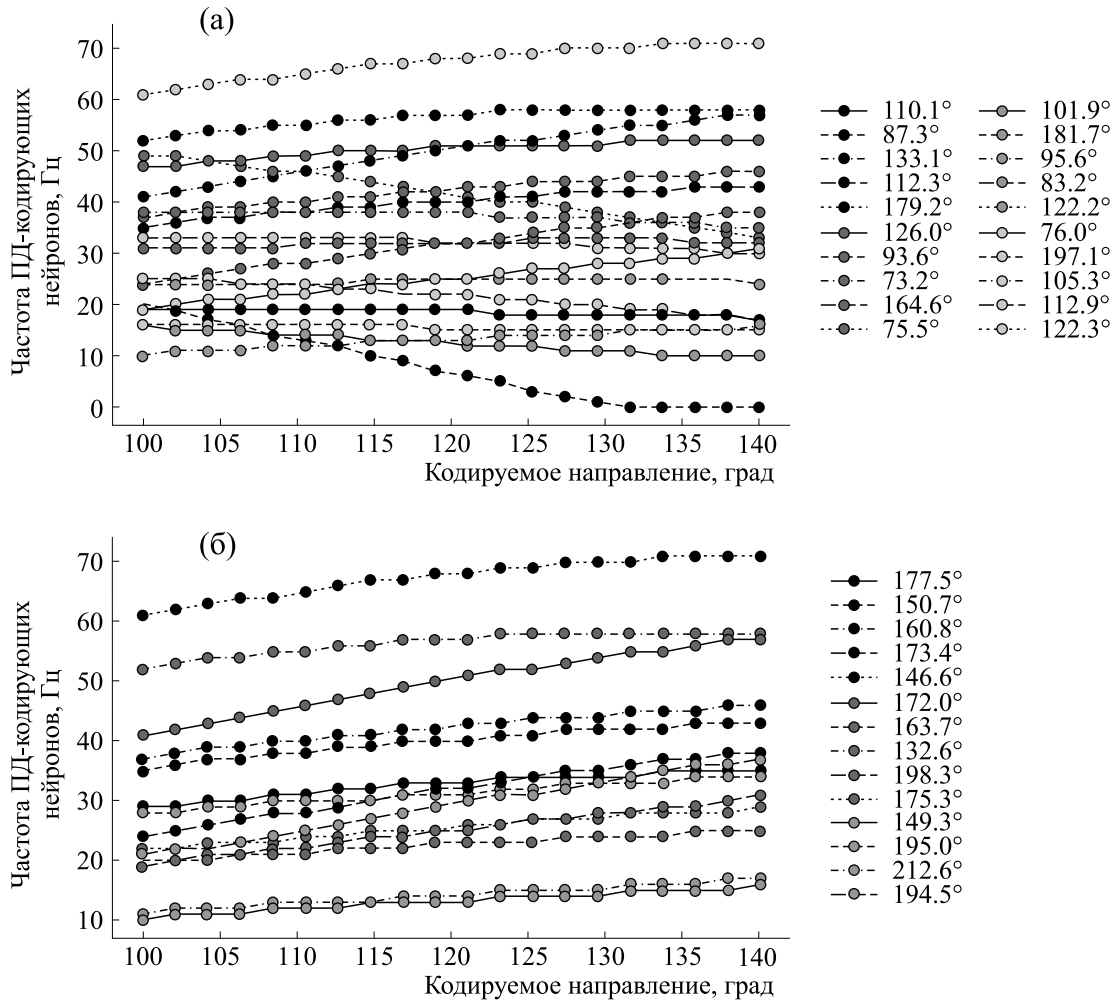


Рис. 7. Пример зависимости активности кодирующих нейронов от кодируемого направления, показаны направления, актуальные для сгибательного движения при начальном угловом положении 15°: (а) – случайная подвыборка кодирующих нейронов; (б) – нейроны, обеспечивающие увеличение частоты при увеличении угла направления кодируемого движения.

отметить, что значительное изменение частоты воздействия на динамику мышечной активации соответствует небольшим изменениям кодируемого направления. Так, например, для точек, соответствующих начальному углу в $\theta_0 = 15°$, диапазон достигаемых направлений составляет примерно от 100° до 140°, при этом частота активации меняется от 20 до 150 Гц. Это означает, что вариативность направления на нижних уровнях модели должна обеспечиваться вкладом активности «второстепенных» кодирующих нейронов в большей степени, нежели нейронов с наибольшим модулем активности.

Способность кодирующих нейронов предоставить необходимую активность можно оценить из соотношения их активности от кодируемого направления (рис. 6).

Зависимость активности кодирующих нейронов от кодируемого направления показывает (рис. 7а), что только часть нейронов способна обеспечить необходимый диапазон частот (рис. 7б), чтобы удовлетворить соотношению диапазона активности низкого уровня к диапазону кодируемых направлений. Увеличение частоты следования спайков при увеличении угла направления обеспечивается только для кодирующих нейронов, отвечающих за большие, чем кодируемые углы направления. Из-за случайного выбора предпочитаемого направления наблюдается картина, при которой кодирующие нейроны разделяются на три группы: увеличивающие активность при кодировании больших углов сгибания, уменьшающие и относительно нейтральные.

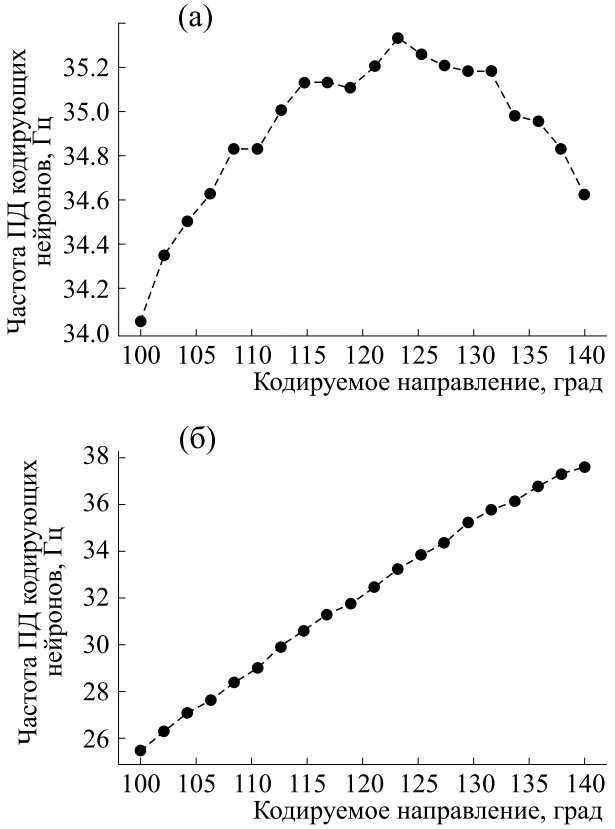


Рис. 8. Средняя частота активации кодирующих нейронов в зависимости от кодируемого направления: (а) – для всех кодирующих нейронов; (б) – для нейронов, обеспечивающих увеличение частоты при увеличении угла направления.

Сравнение диапазонов общей активности кодирующих нейронов и активности нейронов, которые обеспечивают увеличение частоты спайков

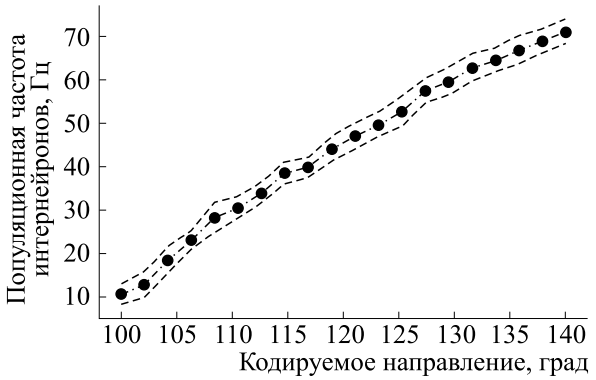


Рис. 9. Активность интернейронов: среднее и стандартное отклонение для 100 решений прямого прохода по кодируемым углам для начального углового положения 15°.

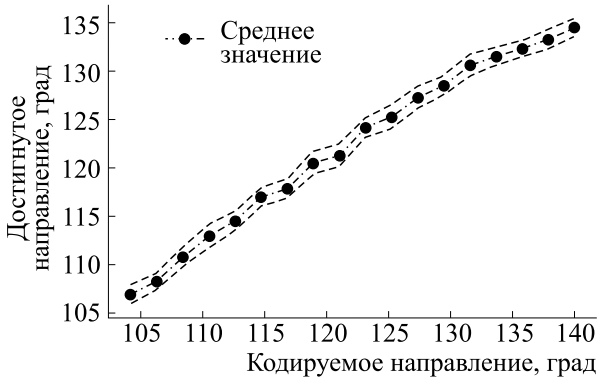


Рис. 10. Результаты механического моделирования под действием активности кодирующих нейронов: кружки – кодируемые (потребное) направление, сплошная линия – среднее значение результатов моделировании, пунктирные линии – стандартное отклонение.

при увеличении угла направления показано на рис. 8.

Результаты моделирования кодирования движения. По результатам анализа диапазона частот потенциалов действия кодирующих нейронов и соотношения уровня активации мышцы и кодируемого направления была скомпонована модель, состоящая из кодирующих нейронов, интернейронов и нейромеханической части. Параметры подбирали таким образом, чтобы обеспечить более слабую и пологую зависимость популяционной активности интернейронов от пресинаптического уровня активности. Синаптически соединены с интернейронами были только кодирующие нейроны, обеспечивающие увеличение частоты спайков при увеличении угла направления. Ниже представлены результаты попытки при помощи одной гомогенной популяции интернейронов обеспечить управление простой биомеханической системой. Результаты серии расчетов, в каждом из которых с одинаковой вероятностью случайно генерировались синаптические связи между кодирующими нейронами и интернейронами, а также связи внутри популяции интернейронов, представлены на рис. 9 (для популяционной частоты интернейронов) и рис. 10 (для механического действия).

При кодировании близких к начальному положению направлений, то есть при невысокой необходимой активации мышцы, наблюдается нестабильность популяционной активности интернейронов во времени, что впоследствии выливается в нестабильную активацию и механический выход для таких углов.

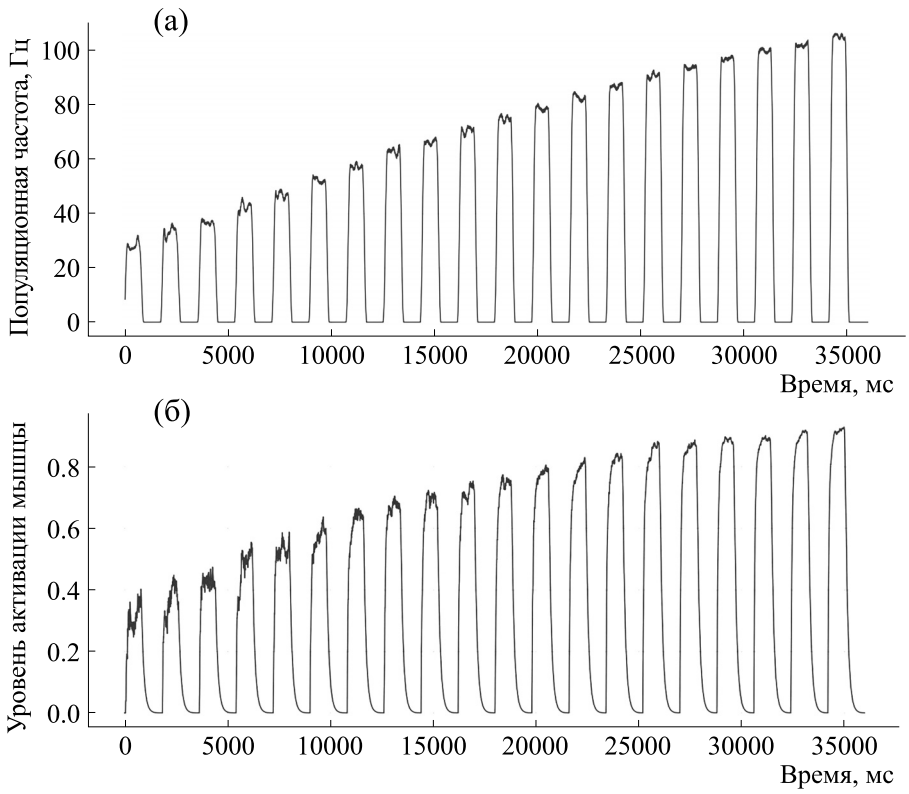


Рис. 11. Результаты моделирования при кодировании угла направления от 100° до 140° с шагом 2°: (а) – активность интернейронов; (б) – кальциевая динамика.

ОБСУЖДЕНИЕ

К настоящему времени осуществлен значительный прогресс в понимании механизмов моторного контроля, в частотности, установлены многие механические параметры, которые кодируются нервной системой. Однако не так хорошо исследованы механизмы преобразования активности кодирующих нейронов в уровень активации мышц, которые, действуя непосредственно на скелетную систему, реализуют закодированное движение.

В данной работе для решения этой проблемы была использована математическая модель нейромеханической системы. Такой подход позволил обратиться к промежуточным элементам системы трансформации управляющей активности, в частности, разработанная модель позволила сопоставить активность кодирующих нейронов с активностью популяции промежуточных нейронов и соответствующим механическим действием (рис. 5 и 6). Эти результаты позволили осуществить подбор синаптических связей между кодирующими и промежуточными нейронами таким образом, что для одного начального положения механической системы модель способна реализовывать закодированное направление движения. Полученные данные можно интерпретировать так, что преобразование моторной команды строится на разделении кодирующих нейронов на подвыборки, характерные для начальных положений, и на нелинейном отклике интернейронов, который позволяет получить необходимую мышечную активацию. Разделение кодирующих нейронов на подвыборки осуществляется паттерном синаптических связей с промежуточными нейронами, а отклик популяции интернейронов зависит от их параметров [26]. Эти выводы не согласуются с абстрактной моделью в работе [27], в которой предполагался общий пул интернейронов для преобразования направления движения в уровень активации мышцы. Однако подобный способ обработки информации, заключающийся в разделении сигнала на несколько афферентов, каждый из которых несет линейно закодированную информацию, был выявлен в работах, посвященных преобразованию первичных сенсорных сигналов [28–30], в частности, автор работы [28] отмечал, что в простых случаях нервная система

ведет себя как линейный оператор. Также в этих работах показано, что кодируемый параметр передается только на некотором диапазоне активности, который характеризуется стабильностью нервной активности. Такое ограничение наблюдается в нашей модели (рис. 11), что было показано благодаря применению модели кальциевой динамики в нейромышечном синапсе.

Развитие этой работы может быть направлено в сторону приложения реализованного подхода к механической системе с большим количеством степеней свободы. Также, возможно, интерес представляет сравнительный анализ для различных начальных положений.

ВЫВОДЫ

1. В рамках данной работы впервые удалось реализовать математическую модель, объединяющую моделирование нейронов, кодирующих параметры движения и механической системы под их управлением.

2. Результаты исследования модели *in silico* позволяют сделать вывод о том, что преобразование активности кодирующих нейронов происходит за счет передачи сигнала от подвыборки кодирующих нейронов и биофизических свойств интернейронов. Изоляция такой подвыборки осуществляется набором синаптических связей между кодирующими и промежуточными нейронами. Характер зависимости частоты активации интернейронов от входного сигнала позволяет осуществить необходимое для уровня активации мышцы нелинейное преобразование.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-31-90044).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. G. B. Stanley, Nat. Neurosci. **16** (3), 259 (2013).
2. G. Panuccio, M. Semprini, L. Natale, et al., Brain Neurosci. Adv. **2**, 1 (2018).
3. A. Tankus, Y. Yeshurun, T. Flash, and I. Fried, J. Neurosurg. **110** (6), 1304 (2009).
4. C. S. R. Li, C. Padoa-Schioppa, and E. Bizzi, Neuron **30** (2), 593 (2001).
5. R. N. Holdefer and L. E. Miller, Exp. Brain Res. **146** (2), 233 (2002).
6. B. Amirikian and A. P. Georgopoulos, Neurosci. Res. **36** (1), 73 (2000).
7. A. P. Georgopoulos, FASEB J. **2** (13), 2849 (1988).
8. A. P. Georgopoulos, A. B. Schwartz, and R. E. Kettner, Science **233** (4771), 1416 (1986).
9. T. Flash and T. J. Sejnowski, Encycl. Neurosci. **11** (6), 9 (2009).
10. T. Takei, F. Crevecoeur, T. M. Herter, et al., J. Neurosci. **38** (36), 7787 (2018).
11. S. H. Scott, Nat. Neurosci. **3** (4), 307 (2000).
12. E. Todorov, Nat. Neurosci. **3** (4), 391 (2000).
13. T. N. Aflalo and M. S. A. Graziano, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103** (8), 2909 (2006).
14. N. A. Shevtsova, A. E. Talpalar, S. N. Markin, et al., J. Physiol. **593** (11), 2403 (2015).
15. S. N. Markin, A. N. Klishko, N. A. Shevtsova, et al., Physiol. Behav. **176** (1), 139 (2017).
16. T. McMillen, T. Williams, and P. Holmes, PLoS Comput. Biol. **4** (8), (2008).
17. K. R. S. Holzbaur, W. M. Murray, and S. L. Delp, Ann. Biomed. Eng. **33** (6), 829 (2005).
18. I. A. Rybak, K. Stecina, N. A. Shevtsova, and D. A. McCrea, J. Physiol. **577** (2), 641 (2006).
19. A. P. Georgopoulos, J. F. Kalaska, R. Caminiti, and J. T. Massey, J. Neurosci. **2** (11), 1527 (1982).
20. T. L. Williams, G. Bowtell, and N. A. Curtin, J. Exp. Biol. **201** (6), 869 (1998).
21. D. G. Thelen, J. Biomech Eng. **125** (1), 70 (2003).
22. J. M. Winters, Ann. Biomed. Eng. **23** (4), 359 (1995).
23. M. Stimberg, R. Brette, and D. F. Goodman, Elife **8**, e47314 (2019).
24. P. Virtanen, R. Gommers, and T. E. Oliphant, Nat. Methods **17**, 261 (2020).
25. M. Duarte and R. N. Watanabe, GitHub Repos. Published online (2018).
26. N. Brunel, J. Comput. Neurosci. **8** (3), 183 (2000).
27. A. Georgopoulos, Brain Res. Cogn. Brain Res. **3** (2), 151 (1996).
28. V. Mountcastle, W. Talbot, I. Darian-Smith, Science **155** (3762), 596 (1967).
29. E. R. Perl, D. G. Whitlock, and J. R. Gentry, J. Neurophysiol. **25**, 337 (1962).
30. C. C. Hunt, J. Physiol. **155**, 175 (1961).

Mathematical Simulation of the Efferent Regulation of Muscle Contraction

E.A. Skrebenkov* and O.L. Vlasova*, **

**Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Polytechnicheskaya ul. 29, Saint-Petersburg, 195251 Russia*

***Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences, nab. Makarova 6, Saint-Petersburg, 199034 Russia*

This study has focused on the feasibility of mathematical simulation of the population coding hypothesis using a simple neuromechanical model, where the activity of neurons that encode movement direction is used as input. Input activity is transformed by the population model which represents integrate-and-fire interneurons, then contributing to the level of muscular activation and affecting a simple mechanical model of a single joint. Mechanical movement has been simulated for a fixed period of time and the final position is used as output. The model enables the evaluation of transformation of input activity needed to achieve coded movement direction. For a set of initial angular positions in the mechanical system, the dependences between interneuron population activity and coded movement direction were determined and complexity of implementation of these dependencies in terms of synaptic connections of coding neurons with the homogenous population of interneurons was defined. For a single initial angular position in the mechanical systems, parameters that can help in transformation of input activity into suitable motion are obtained.

Keywords: motor neurons, biomechanics, motor control, neuromuscular modeling

EDN: GQOFRY
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 301–318

БИОФИЗИКА КЛЕТКИ

УДК 571.3

МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МОДЕЛИ ЭПИДЕМИИ COVID-19 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДАННЫХ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ БОЛЕЗНЕЙ, РАСПРОСТРАНЕННЫХ В ИНДИИ

© 2022 г. Д. Пал*, Д. Гхош, П.К. Сантра***, Г.С. Махапатра****

**Высшая школа Чандрахати Дилип Кумар, Чандрахати, Западная Бенгалия, 712504, Индия*
***Национальный технологический институт Пудучерри, Караикал, 609609, Индия*
****Технологический университет имени Азада Маулана Абул Калама, Калькутта, 700064, Индия*
E-mail: pal.debkumar@gmail.com

Поступила в редакцию 09.02.2021 г.
После доработки 18.04.2021 г.
Принята к публикации 23.12.2021 г.

Сделана попытка описания вспышки возбудителя тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV 2 (COVID-19) с помощью эпидемической модели. Вирус имеет различные проявления в разных странах. а количество новых подтвержденных случаев коронавирусной инфекции стремительно увеличивается по всему земному шару. Индия сейчас проходит вторую стадию распространения COVID-19, которая очень быстро примет характер эпидемии, если не будут предприняты надлежащие меры защиты, основанные на базе данных передачи заболевания. В данной работе текущие данные по COVID-19 были использованы для математического моделирования с последующим анализом динамики. Предложен новый тип представления данных для оценки и контроля инфекционного заболевания COVID-19 через модель пандемии SEQIR, которая основана на предложении отправлять на карантин на время инкубационного периода инфицированных людей, у которых инфекция не определяется по результатам анализа. В течение инкубационного периода, если кто-либо из людей инфицируется COVID-19, их изолируют, и применяется необходимое лечение, чтобы они не заражали других жителей местности. Динамика модели SEQIR представлена основным числом воспроизведения R_0 и детальным анализом стабильности. Численные результаты приводятся на графиках по данным пяти штатов и всей Индии.

Ключевые слова: новый коронавирус, модель SEQIR, число воспроизведения, самоизоляция, стабильность.‘

DOI: 10.31857/S0006302922020132

Математическая формулировка моделей болезней очень эффективна для понимания эпидемиологических прототипов болезней, также она помогает принимать необходимые меры в сфере здравоохранения через контроль распространения заболеваний. В начале декабря 2019 года население Уханя в китайской провинции Хубэй было инфицировано возбудителем неизвестной пневмонии [1, 2]. Эта пневмония была вызвана новым коронавирусом, обычно называемым 2019-nCoV, или SARS-CoV-2 по классификации международного комитета таксономии вирусов; официально по предложению Всемирной организации здравоохранения это заболевание называется COVID-19.

Сокращения: SARS – тяжелый острый респираторный синдром, MERS – ближневосточный респираторный синдром.

COVID-19 быстро распространился из Уханя по всему Китаю [1]. На 1 апреля 2020 года в Китае было диагностировано 81589 случаев (из них 3318 смертей), из которых 67802 – в провинции Хубэй, причем 50007 – в городе Ухань, столице провинции Хубэй [3]. Коронавирусы впервые были обнаружены в 1965 г., после этого произошли три жизненно значимых вспышки коронавирусных инфекций. В 2003 г. первая вспышка возникла в материковом Китае. Она была названа тяжелым острым респираторным синдромом (SARS – Severe Acute Respiratory Syndrome) [4, 5]. Вторая вспышка – ближневосточного респираторного синдрома (MERS) – произошла в 2012 г. в Саудовской Аравии [6, 7]. Третья вспышка в форме MERS имела место в 2015 г. в Южной Корее [8]. В четвертый раз коронавирусная инфекция возникла как COVID-19 в Китае и далее распространилась по всему земному шару. Отмечается,

что в США намного больше пациентов с проявлениями COVID-19, чем в Китае, стране, с которой началась вспышка. Теперь этот вирус играет свою разрушительную роль уже в таких странах, как Индия, Иран, Пакистан, Бангладеш, Шри-Ланка и другие страны Южной Азии.

Основные симптомы COVID-19 почти такие же, как у инфекций SARS-CoV и MERS-CoV. Пациенты с COVID-19 страдают от сухого кашля, высокой температуры, слабости, затруднений дыхания и двустороннего поражения легких в тяжелых случаях [9]. Кроме того, некоторые пациенты с COVID-19 испытывают тошноту, рвоту и диарею без всяких симптомов расстройства дыхательной системы [10]. Китайское министерство здравоохранения объявило [11], что анализы пациентов могут сначала давать отрицательные результаты, но через несколько последовательных тестов появляются положительные результаты обнаружения COVID-19. Благодаря нескольким исследованиям [11, 12] было установлено, что возбудитель COVID-19 передается от человека к человеку. В результате распространение вируса не ограничилось Китаем, а произошло по всему миру. Теперь оно приобрело характер пандемии, затронув 205 стран с 900306 подтвержденными случаями, а также 45693 подтвержденными смертями (на 2 апреля 2020 г. [13]). Ситуация ухудшается в таких странах, как Италия, США, Испания, Франция, Германия и т.д. Поскольку вирус передается от человека к человеку, страны с высокой плотностью населения, в особенности Индия, находятся в угрожающем положении. Если не предпринять правильную стратегию для защиты от распространения вируса COVID-19, то и Индию ждет эпидемия, которая будет причиной смерти многих индийцев.

Первой жертвой COVID-19 в Индии был студент из округа Тхиссур в Керале, приехавший домой из Уханя (Китай) и идентифицированный как подтвержденный вирусоноситель 30 января 2020 г. [15]. В настоящем сценарии мы наблюдаем быстрый, умеренный и медленный темпы распространения инфекции в ряде штатов Индии. В Махараштре (подтвержденных случаев – 335, из них смертей – 16), Керале (подтвержденных случаев – 286, из них смертей – 2), Тамил Наду (подтвержденных случаев – 309, из них смертей – 1), Дели (подтвержденных случаев – 219, из них смертей – 4), Телангане (подтвержденных случаев – 158, из них смертей – 7), Уттар-Прадеше (подтвержденных случаев – 172, из них смертей – 2), Раджастхане (подтвержденных случаев – 167, из них смертей – 0) темп распространения инфекции очень быстрый (на 04.04.2020 г.) [16]. Умеренный рост имеет место в таких штатах, как Ассам (подтвержденных случаев – 16, из них смертей – 0), Бихар (подтвержденных случаев – 29, из них смертей – 1), Чандигарх (подтвержденных случаев – 18, из них смертей – 0), Ладакх (подтвержденных случаев – 14, из них смертей – 0) , Западная Бенгалия (подтвержденных случаев – 53, из них смертей – 3) (по данным на 03.04.2020 г.) [16]. В таких штатах, как Одиша (подтвержденных случаев – 5, из них смертей – 0), Пудучерри (подтвержденных случаев – 5, из них смертей – 0), Мизорам (подтвержденных случаев – 1, из них смертей – 0), Гимачал-Прадеш (подтвержденных случаев – 6, из них смертей – 1), Гоа (подтвержденных случаев – 6, из них смертей – 0), распространение шло очень медленно (по данным на 03.04.2020 г.) [16].

Федеральное правительство Индии и все правительства штатов предприняли надлежащие меры сдерживания распространения COVID-19 в Индии с 21 марта 2020 г. В Индии 22 марта 2020 г. был введен обязательный 14-часовой комендантский час в общественных местах [17]. Также премьер-министр Индии объявил полный 21-дневный локдаун с 24 марта 2020 г. [17]. Правительство приняло множество мер, таких, как поддержание определенной социальной дистанции, повышение общественной сознательности и мер предосторожности, как ношение масок в общественных местах, карантин для инфицированных и так далее. Более того, до сих пор (до конца работы над данной рукописью), количество подтвержденных случаев COVID-19 растет день ото дня.

Не только медицинские и биологические исследования, но и методы математического моделирования вовлекаются в сотрудничество и играют ключевую роль в остановке распространения COVID-19. Методами математического моделирования мы можем предсказывать начало инфекции и время конца эпидемии. Это также помогает нам принимать правильные решения по необходимым мерам для ограничения распространения болезней. В 2019 г. вирус COVID-19 широко распространялся по всему миру. Следовательно, сейчас имеет место тревожная ситуация, становящаяся глобальной пандемией [18] из-за тяжести этого вирусного заболевания. Поэтому необходимы реальные эпидемиологические данные со всего мира для улучшения понимания ситуации и уведомления о вовлечении [19]. Не так давно, когда случались такие пандемии, как SARS, пандемия гриппа 2009 г. или вспышка лихорадки Эбола [20–23], в течение первых нескольких недель при анализе реальной ситуации уделялось внимание тяжести, контагиозности и естественной истории новообразованного патогена. И в этом случае математическое моделирование, фундированное динамическими уравнениями [24, 25], может позволить детально охарактеризовать динамику эпидемий так же подробно, как и статистические методы [26, 27]. На ранней стадии пандемии COVID-19 многие исследования проводились в области статистического подхода, а равно и математического моделирования, чтобы определить

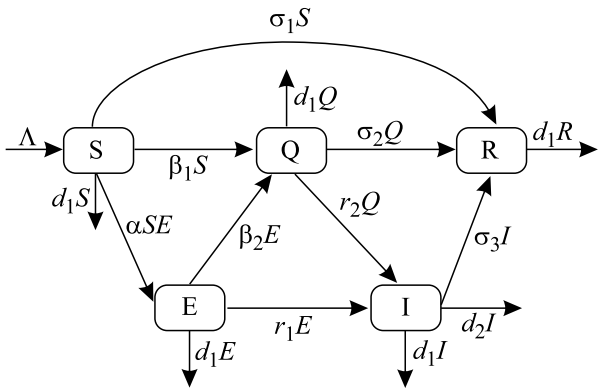


Рис. 1. Диаграмма передачи COVID-19 в модели SEQIR.

основные параметры эпидемии, такие как число воспроизведения, серийный интервал и время удвоения [28, 29].

Авторы работы [30] сосчитали количество подтвержденных случаев передачи инфекции из Уханя в другие крупные города Китая. В работе [31] была предложена SEIR-модель для предсказания распространения болезни по всему миру на основе данных, отслеживаемых с 31 декабря 2019 г. по 28 января 2020 г. В работе [32] изучалась SEIR-модель на COVID-19, а в работе [33] была представлена передача COVID-19 от человека к человеку и предсказан размер вспышки COVID-19 в Ухане (Китай). Авторы работы [34] изучили математическую модель SIR для того, чтобы уменьшить рост новых случаев коронавируса методом введения жестких карантинных процедур.

В данной статье мы разработали эпидемическую модель COVID-19, оптимизируя ее под ситуацию в Индии. В данной модельной системе мы делим население Индии на пять субпопуляций, таких, как подверженная инфекции популяция, инфицированная, но не определяемая по тестам популяция, популяция в карантине, популяция с подтвержденной инфекцией в изоляции, и популяция, проживающая в безопасной зоне, не затронутой COVID-19. Затем при использовании анализа с применением динамического моделирования нашей целью будет предсказание количества подтвержденных случаев COVID-19 в Индии в будущем с разбивкой для различных штатов. Мы также анализируем предложенную модель развития болезни математически для понимания динамики передачи COVID-19 от человека к человеку.

РАЗРАБОТКА МОДЕЛИ НОВОГО КОРОНАВИРУСНОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

Разные исследователи ранее разрабатывали математическую модель распространения инфекционных заболеваний [35–38]. Индия также подверглась новой завезенной болезни, и количество пациентов с COVID-19 увеличивается день ото дня. Из-за недавней ситуации правительство Индии предприняло некоторые стратегические меры для предотвращения распространения возбудителя COVID-19. В этом разделе представлена модель SEQIR для эпидемии COVID-19, основанная на текущей ситуации с болезнью в условиях Индии. Мы придерживаемся той версии, что воспроизводит несколько ключевых эпидемиологических свойств вируса COVID-19. Настоящая структура модели COVID-19 описывает динамику пяти субпопуляций индийцев, таких, как субпопуляция, подверженная инфекции ($S(t)$); инфицированная, но не определяемая по результатам тестов ($E(t)$); популяция в карантине ($Q(t)$); популяция с подтвержденной инфекцией в изоляции ($I(t)$) и популяция, проживающая в безопасной зоне, не затронутой COVID-19 ($R(t)$). Мы принимаем общее население Индии за $N(t)$, тогда

$$N(t) = S(t) + E(t) + Q(t) + I(t) + R(t).$$

В этой модели карантин вводится для отделения инфицированных людей от общего населения Индии, при этом часть популяции инфицирована, но не инфекционна. Под инфицированной популяцией мы понимаем людей, у которых подтверждено наличие вируса COVID-19. Под популяцией в безопасной зоне мы понимаем тех жителей Индии, которые не подвержены коронавирусной инфекции. Чтобы сделать предложенную модель SEQIR более реалистичной, мы включаем несколько демографических эффектов, вводя пропорциональную частоту естественной смерти ($d_1 > 0$) в каждой из пяти субпопуляций Индии. Более того, мы включаем общий приток подверженных инфекции жителей Индии в страну со скоростью Λ (> 0) в единицу времени. Λ представляет собой интегральный показатель, объединяющий новорожденных детей, иммиграцию и эмиграцию. Потоковая диаграмма модели инфекции COVID-19 описана на рис. 1.

Моделирование подверженной популяции: данная популяция увеличивается за счет притока населения в регион (Индию) со скоростью Λ и уменьшается за счет естественной смертности d_1. Также подверженная популяция уменьшается за счет взаимодействия между подверженной популяцией и инфицированной, но не определяемой тестами. Также она уменьшается с постоянными коэффициентами скорости σ_1 и β_1 соответственно, отражающими переход в группу в безопасной зоне и в группу в карантине. В Индии и в самом деле, в особенности в округах Пурулия, Муршидабад, Бирбхум (Западная Бенгалия), Гайя, Бхагалпур (Бихар) и ряде других подверженная популяция прямо переселяется в безопасную зону, поскольку жители боятся распространения болезни.

Эта ситуация возникает вследствие отсутствия доступного адекватного лечения и тестирования для значительной части населения Индии. Таким образом, скорость изменения подверженной популяции определяется следующим дифференциальным уравнением:

$$dS/dt = \Lambda - \alpha SE - \sigma_1 S - \beta_1 S - d_1 S. \quad (1)$$

Моделирование инфицированной популяции, не определяемой тестами ($E(t)$): данная популяция обозначает тех людей, которые инфицированы, но результатами теста инфекция не подтверждена вследствие неадекватных возможностей тестирования. Эта популяция увеличивается со скоростью, отражающей переход из подверженной популяции в данную группу. Она уменьшается вследствие перехода в карантин со скоростью β_2 и вследствие естественной смертности со скоростью d_1. Из-за очень большой плотности населения для правительства Индии трудно изолировать некоторых граждан, которые инфицированы, но не определяются по тестам, и отослать их на карантин. Держа в уме этот факт, примем, что эта популяция также прямо уменьшается со скоростью r_1. Таким образом, изменение популяции инфицированных людей, не определяемых тестами, описывается следующим дифференциальным уравнением:

$$dE/dt = \alpha SE - r_1 E - \beta_2 E - d_1 E. \quad (2)$$

При моделировании популяции в карантине (Q(t)) учитываем, что инкубационный период COVID-19 составляет от 2 до 14 суток. Этот период является ключевым для передачи болезни от индивида к индивиду. Следовательно, необходимо отделять таких индивидов от подверженных и инфицированных, но не определяемых тестами, тестируя в течение 14 суток для контроля распространения COVID-19 в Индии. Эта упомянутая популяция также известна как карантинная популяция. Она увеличивается со скоростью β_1 и β_2, пополняясь соответственно из подверженной и инфицированной, но не определяемой тестами популяции. Эта популяция уменьшается со скоростью r_2 и σ_2 за счет перехода соответственно в инфицированную популяцию и популяцию в безопасной зоне. Примем скорость естественной смертности в этой популяции за d_1, тогда скорость изменения карантинной популяции выглядит следующим образом:

$$dQ/dt = \beta_1 S + \beta_2 E - r_2 Q - \sigma_2 Q - d_1 Q. \quad (3)$$

Моделирование популяции с подтвержденной инфекцией ($I(t)$): инфицированная популяция, у которой наличие COVID-19 было подтверждено тестами, увеличивается за счет перехода из группы инфицированных, но не определяемых по тестам, со скоростью r_1 (инфицированные, не определяемые тестами, не могут быть все помещены в карантин по причине отсутствия возможностей помещения в карантин из-за недостатка пространства или других факторов; инфицированные, но не определяемые тестами индивиды могут впоследствии стать больными и повторные тесты покажут положительные результаты. Поэтому они напрямую попадают в популяцию инфицированных, и этот особый случай очень вреден с точки зрения предотвращения распространения COVID-19 в Индии), а также увеличивается со скоростью r_2 из популяции в карантине, как обычно. Инфицированная популяция уменьшается со скоростью σ_3 за счет перехода в популяцию, восстановившуюся после болезни, а также за счет естественной смертности. Примем естественную смертность за d_1 и, для большей реалистичности, введем d_2 как смертность от инфекции, тогда изменение инфицированной популяции будет определяться следующим дифференциальным уравнением:

$$dI/dt = r_1 E + r_2 Q - \sigma_3 I - d_1 I - d_2 I. \quad (4)$$

Моделирование популяции в безопасной зоне, не подверженной риску заражения COVID-19 ($R(t)$): примем, что подверженные инфекции люди, жители, находящиеся в карантине и инфицированные индивиды восстанавливаются после болезни соответственно со скоростями σ_1, σ_2 и σ_3 и переходят в популяцию безопасной зоны. Эта популяция уменьшается за счет естественной смертности d_1. Таким образом, изменение популяции безопасной зоны, не подверженной риску заражения вирусом COVID-19, определяется следующим дифференциальным уравнением:

$$dR/dt = \sigma_1 S + \sigma_2 Q + \sigma_3 I - d_1 R. \quad (5)$$

Комбинируя уравнения ((1)–(5)), придаем нашей желаемой структуре модели следующую форму:

$$\begin{aligned} dS/dt &= \Lambda - \alpha SE - \sigma_1 S - \beta_1 S - d_1 S, \\ dE/dt &= \alpha SE - r_1 E - \beta_2 E - d_1 E, \\ dQ/dt &= \beta_1 S + \beta_2 E - r_2 Q - \sigma_2 Q - d_1 Q, \\ dI/dt &= r_1 E + r_2 Q - \sigma_3 I - d_1 I - d_2 I, \\ dR/dt &= \sigma_1 S + \sigma_2 Q + \sigma_3 I - d_1 R, \end{aligned} \quad (6)$$

с начальными плотностями $S(0) > 0$, $E(0) \geq 0$, $I(0) \geq 0$, $Q(0) \geq 0$, $R(0) > 0$.

Все параметры и соответствующий им биологический смысл представлены в табл. 1.

Таблица 1. Объяснение параметров, используемых в предложенной структуре модели SEQIR

Параметр	Смысл
Λ	Скорость притока новых индивидов в население Индии
α	Скорость перехода из подверженной популяции в популяцию инфицированных, но не определяемых тестами индивидов
β_1	Коэффициент перехода из подверженной популяции в популяцию на карантине
β_2	Коэффициент перехода из инфицированной, но не определяемой тестами популяции в популяцию на карантине
σ_1	Коэффициент перехода из подверженной популяции в популяцию в безопасной зоне
σ_2	Коэффициент перехода из инфицированной, но не определяемой тестами популяции в популяцию в безопасной зоне
σ_3	Коэффициент перехода из популяции на карантине в популяцию в безопасной зоне
r_1	Коэффициент перехода из инфицированной, но не определяемой тестами популяции в инфицированную популяцию, получающую лечение
r_2	Коэффициент перехода из популяции на карантине в инфицированную популяцию, получающую лечение
d_2	Смертность инфицированной популяции от COVID-19
d_1	Естественная смертность всех пяти субпопуляций

Приведенная выше формула для модели SEQIR (6) может быть переписана в виде

$$\begin{aligned} dS/dt &= \Lambda - \alpha SE - AS, \\ dE/dt &= \alpha SE - BE, \\ dQ/dt &= \beta_1 S + \beta_2 E - CQ, \\ dI/dt &= r_1 E + r_2 Q - DI, \\ dR/dt &= \sigma_1 S + \sigma_2 Q + \sigma_3 I - d_1 R, \end{aligned} \tag{7}$$

где $A = \sigma_1 + \beta_1 + d$, $B = r_1 + \beta_2 + d_1$, $C = r_2 + \sigma_2 + d_1$, $D = \sigma_3 + d_1 + d_2$.

ЧИСЛЕННАЯ ВЕРИФИКАЦИЯ И ПРЕДСКАЗАНИЯ

Для оптимизации нашей модели COVID-19 (6) с целью соответствия ежедневным сообщениям о новых случаях COVID по всей Индии и отдельно по пяти штатам (Дели, Керала, Махараштра, Ут-

Таблица 2. Значения параметров модельной системы уравнений (6) для Индии

Параметры	Значения	Ссылка
Λ	$4\cdot10^4$	[49]
β_1	$4\cdot10^{-7}$	Предположение
β_2	0.1	Оценка
σ_1	$5\cdot10^{-4}$	Предположение
σ_2	$5\cdot10^{-2}$	Предположение
σ_3	$6\cdot10^{-3}$	Оценка
r_1	$1\cdot10^{-2}$	Оценка
r_2	$1\cdot10^{-3}$	Оценка
d_2	$197\cdot10^{-5}$	Оценка
d_1	$2\cdot10^{-5}$	Оценка

Таблица 3. Начальные плотности в модельной системе (2.6) для Индии

$S(0)$	$E(0)$	$Q(0)$	$I(0)$	$R(0)$
$8\cdot10^8$	$15\cdot10^2$	$5\cdot10^4$	284	$4\cdot10^8$

Таблица 4. Значение R_0 для различных α для Индии

α	$2.1\cdot10^{-10}$	$2.5\cdot10^{-10}$	$2.8\cdot10^{-10}$
R_0	0.35847	0.42675	0.47796

тар-Прадеш и Западная Бенгалия) мы провели в этой части численное моделирование. Данные были взяты с официального сайта Индийского совета по медицинским исследованиям и Всемирной организации здравоохранения [47, 48]. Сначала мы оценили значения различных параметров модели, приведенные в табл. 2.

Изначальные плотности на 21 марта 2020 г. приводятся в табл. 3.

В предложенной нами модельной системе наиболее чувствительным параметром является α – скорость перехода из подверженной популяции в популяцию инфицированных, но не определяемых тестами. Поэтому мы в основном стремимся увидеть именно эффект α на скорость распространения COVID-19. Для разных значений α значение R_0 представлено в табл. 4.

Из вышеприведенной таблицы мы наблюдаем, что все значения R_0 менее единицы. Следовательно, эндемическое уравнение E_1 не является локально асимптотически стабильным для этих значений R_0 и соответствующих значений α. Давайте теперь построим график R_0 относительно α (рис. 2).

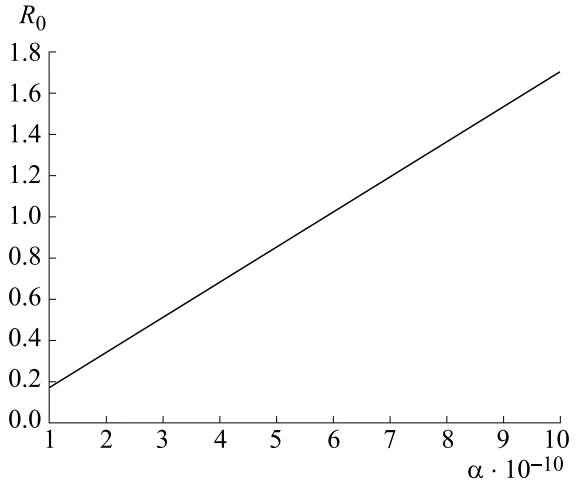


Рис. 2. Изменение R_0 в зависимости от наиболее чувствительного параметра α.

На данном рисунке мы видим, что при увеличении значений α увеличивается и R_0. Также наблюдается, что после определенных значений α величина R_0 становится больше единицы. Следовательно, до определенных значений α равновесие, свободное от болезни, является стабильным, а за пределами этих значений оно нестабильно. В данном конкретном состоянии нас интересует инфицированная популяция $I(t)$, изменяющаяся с каждым днем. Таким образом, изобразим временные ряды инфицированной популяции при принятии начальных значений плотностей из табл. 3.

Рис. 3 очень интересен, поскольку при $\alpha = 2.5\cdot10^{-10}$ количество подтвержденных случаев инфекции в модели точно ложится на реальные подтвержденные случаи в Индии в недавнее время.

На рис. 4 представлен пик инфекции для долговременного течения эпидемии. Этот рисунок

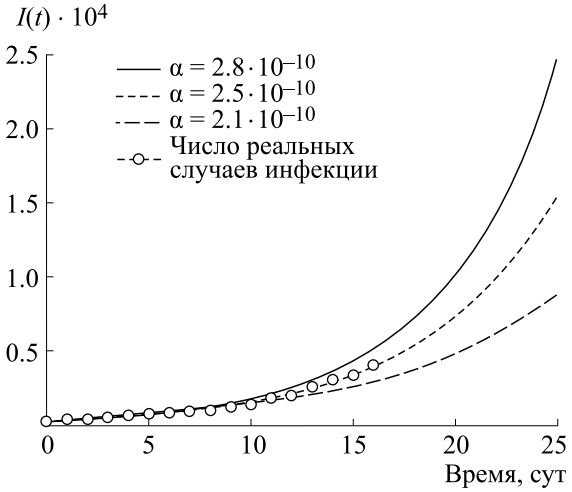


Рис. 3. Графики временных рядов инфицированной популяции для $\alpha = 2.1\cdot10^{-10}$, $2.5\cdot10^{-10}$ и $2.8\cdot10^{-10}$. Начальные условия и значения параметров приводятся в табл. 2 и 3 соответственно. По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$. Кружками отмечено число реальных случаев инфекции.

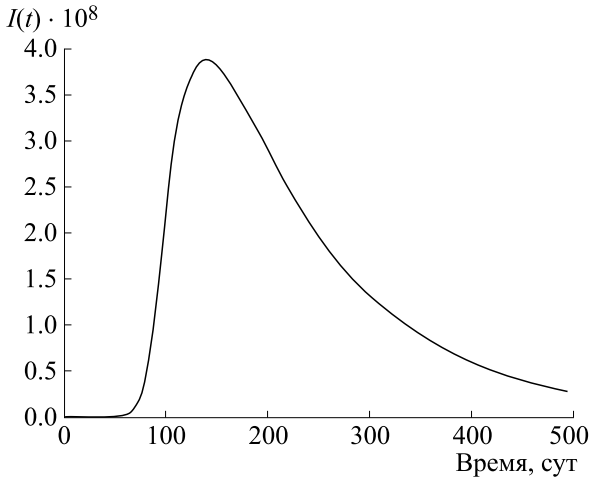


Рис. 4. График инфицированной популяции на длительном временном промежутке при $\alpha = 2.5 \cdot 10^{-10}$. Начальные условия и значения параметров приведены в табл. 2 и 3 соответственно. По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$.

для инфицированной популяции в предложенной нами модели показывает, что при введении ограничительных мер правительством Индии 21 марта 2020 г. пик инфекции (максимум количества случаев в день) ожидается почти через четыре месяца (120 суток). После этого, если продолжится такой же уровень ограничений, скорость распространения инфекции постепенно уменьшится.

Краткосрочное поведение предложенной нами модели в течение 30 и 60 суток после ограничительных мер, начатых правительством Индии, описывается на рис. 5 и 6 соответственно.

Таким образом, при введении правительственных ограничений, в нашей математической модели из рис. 5 и 6 можно вывести, что за 30 суток количество инфицированных жителей Индии приблизится к 32000. За 60 суток оно станет равно 3000000.

Поскольку после определенного периода правительство меняет ограничительные меры, параметры системы после этого периода меняются. Следовательно, в нынешней ситуации нам неинтересна инфицированная популяция на долгом отрезке времени.

Теперь мы моделируем ежедневные новые случаи подтвержденного заболевания COVID-19 для пяти штатов Индии – Махараштра, Керала, Уттар-Прадеш, Дели и Западная Бенгалия, начиная с 21 марта 2020 г. Попытаемся оптимизировать модель (6) к ежедневным новым случаям подтвержденного COVID-19 в этих пяти штатах. Здесь мы также принимаем для α (скорости перехода из подверженной популяции в популяцию инфицированных, но не определяемых тестами индивидов) то же значение, что и раньше. Оцененные начальные плотности на 21 марта 2020 г. приведены в табл. 5, а скорости притока населения и смертность от инфекции для пяти штатов Индии – в табл. 6. Наконец, остальные оцененные параметры приведены в табл. 7.

Используя эти оценочные параметры, фиксированные параметры и начальные плотности

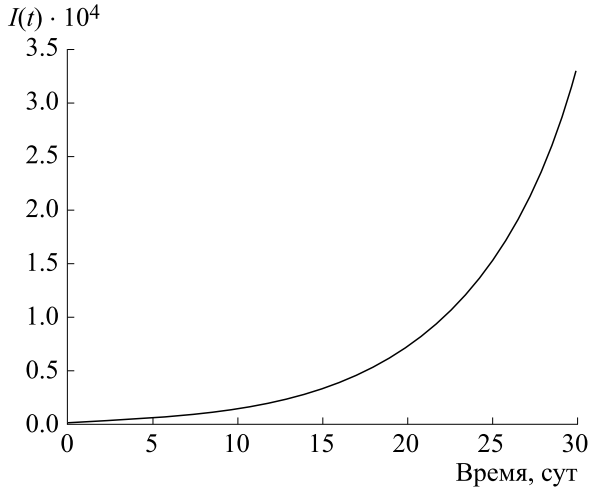


Рис. 5. График временного ряда инфицированной популяции при $\alpha = 2.5 \cdot 10^{-10}$ на временном промежутке в один месяц. Начальные условия и значения параметров приведены в табл. 2 и 3 соответственно. По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$.

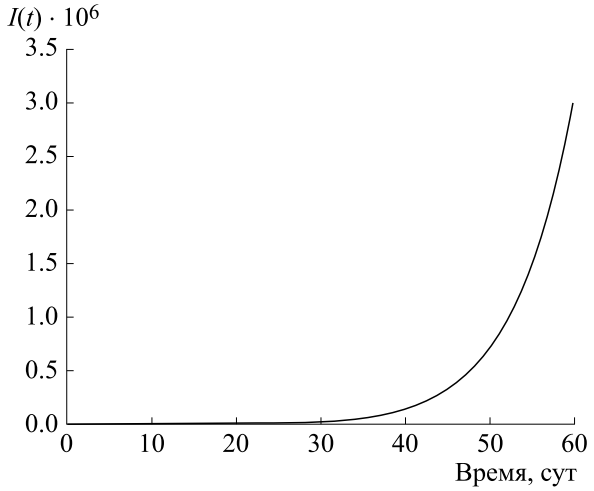


Рис. 6. График временного ряда инфицированной популяции при $\alpha = 2.5 \cdot 10^{-10}$ на временном промежутке в два месяца. Начальные условия и значения параметров приведены в табл. 2 и 3 соответственно. По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$.

Таблица 5. Оценочные значения начальных плотностей на 21 марта 2020 г.

Штат	$S(0)$	$E(0)$	$Q(0)$	$I(0)$	$R(0)$
Махараштра	75000000	225	800	58	30000000
Керала	10000000	200	1000	40	10050000
Уттар-Прадеш	150000000	120	1500	24	50000000
Дели	10000000	150	800	27	500000
Западная Бенгалия	50000000	20	200	03	30000000

Таблица 6. Скорость притока населения и смертность от инфекции для пяти штатов Индии

Параметры	Махараштра	Керала	Уттар-Прадеш	Дели	Западная Бенгалия
Λ	3300	405	14200	650	3490
d_2	0.0032	0.00029	0.0049	0.00067	0.0024

Таблица 7. Оценочные параметры для пяти штатов Индии

Параметры	Махараштра	Керала	Уттар-Прадеш	Дели	Западная Бенгалия
β_1	0.0000004	0.0000004	0.0000004	0.0000004	0.0000004
β_2	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
σ_1	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005
σ_2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
σ_3	0.005	0.012	0.0038	0.0016	0.0078
r_1	0.04	0.05	0.02	0.05	0.05
r_2	0.002	0.001	0.0012	0.00093	0.0005
d_1	0.000015	0.000018	0.00002	0.00001	0.000016

(табл. 5 и 7), мы можем графически представить инфицированные популяции для разных штатов. Рис. 7 и 8 показывают графическое представление инфицированной популяции для штата Махараштра.

По рис. 7 мы можем наблюдать, что после применения правительством Индии ограничительных мер общее количество инфицированных жителей Махараштры за 30 суток достигнет 4100 с 21 марта 2020 г. Также можно заметить, что действительное количество инфицированных жителей совпадает с предсказанным нашей системой количеством индивидов с COVID-19 в течение 13 суток с 21 марта 2020 г.

Из рис. 8 можно вывести, что общее количество инфицированных достигнет 260000 через два месяца. Но в реальности этого может и не случиться, поскольку правительство постоянно меняет ограничительные меры, стремясь остановить распространение COVID-19.

Чтобы проиллюстрировать ситуацию с COVID-19 в штате Керала на основе значений параметров, приведенных в табл. 5–7, приведем следующие два графика.

Рис. 9 показывает, что за 30 суток инфицированная популяция в Керале достигнет 2100. Мы также наблюдаем, что реальное количество новых случаев инфекции перекрывается с моделируемой кривой новых случаев в течение 13 суток. Рисунок 10 показывает, что количество инфицированных индивидов в Керале спустя 60 суток с 21 марта 2020 г. достигнет 50000. Но недавние тренды показывают, что количество новых инфицированных намного меньше, чем ожидаемое нами число. Это можно объяснить тем, что правительство Кералы предприняло строгие ограничительные меры для предотвращения распространения вируса COVID-19.

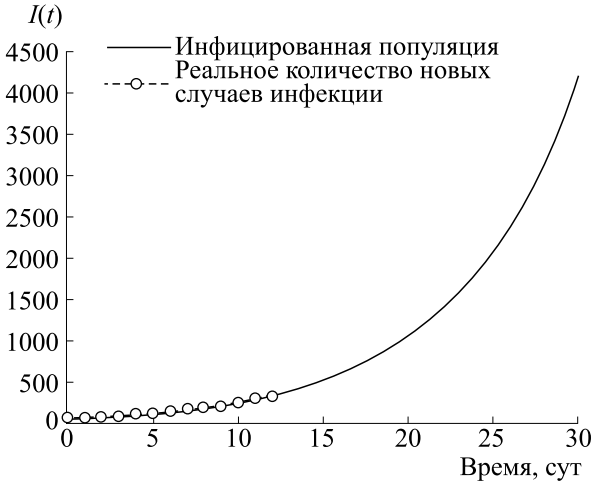


Рис. 7. График временного ряда инфицированной популяции при $\alpha = 2.5 \cdot 10^{-9}$ на временном промежутке в один месяц (с 22 марта 2020 г.) для штата Махараштра с применением данных из табл. 5–7. По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$. Кружками отмечено реальное количество новых случаев инфекции.

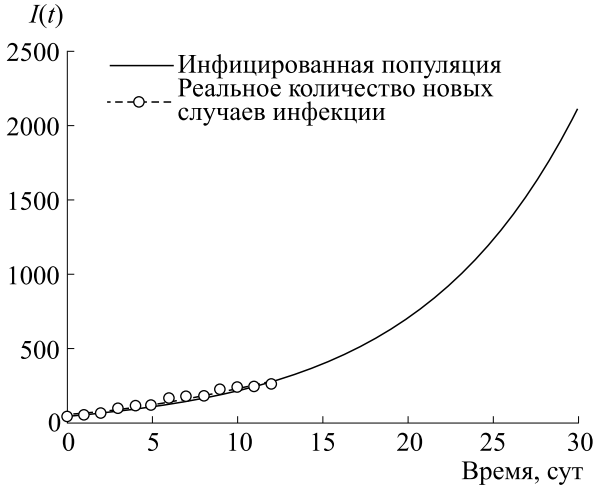


Рис. 9. Временной ряд инфицированной популяции в Керале при $\alpha = 0.0000000164$ с данными из табл. 5–7 для периода в один месяц (с 22 марта 2020 г.). По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$. Кружками отмечено реальное количество новых случаев инфекции.

Следующие два рисунка (рис. 11 и 12) показывают ситуацию с COVID-19 в штате Уттар-Прадеш.

Рис. 11 и 12 показывают, что для наших построений инфицированная популяция в Уттар-Прадеше за 30 и 60 суток достигнет 4400 и 620000 соответственно, начиная с 21 марта 2020 г.

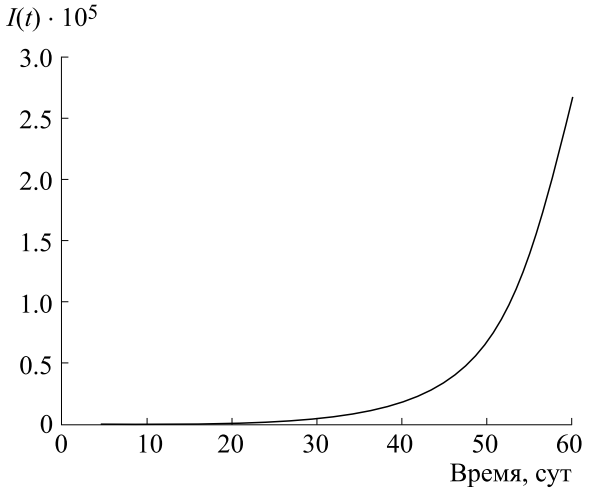


Рис. 8. График временного ряда инфицированной популяции при $\alpha = 2.5 \cdot 10^{-9}$ на временном промежутке в два месяца (с 22 марта 2020 г.) для штата Махараштра с применением данных из табл. 5–7. По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$.

Аналогичным образом представим следующие два графика для штата Дели (рис. 13 и 14). Они показывают, что для нашей модели количество инфицированных в Дели спустя 30 и 60 суток с 21 марта 2020 г. достигнет 4600 и 400000 соответственно.

Наконец, возможная ситуация с пандемией COVID-19 по Западной Бенгалии представлена на рис. 15 и 16. Как и ранее, рис. 15 и 16 показыва-

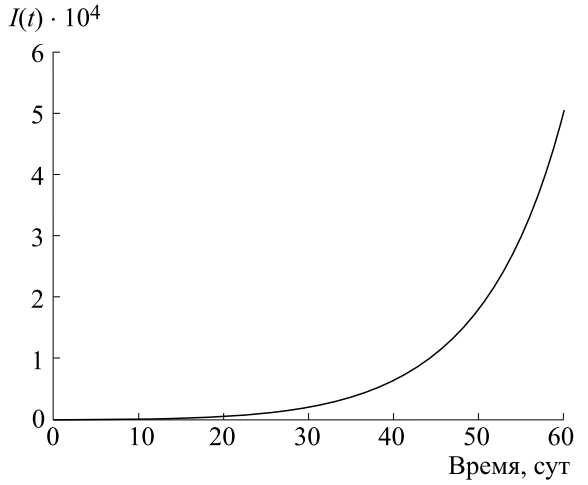


Рис. 10. Временной ряд инфицированной популяции в Керале при $\alpha = 0.0000000164$ с данными из табл. 5–7 для периода в два месяца (с 22 марта 2020 г.). По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$.

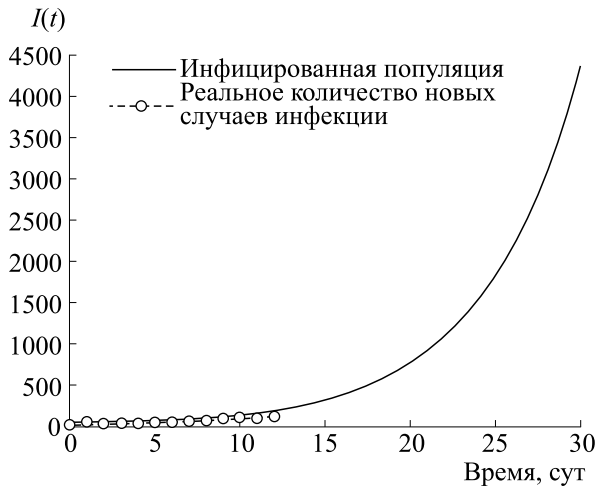


Рис. 11. Временной ряд инфицированной популяции в штате Уттар-Прадеш при $\alpha = 0.000000020$ с данными из табл. 5–7 для периода в один месяц (с 22 марта 2020 г.). По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$. Кружками отмечено реальное количество новых случаев инфекции.

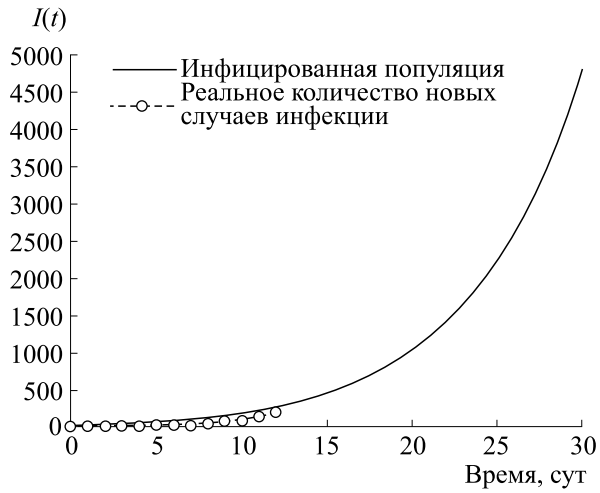


Рис. 13. Временной ряд инфицированной популяции в штате Дели при $\alpha = 0.000000021$ с данными из табл. 5–7 для периода в один месяц (с 22 марта 2020 г.). По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$. Кружками отмечено реальное количество новых случаев инфекции.

ют, что инфицированная популяция в Западной Бенгалии через 30 и 60 суток с 21 марта 2020 г. достигнет 1100 и 210000 соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В данной статье мы сформулировали и изучили эпидемиологическую модель для вируса болезни COVID-19, передаваемой от человека к человеку. Сейчас количество подтвержденных случаев COVID-19 растет день ото дня во всем мире. Исходя из этого, предсказание количества инфицированных индивидов чрезвычайно важно для принятия надлежащих мер здравоохранения. Также важно контролировать скорость распространения COVID-19, ограничивая количество новых случаев. Наше математическое исследование основано на распространении вируса COVID-19 в Индии. Мы попытались оптимизировать нашу модель к случаю распространения

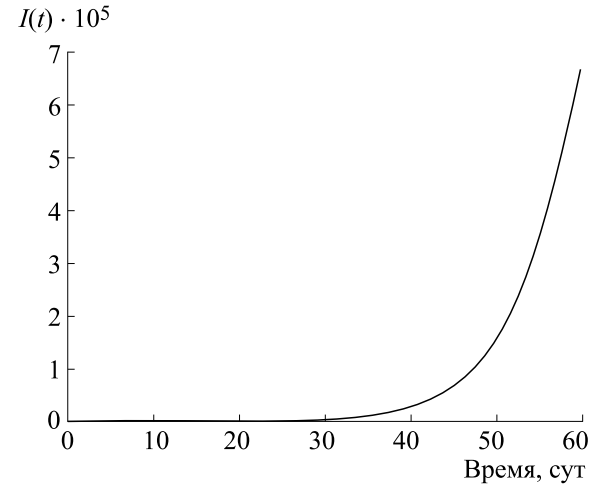


Рис. 12. Временной ряд инфицированной популяции в штате Уттар-Прадеш при $\alpha = 0.000000020$ с данными из табл. 5–7 для периода в два месяца (с 22 марта 2020 г.). По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$.

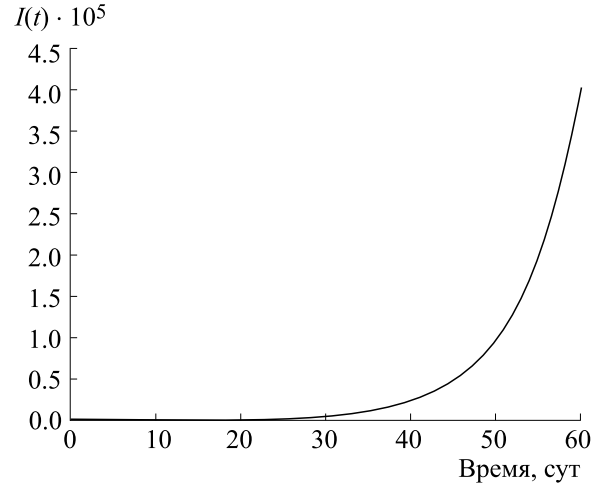


Рис. 14. Временной ряд инфицированной популяции в штате Дели при $\alpha = 0.000000021$ с данными из табл. 5–7 для периода в два месяца (с 22 марта 2020 г.). По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$.

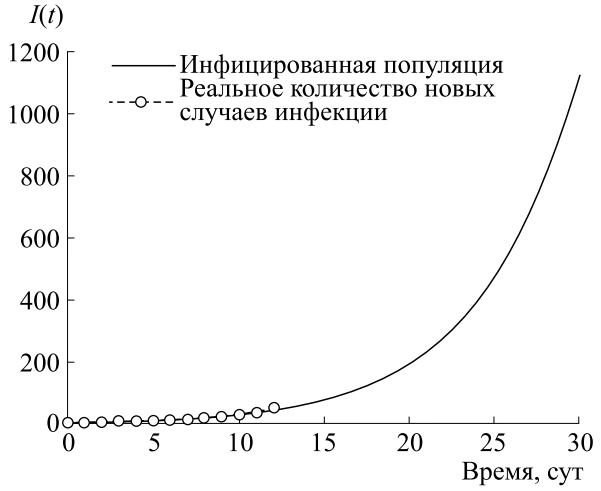


Рис. 15. Временной ряд инфицированной популяции в штате Западная Бенгалия при $\alpha = 0.0000000047$ с данными из табл. 5–7 для периода в один месяц (с 22 марта 2020 г.). По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$. Кружками отмечено реальное количество новых случаев инфекции.

COVID-19 в Индии, поскольку объем доступных данных достаточно ограничен. Основной параметр взаимодействия R_0 рассчитан для нашей ожидаемой модели. Наблюдается, что при $R_0 < 1$ величина E_0 для равновесия, свободного от болезни, глобально асимптотически стабильна. Далее, из анализа чувствительности R_0 мы наблюдаем, что самый чувствительный параметр нашей модельной структуры – α (скорость перехода из подверженной популяции в популяцию инфицированных, но не определяемых тестами индивидов). Также эндемическое равновесие E_1 существует и стабильно при $R_0 > 1$.

В данном исследовании наша главная цель – математически предсказать количество инфицированных жителей Индии с COVID-19. Для достижения цели мы провели подробное численное моделирование предложенной системы. Сначала мы провели моделирование развития COVID-19 в Индии, а затем в пяти различных штатах (Махараштра, Керала, Уттар-Прадеш, Дели и Западная Бенгалия) выполнили численное предсказание через графический подход, используя программу Matlab. Мы оценили значения параметров и начальных условий, исходя из данных, доступных на момент 21 марта 2020 г.

Видно, что α – наиболее чувствительный параметр нашей системы. Поэтому для разных значе-

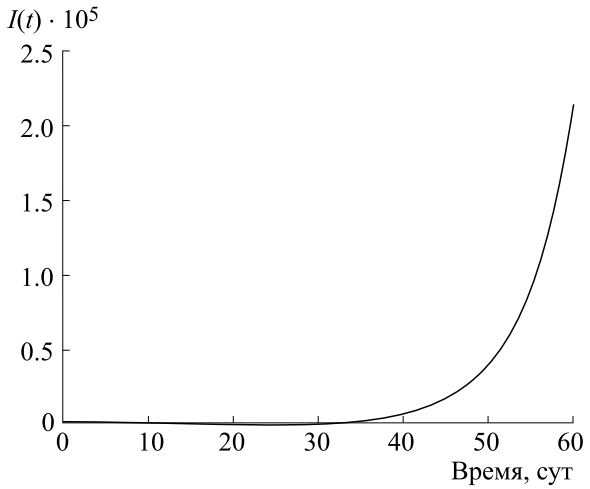


Рис. 16. Временной ряд инфицированной популяции в штате Западная Бенгалия при $\alpha = 0.0000000047$ с данными из табл. 5–7 для периода в два месяца (с 22 марта 2020 г.). По оси абсцисс – время в сутках, по оси ординат – инфицированная популяция $I(t)$.

ний α популяционные кривые представлены на рис. 3. Мы наблюдаем, что для $\alpha = 2.5 \cdot 10^{-10}$ инфицированная популяция наилучшим образом совпадает с реальным количеством инфицированных индивидов в течение 13 суток с 21 марта 2020 г. Долгосрочное развитие эпидемиии можно наблюдать на рис. 4. Этот рисунок показывает, что для данной модели и доступных данных пик инфекции должен быть достигнут в течение 120 суток с 21 марта 2020 г. Таким образом, оценочная дата достижения пика инфекции по нашему предсказанию – 21 июля 2020 г., если ограничительные меры, объявленные правительством Индии 21 марта 2020 г., будут неизменными. Краткосрочные предсказания размера инфицированной популяции приведены на рис. 5 и 6 соответственно.

Согласно этим двум рисункам, количество пациентов с COVID-19 через 30 и 60 суток с 21 марта 2020 г. составит 32000 и 3000000 соответственно.

Теперь взглянем на ситуацию в разных штатах. Рис. 7 и 8 показывают, что количество инфицированных индивидов в штате Махараштра достигнет соответственно 4100 и 260000 в течение 30 и 60 суток. Для Кералы эти числа составят 2100 и 50000 (при α = 0.0000000164) соответственно (рис. 9 и 10). В Уттар-Прадеше, согласно рис. 11 и 12, при $\alpha = 0.000000020$ предсказанное количество инфицированных жителей составит 4400 и 620000; 4600 и 400000 человек будет инфицировано через в Дели (рис. 13 и 14). Наконец, в Западной Бенгалии соответственно 1100 и 210000 жителей будет инфицировано вирусом COVID-19 через 30 и 60 суток (рис. 15 и 16).

Таким образом, анализ всех результатов предложенной нами модели и наблюдение за ситуацией в разных странах позволяет нам сделать вывод, что в ближайшем будущем Индию ожидают очень большие проблемы из-за COVID-19. Во избежание этих проблем правительство Индии должно принять более строгие меры помимо карантина, локдауна и т. д. В настоящее время индийское правительство постоянно меняет меры противодействия COVID-19. Недавно все округа Индии были классифицированы в три группы, названные красными зонами (тревожные зоны), оранжевыми зонами (зоны меньшего уровня тревоги) и зелеными зонами (безопасные зоны). По предварительным данным, 170 округов Индии являются тревожными зонами, в которых мощности экспресс-тестирования быстро развертываются и становятся доступными для общества. С течением времени все больше стратегических мер принимается правительством Индии и всеми правительствами штатов для остановки распространения COVID-19 в Индии. Таким образом, мы можем оценить, что если правительство Индии будет принимать надлежащие меры раз за разом, инфицированная популяция будет отличаться от предсказанных нами значений с течением времени, и Индия излечится от этой вирусной инфекции в ближайшем будущем. Наконец, мы должны сказать, что индийское общество должно помочь правительству бороться с опасным заболеванием COVID-19, описанным представленной моделью.

Приложение А

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА

Неотрицательность решения.

Теорема 1 (A1). Каждое решение структуры модели SEQIR (7) при предварительных ограничениях существует в интервале $(0, \infty)$, при этом $S(t) > 0$, $E(t) \geq 0$, $I(t) \geq 0$, а также $R(t) > 0$ для всех значений t больше нуля.

Доказательство. Поскольку правая часть структуры модели SEQIR (7) полностью непрерывна и локально на C является функцией Липшица, решение $(S(t), E(t), I(t), R(t))$ уравнения (7) с начальными условиями существует и является единственным на $(0, \xi)$; где $0 < \xi < +\infty$.

Из системы (7) с начальным условием имеем

$$dS/dt \geq -AS(t),$$

$$S(t) \geq S(0)\exp[-At] > 0.$$

Из второго уравнения системы (7) следует, что $dE/dt \geq -BE(t)$. Используя начальное условие, получаем $E(t) \geq E(0)\exp[-Bt] \geq 0$. Вновь из третьего и четвертого уравнений системы (7) с помощью начального условия находим

$$Q(t) \geq Q(0)\exp[-Ct] \geq 0 \text{ и } I(t) \geq I(0)\exp[-Dt] \geq 0.$$

Кроме того, последнее уравнение (7) дает

$$dR/dt \geq -d_1 R \rightarrow R(t) \geq R(0)\exp[-d_1 t] > 0.$$

Отсюда видно, что $S(t) > 0$, $E(t) \geq 0$, $I(t) \geq 0$, $R(t) > 0$, $\forall t \geq 0$. Это завершает доказательство теоремы.

Инвариантная область.

Теорема 2 (A2). Все решения структуры модели SEQIR (7), инициирующиеся в $\mathbb{R}^5_+$, ограничены и входят в область Ω, определяемую равенством $\Omega = \{(S, E, Q, I, R) \in \mathbb{R}^5_+ : 0 < N(t) \leq \Lambda/\zeta\}$ при $t \rightarrow \infty$, где $\zeta = \min\{d_1, d_1 + d_2\}$.

Доказательство. Предположим, что $N(t) = S(t) + E(t) + I(t) + R(t)$, где $(S(t), E(t), Q(t), I(t), R(t))$ – структура модели SEQIR (7). Дифференцируя обе части по t, имеем

$$dN(t)/dt = dS(t)/dt + dE(t)/dt + dQ(t)/dt + dI(t)/dt + dR(t)/dt.$$

Подставив значения $dS(t)/dt$, $dE(t)/dt$, $dQ(t)/dt$, $dI(t)/dt$ и $dR(t)/dt$ из уравнения (7), получим

$$dN(t)/dt = \Lambda - d_1S - d_1E - d_1Q - d_1R - (d_1 + d_2)I.$$

Таким образом, имеем

$$dN(t)/dt + \zeta N(t) = \Lambda - (d_1 - \zeta)S - (d_1 - \zeta)E - \\ - (d_1 - \zeta)Q - (d_1 + d_2)I - (d_1 - \zeta)R \to \\ \to dN(t)/dt + \zeta N(t) \le \Lambda,$$

где $\zeta = \min\{d_1, d_1 + d_2\}$. Теперь, используя теорему сравнения, получаем

$$0 < \mathrm{N(t)} \le \mathrm{N(0)}\exp(-\zeta \mathrm{t}) + \Lambda/\zeta.$$

При $t \to \infty$ имеем $0 < \mathrm{N(t)} \le \Lambda/\zeta$. Следовательно, все решения структуры модели (7) входят в область $\Omega = \{(S, E, Q, I, R) \in \mathbb{R}^5{}_+ : 0 < N(t) \le \Lambda/\zeta\}$. Таким образом, мы завершили требуемое доказательство.

Приложение B

Равновесие без болезни и базовое число воспроизводства. Равновесие без болезни в предложенной модели SEQIR (7) достигается установкой $E = 0$, $Q = 0$, $I = 0$ и $R = 0$. Полученное равновесие без болезней равно $E_0(\Lambda/A, 0, 0, 0, 0)$.

Базовое число воспроизводства [39–42] – это число, определяемое как новообразованное инфицирование, производимое одиночным инфицированным индивидуумом на протяжении его или ее активной инфекционной эпохи при введении в крайне восприимчивое население, находящееся в равновесии.

Чтобы найти базовое число воспроизводства в предлагаемой нами структуре модели SEQIR (7), воспользуемся формулировкой из нового поколения матричного метода [41]. Предположим, что $y = (E, Q, I, R, S)^T$, тогда систему (7) можно переписать в виде

$$dy/dt = F(y) - v(y),$$

где $F(y) = \begin{bmatrix} \alpha SE \\ 0 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{bmatrix}$ и $\begin{bmatrix} BE \\ -\beta_1 S - \beta_2 E + CQ \\ -r_1 E - r_2 Q + DI \\ -\sigma_1 S - \sigma_2 Q - \sigma_3 I + d_1 R \\ -\Lambda + \alpha SE + \Lambda S \end{bmatrix}$.

Величина F известна как передаточная часть, которая отражает возникновение новой инфекции, а v – как переходная часть, которая объясняет изменение состояния.

Матрицы Якоби $F(y)$ и $v(y)$ в равновесии без болезни E_0 задаются выражением

$$DF(E_0) = \begin{bmatrix} F_{3\times3} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} \text{ и } Dv(E_0) = \begin{bmatrix} V_{3\times3} & & 0 & 0 \\ 0 & -\sigma_2 & -\sigma_3 & d_1 & -\sigma_1 \\ \dfrac{\alpha\Lambda}{A} & 0 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix},$$

где $F = \begin{bmatrix} \dfrac{\alpha\Lambda}{A} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}$ и $V = \begin{bmatrix} B & 0 & 0 \\ -\delta_2 & C & 0 \\ -r_1 & -r_2 & D \end{bmatrix}$,

Таким образом, FV^{-1} является матрицей следующего поколения структуры модели SEQIR (7). Так, согласно работе [41] $R_0 = \rho(FV^{-1})$, где ρ – спектральный радиус матрицы следующего поколения FV^{-1}. Следовательно,

$$R_0 = \rho(FV^{-1}) = \frac{\alpha\Lambda}{AB} = \frac{\alpha\Lambda}{(\beta_1 + \sigma_1 + d_1)(r_1 + \beta_2 + d_1)} > 0.$$

Примечательно, что L/A представляет количество восприимчивых лиц в равновесии без болезней E_0.

Анализ чувствительности R_0. На основе каждого из параметров R_0 выполняется анализ чувствительности для проверки чувствительности основного числа воспроизведения. Как указывали авторы работы [43], мы рассчитали нормализованный индекс прямой чувствительности по отношению к каждому из параметров:

$$A_\alpha = \frac{\frac{\partial R_0}{R_0}}{\frac{\partial \alpha}{\alpha}} = \frac{\alpha}{R_0}\frac{\partial R_0}{\partial \alpha} = \frac{\alpha}{R_0}\frac{\Lambda}{(\beta_1+\sigma_1+d_1)(r_1+\beta_2+d_1)} = \frac{R_0}{R_0} = 1$$

$$A_{\beta_1} = \frac{\frac{\partial R_0}{R_0}}{\frac{\partial \beta_1}{\beta_1}} = \frac{\beta_1}{R_0}\frac{\partial R_0}{\partial \beta_1} = \left|\frac{-\beta_1}{\beta_1+\sigma_1+d_1}\right| < 1$$

$$A_{\sigma_1} = \frac{\frac{\partial R_0}{R_0}}{\frac{\partial \sigma_1}{\sigma_1}} = \frac{\sigma_1}{R_0}\frac{\partial R_0}{\partial \sigma_1} = \left|\frac{-\sigma_1}{\beta_1+\sigma_1+d_1}\right| < 1$$

$$A_{d_1} = \frac{\frac{\partial R_0}{R_0}}{\frac{\partial d_1}{d_1}} = \frac{d_1}{R_0}\frac{\partial R_0}{\partial d_1} = \left|\frac{-d_1}{\beta_1+\sigma_1+d_1} - \frac{-d_1}{r_1+\beta_2+d_1}\right| < 1 \qquad \text{(B1)}$$

$$A_{r_1} = \frac{\frac{\partial R_0}{R_0}}{\frac{\partial r_1}{r_1}} = \frac{r_1}{R_0}\frac{\partial R_0}{\partial r_1} = \left|\frac{-r_1}{r_1+\beta_2+d_1}\right| < 1$$

$$A_{\beta_2} = \frac{\frac{\partial R_0}{R_0}}{\frac{\partial \beta_1}{\beta_1}} = \frac{\beta_2}{R_0}\frac{\partial R_0}{\partial \beta_1} = \left|\frac{-\beta_2}{r_1+\beta_2+d_1}\right| < 1.$$

Из приведенных выше расчетов очевидно, что базовое число воспроизводства R_0 в основном чувствительно к изменениям в α. Значение R_0 будет увеличено, если мы увеличим значение α. Наоборот, в той же пропорции значение R_0 уменьшится, если мы уменьшим значение α. Также было замечено, что параметры β_1, σ_1, d_1, r_1 и β_2 связаны с R_0 обратно пропорционально. Следовательно, при любом увеличении значения любого из упомянутых параметров обязательно будет уменьшаться значение R_0. Но уменьшающееся значение R_0 будет относительно меньшим. Поскольку влияние параметров β_1, σ_1, d_1, r_1 и β_2 на R_0 очень мало; будет разумно сосредоточить усилия на снижении α (скорости передачи, при которой восприимчивый индивидуум превращается в подвергающегося воздействию индивидуума). Таким образом, детальный анализ базового числа воспроизводства подчеркнул, что профилактика лучше, чем лечение. Иными словами, меры по усилению профилактики более эффективны в борьбе с распространением болезни COVID-19, чем в увеличении числа людей, получающих доступ к лечению, поскольку пока нет надлежащих вакцин, что доказано с медицинской точки зрения, этот метод очень эффективен для контроля распространения коронавирусной болезни в такой стране, как Индия. Следуя той же концепции, правительство Индии, а также правительства всех индийских штатов предприняли необходимые действия, такие как изоляция, кампания против болезни и т. д., для защиты от вспышки этой опасной болезни.

Анализ устойчивости равновесия без болезни. Этот раздел построен с целью изучения природы устойчивости равновесия без болезни E0 с помощью следующих теорем.

Теорема 3. Структура модели SEQIR (7) при равновесии без болезни $E_0(\Lambda/A, 0, 0, 0, 0)$ локально асимптотически устойчива при условии $R_0 < 1$ и становится неустойчивой при $R_0 > 1$.

Доказательство. Якобиан системы (7) при равновесии без болезни $E_0(\Lambda/A, 0, 0, 0, 0)$ имеет следующий вид:

$$J_{E_0} = \begin{bmatrix} -A & -\frac{\alpha\Lambda}{A} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \frac{\alpha\Lambda}{A} - B & 0 & 0 & 0 \\ \beta_1 & \beta_2 & -C & 0 & 0 \\ 0 & r_1 & r_2 & -D & 0 \\ \sigma_1 & 0 & \sigma_2 & \sigma_3 & -d_1 \end{bmatrix}.$$

Характеристическое уравнение матрицы J_{E0} задается выражением

$$\det(J_{E0} - \lambda I) = 0, \qquad \text{(B2)}$$

где λ — собственное значение матрицы J_{E0}. Таким образом, корнями уравнения (B2), т.е. собственными значениями матрицы J_{E0}, являются $\lambda_1 = -A < 0$, $\lambda_2 = \alpha\Lambda/A - B$, $\lambda_3 = -C < 0$, $\lambda_4 = -D < 0$, а также $\lambda_5 = -d_1 < 0$. Поэтому система (7) локально асимптотически находится в равновесии без болезни $E_0(\Lambda/A, 0, 0, 0, 0)$, если $\lambda_2 < 0$. Теперь $\lambda_2 < 0$ влечет

$$\frac{\alpha\Lambda}{A} - B < 0 \Rightarrow \frac{\alpha\Lambda}{AB} < 1 \Rightarrow R_0 < 1.$$

Следовательно, равновесие без болезни $E_0(\Lambda/A, 0, 0, 0, 0)$ локально асимптотически устойчиво при условии $R_0 < 1$.

Теорема 4. Структура модели SEQIR (7) при равновесии без болезни $E_0(\Lambda/A, 0, 0, 0, 0)$ глобально асимптотически устойчива при условии $R_0 < 1$ и становится неустойчивой при $R_0 > 1$.

Доказательство. Мы можем переписать систему дифференциальных уравнений (7) в следующем виде:

$$dX/dt = F(X, V),$$
$$dV/dt = G(X, V),\ G(X, 0) = 0,$$

где $X = (S, R) \in R^2$ (число компартментов незараженных особей), $V = (E, Q, R) \in R^3$ (количество компартментов инфицированных особей), а также $E_0(\Lambda/A, 0, 0, 0, 0)$ – равновесие без болезни структуры модели SEQIR (7). E_0 является глобально стабильным, если выполняются следующие два условия:

1) при $dX/dt = F(X, V)$ X^* глобально асимптотически устойчиво,

2) $G(X, V) = BV - \hat{G}(X, V)$, $\hat{G}(X, V) \geq 0$ for $(X, V) \in \Omega$,

где $B = D_V G(X^*, 0)$ – матрица Метцлера и Ω – положительно инвариантное множество относительно модели (7). Вслед за авторами работы [44] проверяем указанные выше условия. Для предложенной нами структуры модели (7) имеем:

$$F(X,0) = \begin{bmatrix} \Lambda - AS \\ 0 \end{bmatrix},\ B = \begin{bmatrix} -B & 0 & 0 \\ \beta_2 & -C & 0 \\ r_1 & r_2 & -D \end{bmatrix} \text{ and } \widehat{G}(X,V) = \begin{bmatrix} \alpha SE \\ \beta_1 S \\ 0 \end{bmatrix}.$$

Очевидно, что $\hat{G}(X,V) \geq 0$ каждый раз, когда переменные состояния находятся в пределах Ω. Также очевидно, что $X^* = (L/A, 0)$ является глобальным асимптотически устойчивым равновесием системы $dX/dt = F(X, 0)$. Следовательно, теорема доказана.

Приложение C

Наличие эндемической точки равновесия и ее устойчивость. Этот раздел отражает наличие эндемического равновесия, а также демонстрирует его устойчивый характер. Чтобы обнаружить эндемическое равновесие $E_1(S^*, E^*, Q^*, I^*, R^*)$ в нашей предлагаемой структуре SEQIR (7), мы считаем следующее:

$$S > 0,\ E > 0,\ Q > 0,\ I > 0,\ R > 0,$$

а также

$$dS/dt = dE/dt = dQ/dt = dI/dt = dR/dt = 0. \qquad \text{(C1)}$$

Решая систему уравнений (C1), получаем

$$S^* = \frac{B}{\alpha} = \frac{\Lambda}{A}\frac{1}{R_0} > 0[R_0 > 0],\ Q^* = \frac{\beta_1 B + r_1 E^*}{\alpha C},\ I^* = \frac{\alpha(r_2\beta_2 + Cr_1)E^* + r_2\beta_1 B}{\alpha CD},$$
$$R^* = \frac{B\{\sigma_1 CD + \beta_1(\sigma_2 D + \sigma_3 r_2)\} + \alpha\{\beta_2\sigma_2 D + \sigma_3(r_2\beta_2 + Cr_1)\}E^*}{\alpha d_1 CD}.$$

Из первого уравнения (C1) имеем

$$E^* = \frac{\Lambda - AS^*}{\alpha S^*} = \frac{\Delta - A\dfrac{\Lambda}{A}\dfrac{1}{R_0}}{\alpha\dfrac{\Lambda}{A}\dfrac{1}{R_0}} \text{ (ввод значения } S\text{)},$$
$$= \frac{\Lambda\left[1 - \dfrac{1}{R_0}\right]}{\alpha\Lambda} R_0 A = \frac{\Lambda}{\alpha}[R_0 - 1].$$

Следовательно, E^* имеет единственное положительное значение, если $R_0 - 1 > 0$, т. е. $R_0 > 1$. Сокращая приведенные выше рассуждения и рассуждения в предыдущих разделах, мы пришли к следующей теореме.

Теорема 5 (C1). Структура модели SEQIR (7) имеет уникальное равновесие без болезни $E_0(\Lambda/A, 0, 0, 0, 0)$ для всех значений параметров, также система (7) имеет уникальное эндемическое равновесие $E_1(S^*, E^*, Q^*, I^*, R^*)$ при условии $R_0 > 1$.

Следующая теорема устанавливает локальную устойчивость эндемического равновесия $E_1(S^*, E^*, Q^*, I^*, R^*)$:

$$\begin{aligned} g_1 &= \Lambda - \alpha SE - AS, \\ g_2 &= \alpha SE - BE, \\ g_3 &= \beta_1 S + \beta_2 E - CQ, \\ g_4 &= r_1 E + r_2 Q - DI, \\ g_5 &= \sigma_1 S + \sigma_2 Q + \sigma_3 I - d_1 R. \end{aligned} \tag{C2}$$

Мы предполагаем, что $\alpha^* = \alpha$ как параметр бифуркации, при этом, как было объяснено в (B1), R_0 преимущественно более чувствителен к изменению, чем другие параметры. Если считать, что $R_0 = 1$, то имеем

$$\alpha^* = AB/\Lambda. \tag{C3}$$

Теперь якобиан линеаризованной системы (C1) через (C2) при равновесии без болезни E_0, когда $\alpha^* = \alpha$, выглядит следующим образом:

$$J(\alpha^*) = \begin{bmatrix} -A & -B & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ \beta_1 & \beta_2 & -C & 0 & 0 \\ 0 & r_1 & r_2 & -D & 0 \\ \sigma_1 & 0 & \sigma_2 & \sigma_3 & -d_1 \end{bmatrix}. \tag{C4}$$

Собственные значения матрицы (C4) задаются как $(0, -A, -C, -D, -d_1)^T$. Заметим, что матрица (C4) имеет простое нулевое собственное значение, а ее остальные собственные значения отрицательны. Сейчас мы находимся на этапе применения теории центрального многообразия [45] для анализа динамики системы (C1). Нулевому собственному значению соответствует правильный собственный вектор $\omega = (\omega_1, \omega_2, \omega_3, \omega_4, \omega_5)^T$ матрицы (C4) определяется выражениями

$$\begin{aligned} \omega_1 &= -\frac{B}{A}\omega_2, \\ \omega_3 &= \frac{1}{C}\left(\beta_2 - \beta_1 \frac{B}{A}\right)\omega_2, \\ \omega_4 &= \frac{1}{D}\left[r_1 + \frac{r_3}{C}\left(\beta_2 - \beta_1 \frac{B}{A}\right)\right]\omega_2, \\ \omega_5 &= \frac{1}{d_1}\left[-\frac{\sigma_1 B}{A} + \frac{\sigma_2}{C}\left(\beta_2 - \beta_1 \frac{B}{A}\right) + \frac{\sigma_3}{D}\left\{r_1 + \frac{r_3}{C}\left(\beta_2 - \beta_1 \frac{B}{A}\right)\right\}\right]\omega_2, \\ \omega_2 &= 1. \end{aligned}$$

со свободным ω_2. Более того, $J(a^*)$ имеет соответствующий левый собственный вектор $v = (v_1, v_2, v_3, v_4, v_5)$, где $v_1 = 0$, $v_2 = 0$, $v_3 = 0$, $v_4 = 0$, $v_5 = 0$ со свободным v_2. Таким образом, мы имеем

$$\begin{aligned} \alpha &= \sum_{k,i,j=1}^{5} v_k \omega_i \omega_j \frac{\partial^2 f_k}{\partial x_i x_j}(0,0) = \sum_{k,i,j=1}^{5} v_k \omega_i \omega_j \frac{\partial^2 f_k}{\partial x_i x_j}(0,0) = v_2 \sum_{i,j=1}^{5} \omega_i \omega_j \frac{\partial^2 f_2}{\partial x_i x_j}(0,0), \\ b &= \sum_{k,i=1}^{5} v_k \omega_i \frac{\partial^2 f_k}{\partial x_i \alpha}(0,0) = v_2 \sum_{j=1}^{5} \omega_i \frac{\partial^2 f_2}{\partial x_i \alpha}(0,0). \end{aligned}$$

Подставляя значения всех производных второго порядка, рассчитанных для равновесия без болезни, а также $\alpha^* = \alpha$, получаем

$$a = -(2/\Lambda)B^2 < 0 \text{ и } b = \Lambda/A > 0.$$

Поскольку $a < 0$ и $b > 0$ при $\alpha^* = \alpha$, то, исходя из замечания 1 к теореме 4.1, сформулированной в работе [44], имеем транскритическую бифуркацию при $R_0 = 1$, а неподражаемое эндемическое равновесие локально асимптотически устойчиво

благодаря $R_0 > 1$. Таким образом, мы завершаем доказательство.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность главному редактору, секретарю редакции и рецензентам за поддержку и конструктивные замечания при доработке статьи.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Huang, Y. Wang, X. Li, et al., Lancet **395** (10223), 497 (2020).
2. N. Zhu, D. Zhang, W. Wang, et al., N. Engl. J. Med. **382**, 727 (2020).
3. *National Health Commission of the People's Republic of China*, http://www.nhc.gov.cn/xcs/yqfkdt/202004/be27dc3c4a9544b081e2233537e762c3.shtml. Accessed April 02, 2020.
4. A. B. Gumel, S. Ruan, T. Day, et al., Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B: Biological Sciences **271** (1554), 2223 (2004).
5. W. Li, M. J. Moore, N. Vasilieva, et al., Nature **426** (6965), 450 (2003).
6. R. J. Groot, S. C. Baker, R. S. Baric, et al., J. Virology **87** (14), 7790 (2013).
7. E. Wit, N. Doremalen, D. Falzarano, and V. J. Munster, Nature Rev. Microbiol. 14 (8), 523 (2016).
8. B. J. Cowling, M. Park, V. J. Fang, et al., Eur. Commun. Dis. Bull. **20** (25) (2015).
9. L. E. Gralinski and V. D. Menachery, Viruses **12** (2), 135 (2020).
10. *Centers for disease control and prevention: 2019 novel coronavirus*, https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov. Retrieved: 2020-03-10.
11. J. F.-W. Chan, S. Yuan, K. Kok, et al., Lancet **395** (10223), 514 (2020).
12. Z. J. Cheng and J. Shan, Infection **48** (2), 155 (2020).
13. *Coronavirus disease (COVID-19) Situation Dashboard* (World Health Organization, 2020), https://experience.arcgis.com/experience/685d0ace521648f8a5-beeeee1b9125cd. Retrieved: 2020-04-02.
14. *Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report – 73* (World Health Organization, 2020), https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/situation-reports/20200402-sitrep-73-covid-19.pdf?sfvrsn=5ae25bc7_2. Retrieved: 2020-04-02.
15. *Timeline of the 2020 coronavirus pandemic in India, 2020*, https://en.wikipedia.org/wiki/Timeline_of_the_2020_coronavirus_pandemic_in_India#January. Retrieved: 2020-04-02.
16. *Ministry of Health and Family Welfare* (Government of India, 2020), https://www.mohfw.gov.in/. Retrieved: 03.04.2020.
17. *2020 coronavirus pandemic in India, 2020*, https://en.wikipedia.org/wiki/2020_coronavirus_pandemic_in_India#cite_note-2-10. Retrieved: 03.04.2020.
18. *Statement on the second meeting of the international health regulations (2005) emergency committee regarding the outbreak of novel coronavirus (2019-ncov)* (Geneva: World health organization, 2020), https://www.who.int/, 2019. Retrieved: 2020-09-04.
19. C. Rivers, J. P. Chretien, S. Riley, et al., Nature Commun. **10** (1), 1 (2019).
20. G. Chowell, S. M. Bertozzi, M. A. Colchero, et al., N. Engl. J. Med. **361** (7), 674 (2009).
21. G. Chowell, S. Echevarria-Zuno, C. Viboud, et al., PLoS Med. **8** (5), e1000436 (2011).
22. C. Fraser, C. A. Donnelly, S. Cauchemez, et al., Science **324** (5934), 1557 (2009).
23. M. Lipsitch, T. Cohen, B. Cooper, et al., Science **300** (5627), 1966 (2003).
24. A. J. Kucharski, T. W. Russell, C. Diamond, et al., Lancet Infect Dis. **20**, 553 (2020).
25. B. Tang, X. Wang, Q. Li, et al., J. Clin. Med. **9** (2), 2 (2020).
26. T. Zeng, Y. Zhang, Z. Li, X. Liu, B. Qiu, ArXiv **2020**, 04945 (2020).
27. N. E. Huang and F. Qiao, Sci. Bull. **65** (6), 425 (2020).
28. S. Lai, I. Bogoch, N. Ruktanonchai, A. Watts, et al., medRxiv (2020). DOI: 10.1101/2020.02.04.20020479
29. K. Muniz-Rodriguez, G. Chowell, C. Cheung, et al., Emerging Infect. Dis. **26** (8), 1912 (2020).
30. *Nowcasting and Forecasting the Wuhan 2019-nCoV Outbreak*, https://les.sph.hku.hk/download/wuhan_exportation_preprint.pdf, 2020. Retrieved: 2020-04-09.
31. J. T. Wu, K. Leung, and G. M. Leung, Lancet, **395** (10225), 689 (2020).
32. J. M. Read, J. R. E. Bridgen, D. A. Cummings, et al., Phil. Trans. R. Soc. B **376**, 20200265 (2020). DOI: 10.1098/rstb.2020.0265
33. N. Imai, A. Cori, I. Dorigatti, et al., Report 3: transmissibility of 2019-ncov. Reference Source (2020).

34. V. Volpert, M. Banerjee, and S. Petrovskii, Math. Model. Nat. Phenom. **15**, 24 (2020).
35. R. M. May, *Infectious diseases of humans: dynamics and control* (Oxford University Press, 1991).
36. O. Diekmann and J. A. P. Heesterbeek, *Mathematical epidemiology of infectious diseases: model building, analysis and interpretation* (John Wiley & Sons, 2000), vol. 5.
37. H. W. Hethcote, SIAM Rev. **42** (4), 599 (2000).
38. S. Sharma and G. P. Samanta, J. Biol. Syst. **22**, 1 (2014).
39. R. M. Anderson and R. M. May, Nature **280**, 361 (1979).
40. F. Brauer and C. Castillo-Chavez, *Mathematical Models in Population Biology and Epidemiology* (Springer, Berlin, 2001).
41. P. Van Den Driessche and J. Watmough, Math. Biosci. **180**, 29 (2002).
42. F. Nyabadza and S. D. Hove-Musekwa, Math. Biosci. **225**, 132 (2010).
43. L. Arriola and J. Hyman, *Lecture notes, Forward and adjoint sensitivity analysis: with applications in Dynamical Systems, Linear Algebra and Optimization* (Mathematical and Theoretical Biology Institute, 2005).
44. C. Castillo-Chavez, Z. Feng, and W. Huang, In *Mathematical Approaches for Emerging and Reemerging Infectious Diseases: An Introduction* (Springer-Verlag, New York, 2002), pp. 229–250.
45. J. Carr, *Applications of Center Manifold Theory* (Springer-Verlag, New York, 1981).
46. C. Castillo-Chavez and B. Song, Math. Biosci. Engineer. **1** (2), 361 (2004).
47. *Coronavirus disease (covid-19) outbreak*, https://www.who.int/emergencies/diseases/novelcoronavirus-2019. Retrieved: 2020-04-14.
48. *Indian Council of Medical research, 2019*, https://www.icmr.nic.in/. Retrieved: 2020-04-14.
49. Knoema, https://knoema.com/atlas/India/Birth-rate. Retrieved: 2020-04-08.

Mathematical Analysis of a COVID-19 Epidemic Model by using Data Driven Epidemiological Parameters of Diseases Spread in India

D. Pal*, D. Ghosh, P.K. Santra***, and G.S. Mahapatra****

**Chandrahati Dilip Kumar High School, Chandrahati 712504, West Bengal, India*

***National Institute of Technology Puducherry, Karaikal-609609, India*

****Maulana Abul Kalam Azad University of Technology, Kolkata-700064, India*

This paper attempts to describe the outbreak of SARS-CoV 2 (COVID-19) via an epidemic model. This virus has dissimilar effects in different countries. The number of new active coronavirus cases is increasing gradually across the globe. India is now in the second stage of COVID-19 spreading, it will be an epidemic very quickly if proper protection is not undertaken based on the database of the transmission of the disease. This paper is using the current data of COVID-19 for the mathematical modeling and its dynamical analysis. We bring in a new representation to appraise and manage the outbreak of infectious disease COVID-19 through SEQIR pandemic model, which is based on the supposition that the infected but undetected by testing individuals are send to quarantine during the incubation period. During the incubation period if any individual be infected by COVID-19, then that confirmed infected individuals are isolated and the necessary treatments are arranged so that they cannot taint the other residents in the community. Dynamics of the SEQIR model is presented by basic reproduction number R_0 and the comprehensive stability analysis. Numerical results are depicted through apt graphical appearances using the data of five states and India.

Keywords: novel coronavirus, SEQIR model, reproduction number, lockdown, stability

EDN: HNJCJQ
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 319–326

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.3

КРАТКИЙ ОБЗОР СОВРЕМЕННОГО СОСТОЯНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СЛАБЫХ МАГНИТНЫХ ПОЛЕЙ

© 2022 г. И.А. Шаев, В.В. Новиков*, Е.В. Яблокова, Е.Е. Фесенко

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

E-mail: docmag@mail.ru

Поступила в редакцию 27.12.2021 г.
После доработки 27.12.2021 г.
Принята к публикации 30.12.2021 г.

Представлены некоторые современные тенденции развития исследований в области эффектов и механизмов биологического действия слабых и сверхслабых постоянных, низкочастотных переменных и комбинированных магнитных полей, а также полей радиочастотного диапазона в сочетании с постоянным магнитным полем. В числе прочих рассмотрены результаты ряда экспериментальных работ с использованием напряженности магнитного поля значительно ниже окружающего магнитного поля Земли (в том числе с интенсивностями, близкими к нулю), в которых были обнаружены интересные и несколько неожиданные эффекты. Данные приведены с учетом материалов совместного ежегодного собрания Общества биоэлектромагнетизма и Европейской ассоциации биоэлектромагнетизма «BioEM 2021» (26–30 сентября 2021 г., Гент, Бельгия).

Ключевые слова: слабые магнитные поля, свободные радикалы, активные формы кислорода, кровь, нейтрофилы, злокачественные новообразования.

DOI: 10.31857/S0006302922020144

Неоднократно отмечалось, что изменения активности свободных радикалов, включая уровни внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) и азота (АФА), эндогенных антиоксидантных ферментов и соединений, которые поддерживают физиологические концентрации свободных радикалов в клетках, являются одними из наиболее заметных эффектов воздействия слабого магнитного поля (МП) [1–3]. Эти изменения влияют на многие физиологические функции [1] и могут приводить к повреждениям ДНК [4, 5], модифицировать иммунные и воспалительные реакции [6], влиять на пролиферацию и дифференцировку клеток [7, 8] и результаты лечения ран [9], нервно-электрическую активность [10] и поведение [11]. Однако до последнего времени не было разработано приемлемой и общепринятой надежной гипотезы или механизма, которые могли бы адекватно объяснить все наблюдаемые эффекты постоянного и низкочастотного переменного магнитных полей на свободнорадикальные процессы.

Сокращения: АФК – активные формы кислорода, АФА – активные формы азота, МП – магнитное поле, ГМП – геомагнитное поле, ЭМП – электромагнитное поле, ПМП – постоянное магнитное поле.

Реактивные свободные радикалы (в основном АФК и АФА) образуются в результате клеточного метаболизма, особенно в митохондриях, а также оксидазами клеточных и внутриклеточных мембран. АФК включают в основном синглетный кислород, супероксид, пероксиды и гидроксильный радикал. АФА включают пероксинитрит, который является продуктом реакции между оксидом азота и супероксидом, и диоксид азота, а сам оксид азота генерируется в клетке соответствующими синтазами. В нормальных условиях уровень свободных радикалов контролируется различными индуцибельными антиоксидантными ферментами, прежде всего супероксиддисмутазой, каталазой и глутатионпероксидазой.

Современные, разрабатываемые в настоящий момент теоретические подходы указывают на то, что теоретический порог в 100 мкТл для срабатывания механизма радикальных пар в низкочастотных переменных или постоянных МП, определенный на основе принятых ранее, но, как оказалось, сильно упрощенных расчетов [12], завышен приблизительно на два порядка [13]. Выяснилось, что в этих устаревших расчетах не учитывались резонансные переходы между состояниями, созданными электронными и ядерными моментами, показавшими сильную связь именно

в случае слабых внешних МП порядка геомагнитного поля (ГМП) – 30–65 мкТл [13, 14]. В слабом поле связь между ядрами, ядрами и электронами, а также зеемановские сдвиги в уровнях энергии электронов и ядер могут привести к переходам с резонансами, охватывающими частоты от нескольких герц до мегагерцовой области [13, 15]. В рамках этой концепции предполагается, что активность переменного МП в области частот в диапазоне от единиц до десятков Гц может быть обусловлена изменением связи ядерных магнитных моментов протонов друг с другом. Связь протонных спинов в больших биологических молекулах используется в ЯМР-экспериментах, чтобы помочь понять структуру этих молекул [16]. Резонансные частоты для этих связей обычно составляют от 1 до 20 Гц [13]. Обнаруженная экспериментально высокая чувствительность к изменению скорости роста клеток фибросаркомы для приложенного магнитного поля с частотой 16 или 17 Гц при 9.8 мкТл указывает на долгое время жизни связи между протонами в большой биологической молекуле. Активность поля в мегагерцовом диапазоне может быть связана с уровнем сверхтонкой энергии, которая генерируется за счет связи между ядерными спинами и магнитным моментом электронов. Для сверхтонких переходов в магнитных полях Земли частоты обычно находятся в диапазоне 1–20 МГц, для ядерных спинов они меньше нескольких килогерц [13, 17]. Здесь удобно рассматривать как электронные, так и ядерные спины, имеющие как синглетные (S), так и триплетные (T) состояния. Квантовые числа, характеризующие спиновые состояния, обычно кратны ½. Состояния T+ и T- настраиваются по частоте с магнитным полем, а состояния To и S – нет.

Динамика обнаруживаемых экспериментально эффектов МП находит удовлетворительное объяснение при учете того, что с биологической точки зрения сдвиги в радикальных концентрациях в организме всегда стремятся быть компенсированы обратной связью за счет активизации антиоксидантных систем [18]. Для разных биологических объектов возникающие временные задержки в компенсации концентрации радикалов имеют разную длительность, поэтому значительные и воспроизводимые последствия действия МП могут быть, по-видимому, зарегистрированы при определенных временных режимах действия поля, на идентичных объектах, и при соблюдении прочих условий экспериментов. Не всегда могут быть показательными результаты опытов на культурах клеток, приспособленных для культивирования вне организма в достаточно жестких условиях стандартных биологических инкубаторов, которые сами являются источниками сильных магнитных помех [19]. Подобные объекты, уже в силу своей приспособленности к действию внешних МП, могут иметь малые времена компенсации концентраций радикалов, особенно если уровни продукции АФК находятся вблизи их физиологических значений. В этой связи перспективны исследования действия МП на нативных тканях (приспособленных к жизнедеятельности в условиях слабого ГМП), в частности, на крови [20, 21] и на ее клеточных компонентах, в том числе фагоцитирующих клетках – нейтрофилах (одних из основных продуцентов АФК в крови), при их кратковременной инкубации вне организма в определенных (создаваемых и четко контролируемых) магнитных условиях [22–24]. На этих объектах удалось получить устойчивые и выраженные результаты влияния изменений параметров магнитного поля (комбинированных МП; «нулевого», постоянного и импульсного МП) на продукцию АФК [25–28], что позволяет исследовать биофизические молекулярные механизмы действия этого физического фактора [29–31].

В настоящее время считается, что одними из наиболее вероятных мишеней физического механизма рецепции слабых МП являются процессы рекомбинации радикальных пар, скорость которых варьируется в зависимости от индукции поля, в присутствии которого эти процессы происходят [13, 32]. В связи с вышеизложенным представляется, что этот механизм широко распространен в биологических объектах и реализуется в различных радикальных парах, детальные характеристики которых еще только предстоит изучить. В частности, эта широко принятая, но пока не полностью доказанная модель используется при объяснении магниточувствительности у птиц [33, 34]. Одним из слабых мест этой модели является то, что теория предсказывает недостаточную силу эффекта для того, чтобы он проявился на макроскопическом уровне, поскольку его влияние должно подавляться внутренним электрон-электронным дипольным взаимодействием [35, 36]. Классическая модель этого механизма предполагает наличие двух геминальных молекулярных радикалов, появляющихся в результате распада молекулярного предшественника либо в результате фотовозбуждения, либо каскада реакций, не зависящих от света. Эта радикальная пара изначально представляет собой две физически разделенные молекулы с скоррелированными спинами в общем синглетном состоянии. Из этого синглетного состояния пара может эволюционировать во времени под действием локальных магнитных взаимодействий, которые модулируют ее мультиплетность (переход из синглетного в триплетное состояние и обратно) и, следовательно, вероятность ее рекомбинации. Эта динамика опосредована эффектом Зеемана (появлением новых энергетических подуровней в МП) в сочетании с локальными изменениями магнитного поля, возникающими в результате

действия сверхтонких взаимодействий. Таким образом, сверхтонкие взаимодействия электронов с ядрами являются основным драйвером синглет-триплетного взаимопревращения в данной модели. Анизотропия этих взаимодействий (электронно-ядерная дипольная связь) накладывает отпечаток направленности на магниточувствительные характеристики этого процесса, обеспечивая теоретическую основу «эффекта компаса», позволяющего находить требуемое направление движения в пространстве (ориентирование по магнитному полю птиц, насекомых и т. д.). Согласно этой модели, химическая чувствительность к индукции и направлению окружающего магнитного поля возникает в фоторецепторном белке криптохроме, расположенном в сетчатке глаз, где спиновая динамика модулирует долю радикальных пар, которые рекомбинируют, не затрагивая пары, «избегающие» рекомбинации вследствие принятия ими структурно отличного состояния (например, посредством изменения молекулярной конформации). Таким образом, формируется датчик, который нечувствителен к полярности поля, а реагирует на узкий (но регулируемый) диапазон напряженности магнитного поля. Этот датчик зависит от света (хотя этап магниторецепции может быть и фотонезависимым), и дает сбой при действии слабых радиочастотных электромагнитных полей. Таким образом, например, может функционировать специальный рецептор у некоторых перелетных птиц, который совмещен со зрением так, что птица способна «видеть» изменения МП величиной порядка 1/1000 от ГМП, и ориентироваться по магнитному рельефу Земли [32].

Альтернативный сценарий развития магнитобиологических эффектов сформулирован в теоретических работах В.Н. Бинги [37–39], который считает, что основной интерес магнитобиологов может быть связан с неспецифическими (не зависимыми от специальных рецепторов) магнитными эффектами, наблюдающимися у множества организмов – от простейших и грибов до насекомых, растений, рыб, животных и человека [40]. В этом сценарии, в отличие от механизма радикальных пар, внешнее МП меняет динамику одиночного магнитного момента относительно выделенного направления, заданного его локальным биофизическим окружением. В этом случае наиболее существенные изменения в динамике магнитных моментов могут происходить в «нулевом» МП, когда зазор между расщепленными зеемановскими подуровнями магнитных моментов становится сравним с шириной самих уровней. Возможных мишеней, обладающих одиночным магнитным моментом, в организме немного, это – электрон, протон, магнитные ядра и орбитальный момент электрона. Гиромагнитные отношения и времена жизни у всех этих потенциальных мишеней действия МП существенно отличаются и часто известны по порядку величины для разных молекулярных окружений. Поэтому при наличии детально снятой экспериментальной зависимости величины эффекта от величины ослабленного остаточного постоянного МП в диапазоне, близком к «нулю», есть вероятность удачного расчета и определения мишени, ответственной за конкретный магнитобиологический эффект. В этой связи можно упомянуть результаты наших экспериментов по действию ослабленного постоянного МП на продукцию АФК нейтрофилами, в которых действительно выявлена анизотропия ответа в зависимости от величины остаточного постоянного МП [27, 41, 42]. Можно надеяться, что при наличии более детальной экспериментально определенной зависимости такие расчеты удастся произвести и определить соответствующие первичные мишени этого магнитобиологического эффекта.

Следует иметь в виду, что свободные радикалы нельзя считать единственным механизмом, с помощью которого постоянное и переменное МП влияют на жизнеспособность клеток. Могут быть задействованы и другие механизмы, например активация сигнального пути ERK1/2 [43], или механизмы, связанные с белками теплового шока [44]. Было предположено, что прямая цель слабого электромагнитного поля (ЭМП) – датчик напряжения, который в нормальной физиологии контролирует открытие VGCC (потенциал-управляемых кальциевых каналов) в ответ на частичную деполяризацию через плазматическую мембрану [45]. Четыре различных класса VGCC активируются в ответ на воздействие ЭМП низкого уровня: VGCC L-типа, T-типа, N-типа и P/Q-типа [45]. Управляемые напряжением натриевые, калиевые и хлоридные каналы, каждый из которых контролируется аналогичным датчиком напряжения, также активируются при воздействии ЭМП низкой интенсивности. Белковая молекула потенциал-зависимого кальциевого канала содержит четырехдоменную структуру, в которой каждый домен несет α-спираль, обозначаемую как спираль S4, содержащую пять положительных зарядов. Эти четыре заряженных α-спирали действуют вместе как так называемый датчик напряжения, структура, которая реагирует на электрические изменения на плазматической мембране, открывая канал. Структура и расположение датчика напряжения, а также использование законов Кулона и Ома предсказывают, что силы ЭМП, действующие на датчик напряжения, велики, примерно в 7.2 миллиона раз сильнее, чем силы, действующие на однозначно электрически заряженные группы в водных частях наших клеток. Управляемые потенциалом натриевые, калиевые и хлоридные каналы, по-видимому, играют лишь второстепенную роль в создании эф-

фектов ЭМП, так что в первом приближении эффекты можно объяснить преимущественной активацией VGCC и последующим увеличением внутриклеточного кальция. Это объясняет, почему датчик напряжения может являться основной прямой мишенью ЭМП. Большое количество нетепловых патофизиологических эффектов ЭМП можно объяснить действием активации VGCC, вызванного двумя различными путями – сигнальным путем кальция и путем пероксинитрит/свободные радикалы/окислительный стресс/воспаление. Статические МП могут действовать через датчик напряжения, чтобы активировать VGCC и, по-видимому, другие потенциалзависимые ионные каналы. Статические МП не создают сил на статические электрически заряженные объекты, но плазматические мембраны клеток постоянно перемещаются, и поэтому датчики напряжения VGCC, расположенные в плазматической мембране, также движутся, так что статические МП могут создавать изменяющиеся во времени силы на заряды датчика напряжения VGCC. Эти возможности явно повышают вероятность того, что сильно проникающие, изменяющиеся во времени магнитные поля, полученные от ММ-волн или других частотных ЭМП, включая чрезвычайно высокие плотности модулирующих импульсов ЭМП, могут иметь очень высокую активность при воздействии непосредственно на 20 положительных зарядов в датчике напряжения VGCC, что приведет к активации данного канала.

Авторы работы [46] представили еще одну гипотезу о биологическом аспекте взаимодействия низкочастотных магнитных полей и клеток. Мембранный белок эндоплазматического ретикулума STIM1, который функционирует как датчик для нескольких клеточных состояний (низкие уровни Ca^{2+}, повышение температуры, повышенные уровни кислородных радикалов, гипоксия), является, по их мнению, перспективным кандидатом на роль МП-сенсора. Такая сенсорная функция может быть либо прямой (через локальное повышение температуры, вызванное внутриклеточными электрическими полями), либо косвенной из-за реакции на повышенные уровни АФК. Активированный STIM1 приводит к последующим эффектам за счет активации процессов передачи сигнала и изменений в экспрессии генов, приводящим к вторичным событиям. Природа этих изменений будет зависеть как от типа клетки, так и от конкретного физиологического состояния, которое клетка демонстрирует во время активации STIM1. Предполагается, что окислительные процессы, запускаемые МП, играют ключевую роль в биологической эффективности этого воздействия. Пока неизвестно, содержит ли STIM1 эпитопы, которые предполагают наличие магнитных дипольных моментов и в связи с этим определяют его особую магниточувствительность. Эта модель, по-видимому, могла бы быть использована для объяснения уже обнаруженных эффектов действия слабых комбинированных МП на повышение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в нейтрофилах [29, 30], которое реализуется за счет выхода ионов кальция из внутриклеточных депо (например, из эндоплазматического ретикулума), и не связано с увеличением проницаемости клеточной мембраны для внешних ионов Ca^{2+}.

В наших недавних работах были представлены результаты влияния гипомагнитных условий [24, 27, 41, 42] и комбинированных магнитных полей [22, 23] на продукцию АФК перитонеальными нейтрофилами мыши. Как более простая модель, отвечающая на воздействие гипомагнитных условий, использовались неактивированные клетки, что позволило исключить из рассмотрения дополнительные факторы, связанные с перестройкой метаболического режима работы нейтрофила при его химической стимуляции активаторами респираторного взрыва [24, 41, 42]. По итогам применения двух методов – флуоресцентного анализа с использованием 2,7-дихлоргидрофлуоресцеина и дигидрородамина 123, а также активированной хемилюминесценции с люцигенином (относительно селективный зонд на супероксид-анион) – было выявлено снижение внутриклеточной продукции АФК в гипомагнитных условиях [27]. В частности, инкубация суспензии нейтрофилов в гипомагнитных условиях (менее 0.02 мкТл) приводила к существенному снижению интенсивности ее люцигенин-зависимой хемилюминесценции (приблизительно на 30%). При увеличении индукции постоянного поля до 2.5 мкТл этот эффект исчезал, но снова появлялся в точке 7.0 мкТл и наблюдался вплоть до значений 30 и 44 мкТл, при которых результаты уже не отличались от контрольных значений (в ГМП с постоянным МП 44 мкТл) [27, 41]. Аналогичные данные получены и методом флуоресцентного анализа с использованием 2,7-дихлоргидрофлуоресцеина [27, 42].

С целью конкретизации клеточного локуса, отвечающего за магнитозависимость продукции АФК в нейтрофилах при действии гипомагнитных условий, был проведен ингибиторный анализ, продемонстрировавший перспективность рассмотрения митохондрий в качестве искомого локуса, поскольку разобщитель окислительного фосфорилирования 2,4-динитрофенол в диапазоне концентраций 5–200 мкМ приводил к почти полному нивелированию различий между контрольными и экспериментальными образцами, в отличие от дифенилиодония (ингибитора НАДФН-оксидазы), эффект которого при концентрациях от 2.5 до 100 мкМ заключался в сни-

жении продукции АФК как в контроле, так и в опыте [42].

Напротив, возможную роль НАДФН-оксидазы как конечного звена системы магниточувствительной АФК-продукции выявили эксперименты с активированными нейтрофилами при действии комбинированных МП [22]. Так, люминол-зависимый хемилюминесцентный сигнал значительно усиливался в суспензии нейтрофилов, предварительно подвергнутых воздействию слабого статического поля (42 мкТл) и коллинеарного ему низкочастотного поля (сумма частот 1.0, 4.4 и 16.5 Гц, индукция 0.86 мкТл, экспозиция 1 ч), в ответ на стимуляцию бактериальным пептидом fMLF или сложным эфиром форбола PMA [22]. Этим же методом был продемонстрирован и противоположный эффект снижения интенсивности респираторного взрыва в суспензии нейтрофилов в ответ на активатор fMLF, но при использовании других параметров комбинированных МП (постоянная компонента 60 мкТл и коллинеарное ей переменное низкочастотное магнитное поле с частотой 49.5 Гц и с индукцией в диапазоне 60–180 нТл, при 40-минутной экспозиции) [23].

Эксперименты в данной области важны не только по причине значительного количества «белых пятен» относительно понимания эффектов и механизмов влияния слабых МП на нейтрофилы, но и ввиду особой роли, которую играют эти клетки в иммунном ответе. Являясь самой мобильной фракцией иммунокомпетентных клеток, нейтрофилы первыми оказываются в очаге воспаления, занимая позицию начального звена в цепи защитных реакций организма [47]. Поэтому воздействием МП на эти клетки можно добиться изменений в основных характеристиках неспецифического иммунитета, а также общей иммунореактивности, и направить вектор этих изменений в сторону оптимизации иммунного ответа.

В 2021 г. на семинаре по постоянным и низкочастотным переменным магнитным полям совместного ежегодного собрания Общества биоэлектромагнетизма и Европейской ассоциации биоэлектромагнетизма «BioEM 2021» (26–30 сентября 2021 г., Гент, Бельгия) были относительно широко представлены работы по действию этих полей на раковые клетки [48]. Исследования терапевтического потенциала слабых постоянных МП (ПМП) в отношении раковых клеток были проведены в работе [49]. В ранних экспериментах этими же авторами был обнаружен эффект ускорения деления клеток нейробластомы человека с одновременным снижением их подвижности, достигнутый экранированием ГМП (индукция составляла <200 нТл) [50, 51]. Однако механизм этого воздействия трудно было определить в отсутствие специального молекулярного маркера. Поэтому на следующем этапе была изучена роль теломеразы, поскольку этот фермент является одним из ключевых для опухолевых клеток, так как его работа лежит в основе главной особенности последних – отсутствии предела Хейфлика. Также кроме своей классической роли, заключающейся во влиянии на длину теломер, теломераза связана с миграцией раковых клеток – сверхэкспрессия ее субъединицы TERT (обратная транскриптаза теломеразы) способствует миграции клеток, тогда как снижение экспрессии приводит к снижению миграции и способности к адгезии [52, 53]. При оценке влияния умеренного ПМП (~150 мТл) на клетки рака молочной железы 4T1 было обнаружено ускорение пролиферации клеток, ингибирование их миграции, снижение активности теломеразы и экспрессии TERT. В частности, количество клеток в опыте было таким же, как и в контроле через 24 ч экспозиции и выше через 48 ч (11.02%), достигнув значительного увеличения через 72 ч (19.28%). Эффективность миграции клеток в опыте составила 71.68% от контрольных значений после 24-часовой экспозиции. В качестве гипотезы для объяснения этого эффекта авторами рассматривалась возможность роста экспрессии e2f1, репрессора транскрипции TERT и положительного регулятора митотического клеточного цикла. Несмотря на то, что в более ранних исследованиях ПМП играло роль ускорителя пролиферации клеток 4T1 [54, 55], данный результат не является парадоксальным, поскольку эффекты ПМП в значительной степени зависят от типов клеток и параметров самого поля [56]. Прикладная перспективность этих результатов может заключаться в повышении эффективности некоторых химиотерапевтических препаратов именно против быстро делящихся клеток. Таким образом, было показано, что теломеразная сеть реагирует на ПМП и может выступать в качестве мишени при магнитотерапии рака груди. В дальнейших исследованиях предполагается определить конкретные параметры магнитных условий с целью сокращения теломер до критической длины и остановки деления, что должно привести к старению опухолевых клеток.

В работе [57] были выявлены эффекты слабых статических магнитных полей на клетки фибросаркомы человека HT-1080. Опытные образцы подвергали воздействию этих полей в течение четырех суток подряд, индукция постоянного МП варьировалась от 0.5 до 600 мкТл, для контроля значение этого параметра сохранялось на уровне 45 мкТл (что соответствовало ГМП). Было показано, что относительные скорости роста клеток меняются в зависимости от величины магнитной индукции. Увеличение индукции поля приводило к возрастанию концентрации митохондриального кальция, росту значений мембранного потенциала и снижению внутриклеточного pH.

Концентрация пероксида водорода увеличивалась при 100 и 200 мкТл, уменьшалась при 300 и 400 мкТл и снова увеличивалась при 500 и 600 мкТл. В целом интенсивность окислительного стресса немного увеличивалась с ростом индукции ПМП, в то время как концентрации супероксид-аниона и NO уменьшались. Эти результаты показывают, что слабое статическое МП может ускорять или ингибировать скорость роста опухолевых клеток фибросаркомы HT-1080 и вызывать изменения в концентрации АФК, что в конечном итоге оказывает влияние на различные функции клеток, при этом приток кальция в митохондрии был одним из первых шагов в соответствующих изменениях.

Авторы работы [58] сообщили, что вероятно белки с железно-серными кластерами в цепи переноса электронов в митохондриях являются одними из важных молекул, взаимодействующих с внешними статическими и радиочастотными магнитными полями согласно модели радикальных пар. Было исследовано влияние радиочастотных МП на частотах от 1 до 10 МГц в сочетании с ПМП на рост клеток, внутриклеточный pH, мембранный потенциал, концентрации перекиси водорода и митохондриального кальция. Объектом исследования выступали клетки фибросаркомы человека HT-1080, подвергавшиеся воздействию этих полей в течение четырех суток. Полученные результаты показали, что рост клеток и значения мембранного потенциала зависят от частоты поля, в то время как концентрация митохондриального кальция не демонстрирует значительных изменений. Также радиочастотные поля имеют тенденцию уменьшать концентрацию перекиси водорода. Авторы полагают, что радиочастотное поле в сочетании со статическим МП может изменять выход продукта реакции, если оно находится в резонансе с расщеплением уровней энергии, возникающим в результате сверхтонкого и зеемановского взаимодействий. Компартментом, отвечающим за магниторецепцию, может выступать митохондриальная сеть, которая в этом случае функционирует как система передачи сигналов с частотной и амплитудной модуляцией, а также является чувствительной к различным физиологическим переменным, таким как концентрация АФК. Считается, что комплексы I и III цепи переноса электронов в митохондриях являются основными источниками продукции этих АФК. Комплекс I содержит наибольшее количество железо-серных кластеров, большинство которых обладают парамагнитными свойствами и имеют относительно высокие спиновые состояния. Хотя Fe-S-кластеры в основном известны как переносчики электронов, они присутствуют в активных центрах многих ферментов, обеспечивая также ряд таких функций, как инициирование и стабилизация радикальных цепных реакций. Показано, что различные Fe-S-кластеры, интегрированные в белковую структуру, могут обеспечивать сверхтонкое взаимодействие в диапазоне частот от 2.15 МГц до 3.85 МГц [58].

Обобщая итоги исследований, представленных по тематике противоопухолевых эффектов МП на семинаре в Генте, можно считать, что есть основания для умеренного оптимизма в отношении противоопухолевого потенциала магнитотерапевтических методов, что согласуется с выводами, сделанными в других работах в этой области [6, 59–61].

В заключение следует отметить, что превалирование в настоящий момент экспериментальных и теоретических подходов к анализу механизмов биологического действия слабых МП, основанных на принципах спиновой химии, не исключает, а скорее дополняет другие направления работ в этой области [62–70].

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Lai, Electromagn. Biol. Med. **38**, 231 (2019).
2. H. Wang and X. Zhang, Int. J. Mol. Sci. **18**, 2175 (2017).
3. B. Zhang and L. Tian, Bioelectromagnetics **41** (8), 573 (2020).
4. G. Giorgi, C. Pirazzini, M. G. Bacalini, et al., Radiat. Environ. Biophys. **56**, 193 (2017).
5. V. V. Novikov, V. O. Ponomarev, G. V. Novikov, et al., Biophysics (Moscow) **55**, 565 (2010).
6. E. G. Novoselova, V. V. Novikov, S. M. Lunin, et al., Electromagn. Biol. Med. **38** (1), 74 (2019).
7. A. V. Van Huizen, J. M. Morton, L. J. Kinsey, et al., Sci. Adv. **5**, eaau7201 (2019). DOI: 10.1126/sciadv.aau7201.
8. V. V. Novikov, I. M. Sheiman, and E. E. Fesenko, Bioelectromagnetics **29**, 387 (2008).
9. M. Jedrzejczak-Silicka, M. Kordas, M. Konopacki, and R. Rakoczy, Int. J. Mol. Sci. **22** (11), 5785 (2021). DOI: 10.3390/ijms22115785.
10. F. Barnes and B. Greenebaum, Bioelectromagnetics **41**, 213 (2020).
11. N. V. Bobkova, V. V. Novikov, N. I. Medvinskaya, et al., Electromagn. Biol. Med. **37** (3), 127 (2018).
12. R. K. Adair, Bioelectromagnetics **20**, 255 (1999).

13. F. S. Barnes and B. Greenebaum, Bioelectromagnetics **36**, 45 (2015).
14. V. O. Ponomarev and V. V. Novikov, Biophysics **54**, 163 (2009).
15. F. Barnes and B. Greenebaum, Bioelectromagnetics **41**, 392 (2020).
16. C. A. G. Haasnoot, F. A. A. M. de Leeuw, and C. Altona, Tetrahedron **36** (19):2783 (1980).
17. F. Barnes and B. Greenebaum, Environ. Res. **163**, 165 (2018).
18. F. Barnes and S. Kandala, Bioelectromagnetics **39**, 249 (2018).
19. L. Portelli, T. Schomay, and F. Barnes, Bioelectromagnetics **34**, 337 (2013).
20. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика 60 (3), 530 (2015).
21. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **61** (1), 126 (2016).
22. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **61** (3), 510 (2016).
23. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **65** (1), 97 (2020).
24. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика 63 (3), 484 (2018).
25. V. V. Novikov, E. V. Yablokova, and E. E. Fesenko, Electromag. Biol. Med. **39**, 364 (2020).
26. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика **66** (3), 511 (2021).
27. V. V. Novikov, E. V. Yablokova, and I. A. Shaev, IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. **853**, 012008 (2021). DOI: 10.1088/1755-1315/853/1/012008
28. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, А. П. Кадырков и Е. Е. Фесенко, Биофизика **66** (4), 724 (2021).
29. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **62** (3), 547 (2017).
30. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, Г. В. Новиков и Е. Е. Фесенко, Биофизика **62** (5), 926 (2017).
31. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова и Е. Е. Фесенко, Биофизика **63** (2), 547 (2018).
32. P. J. Hore and H. Mouritsen, Annu. Rev. Biophys. **45**, 299 (2016).
33. R. Wiltschko and W. Wiltschko, BioEssays, **28**, 157 (2006).
34. R. Wiltschko and W. Wiltschko, J. R. Soc. Interface **16**, 20190295 (2019).
35. N. S. Babcock and D. R. Kattnig, J. Phys. Chem. Lett. **11**, 2414 (2020).
36. N. S. Babcock and D. R. Kattnig, JACS Au **11** (1), 2033 (2021). DOI: 10.1021/jacsau.1c00332
37. В. Н. Бинги, Биофизика **61** (1), 201 (2016).
38. V. N. Binhi and F. S. Prato, PLoS One **12** (6): e0179340 (2017).
39. V. N. Binhi and F. S. Prato, Bioelectromagnetics **38** (1), 41 (2017).
40. Т. К. Бреус, В. Н. Бинги и А. А. Петрукович, Успехи физ. наук **186** (5), 568 (2016).
41. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика **65** (2), 524 (2020).
42. В. В. Новиков, Е. В. Яблокова, И. А. Шаев и Е. Е. Фесенко, Биофизика **65** (4), 735 (2020).
43. L. Qiu, L. Chen, X. Yang, et al., J. Cell. Physiol. **234**, 7734 (2019).
44. O. Zeni, M. Simkó, and M. R. Scarfi, Front. Public Health **18**, 280 (2017).
45. M. L. Pall, J. Cell. Mol. Medicine **17**, 958 (2013).
46. M. Simkó and M. O. Mattsson, Med. Hypotheses **122**, 68 (2019).
47. А. Н. Маянский, Цитокины и воспаление **6** (3), 3 (2007).
48. *Abstr. of the Joint Annu. Meet. of the Bioelectromagnetics Society and the European Bioelectromagnetics Association (BioEM 2021)* (Ghent, Belgium. 2021), Workshop 3. Ultraweak and weak static, ELF, and RF field effects on biological systems, pp. 306–319.
49. Z. Fan, P. Hu, L. Xiang, et al., BioMed Res. Int. 2020, 7472618 (2020).
50. W. Mo, Y. Liu, P. Bartlett, and R. He, Sci. China: Life Sci. **57** (4), 448 (2014).
51. W. Mo, Z. Zhang, D. Wang, et al., Sci. Rep. **6** (1), 22624 (2016).
52. H. Liu, Q. Liu, Y. Ge, et al., Sci. Rep. **6** (1), 22886 (2016).
53. V. Maggisano, M. Celano, G. Lombardo, et al., Mol. Cell. Endocrinol. **448**, 34 (2017).
54. S. Tofani, D. Barone, M. Cintorino, et al., Bioelectromagnetics **22** (6), 419 (2001).
55. L. Zhang, J. Wang, H. Wang, et al., Oncotarget **7** (27), 41527 (2016).
56. L. Zhang, X. Ji, X. Yang, and X. Zhang, Oncotarget **8** (8), 13126 (2017).
57. H. Gurhan, R. Bruzon, S. Kandala, et al., Bioelectromagnetics **42**, 212 (2021).
58. H. Gurhan and F. Barnes, in *Abstr. of the Joint Annu. Meet. of the Bioelectromagnetics Society and the European Bioelectromagnetics Association (BioEM 2021)* (Ghent, Belgium. 2021), pp. 309–310.
59. X. Aoshu, Q. Wang, I. Xin, and T. Lin, Front. Oncol. **11**, 638146 (2021). DOI: 10.3389/fonc.2021.638146.
60. V. V. Novikov, G. V. Novikov, and E. E. Fesenko, Bioelectromagnetics **30**, 343 (2009).
61. L. Makinistian and I. Belyaev, in *Pulsed Electromagnetic Fields for Clinical Applications*, Ed. by M. S. Markov, J. T. Ryaby and E. I. Waldorff (Boca Raton. CRC Press. 2020), pp. 137–157.
62. V. V. Novikov and A. V. Karnaukhov, Bioelectromagnetics **18**, 25 (1997).
63. M. N. Zhadin, V. V. Novikov, F. S. Barnes, and N. F. Pergola, Bioelectromagnetics **19**, 41 (1998).
64. V. V. Novikov, E. V. Yablokova, and E. E. Fesenko, Appl. Sci. (Switzerland) **10** (9), 3326 (2020).

65. A. R. Liboff, Electromagn. Biol. Med. **39**, 45 (2020).
66. A. R. Liboff, C. Poggi, and P. Pratesi, Electromagn. Biol. Med. **36**, 154 (2017).
67. Н. А. Белова и В. А. Панчелюга, Биофизика **55** (4), 750 (2010).
68. 68. E. D'Emilia, L. Giuliani, M. Ledda, et al., Electromagn. Biol. Med. **36** (1), 55 (2017).
69. A. Pazur, Electromagn. Biol. Med. **37** (2), 100 (2018).
70. L. Makinistian, Sci. Rep. **9**, 7478 (2019).

A Brief Review of the Current State of Research on the Biological Effects of Weak Magnetic Fields

I.A. Shaev, V.V. Novikov, E.V. Yablokova, and E.E. Fesenko

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

This paper offers an overview of current research trends associated with the study of the effects and mechanisms of biological action of weak and extremely weak static, low-frequency alternating and combined magnetic fields, as well as radio-frequency fields in combination with a static magnetic field. Of a series of research works, examples are the results of experimental studies in which the levels of magnetic field strength were substantially lower than the magnetic field of Earth (and intensities tend toward "zero"), the effects were fascinating and somewhat unexpected. The information is presented tailored to the materials of the joint annual meeting of the Bioelectromagnetics Society and the European Bioelectromagnetics Association (BioEM 2021, September 26–30, 2021, Ghent, Belgium).

Keywords: weak magnetic fields, free radicals, reactive oxygen species, blood, neutrophils, malignant neoplasms

EDN: FEZXRT
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 327–332

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 632.9; 578.833.26.083.2

О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ МИКРОВОЛН НА ЧЛЕНИСТОНОГИХ

© 2022 г. Б.Л. Ихлов, И.Л. Вольхин, А.Ю. Ощепков

Пермский государственный национальный исследовательский университет, 614068, Пермь, ул. Букирева, 15

E-mail: okbmayak@psu.ru

Поступила в редакцию 17.09.2021 г.
После доработки 28.10.2021 г.
Принята к публикации 29.10.2021 г.

Целью работы было изучение воздействия слабых микроволн на жесткокрылых и паукообразных (жуки *Stegobium paniceum,* жуки *Nauphoeta cinerea* и клещи *Dermacentor silvarum*). Использовали высокочастотный генератор электромагнитного излучения, облучение проводили как при тепловом уровне плотности потока мощности (0.38 Вт/см^3), так и нетепловом уровне плотности потока мощности (0.25 мВт/см^3 и 0.17 Вт/см^3, время экспозиции – от двух десятков секунд до суток. Обнаружено, что сверхвысокочастотное поле за время экспозиции гарантированно уничтожает *Stegobium paniceum*, *Nauphoeta cinerea* и *Dermacentor silvarum*, слабое сверхвысокочастотное поле оказывает на жесткокрылых угнетающее действие, некоторые частоты поля с плотностью потока мощности 0.17 Вт/см^3 затормаживают развитие личинок, действие электромагнитного поля резонансной частоты приводит к гибели жесткокрылых и паукообразных.

Ключевые слова: резонанс, ДНК, мощность, энцефалит, температура.

DOI: 10.31857/S0006302922020156

Воздействие электромагнитного поля (ЭМП) на живые организмы достаточно изучено, широко известны, например, работы А.С. Пресмана, Ю.А. Холодова, А.З. Смолянской, Н.Д. Девяткова и др., однако механизм нетеплового воздействия сверхвысокочастотного (СВЧ) излучения еще слабо изучен. Неизвестно, например, почему одна и та же частота ЭМП действует на клещей, но не действует на насекомых. Так, установлено, что при облучении СВЧ ЭМП малых плотностей потока мощности (ППМ) в течение 5 с пчел, пораженных клещами *Varroa jacobsoni*, от 80 до 100% клещей осыпается с пчел [1]. То есть поле определенной частоты не действует на пчел, но негативно воздействует на клещей.

ЭМП в диапазоне частот 1–4 ГГц и с плотностью потока мощности 10–30 мкВт/см^2 вызывает задержку отрождения личинок из облученных яйцекладок, снижение активности и выживаемости отродившихся особей клеща *Hyalomma asiaticum* [2, 3]. При этом летальное действие нетеплового ЭМП частотой, входящей в диапазон резонансной для воды (2.45 ГГц), отсутствует. Установлено [4], что слабое крайне высокочастотное (КВЧ) ЭМП оказывает как стимулирующее, так и тормозящее воздействие, оно влияет на рост и развитие мучного хрущака *Tenebrio molitor*. Отмечено угнетающее действие низкоэнергетического модулированного СВЧ-излучения с несущими частотами 1 и 3 ГГц, а также широкополосного излучения с частотой 1–4 ГГц на клеща *Hyalomma asiaticum* [5]. СВЧ ЭМП влияет на обучение мучного хрущака [6].

Любопытно, что отдельная пчела реагирует на напряженность поля 1500 В/м, а группа из 100 насекомых – уже на 250 В/м [7].

Дрозофилы фруктовые располагаются по силовым линиям магнитного поля, а после замены гена *Cryl* теряют чувствительность к магнитным полям [8].

В исследованиях на *Drosophila melanogaster* выявлено снижение плодовитости и рост смертности при увеличением времени экспозиции в поле волн миллиметрового диапазона [9].

Также исследовано действие ЭМП на колорадского жука (*Leptinotarsa decimlineata*) при мощности излучателя 20 Вт на частоте 2.45 ГГц [10]. Облучали имаго жука, которые были помещены в специальные картонные емкости. Время обработки составляло 4–7 мин с интервалом 1 мин при расстоянии до жуков 10 см. После обработки жуков высаживали на картофель. После 4 мин обработки выживаемость жуков составляла 100%, после 7 мин – 70–80%. Активность самок после

Сокращения: ЭМП – электромагнитное поле, СВЧ – сверхвысокочастотный, ППМ – плотность потока мощности, КВЧ – крайне высокочастотный.

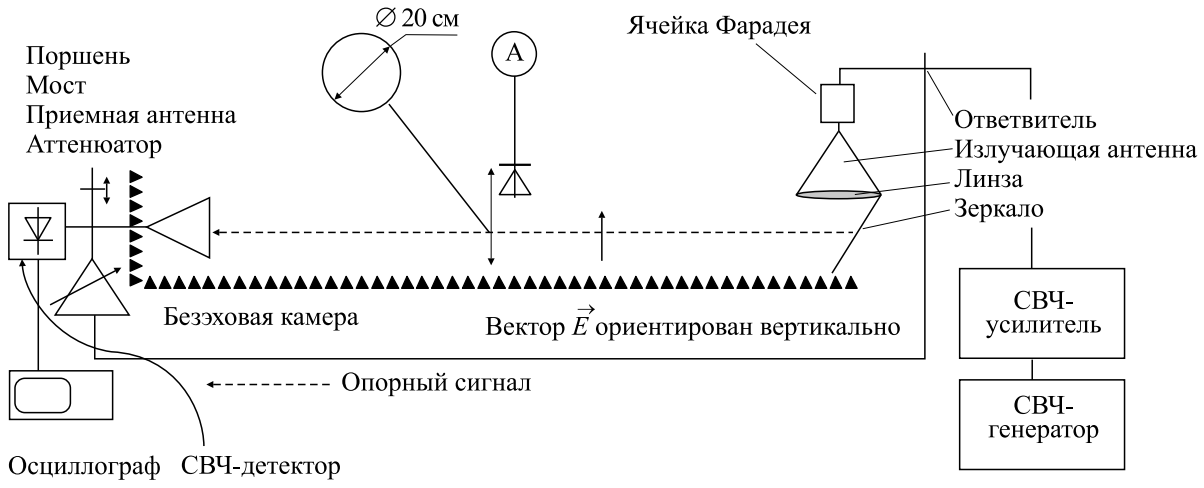


Схема экспериментальной установки.

4 мин обработки – 100%, после 7 мин – 50–80%, резко снижалась плодовитость самок. При температуре 40°С и низкой влажности в первые сутки после обработки СВЧ в течение 4 мин погибли 45% жуков, 5 мин – 45%, 6 мин – 55%, 7 мин – 60%. На вторые сутки погибли 100% при экспозиции 5, 6, 7 мин, при экспозиции 4 мин – 40%. После облучения вес жуков резко снижался (на 35–45%). Обработка самцов в течение 6–7 мин приводила к их полной стерильности.

Очевидно, что тепловой эффект играл роль, но не обязательно главную.

На сходном материале, долгоносике амбарном обыкновенном (*Sitophilus granarius*), был получен сходный результат в работе [10]. Авторы этой работы использовали ту же частоту (2.45 ГГц) и отмечают, что перегрев насекомых до 48–60°С приводит к гибели насекомых. Увеличение времени экспозиции зерна от 5 до 45–90 с повышало число погибших насекомых от 60 до 100%. Температура зерна при этом не превышала 45–50°С.

Авторы указывают, что «молекулярная структура носителей генетической информации представляет собой спиральный резонатор или цепочку большого количества сильно связанных колебательных контуров. В итоге воздействия ВЧ поля генетическая информация не может быть считана, что приводит к потере репродуктивной функции биологического объекта» ([10], сс. 130–131).

Это некорректно. Во-первых, если речь идет о токах в спирали ДНК, т.е. о паразитной емкости соленоида, то соответствующая частота, например, для ДНК человека составляет порядка 10^{24} Гц, что выходит далеко за пределы СВЧ-диапазона [11]. В-вторых, если речь идет о каких-либо механических колебаниях ДНК жуков, то их частота для этой ДНК, занимающей по длине промежуточное положение между ДНК бактерий и млекопитающих, далека от частоты 2.45 ГГц.

Объяснение механизмов действия СВЧ ЭМП на паукообразных и жесткокрылых актуально в связи с проблемой дезинсекции пищевых продуктов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для облучения хлебного точильщика использовали микроволновую печь (частота СВЧ ЭМП – 2.45 ГГц), облучение клещей и мраморных тараканов также осуществляли с помощью микроволновой печи (модель LG MW23R35GIB) и на специально созданной экспериментальной установке. Отбирали самок клещей, найденных 11.6.2021–18.6.2021 в лесу близ пос. Жебреи Пермского района.

Схема экспериментальной установки приведена на рисунке. Источником излучения являлся СВЧ-генератор E82570 1 (Agilent Technologies, США), для усиления сигнала до 1 Вт использовали усилитель мощности 82006A (Agilent Technologies, США). Сигнал с выхода усилителя через направленный ответвитель, ячейку Фарадея и коническую рупорную антенну с диэлектрической линзой падал на СВЧ-зеркало. Использование СВЧ-линзы формировало слаборасходящийся СВЧ-луч, после его отражения от СВЧ-зеркала начиналась *дальняя зона излучения*. В коаксиальном кабеле с выхода усилителя мощности распространялась волна ТЕМ, которая после коаксиально-волноводного перехода трансформировалась в волну H_{10}. Перед ячейкой Фарадея установлен переход с волновода прямоугольного сечения на волновод круглого сечения, в котором волна H_{10} преобразовывалась в волну H_{11}. Изменяя ток через обмотку соленоида ячейки Фарадея, можно

Таблица 1. Выживаемость *Stegobium paniceum* при облучении СВЧ ЭМП

Среда	В муке ♂	В хлебных изделиях ♀, ♂	В пробирке ♂
Число экспериментов	3	2	1
Число жуков	11	6	4
Время экспозиции, с	20	20	20
Наблюдаемый эффект: гибель, %	100	100	100

было изменять ориентацию вектора напряженности электрического поля внутри безэховой камеры. В экспериментах его ориентация была установлена вертикально. С помощью ориентации СВЧ-зеркала ось распространения СВЧ-луча установили горизонтально вдоль безэховой СВЧ-камеры.

Распределение СВЧ-мощности в вертикальной и горизонтальной плоскости было измерено в дополнительном эксперименте. СВЧ-диод, расположенный на тонком щупе, перемещали в вертикальной и горизонтальной плоскостях внутри безэховой СВЧ-камеры. При малой мощности СВЧ-сигнала детектор работал на квадратичном участке вольтамперной характеристики, и измеряемый ток был пропорционален мощности СВЧ-излучения в точке приема. Установлено, что распространяющийся вдоль безэховой камеры СВЧ-луч имел в сечении форму гауссова пучка. Его сечение на уровне половинной мощности было близко к кругу, диаметр которого составлял 20 см.

В эксперименте мощность излучения СВЧ-генератора составляла 0 дБм, что соответствует 1 мВт. Усиление усилителя мощности 30 дБ, таким образом мощность сигнала на выходе усилителя составляла 1 Вт. С учетом потерь в соединительных кабелях, волноводных переходах, 10% мощности, отведенной с направленного ответвителя, потерь в ячейке Фарадея, антенне, линзе, зеркале и выходе части излучения за пределы сечения луча на уровне половинной мощности плотность потока мощности СВЧ-излучения составляла примерно 2.5 мВт/см^2. В указанном сечении вектор напряженности электрического поля был ориентирован вертикально, его горизонтальная составляющая была менее 3%, поэтому в этой области СВЧ-излучение представляло волну H_{10}. Приемная пирамидальная СВЧ-антенна, используемая для контроля мощности, была сориентирована соосно СВЧ-лучу на прием вертикально поляризованной СВЧ-волны. Была использована мостовая схема измерения (опорный сигнал, аттенюатор, мост, поршень в проведенных исследованиях не использовали. Они были задействованы для обоснования расчетов плотности потока СВЧ-излучения в пределах сечения пучка половинной мощности).

В экспериментах пластиковый контейнер с облучаемыми клещами, прозрачный для СВЧ-излучения, размещали вместо щупа с диодом в центре пучка СВЧ-излучения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Воздействие СВЧ ЭМП на имаго хлебного точильщика *Stegobium paniceum* СВЧ ЭМП с частотой 2.45 ГГц и нетепловой ППМ 0.17 Вт/см^3, как показано в табл. 1, приводит к гибели жуков.

Другой тип жесткокрылых, мраморных тараканов *Nauphoeta cinerea*, облучали полем той же частоты при экспозиции 20 с при вариации объемной средней ППМ ЭМП.

Как видно из табл. 2, снижение подвижности жуков наблюдалось при достаточно низкой ППМ.

При увеличении ППМ до 0.38 Вт/см^3 при облучении в течение 20 с наблюдали гибель жуков вследствие теплового эффекта.

Для облучения ЭМП более высоких частот использовали вышеописанную экспериментальную установка. Плотность потока мощности устанавливали десятикратно меньше тепловой, 0.25 мВт/см^2. Жуков и клещей помещали в прозрачные пластиковые контейнеры с доступом воздуха. Время экспозиции составляло 24 ч. Температура в комнате – 20–23°С, во время эксперимента температура в контейнерах не отклонялась от комнатной. Изменения фиксировали через 20 суток наблюдений.

Таким образом, как видно из табл. 3 и 4, эффект воздействия и на клещей, и на мраморных тараканов резко усиливался при приближении к частоте 8.054 ГГц.

ОБСУЖДЕНИЕ

Очевидно, что в экспериментах при частоте 2.45 ГГц поле воздействует на кластеры воды в организмах жесткокрылых и паукообразных. Однако за 20 с водосодержащие фрагменты *Stegobium paniceum*и *Nauphoeta cinerea* не могут разогреться

Таблица 2. Реакция *Nauphoeta cinerea* на действие СВЧ ЭМП

Стадия развития	Имаго ♀	Имаго ♂	Личинка начальной стадии	Личинка промежуточной стадии
Число жуков	1	1	2	3
ППМ, Вт/см^3	0.038	0.038	0.038	0.038
Число жуков	1	1	2	3
Наблюдаемый эффект: гибель, %	100	100	100	100
ППМ, Вт/см^3	0.01	0.01 Вт/см^3	0.01 Вт/см^3	0.01
Число жуков	1	2	1	5
Наблюдаемый эффект: снижение подвижности, %	100	100	100	100

до летальной температуры. С другой стороны, вода в организмах насекомых или клещей не содержится в чистом виде, она является составной частью гемолимфы. Гемолимфа или жировое тело не могут реагировать на поле с частотой 2.45 ГГц, резонансная частота для них ниже, потому, например, рыжие тараканы или мухи не погибают в микроволновых печах (но, разумеется, не потому, что якобы выбирают точки с минимумом поля). Следовательно, при низких плотностях мощности воздействие является существенно нетепловым.

Тепловой эффект при воздействии СВЧ ЭМП на *Nauphoeta cinerea* имеет место лишь при высокой интенсивности излучения и при достаточном времени экспозиции. При низкой плотности потока мощности и при малом времени экспозиции тепловой эффект отсутствует, однако имеют место как летальный результат, так и резкая потеря подвижности.

Таким образом, вопрос о механизме воздействия СВЧ ЭМП с частотой 2.45 ГГц низких плотностей потока мощности на членистоногих остается открытым. Ясно, что эффект проявляется на всех уровнях: молекулярном (генетическом), клеточном, системном (тканевом) и популяционном. Очевиден лишь результат нетеплового воздействия на *Stegobium paniceum* и *Nauphoeta cinerea*.

В случае более высоких частот воздействие СВЧ ЭМП, скорее всего, имеет резонансный характер.

В [12, 13] показано, что СВЧ ЭМП резко снижает выживаемость *E. coli*, *M. avium* и *Mycobacterium tuberculosis* на частотах, резонансных собственным частотам крутильных коле-

Таблица 3. Действие на *Nauphoeta cinerea* СВЧ ЭМП

	Контроль	Эксперимент
Частота, ГГц	–	10
Число жуков	5	7
Изменения, %	0	0
Частота, ГГц	–	9
Число жуков	6	6
Изменения, %	0	0
Частота, ГГц	–	8
Число жуков	8	9
Наблюдаемый эффект: прекращение роста, %	0	100
Частота, ГГц	–	8.054
Число жуков	7	7
Наблюдаемый эффект: гибель, %	0	86

Таблица 4. Действие на *Dermacentor silvarum* СВЧ ЭМП

	Контроль	Эксперимент
Частота, ГГц	–	10
Число клещей	5	5
Изменения, %	0	0
Частота, ГГц	–	9
Число клещей	4	4
Изменения	0	0
Частота, ГГц	–	8
Число клещей	6	6
Наблюдаемый эффект: снижение подвижности, %	0	100
Частота, ГГц	–	8.054
Число клещей	7	7
Наблюдаемый эффект: гибель, %	0	100

баний спирали ДНК бактерий, которые определяются по формуле

$$\omega = 21.75 / \sqrt{BP}, \text{ ТГц}, \quad (1)$$

где BP – число пар нуклеотидов [13].

Прямой эксперимент по поглощению молекулами ДНК бактерий *E. coli M17* показывает, что максимальное поглощение (7.2%) происходит при частоте генератора, равной собственной частоте крутильных колебаний данных ДНК (10.27 ГГц), рассчитанной по формуле (1). Эти результаты составят предмет отдельного сообщения.

Возбуждение крутильных колебаний в ДНК резко увеличивает число однонитиевых разрывов [14], а также препятствует репликации ДНК, что ведет к гибели клетки.

В состав гемолимфы членистоногих входят аналоги лимфоцитов – амебоциты. СВЧ излучение свободно проникает сквозь хитиновый (или волосяной) покров. Для низких частот гемолимфа насекомых представляет собой проводящую среду, которая поглощает излучение, но для СВЧ гемолимфа (и кровь человека) ведет себя как диэлектрик, поэтому излучение свободно проходит через гемолимфу. В живых клетках отсутствуют молекулы, в спектре которых содержатся СВЧ-линии, единственным агентом, способным поглощать СВЧ ЭМП, являются макромолекулы ДНК. Спектр молекул ДНК складывается из крутильных колебаний ее спирали (что обнаружено группой М.Д. Франк-Каменецкого в конце 1960-х), изгибных и продольных колебаний. Изгибные колебания не могут возбуждаться внешним ЭМП, так как участки молекулы нейтральны. Частота продольных колебаний лежит в мегагерцовом диапазоне, и только для крутильных колебаний ДНК собственными частотами являются частоты, лежащие в диапазоне СВЧ. Таким образом, поглощение СВЧ ЭМП происходит лишь в молекулах ДНК амебоцитов гемолимфы членистоногих.

Длины ДНК данных клеток колеблются от 500 до 13000 п.о. Собственные частоты крутильных колебаний такой ДНК лежат в диапазоне КВЧ. Однако частота внешнего воздействия, лежащая в диапазоне СВЧ, тоже является резонансной, если частота КВЧ кратна частоте СВЧ. Лежащая в диапазоне КВЧ частота 298 ГГц, соответствующая длине ДНК 5330 п.о., была, как видно из табл. 4 и 5, найдена путем подбора, она с высокой степенью точности кратна частоте 8.054 ГГц.

Как предполагается, воздействие на ДНК амебоцитов резонансной частотой и приводит к гибели паукообразных и жесткокрылых.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что при помощи нетеплового электромагнитного излучения возможно не только осуществлять дезинсекцию зерновых, пищевых продуктов или прецизионной техники нетепловым СВЧ-полем, но и подавлять рост численности переносчиков клещевого энцефалита *Dermacentor silvarum* без применения инсектицидов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят за помощь в работе сотрудника ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае» к.б.н. Л.М. Львовского.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Р. Д. Риб, *Матководство* (Усть-Каменогорск, 2004)
2. М. С. Буренков, Л. А. Буренкова, Ю. С. Коротков и др., Радиац. биология. Радиоэкология **36** (5), 681 (1996).
3. М. С. Буренков, Радиац. биология. Радиоэкология. **36** (5), 786 (1996).
4. М. Ф. Шкутин, Дисс. ... канд. биол. наук (ПущГУ, ИБК РАН, Пущино, 2004).
5. В. Г. Каплин и Э. Н. Савельева, Изв. Самарского научного центра РАН **13** (1), 251 (2011).
6. И. М. Шейман и М. Ф. Шкутин, Журнал высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова **53** (6), 775 (2003).
7. Е. К. Еськов и А. М. Сапожников, Зоологич. журн. **5**, 800 (1974).
8. S. J. vanVickle-Chavez and R. N. vanGelder, J. Biol. Chem. **282** (14), 10561 (2007). DOI: 10.1074/jbc.M609314200
9. Е. Г. Васильева, Вестн. Астраханского гос. тех. ун-та **3**, 182 (2008).
10. В. А. Кутовой, Б. И. Рудяк, Л. А. Базыма и др., Вопр. атомной науки и техники **4** (80), 129 (2001).
11. Б. Л. Ихлов, Вестн. новых мед. технологий **25** (2), 121 (2018).
12. Б. Л. Ихлов, А. В. Мельниченко и А. Ю. Ощепков, Вестн. новых мед. технологий **24** (2), 141 (2017).
13. Б. Л. Ихлов, А. А. Шурыгин и В. А. Дробкова, Туберкулез и болезни легких **97** (1), 25 (2019). DOI: 10.21292/2075-1230-2019-97-1-25-27
14. Е. Е. Текуцкая и Р. В. Василиади, Экология человека **2**, 9 (2017).

On the Mechanism of Action of Microwaves on Arthropods

B.L. Ikhlov, I.L. Volkhin, and A.Yu. Oshchepkov

Perm State National Research University; ul. Bukireva 15, Perm, 614068 Russia

The aim of this work was to study the effect of weak microwaves on coleoptera and arachnids (*Stegobium paniceum* beetles, *Nauphoeta cinerea* beetles and *Dermacentor silvarum* ticks). A high-frequency generator of electromagnetic radiation was used, irradiation was carried out both at the thermal level of the power flux density (0.38 W/cm^3) and at the non-thermal level of the power flux density (0.25 mW/cm^3 and 0.17 W/cm^3, the exposure time was from two tens of seconds to a day. It was found that exposure to ultrahigh-frequency field disrupts *Stegobium paniceum*, *Nauphoeta cinerea*, and *Dermacentor silvarum*, a weak ultrahigh-frequency field suppresses coleopterans, some field frequencies with the power flux density of 0.17 W/cm^3 inhibit the development of larvae, and an electromagnetic field exposure to an electromagnetic field resonance frequency is lethal for coleoptera and arachnids.

Keywords: resonance, DNA, power, encephalitis, temperature

EDN: QSLIQI
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 333–342

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 577.34; 612.846

РАННИЕ ЭФФЕКТЫ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРОТОНОВ ВЫСОКИХ ЭНЕРГИЙ НА ЗРИТЕЛЬНО-МОТОРНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ОБЕЗЬЯН

© 2022 г. Л.В. Терещенко*, И.Д. Шамсиев, М.А. Кадочникова*, Е.А. Красавин***, А.В. Латанов***

**Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1/12*

***Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, 117485, Москва, ул. Бутлерова, 5а*

****Объединенный институт ядерных исследований, 141980, Дубна Московской области, ул. Жолио-Кюри, 6*

E-mail: latanov@neurobiology.ru

Поступила в редакцию 29.11.2021 г.
После доработки 29.11.2021 г.
Принята к публикации 06.12.2021 г.

В условиях дальних космических полетов радиационные воздействия галактических космических лучей на организм человека приводят к риску ранних поражений центральной нервной системы и, как следствие, нарушениям операторской деятельности космонавтов. У трех обезьян Macaca mulatta исследовано выполнение зрительно-моторной инструментальной условнорефлекторной задачи, включающей зрительно-вызванные саккады и мануальные реакции. Двух обезьян подвергли однократному краниальному облучению протонами (170 МэВ, 3 Гр), у третьей – однократно облучали протонами (155 МэВ, 3 Гр) теменную кору. В течение трех месяцев после облучения инструментальный рефлекс упрочивался у всех обезьян. Через 20–30 суток после облучения у всех обезьян увеличивались латентные периоды саккад и мануальных инструментальных реакций, которые высоко коррелировали. Такие эффекты сохранялись в последующие два месяца. Облучение теменной коры оказывало более выраженные эффекты на латентные периоды саккад и мануальных реакций. Полученные результаты свидетельствуют об устойчивости системных механизмов условнорефлекторной деятельности к радиационному воздействию протонами. Однако при этом возможны нарушения функционирования систем внимания и исполнительного контроля, что отразилось на временных характеристиках движений глаз и рук.

Ключевые слова: ионизирующая радиация, протоны, обезьяны, инструментальный рефлекс, саккады, латентные периоды.

DOI: 10.31857/S0006302922020168

Во время продолжительных космических полетов за пределами магнитосферы Земли радиационные воздействия галактических космических лучей на организм человека становятся основным лимитирующим фактором, который может привести к нарушениям жизненно важных функций, включая функции центральной нервной системы [1–4]. Значительное число работ по эффектам воздействия различных ионизирующих излучений на поведение и когнитивную деятельность животных выполнено на лабораторных грызунах [1, 5–10]. Такие исследования при всей их масштабности и значимости не отражают эффекты радиационных воздействий на центральную нервную систему и, как следствие, на поведение человека, в частности, на двигательные реакции, которые определяют эффективность операторской деятельности. Для таких исследований необходимы модельные эксперименты на обезьянах. Исследования на обезьянах в мировой литературе встречаются значительно реже, чем исследования на других животных, весьма далеких по развитию центральной нервной системы от таковой у приматов. Первые исследования воздействий различных типов радиационных излучений с разными дозами на состояние и поведение приматов датируются 1970–1980-ми годами. Так, в работе [11] исследовали снижение эффективности выполнения когнитивной задачи задержанного выбора по образцу (англ.: *delayed match-to-sample*) у обезьян в зависимости от дозы гамма-

Сокращения: ПС – периферический стимул, ЦС – центральный стимул, ЛП – латентный период.

облучения, испускаемого ядрами ^{60}Co. В результате исследований показано, что уже при дозе около 500 рад (5 Гр) в расчете на среднюю часть тела отмечались ранние когнитивные нарушения.

Исследования радиационных воздействий на организм млекопитающих, включая человека, широко представлены в мировой литературе (см. обзоры [6–8, 12]). В этих исследованиях освещаются поведенческие, когнитивные, клеточные и молекулярные эффекты различных видов ионизирующей радиации, также различающейся по энергии и временным схемам облучения. В соответствии с задачами нашей работы мы ограничились анализом публикаций, в которых представлены исследования по моделированию влияний радиационных излучений на организм млекопитающих в космическом пространстве, где в составе галактических и солнечных космических лучей доминируют протоны (85–92%) и альфа-частицы (7–14%) [13]. Кроме того, мы также ограничились рассмотрением только поведенческих и когнитивных эффектов ионизирующей радиации на приматов. Таких работ в мировой литературе немного, в то время как на других представителях млекопитающих (главным образом, грызунах) проведено множество исследований. Однако результаты исследований различных форм поведения грызунов при воздействии ионизирующей радиации практически невозможно транслировать на поведение приматов. Для моделирования на обезьянах элементов операторской деятельности человека необходимо исследовать зрительно опосредованные когнитивные действия, включающие тонкие манипуляции с вовлечением глаз [14] и рук [15, 16]. Зрительная система приматов существенно сложнее по сравнению с таковой у грызунов, а регуляция тонких автоматических движений глаз и рук у приматов происходит с участием высокоразвитой (по сравнению с грызунами) экстрапирамидной системы.

В работе [17] у обезьян исследовали эффективность выполнения когнитивной задачи задержанного выбора по образцу в зависимости от дозы протонного облучения. По результатам этой работы впервые была установлена суммарная доза протонного излучения 3 Гр, вызывавшая нарушения когнитивной деятельности у 81% тестированных животных. Доза 3 Гр оказалась адекватной для моделирования радиационного воздействия протонов на поведение приматов, поскольку она соответствовала интенсивности протонного излучения за пределами магнитосферы Земли, измеренной после солнечных вспышек во время полетов беспилотных аппаратов [18].

В недавней работе [19] у обезьян исследовали выполнение зрительно-моторной задачи, состоящей в мануальном сопровождении зрительной цели на мониторе джойстиком, связанным с курсором. В работе оценивали общие показатели зрительно-моторного поведения – количество инициированных самими же животными проб и долю успешных проб при совмещении курсора джойстика с целью. Оказалось, что однократное краниальное облучение протонами (170 МэВ, доза 3 Гр) в течение последующих 40 дней не вызвало каких-либо системных нарушений зрительно-моторного поведения животных. В дальнейшем эти же животные были подвергнуты облучению ионами углерода ^{12}C (160 МэВ, доза 1 Гр). В отличие от протонного облучение ионами ^{12}C приводило к снижению эффективности выполнения задачи по прослеживанию. Задача по прослеживанию цели обезьянами имитирует некоторые элементы операторской деятельности. К сожалению, в данном исследовании не было проведено какого-либо анализа количественных показателей мануального сопровождения цели – траекторий, длины трека, точности слежения и временных характеристик.

До настоящего времени в работах по изучению когнитивных нарушений у обезьян, вызванных ионизирующей радиацией, использовали экспериментальные задачи, не позволяющие раскрыть количественные показатели ключевых компонентов операторской активности, а именно, амплитудно-временные характеристики движений глаз и рук, обеспечивающих зрительно-моторную деятельность. Используя инструментальные задачи с вовлечением движений глаз и рук, у обезьян возможно исследовать глазодвигательные и мануальные составляющие операторской деятельности [14, 15]. Амплитудно-временные характеристики движений глаз и рук отражают эффективность когнитивных процессов, обеспечивающих пилотирование космических аппаратов и манипуляции разнообразным бортовым оборудованием, таких как поиск и восприятие зрительных объектов, ресурсы внимания и его переключение, а также различные формы высокоточных манипуляций [20]. Таким образом, в экспериментах на обезьянах при воздействии на их мозг различных ионизирующих излучений с определенными дозами могут быть оценены радиационные риски, приводящие к нарушениям операторской деятельности у человека в дальних комических экспедициях.

С целью моделирования эффектов ионизирующей радиации на операторскую деятельность человека в настоящей работе поставлена цель исследовать влияние краниального облучения протонами высоких энергий на временные характеристики зрительно вызванных саккад и мануальных реакций у обезьян при осуществлении зрительного инструментального рефлекса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на трех самцах *Macaca mulatta* – О1, О2 и О3 в возрасте 16, 13 и 8 лет соответственно и массой 6–7 кг.

В экспериментах обезьян обучали выполнению зрительно вызванных саккад в направлении периферических стимулов (ПС), предъявляемых на мониторе в пределах зрительного поля размерностью 39° × 26°. После фиксации взором ПС животные выполняли мануальные реакции для получения подкрепления. Такие условия зрительной стимуляции с выполнением саккад и мануальных инструментальных реакций имитируют зрительно опосредованную деятельность человека-оператора.

Стимулы предъявляли на ЭЛТ-мониторе Mitsubishi Diamond Pro 2070SB диагональю 22" (режим VGA Mode, разрешение 640 × 480 пикселей, частота вертикальной развертки 160 Гц), располагаемом на расстоянии 51 см от глаз животного. Освещенность экрана монитора темно-зеленого цвета составляла 0.25 Лк на уровне глаз. В экспериментах в начале каждой пробы обезьян обучали фиксировать взгляд на центральном стимуле (ЦС), а затем выполнять зрительно-вызванные саккады в направлении ПС и фиксировать на нем взгляд. Оба стимула (ЦС и ПС) белого цвета и квадратной формы (со стороной 0.38°) составляли контраст с фоном 0.96. Обезьяны фиксировали взор на ПС, чтобы уловить его незначительное потемнение («пригасание»), уменьшающее его контраст с фоном до 0.90.

Животных обучали совершать двигательную реакцию ипсилатеральной рукой (левым или правым рычагом «на себя») в ответ на «пригасание» ПС, который предъявляли слева или справа центральной вертикальной оси. При предъявлении ПС по этой оси подкрепляли движения любой рукой. Корректные мануальные ответы (на «пригасание» ипсилатеральных стимулов и любой рукой на стимулы по центральной вертикальной оси) подкрепляли фруктовым соком в объеме 0.2 мл. ЦС предъявляли в течение 500–800 мс, ПС – в течение 800–1000 мс, ПС уменьшенной яркости – 1200 мс. ПС включали синхронно с выключением ЦС. Временной интервал между пробами составлял 500–800 мс при выключении всех стимулов (рис. 1а). Все вариабельные интервалы варьировали в случайном порядке с дискретностью 100 мс. Движения рычага оцифровывали с частотой 100 Гц. Эксперименты проводили в автоматическом режиме с использованием оригинального аппаратно-программного комплекса [14, 15]. Вся процедура адаптации обезьяны к установке с последующим обучением детально описана в работах [16, 21].

Движения левого глаза регистрировали с использованием высокоскоростной цифровой камеры FastVideo-250 (НПО «Астек», Россия) с частотой 200 Гц (О1) и 500 Гц (О2, О3) [22]. Видеорегистрацию осуществляли в условиях ИК-подсветки глаза с использованием матрицы из 28 ИК-светодиодов (L-53SF6C, $\lambda_{пик}$ = 860 нм), расположенных радиально для равномерного освещения. Видеокамеру располагали с левой стороны монитора на уровне его полувысоты, а главная оптическая ось ее объектива образовывала угол 25° с оптической осью глаза животного. Во время экспериментов голову животных полужестко фиксировали с использованием пластикового шлема, изготовленного по индивидуальной форме головы. Видеопоток синхронизировали со стимулами посредством двух инфракрасных светодиодов, состояние которых (включено/выключено) синхронно включению/выключению ЦС и ПС. ПС предъявляли в 34-х положениях с различным эксцентриситетом симметрично относительно ЦС (рис. 1б).

Однократное краниальное облучение протонами О1 и О2 проводили на фазотроне Лаборатории ядерных исследований Объединенного института ядерных исследований (Дубна, Московская обл.). Энергия протонов составляла 170 МэВ, сечение пучка – 8 × 8 см, длительность облучения – 5 мин, а суммарная доза – 3 Гр. У О3 однократно облучали протонами в пике Брэгга (155 МэВ, 3 Гр, 5 мин) теменную кору (билатерально), локализацию которой определяли по результатам компьютерной томографии (описание подготовки и процедуры облучения приведено в работе [16]. С обезьяной О2 за 100 суток перед облучением протонами там же также было проведено ложное (контрольное) облучение, то есть с животным были проведены такие же манипуляции, как и при облучении протонами, за исключением собственно облучения.

Для обработки видеоизображений глаза с целью выделения саккад использовали оригинальное программное обеспечение [22, 23]. В зарегистрированных траекториях движений глаза выделяли саккады с использованием комбинации методов дисперсионного и скоростного критериев с дальнейшим нахождением момента начала (латентного периода, ЛП) целенаправленной саккады к ПС. ЛП движений рук определяли по моменту превышения заданной амплитуды хода активного рычага.

ЛП саккад и мануальных реакций усредняли по всем корректным реакциям в течение одного экспериментального дня (сессии). Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Minitab 17. Для оценки линейной связи между долями корректных проб и последовательными экспериментальными сессиями, а также между ЛП саккад и мануальных реакций использовали коэффициент Пирсона (r).

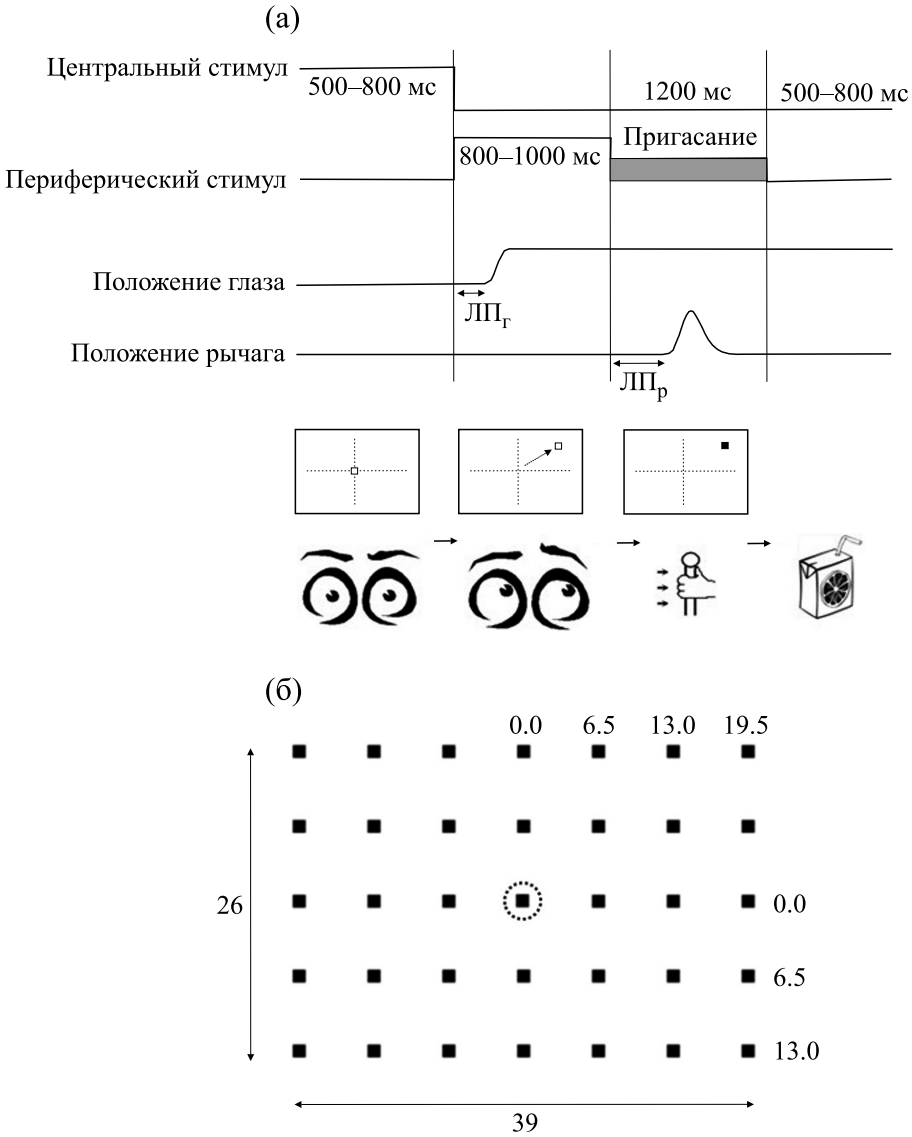


Рис. 1. (а) – Временная схема предъявления стимулов. ЛП$_г$ – ЛП саккады на ПС, ЛП$_р$ – ЛП движения руки. (б) – Пространственная схема предъявления стимулов. Окружностью отмечено положение ЦС, квадратами отмечены возможные положения ПС. Указаны угловые расстояния ПС от ЦС и общий размер поля предъявления стимулов в градусах.

Для сравнения ЛП саккад и мануальных реакций использовали *t*-критерий Стьюдента. Для оценки динамики параметров использовали метод линейного регрессионного анализа. Разброс параметров представлен стандартной ошибкой среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Эффективность инструментальной условнорефлекторной деятельности. В течение всего периода экспериментов три обезьяны продемонстрировали относительно стабильный уровень выполнения инструментального условного рефлекса. Доли корректных реакций (в ответ на «пригасание» ПС), рассчитанные для каждого дня наблюдений, варьировали в относительно узких диапазонах – 75–90% у обезьян О1 и О3 и 80–95% у обезьяны О2 (рис. 2). В остальных случаях животные либо совершали реакцию в ответ на ПС, не дожидаясь его «пригасания» (опережающие движения), либо совершали «запаздывающие» ответы (по истечении времени экспозиции ПС уменьшенной яркости), либо не совершали никакого движения («отказы»). Эффективность инструментальной деятельности незначительно увеличивалась в течение трех месяцев после ложного облучения у обезьяны О2 (рис. 2а), что объясняется монотонным упрочением условного рефлекса в течение длительного периода времени. Облу-

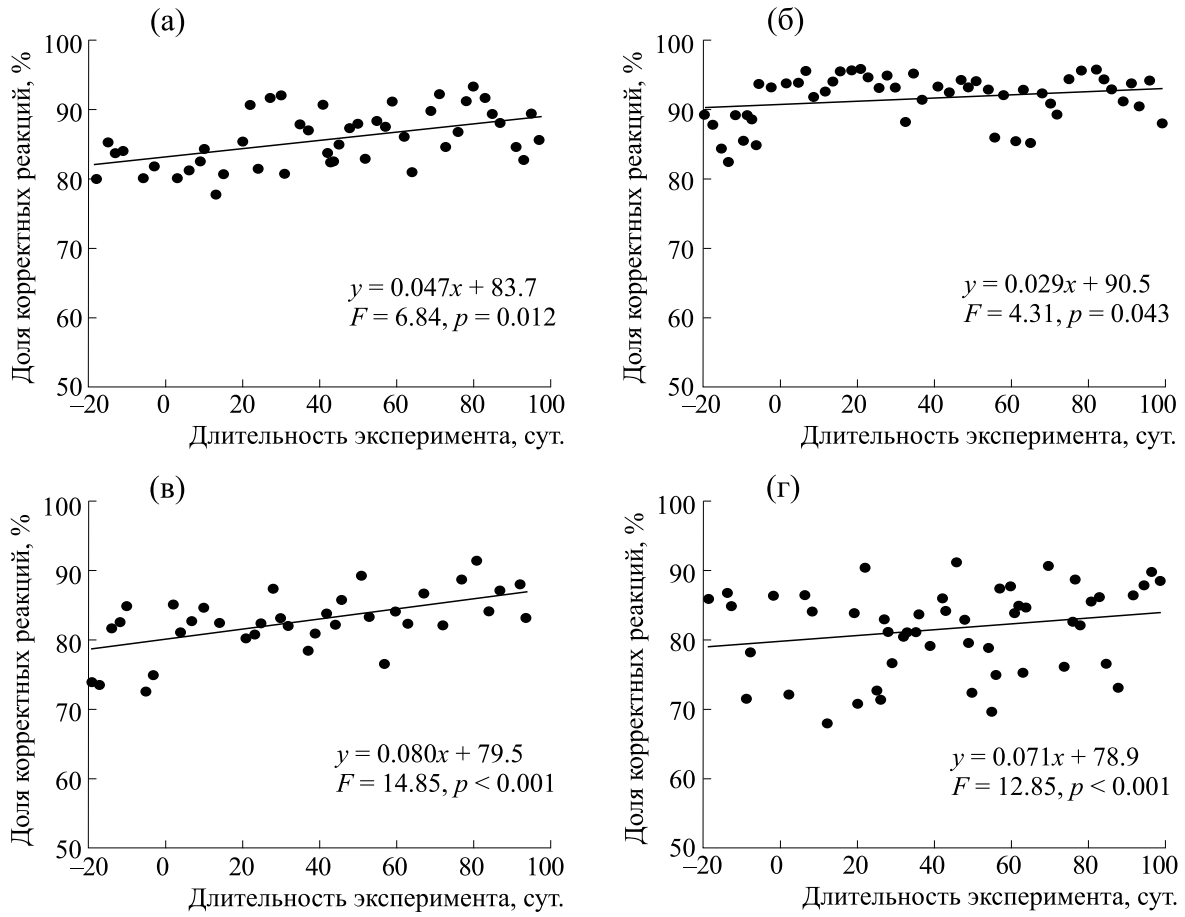


Рис. 2. Динамика долей корректных реакций у обезьян: (а) – ложное облучение обезьяны О2; (б), (в) и (г) – краниальное облучение обезьян О2, О1 и О3 соответственно; «0» – день проведения ложного/протонного облучения.

чение протонами не оказало негативного действия на эффективность инструментального поведения у всех обезьян, тем более, что доли успешных реакций у них даже незначительно, но достоверно возрастали в течение периода наблюдений, о чем свидетельствуют статистически значимые показатели уравнений линейной регрессии. Следует отметить высокую вариабельность доли корректных инструментальных реакций у обезьяны О3, у которой селективно (в пике Брэгга) облучали теменную кору. Такие результаты свидетельствуют об устойчивости инструментальной условнорефлекторной деятельности обезьян к радиационному воздействию протонов и, вероятно, отражают упрочение рефлекса в результате длительного периода тренировок.

Необходимо отметить, что обезьяны существенно различались по работоспособности, что можно объяснить их индивидуальными особенностями, в частности, различиями уровня мотивации в экспериментах. Так, обезьяна О1 совершала в течение одной сессии в среднем 1105 ± 56, а обезьяны О2 и О3 – соответственно 624 ± 28 и 561 ± 32 успешных проб, что составляло высоко достоверные различия ($t = 7.62$, $df = 43$, $p < 0.001$ – между обезьянами О1 и О2; $t = 8.41$, $df = 47$, $p < 0.001$ – между обезьянами О1 и О3). Среднее число успешных проб у обезьян О2 и О3 статистически не различались ($t = 1.47$, $df = 81$, $p = 0.145$). Следует отметить, что у обезьяны О2 после ложного облучения среднее число успешных проб составляло 483 ± 29, что оказалось высоко достоверно меньше, чем после облучения протонами ($t = -3.46$, $df = 82$, $p < 0.001$). В течение всего периода наблюдений у всех обезьян число успешных проб незначительно уменьшалось, однако коэффициенты корреляций между этим параметром и днем экспериментальной сессии имели низкие значения и оказались либо квазидостоверными ($r = -0.344$, $p = 0.062$; $r = -0.312$, $p = 0.053$ для обезьян О1 и О2 соответственно), либо недостоверным ($r = -0.104$, $p = 0.495$ для обезьяны О3). При ложном облучении у обезьяны О2 декремента числа успешных проб по мере сессий не наблюдалось ($r = -0.063$, $p = 0.679$).

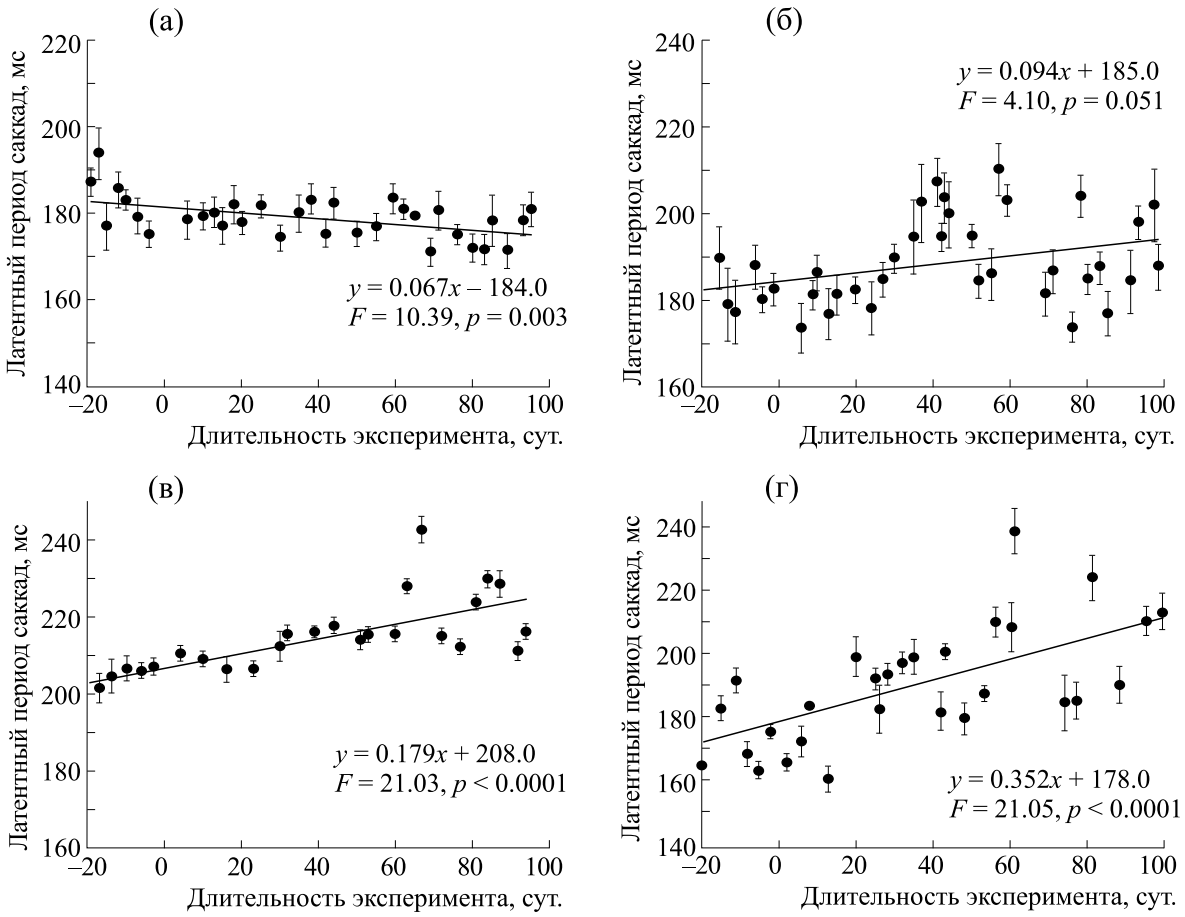


Рис. 3. Динамика ЛП саккад у обезьян в зависимости от времени эксперимента. Линии отражают графики линейных регрессий. Приведены линейные уравнения регрессий и статистические показатели их значимости. Остальные обозначения как на рис. 2.

Латентные периоды саккад и мануальных реакций. Временные характеристики движений глаз и рук являются ключевыми для обеспечения успешной зрительно опосредованной операторской деятельности у человека, включающей перцептивные, интегративные и исполнительные процессы. В связи с этим мы исследовали ЛП саккад и корректных мануальных инструментальных реакций в течение 20 суток до облучения у обезьян О1 и О3, в течение трех месяцев после ложного (контрольного) облучения у обезьяны О2 и в течение трех месяцев после облучения протонами у всех обезьян.

После ложного облучения ЛП саккад у обезьяны О2 незначительно, но достоверно уменьшались в течение 3-х месяцев, свидетельствуя о некотором улучшении глазодвигательной деятельности (рис. 3а). После облучения протонами у обезьян О1 и О3 отмечалось существенное монотонное возрастание ЛП саккад (рис. 3в,г). Следует отметить, что крайние значения линии регрессии у обезьяны О3 различались на 45 мс (рис. 3г), а у обезьяны О1 – на 25 мс (рис. 3в). Кроме того, в целом положительная динамика ЛП саккад у обезьяны О3 характеризуется высокой вариабельностью их значений. По-видимому, это свидетельствует о более выраженном эффекте облучения теменной коры в пике Брэгга на ЛП саккад. У обезьяны О2 такое увеличение носило нерегулярный характер, и положительная динамика ЛП саккад оказалась квазидостоверной (рис. 3б).

Аналогичные результаты получены для ЛП мануальных реакций у обезьян О1 и О3 (рис. 4в,г), у которых ЛП рук увеличивались в течение всего периода наблюдений. Крайние значения линии регрессии у обезьяны О3 различались почти на 60 мс (рис. 4г), а у обезьяны О1 – только на 30 мс (рис. 4в). Это свидетельствует о более выраженном эффекте облучения теменной коры в пике Брэгга не только на ЛП саккад, но и на ЛП мануальных реакций. По истечении трех месяцев у обезьяны О1 ЛП рук уменьшились почти до референсных значений, свидетельствуя об ослаблении эффектов радиации. Следует отметить высокую

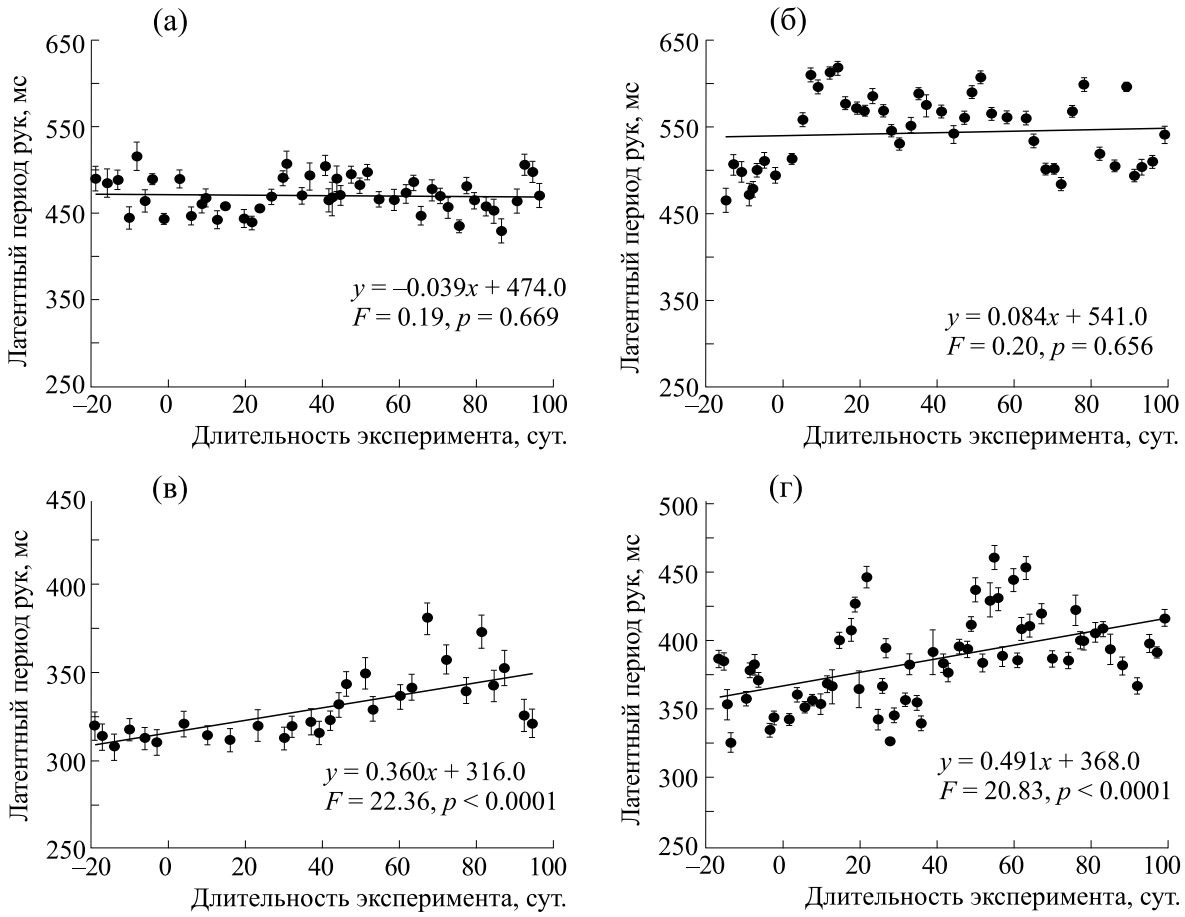


Рис. 4. Динамика ЛП мануальных реакций у обезьян в зависимости от времени эксперимента. Обозначения как на рис. 3.

вариабельность ЛП рук у обезьяны О3 в течение всего периода наблюдений и их устойчивую положительную динамику. У обезьяны О2 после ложного обучения ЛП рук не изменялись, а после облучения протонами скачкообразно увеличивались в среднем на 90 мс в период 7–58 суток, а в последующий месяц снижались в среднем на 45 мс. Это свидетельствует об некотором ослаблении эффекта облучения на ЛП рук после двух месяцев.

Кроме того, нами выявлена высокая корреляция между ЛП саккад и рук у всех обезьян: $r = 0.756$ ($p < 0.0001$), $r = 0.614$ ($p = 0.015$) и $r = 0.594$ ($p = 0.006$) для обезьян О1, О2 и О3 соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В мировой научной литературе по воздействию ионизирующей радиации на поведение обезьян отсутствуют работы, в которых исследованы амплитудно-временные характеристики движений глаз и рук при выполнении зрительно-моторных задач. В нашей работе мы исследовали ЛП двигательных реакций – зрительно вызванных саккад и движений рук при выполнении зрительно-моторной инструментальной задачи. Аналогичные движения совершает человек-оператор при выполнении разнообразной зрительно-моторной деятельности.

Абсолютное большинство работ по исследованию влияния высокоэнергетических протонов, составляющих существенную часть спектра космического излучения, на различные формы поведения (научение, когнитивное поведение) проведены на лабораторных крысах. Так, в работах научной группы Б.Р. Рабина изучали воздействие облучения всего тела крыс протонами высоких энергий (250 МэВ) с различными дозами (1.5–4.0 Гр) на показатели пищедобывательного оперантного поведения [9] и условнорефлекторной вкусовой аверсии [24], а также на пространственное обучение в тесте Морриса [24]. По данным этих авторов, протонное облучение не оказало влияния на показатели как оперантного, так и рефлекторного поведения в течение последующих нескольких дней.

Безусловный интерес представляют и отечественные работы, проведенные в ИМБП РАН. В противоположность предыдущим исследованиям в работе [25] у лабораторных крыс показано ухудшение пространственной дискриминации стимулов с пищевым подкреплением в Т-образном лабиринте после краниального облучения протонами в пике Брэгга (170 МэВ, дозы 1 и 2 Гр). В то же время такое облучение не повлияло на выработку и воспроизведение условной реакции пассивного избегания. Различия в результатах процитированных работ, по-видимому, определяются тем, что краниальное облучение в пике Брэгга оказывает больший ионизирующий эффект из-за большего коэффициента линейной передачи энергии [26].

При несомненной ценности исследований влияния радиационных воздействий на поведенческие параметры грызунов их результаты некорректно транслировать на более сложное поведение приматов, включая человека. Поэтому аналогичные исследования на приматах имеют принципиальное значение для дальнейших шагов по проблемам безопасности космических полетов, касающихся оценки радиационных рисков для здоровья человека и возможных когнитивных нарушений, а также обоснования приемлемых средств защиты от ионизирующей радиации. В мировой литературе таких исследований значительно меньше, что обуславливает их особую ценность.

Для изучения поведенческих нарушений при радиационных воздействиях, моделирующих такие условия в дальнем космосе, у приматов чаще всего исследуют когнитивное поведение с вовлечением различных составляющих высших мозговых процессов, таких как восприятие, рабочая память и др. [10, 11, 17, 19]. При обосновании выбора для исследования когнитивных аспектов поведения исследователи справедливо полагают, что различные виды условных рефлексов являются универсальной и простой формой поведения, и условнорефлекторные эффекты доступнее изучать у грызунов. На протяжении многих лет с целью исследования устойчивости когнитивных процессов к радиации часто используют когнитивную задачу задержанного выбора по образцу, выполнение которой вовлекает перцептивные и мнемические процессы [10, 11]. Необходимо отметить, что подобных работ крайне мало, и они различаются по видам, способам и временным схемам облучения. Результаты этих исследований свидетельствуют, что эффективность выполнения такой задачи снижается как при однократном гамма-облучении всего тела животного в дозе 5 Гр [11], так и при краниальном хроническом рентгеновском облучении (40 Гр, восемь сеансов по 5 Гр в течение четырех месяцев) [10]. В последней работе радиационный эффект прямо зависел от сложности задачи (от двух до шести альтернатив при выборе), и эффективность выполнения задачи монотонно снижалась на протяжении семи месяцев наблюдений после последнего сеанса облучения. Исследования влияния протонного облучения с интенсивностью сравнимой с таковой в космическом пространстве за пределами магнитосферы Земли (3 Гр и меньше) [18] на когнитивную деятельность обезьян встречают редко. Так, в работе [19] после облучения протонами в дозе 3 Гр не было выявлено каких-либо нарушений выполнения когнитивной задачи по мануальному прослеживанию цели с использованием джойстика.

В соответствии с целями нашей работы мы исследовали влияние протонного облучения на условнорефлекторное инструментальное поведение обезьян. Исходя из литературных сведений об отсутствии каких-либо эффектов радиации при краниальном облучении протонами на когнитивное поведение обезьян [19] и условнорефлекторное поведение крыс [9, 24] мы ожидали получить такие же результаты. Действительно, мы не выявили негативного эффекта протонного облучения в дозе 3 Гр на условнорефлекторное инструментальное поведение у всех обезьян (рис. 2). Напротив, доли корректных реакций увеличивались после облучения, что свидетельствует об устойчивости простых форм поведения к таким дозам радиации.

В литературе отсутствуют работы, в которых исследованы тонкие движения глаз и рук приматов при выполнении зрительно-моторных задач, составляющих базовые компоненты операторской зрительно-моторной деятельности. В нашей работе у двух обезьян (О1 и О2) при краниальном облучении протонами мы выявили увеличение ЛП зрительно-вызванных саккад и мануальных реакций спустя один месяц после облучения. Такие эффекты у обезьяны О1 сохранялись в последующие два месяца (рис. 3в), а у обезьяны О2 ослаблялись после двух месяцев (рис. 3б). Эти обезьяны отличались по динамике исследуемых параметров. Так, у обезьяны О1 ЛП рук увеличивались на одну неделю позже (рис. 4в), чем ЛП саккад, а у обезьяны О2 ЛП рук увеличивались спустя неделю (рис. 4б), а ЛП саккад – спустя месяц после облучения. Краниальное облучение влияет на все области мозга, обеспечивающие выполнение обезьянами зрительно-моторной задачи, поэтому замедление ЛП глазодвигательных и мануальных реакций происходило параллельно, что подтверждается высокими корреляциями между этими параметрами. Это свидетельствует об общих механизмах воздействия ионизирующей протонной радиации на зрительно-опосредованные двигательные процессы.

Негативные эффекты протонов на ЛП саккад и рук напоминали таковые при развитии у обезьян метилфенилтетрагидропиридин-вызванного паркинсоноподобного синдрома на предсимптомной стадии [27]. Можно предположить, что сходство эффектов протонов и нейротоксина метилфенилтетрагидропиридина на ЛП двигательных реакций частично заключается в дисфункции базальных ганглиев, которые вовлечены в осуществление произвольных движений глаз и рук [28].

Теменная кора вовлечена в осуществление пространственной задачи – совершение зрительно-вызванной саккады в определенную позицию, поэтому при ее селективном облучении в пике Брэгга мы ожидали обнаружить наиболее выраженные отличия в изменении ЛП зрительно-вызванных движений (саккад и рук). При таком способе облучения повреждающий эффект протонов существенно увеличивается при их замедлении (в пике Брэгга) в теменной коре [26]. Действительно у обезьяны О3 такое облучение вызывало более выраженную положительную динамику как ЛП саккад (рис. 3г), так и ЛП рук (рис. 4г). У обезьяны О3 кроме положительной динамики ЛП саккад и рук также отмечались существенные вариации не только этих параметров, но и долей корректных реакций (рис. 2г). Предположительно, такие результаты свидетельствуют о нестабильности процессов пространственной обработки в результате облучения теменной коры в пике Брэгга. Это свидетельствует о существенной роли этой области коры в обеспечении пространственного анализа зрительной сцены в зрительномоторном поведении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют об устойчивости условнорефлекторного инструментального поведения обезьян к протонам высоких энергий используемой дозы. При этом мы выявили ранние негативные эффекты протонной радиации на временные характеристики зрительно вызванных саккад и мануальных реакций. Предположительно, такие эффекты могут проявиться в ухудшении временных параметров операторских действий человека, что может быть критично для сложной и разнообразной деятельности человека в условиях дальних космических экспедиций.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-29-01027офи_м), в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (научный проект № 121032500080-8), и частично при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Мозг, когнитивные системы, ис-кусственный интеллект».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все действия с животными выполняли в соответствии с требованиями Директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза (2010/63/EU) об использовании животных для экспериментальных исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. И. Григорьев, Е. А. Красавин и М. А. Островский, Вестн. РАН **87** (1), 65 (2017).
2. J. C. Chancellor, R. S. Blue, K. A. Cengel, et al., NPJ Microgravity, **4** (8) (2018).
3. F. Cucinotta, M. Alp, F. Sulzman, et al., Life Sciences in Space Research **2**, 54 (2014).
4. G. A. Nelson, Radiat. Res. **185** (4), 349 (2016).
5. M. J. Pecaut, P. Haerich, C. N. Zuccarelli, et al., Cognitive, Affective, Behav. Neurosci. **2** (4), 329 (2002).
6. V. S. Kokhan, M. I. Matveeva, A. Mukhametov, et al., Neurosci. Biobehav. Rev. **71**, 621 (2016).
7. V. K. Parihar, B. D. Allen, C. Caressi, et al., Sci. Rep. **6**, 34774 (2016).
8. F. Kiffer, M. Boerma, and A. Allen, Life Sciences in Space Research **21**, 1 (2019).
9. B. M. Rabin, L. L. Buhler, J. A. Joseph, et al., J. Radiat. Res., **43** Suppl., 225 (2002).
10. M. E. Robbins, J. D. Bourland, J. M. Cline, et al., Radiat. Res. **175** (4), 519 (2011).
11. A. Bruner, V. Bogo, R. K. Jones, Radiat. Res. **63** (1), 83 (1975).
12. D. Hladik and S. Tapio, Mutation Research/Reviews in Mutation Research **770** (B), 219 (2016).
13. K. Lodders, Astrophys. J. **591**, 1220 (2003).
14. Л. В. Терещенко, С. А. Молчанов, О. В. Колесникова и др., Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова **55** (5), 639 (2005).
15. Л. В. Терещенко, С. А. Молчанов, О. В. Колесникова и др., Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова **62** (4), 431 (2012).
16. И. В. Бондарь, Л. Н. Васильева, Л. В. Терещенко и др., Радиац. биология. Радиоэкология **60** (4), 352 (2020).
17. V. Bogo, Toxicology, **49**, 299 (1988).
18. E. E. Kovalev, Aviation, space, and environmental medicine, **54** (12), 16 (1983).

19. А. Г. Беляева, А. С. Штемберг, А. М. Носовский и др., Нейрохимия **34** (2), 168 (2017).
20. P. König, N. Wilming, T. C. Kietzmann, et al., J. Eye Mov. Res. **9** (5), 1 (2016).
21. И. В. Бондарь, Л. Н. Васильева, Л. В. Терещенко и др., Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова **68** (4), 459 (2018).
22. В. Н. Анисимов, А. В. Краснопёров, Ф. Л. Серженко и др., в сб. *Айтрекинг в психологической науке и практике*, под ред. В.А. Барабанщикова (Когито-Центр, М., 2015), сс. 24–33.
23. А. В. Латанов, В. Н. Анисимов, Патент №2696042 (2019).
24. B. Shukitt-Hale, A. Szprengiel, J. Pluhar, et al., Adv. Space Res. **33** (8), 1334 (2004).
25. А. С. Штемберг, В. С. Кохан, В. С. Кудрин и др., Нейрохимия **32** (1), 78 (2015).
26. А. В. Агапов, В. Н. Гаевский, И. А. Гулидов и др., Письма в ЭЧАЯ **2**, 6 (129), 80 (2005).
27. Л. В. Терещенко и А. В. Латанов, Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова **68** (4), 496 (2018).
28. C. M. Davis, K. L. DeCicco-Skinner, R. D. Hienz, PLoS One **10** (12), e0144556 (2015).

Early Effects of Cranial Irradiation by High Energy Proton Beams on Oculomotor Behavior in Nonhuman Primates

L.V. Tereshchenko*, I.D. Shamsiev, M.A. Kadochnikova*, E.A. Krasavin***, and A.V. Latanov***

**Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia*

***Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, ul. Butlerova 5a, Moscow, 117485 Russia*

****Joint Institute for Nuclear Research, ul. Joliot-Curie, Dubna, Moscow Region, 141980 Russia*

During long-term space missions, exposure to galactic cosmic radiation may place astronauts at risk of early forms of radiation-induced central nervous system damage and, as a result, influence hand and arm movements of the astronauts. Three monkeys (Macaca mulatta) were trained to perform an oculomotor instrumental operant conditioning task consisting of initiation of saccades towards visual stimuli and arm movements. Two monkeys were exposed to a single dose of 3 Gy from 170 MeV protons and the third monkey underwent 3 Gy of parietal cortex irradiation by the 155 MeV proton beam. For three months after the exposure, instrumental task performance got into the habit. 20–30 days after irradiation, all irradiated animals exhibited increased saccade latency and delayed feedforward activity of muscles during arm movements, there were high correlations between these functions. These effects persisted over the next two months. Exposure of rodent parietal cortex to radiation caused more pronounced effects on saccade latency and delayed feedforward activity of muscles. Our results suggest that systemic mechanisms of operant behavior are resistant to irradiation by proton beams although oculomotor function deficits and arm movement disorder may occur contributing to temporal features of eye and arm movements.

Keywords: ionizing radiation, protons, monkeys, instrumental conditioning, saccades, latency

EDN: FKVBMU
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 343–353

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 57.07

ИССЛЕДОВАНИЕ СУММАРНОГО УРОВНЯ ГЛУТАМАТА И ГЛУТАМИНА В ЗРИТЕЛЬНОЙ КОРЕ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ КОРОТКОЙ АКТИВАЦИИ МЕТОДОМ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

© 2022 г.
А. Яковлев*, **, *, А. Мажурцев*, ***, ****, П. Меньщиков**, *****, М. Ублинский*, ***, И. Мельников*, Д. Куприянов*****, Т. Ахадов*, ****, Н. Семенова*, **, ***, ****

**НИИ неотложной детской хирургии и травматологии, 119180, Москва, ул. Большая Полянка, 22*
***Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4*
****Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334, Москва, ул. Косыгина, 4*
*****Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/1*
******Philips Healthcare, 123022, Москва, ул. Сергея Макеева, 13*
E-mail: yakovlevalekcej@bk.ru

Поступила в редакцию 08.09.2021 г.
После доработки 14.01.2022 г.
Принята к публикации 19.01.2022 г.

Методом функциональной магнитно-резонансной спектроскопии в магнитном поле 3 Тл с временным разрешением 2 с исследована динамика суммарного уровня глутамата и глутамина в затылочной коре мозга человека в периоде зависящего от уровня оксигенации крови ответа на короткую (3 с) зрительную стимуляцию. Обнаружено статистически достоверное увеличение содержания глутамата и глутамина на первой и пятнадцатой секундах после предъявления 25 испытуемым волонтерам изображения шахматной доски, мерцающей с частотой 4 Гц. Корреляция между максимумом амплитуды зависящего от уровня оксигенации крови ответа и максимумами уровня глутамата и глутамина не выявлена. Изменения суммарного уровня глутамата и глутамина во времени после стимула не соответствуют скорости оборота глутамин-глутаматного цикла, но согласуются с временными характеристиками везикулярного цикла: высвобождением глутамина из везикул и его обратным захватом. Таким образом, можно полагать, что обнаруженная динамика глутамата и глутамина обусловлена не метаболическими превращениями в цикле нейромедиаторов, а изменением подвижности глутамина при выходе из везикул и обратной упаковке.

Ключевые слова: ^{1}H-МРС, глутамат, PRESS, зрительная стимуляция, короткий стимул.

DOI: 10.31857/S000630292202017X

Функциональная ^{1}H-магнитно-резонансная спектроскопия (фМРС) представляет собой единственный метод неинвазивной оценки изменений концентраций метаболитов в ответ на нейроактивацию. Измерение концентраций основных нейромедиаторов (тормозного нейромедиатора γ-аминомасляной кислоты и возбуждающего нейромедиатора глутамата (Glu)) в мозге человека представляет собой важнейшую характеристику, необходимую при оценке функционального состояния центральной нервной системы в норме и патологии. Основные нейромедиаторы присутствуют в мозге в миллимолярных концентрациях, что достаточно для детектирования их методами магнитно-резонансной спектроскопии. Из всех аминокислот Glu имеет самую большую концентрацию в мозге человека [1]. Однако вследствие сходства его химической структуры и структуры глутамина (Gln) ^{1}H-МР-сигналы этих соединений перекрываются в спектрах, регистрируемых на коммерческих МР-томографах, для которых разрешена напряжен-

Сокращения: фМРС – функциональная ^{1}H-магнитно-резонансная спектроскопия, Glu – глутамат, Gln – глутамин, Glx – сумма глутамата и глутамина, BOLD-ответ – ответ, зависящий от уровня оксигенации крови (от англ. blood oxygenation level dependent), фМРТ – функциональная магнитно-резонансная томография, NAA – n-ацетиласпартат, tNAA – сумма n-ацетиласпартата и n-ацетиласпартилглутамата, Cr – сумма креатина и фосфокреатина, tCho – холинсодержащие соединения.

ность постоянного магнитного поля $B_0 \leq 3$ Тл. Поэтому уровень Glu оценивают по интенсивности суммарного сигнала протонов 4-CH_2-группы обоих веществ с химическим сдвигом δ в диапазоне 2.3 – 2.45 м.д. [2]. Согласно работам [3–5] соотношение интенсивностей этих сигналов Glu и Gln, разрешающихся в поле 7 Тл, составляет в области затылочной коры нормального мозга человека 3/1 [6].

Исследования, проведенные в магнитном поле напряженностью 7 Тл, показали, что под влиянием различных видов нейроактивации с использованием блочных парадигм активации наблюдается рост [Glu] [7–10]. Измерения [Glu], проведенные в поле 7 Тл при активации единичными стимулами, отсутствуют, однако в поле 3 Тл показано, что единичные болевые и когнитивные стимулы увеличивают интенсивность суммарного сигнала глутамата и глутамина (Glx) [11–14]. Количественно эффект зависит от длительности активации и вида применяемого стимула. Например, при постоянной пятиминутной видеостимуляции [15] посредством предъявления изображения мерцающей шахматной доски в зрительной коре наблюдается увеличение [Glu] на 10% по сравнению с состоянием покоя, а при исследовании влияния периода зрительной стимуляции 64 с эффект уменьшается – увеличение [Glu] составляет от 1.5 до 3.0% [7, 9, 10]. Предъявление объектного стимула увеличивает в затылочной коре правого полушария уровень Glx на 11% больше, чем предъявление абстрактного стимула [16]. Влияние коротких стимулов на [Glu] изучено мало. Показано, что под действием короткого (<3 с) болевого стимула [12, 13] [Glx] увеличивается в островке по сравнению с состоянием покоя и по разным данным либо возвращается к исходному уровню в течение 3–6 с [13], либо нет [12].

Известным эффектом нейростимуляции является ответ, зависящий от уровня оксигенации крови (BOLD-ответ), косвенно отражающий нейронную активность. Время BOLD-ответа на единичный стимул составляет 20 с [17]. Приведенные данные по измерению Glx после короткого стимула получены в условиях, когда период между стимулами составляет от 3 до 9 с, что существенно меньше, чем период BOLD-ответа. Это означает незавершенность вызванных стимулом процессов, связанных с расширением сосудов, увеличением притока оксигемоглобина и глюкозы. Можно ожидать, что динамика [Glx] в периоде, превышающем период BOLD-ответа, позволит исследовать процесс оборота нейромедиатора непосредственно в глутаматергических синапсах, так как гемодинамический процесс будет завершен.

Изменения [Glu] зависят от соотношения активности процессов его синтеза и распада. Основным путем синтеза является аспартатаминтрансферазная реакция [18], в которой участвуют α-кетоглутарат и аспартат, а способом деградации – гидролиз глутаматдегидрогеназой с образованием α-кетоглутарата. Доказано, что нейроактивация сопровождается активацией синтеза Gln из глюкозы в астроцитах, затем в нейронах Gln превращается в Glu [19]. Изменение [Glu] под влиянием нейроактивации может происходить также и другими путями [20, 21] – конверсией в тормозной нейромедиатор γ-аминомасляную кислоту, конденсацией с цистеином при синтезе глутатиона или детоксикации аммиака через образование Gln. Изменение содержания Glu вследствие изменения активности метаболических процессов, протекающих с участием Glu, должно вызывать изменения концентраций других метаболитов, в том числе и детектируемых методами МРС [21, 22].

Причиной изменения значений [Glu], измеренных с помощью ^{1}H-МРС, может быть также изменение пула МР-видимого подвижного Glu, вызванное высвобождением Glu из везикул и последующим его перемещением между различными компартментами. Показано, что при использовании спинового эха для детектирования глутамата везикулярный Glu, имея меньшее время поперечной релаксации T2, не дает вклада в суммарный сигнал Glu [23]. Это косвенно подтверждается менее выраженными относительными изменениями [Glu], наблюдающимся в работах с использованием короткого времени эха (<20 мс) [24]. Высвобождение Glu происходит из везикул, и необходимым условием повторения этого процесса является наличие на мембране везикулы, заполненной Glu. Полный цикл, включающий в себя экзоцитоз Glu, эндоцитоз везикулы, ее пополнение нейромедиатором и закрепление на мембране, называется циклом синаптической везикулы [25].

In vitro показано, что изменение постсинаптического потенциала зависит от [Glu] в везикулах [26]. Пополнение везикулярного Glu происходит через глутамат/глутаминовый (Glu-Gln) цикл, а также путем обратного захвата нейромедиатора из синаптической щели. Оборот Glu через цикл в квазистационарном состоянии характеризуется скоростью 0.3 мМ/мин, измеренной на длительном промежутке времени (>10 мин) без активации методом ^{13}C-МРС [27]. Известны быстрый и медленный путь обратного захвата Glu с временными константами < 1 с и 15 с соответственно [26].

К настоящему времени процесс заполнения везикул *in vivo* на промежутке времени цикла синаптической везикулы при активации еще не исследовался.

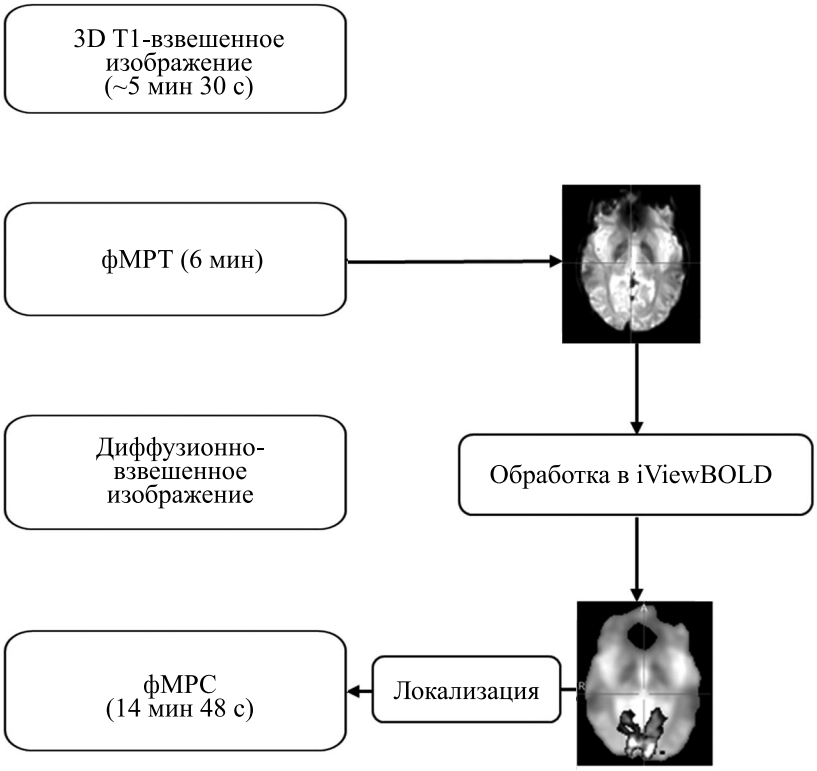


Рис. 1. Протокол исследования. Во время сбора данных DTI фМРТ-изображения обработаны на компьютере и получены карты активации. Локализация спектроскопического вокселя проведена с учетом области активации.

BOLD, как известно, коррелирует с локальными потенциалами поля, которые отражают электрическую активность мозга [28], а Glu является основным возбуждающим нейромедиатором, который непосредственно деполяризует постсинаптические нейроны. Можно предположить, что Glu динамически связан с BOLD. Целью данной работы является измерение [Glu] в динамике BOLD-ответа на короткий стимул на временном интервале, соответствующем везикулярному циклу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Волонтеры. В исследовании участвовало 28 здоровых волонтеров (23.6 ± 2.2 лет, 15 мужчин, 13 женщин). Для каждого волонтера выполнено предварительное диагностическое МРТ (получены T1-, T2- и диффузионно-взвешенные изображения). Заключение об отсутствии патологии головного мозга получали от врача-радиолога.

Протокол исследования. Все данные получены на МРТ-сканере 3T Phillips Achieva dStream (Philips Health Care, Нидерланды) с использованием 20-канальной приемной головной катушки SENSE HeadNeck coil, совместимой с зеркалом. Презентацию стимула и контроль внимания осуществляли при помощи системы InVivo SensaVue, позволяющей точно настраивать временные характеристики применяемого стимула. Стимул предъявляли через монитор, расположенный позади томографа. Изображение передавали волонтеру через систему зеркал, прикрепляемую на катушку.

Получение данных. Сначала получены 3D-T1-взвешенные изображения (5 мин 30 с), затем – изображения, полученные методом функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) (6 мин 0 с). Объем интереса в фМРТ локализовали в затылочной доле по аксиальным проекциям T2*-взвешенных изображений, полученных с помощью градиентного эха. Использованы следующие параметры: время повторения/время эха TR/TE = 3000/40 мс, угол отклонения FA = 90°, матрица $128 \times 128 \times 30$, размер воксела $2.4 \times 2.4 \times 4.0$ мм, количество накоплений – 120, количество срезов – 30. Быстрая обработка фМРТ выполнена для последующего позиционирования вокселя МРС (рис. 1) с использованием программного обеспечения сканера iViewBOLD.

^{1}H-МР-спектры регистрировали с помощью импульсной последовательности PRESS с использованием автоматического шиммирования

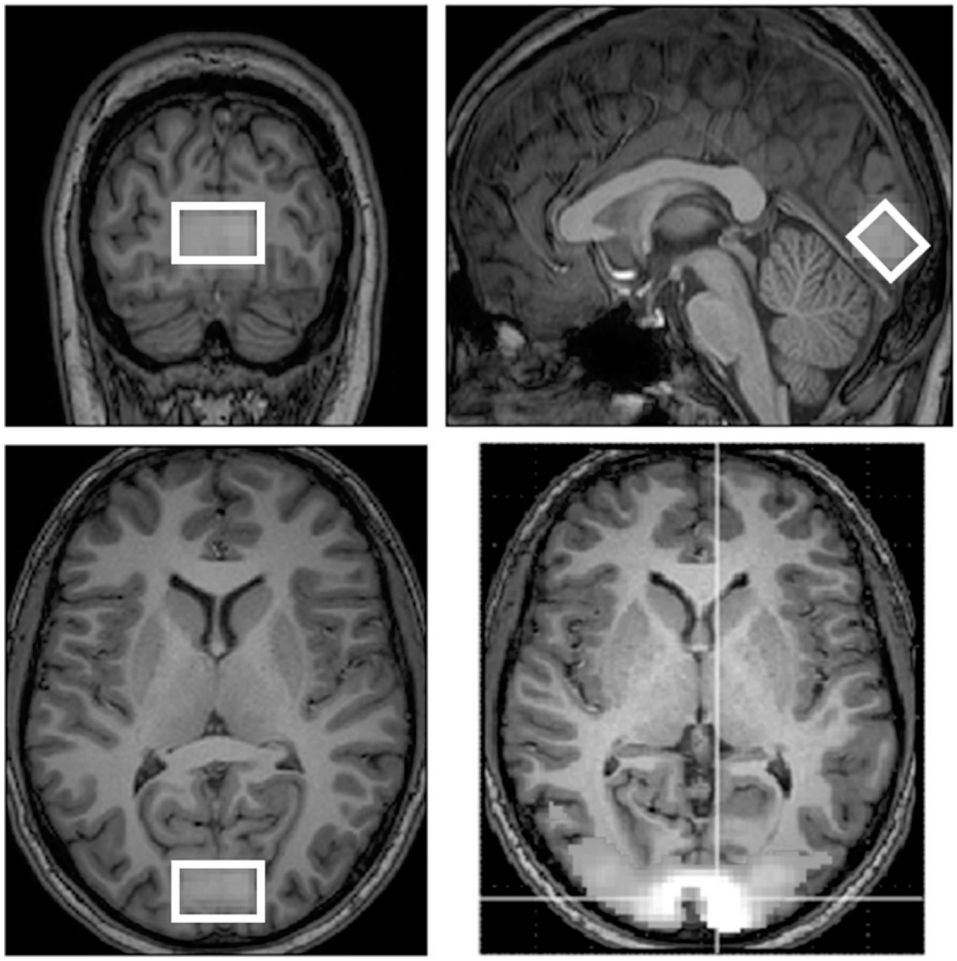


Рис. 2. Усредненная по всем участникам исследования локализация спектроскопического вокселя (прямоугольник белого цвета). Области активации показаны в контрасте. Обе карты изображены на фоне 3D-T1-взвешенного изображения.

второго порядка, которое контролировали по ширине сигнала воды (не более 16 Гц). Параметры регистрации спектров: TR/TE = 2000/35 мс, количество накоплений – 444, размер вокселя – 20 × 30 × 20 мм (рис. 2), FA = 90°, ширина спектра BW = 2000 Гц, подавление воды – MOIST. Общее время исследования составляло 40 мин.

Зрительная стимуляция. Стимуляцию проводили в блоковой парадигме, предъявляемой для получения фМРТ-изображений – 15 раз (6 мин), при исследовании динамики уровней метаболитов – 37 раз (14 мин 48 с). Один блок зрительной стимуляции состоял из трехсекундной демонстрации изображения шахматной доски, мерцающей с частотой 4 Гц, и последующего предъявления темного экрана в течение 21 с (в сумме длительность одного блока равнялась 24 с). Для контроля внимания в процессе предъявления стимула волонтеру давали задание – при каждом пятом появлении стимула нажимать на кнопку (примерно каждые две минуты). Возникающий при этом звуковой сигнал в аппаратной томографа контролировал оператор. Парадигма зрительной стимуляции показана на рис. 3. Сначала был предъявлен черный экран, после чего показан стимул. За точку отсчета выбрана временная точка за 1 с до начала предъявления стимула (–1 с).

Измерение BOLD-сигнала в вокселе. Карты активации получали путем обработки фМРТ-изображений в пакете SPM12 (SPM, RRID:SCR_007037). Обработка состояла в выравнивании изображений относительно друг друга (для исключения искажений вследствие движения головы волонтера), совмещении с анатомическим 3D-T1-изображением, нормировке на усредненную по времени регистрации интенсивность сигнала каждого вокселя, сведении к единому анатомическому пространству MNI-152 и сглаживании матрицей. Полученные данные подвергали статистическому анализу с примене-

нием GLM (general linear model – общая линейная модель) [29]. Зону, соответствующую спектроскопическому вокселю, фиксировали с помощью маски, созданной в программном пакете Matlab [30]. Маска представляет собой бинарное изображение с тем же разрешением и размерами, что и фМРТ-изображения. Вокселям маски, попадающим в объем спектроскопического вокселя, присваивается интенсивность 1, а всем остальным – 0. Усредняя интенсивности фМРТ сигнала в спектроскопическом вокселе в анализируемой временной точке, получали для каждого испытуемого значение интенсивности BOLD-сигнала, соответствующее времени *t*, прошедшему после стимула.

Предварительная обработка спектров. Первые 12 накоплений исключали из рассмотрения из-за большей, чем у других накоплений, интенсивности вследствие неполной T_1-релаксации. Таким образом, спектроскопические данные каждого испытуемого содержали 432 накопления (по 36 накоплений на одну временную точку). Спектральные данные каждого волонтера выравнивали по частоте и фазе в программе FID-A в диапазоне значений $\delta = 1.85–2.15$ м.д, соответствующем наиболее интенсивному сигналу *n*-ацетиласпартата (NAA, $\delta = 2.01$ м.д.) в спектре.

Далее спектральные данные каждого испытуемого разделяли в соответствии с временными точками и для каждой временной точки создавали отдельный файл, содержащий 36 накоплений. Общее количество файлов равнялось 216. Кроме того, для оценки стабильности Glx/Cr во время исследования фМРС спектральные данные каждого участника были разделены на три последовательных временных интервала по 4 мин 28 с каждый, усреднены по группе испытуемых. В результате были получены три спектра, характеризующие соответствующие временные отрезки.

Спектральные данные каждого испытуемого усредняли в каждой временной точке и оценивали ширину линии tCr (2.85–3.15 ppm, LW_{tCr}), измеряя ширину на половине высоты, чтобы оценить влияние сужения линий, вызванное BOLD-эффектом, на интенсивность сигналов метаболитов. Измеряли разность между значением LW_{tCr} для каждой временной точки и значением в исходной точке для каждого волонтера. LW_{tCr} измеряли в программе FID-A, модифицированной авторами: использовали аппроксимацию tCr лоренцевой линией, а не прямое измерение ширины сигнала на полувысоте, что позволило исключить искажения базовой линии, вносимые остаточным сигналом макромолекул, который может присутствовать в спектре при относительно коротком TE (35 мс), примененном в настоящем исследовании. Далее ширины спектральных линий корректировали на полученную величину [31].

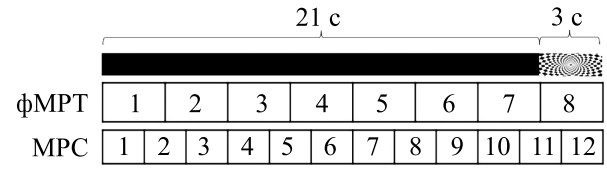


Рис. 3. Парадигма зрительной стимуляции: 3 с – шахматная доска, мерцающая с частотой 4 Гц; 21 с – темный экран; паттерн получения данных (время сбора данных) фМРТ и ^{1}H-МРС при покое и активации.

Процедуру повторяли до тех пор, пока ширина линии корректируемого спектра отличалась не более чем на 1% относительно спектра, соответствующего исходной временной точке.

Количественная обработка. Спектры обрабатывали в LCModel [32] с набором априорных данных для импульсной последовательности PRESS с TE = 35 мс. Набор априорных данных состоял из 17 метаболитов: аланин, аспартат, креатин (Cr), фосфокреатин, γ-аминомасляная кислота, Glc, Gln, Glu, глицерофосфохолин, фосфохолин, глутатион, миоинозитол, Lac, NAA, N-ацетиласпартатглутамат, сциллоинозитол, таурин. Качество аппроксимации оценивали по разности сырого и обработанного спектров (рис. 4).

При нижней границе Крамера–Рао для сигнала Glx более 15% данные исключали из анализа (по этому критерию был исключен один волонтер – Sub.02 (рис. 5). Еще один волонтер был исключен из-за низкого значения отношения сигнал/шум, которое явно наблюдается на «сырых» спектрах по сравнению со спектрами других волонтеров (рис. 5, Sub.24). У одного испытуемого в спектрах наблюдался почти двукратный разброс значений Glx, поэтому его данные также исключили из анализа (рис. 5, Sub.26). Таким образом, для последующей обработки выборка была сокращена до 25 человек (13 мужчин и 12 женщин).

В результате получали значения Glx/Cr, NAA/Cr в каждой временной точке.

Статистический анализ. Распределение всех наборов данных проверяли на нормальность с помощью теста Шапиро–Уилка. Достоверность изменения интенсивности BOLD-сигнала, [Glx]/[Cr], [NAA]/Cr, ширины линий NAA, Cr, Cho в динамике после стимула определяли при помощи ANOVA с повторными измерениями (с уровнем значимости $p < 0,05$) и при обнаружении статистически значимых различий какого-либо параметра каждое среднее значение этого параметра во временной точке сравнивали со средним значением на –1 с при помощи двухэтапной линейной процедуры Бенджамини, Кригера и Йекутиели, учитывающей множественные сравне-

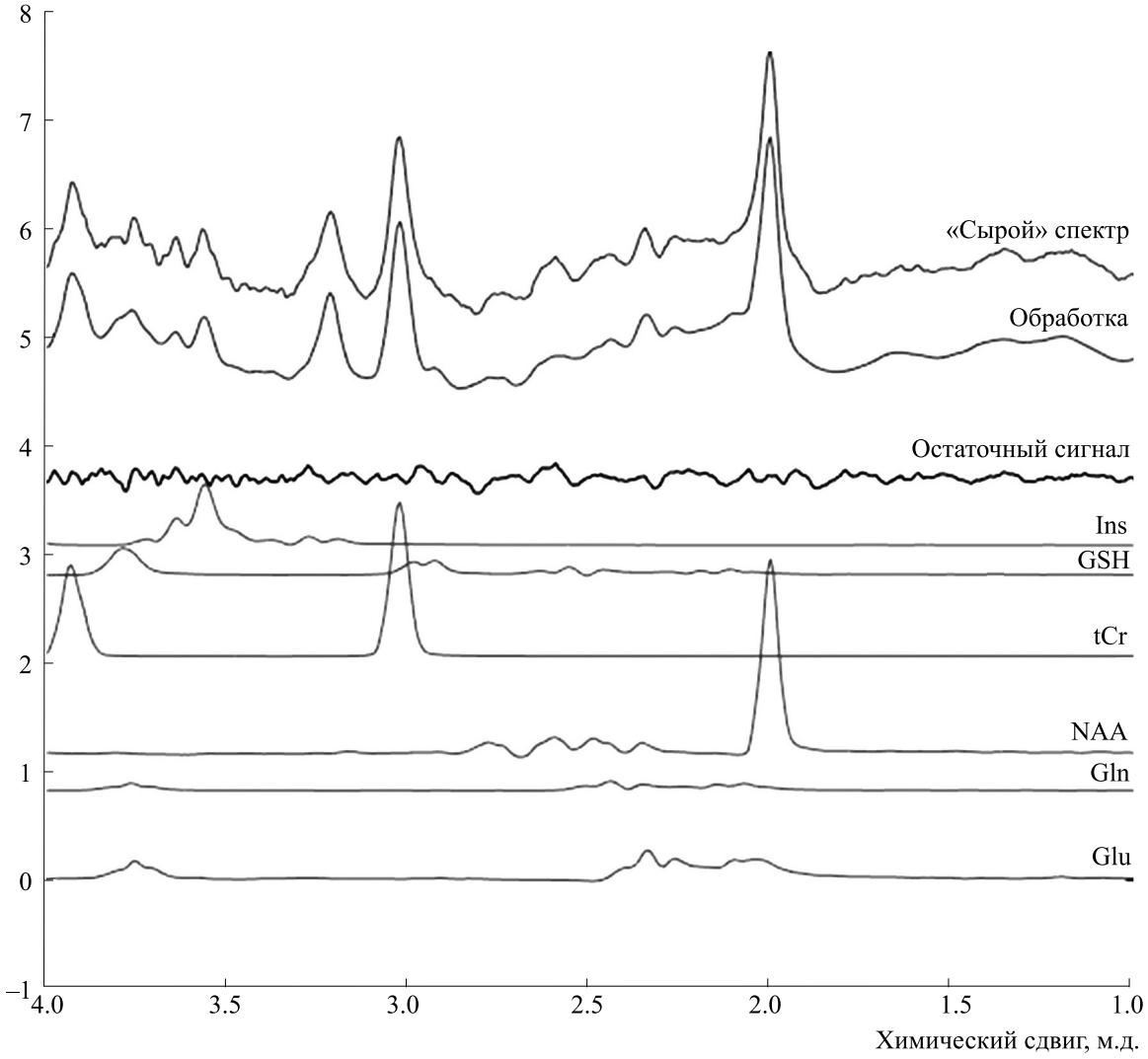


Рис. 4. Аппроксимация спектров с использованием линейной комбинации базисных спектров, выполненная в LCModel, «сырого» (до предварительной обработки) спектра зрительной коры здорового испытуемого. Полученные данные представлены на верхнем спектре, суммарная обработка – на втором сверху спектре, остаточный спектр после аппроксимации – третий сверху. Ниже показаны спектральные вклады каждого элемента в суммарный спектр.

ния. Статистические тесты выполняли в программе GraphPad Prism (GraphPad Prism, RRID:SCR_002798).

Определили коэффициент корреляции между значениями максимума BOLD и разностью [Glx]/[Cr] значений на –1 с и 1 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активация по данным фМРТ. Анализ фМРТ-изображений при помощи общей линейной модели выявил статистически значимый эффект зрительной стимуляции у всех волонтеров – большой кластер BOLD-активации, включающий в себя первичную и экстрастриарную (в основном V2) зрительные коры билатерально. Полученная динамика BOLD-сигнала характеризуется одним пиком с максимумом примерно на 6 с, что соответствует стандартному гемодинамическому ответу [17].

Динамика [Glx] и [NAA] в ответ на короткий стимул. Влияние видеостимуляции на уровень Glu представлено динамикой значений [Glx]/[Cr], нормированных на исходное значение (см. рис. 6). Дисперсионный анализ с повторными измерениями показал статистически значимое отличие (p = 0.0267) средних значений [Glx]/[Cr] в группе как минимум в одной из временных точек. Последующий тест двухэтапной линейной повышающей процедуры Бенджамини, Кригера и Йекутиели (контролирующий коэффициент ложного обнаружения) зафиксировал

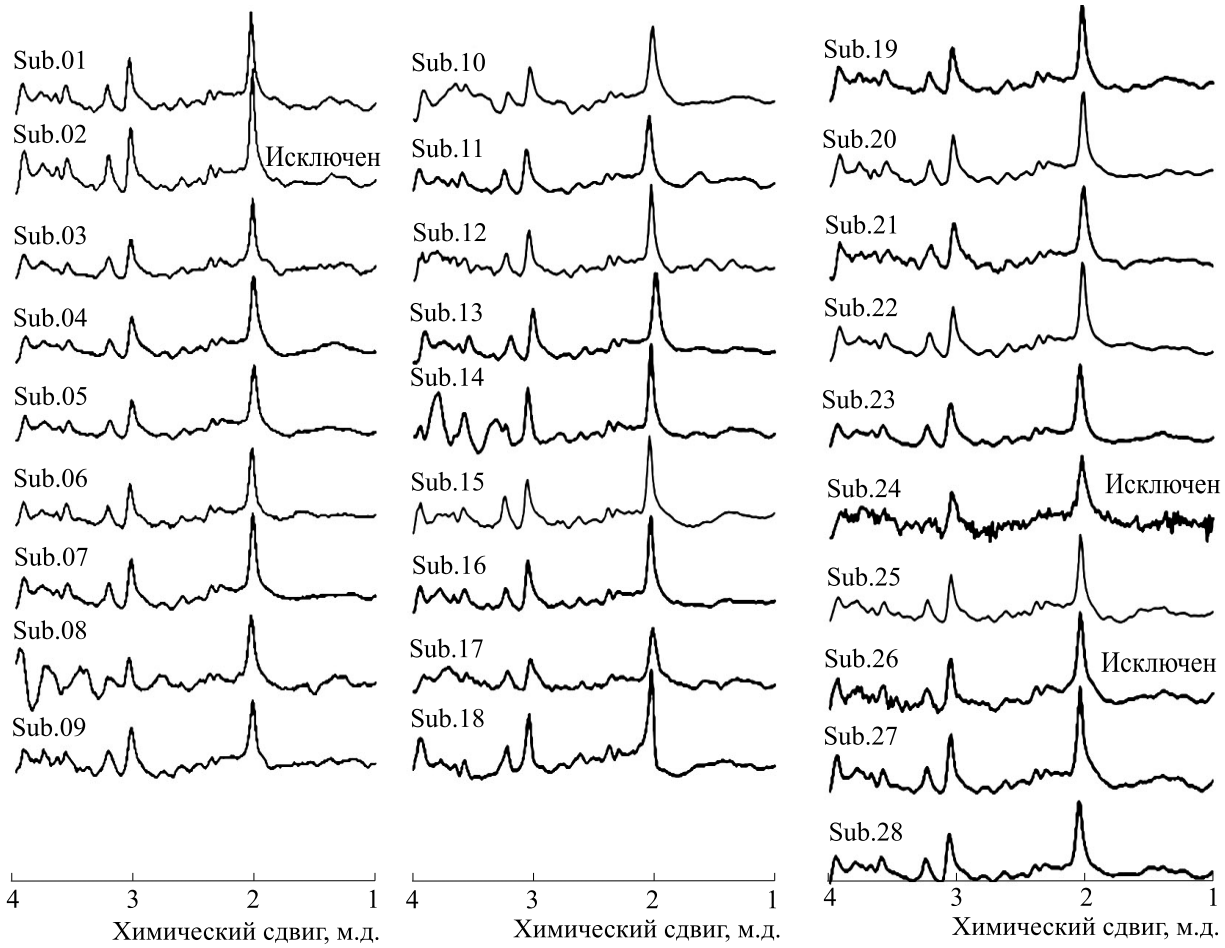


Рис. 5. «Сырые» спектры всех волонтеров, участвовавших в исследовании. Исключенные из обработки спектры волонтеров отмечены надписью «исключен» (причины исключения спектров см. в тексте).

увеличение [Glx]/[Cr] на 1 с (14 ± 3%, $p = 0.0006$) и 15 с (10 ± 3%, $p = 0.04$) по сравнению с исходным значением. Статистически значимое увеличение [Glx]/[Cr] соответствует изменению суммарной концентрации [Glu] + [Gln] на 1.7 и 1.2 мМ (на первой и пятнадцатой секунде соответственно), если принять их суммарную концентрацию в зрительной коре мозга человека равной 12 мМ [33].

Анализ временных рядов концентрации других метаболитов не выявил статистически значимых изменений [NAA]/[Cr] и [Cho]/[Cr] (rANOVA: $p = 0.53$ и 0.50 соответственно).

Средние значения [Glx]/[Cr] в начальном, среднем и конечном временных интервалах не изменяются (ANOVA: $p = 0.27$), что свидетельствует о стабильности базового значения [Glx]/[Cr] в течение всего исследования (среднее значение ± ошибка среднего Glx/Cr в каждый из трех периодов равнялись соответствено 1.97 ± ± 0.16, 1.92 ± 0.16, 1.85 ± 0.14).

ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика [Glx]/[Cr] и скорость везикулярного цикла. Из измерения динамики [Glx]/[Cr] мы обнаружили статистически значимое увеличение этого отношения уже на первой секунде после начала предъявления стимула, указывающее на высокую скорость изменения концентрации Glx (~1.7 мМ/с, см. раздел «Результаты»). Предположим, что полученное нами увеличение [Glx] обусловлено синтезом Glu или Gln. Поскольку Gln синтезируется из Glu, можно полагать, что изменение [Glx] происходит через увеличение [Glu]. Его синтез непосредственно связан с α-кетоглутаратом, интермедиатом цикла Кребса, поэтому реализация этого пути повышения [Glx] возможна только в том случае, если скорость цикла Кребса превышает скорость нарастания Glx. Суммарная скорость потока веществ в астроцитах и нейронах через цикл Кребса равен ~0.8 мМ/мин [27], что на порядок меньше полученной нами оценки скорости увеличения Glx на первой секунде после стимула. Поэтому наблюдаемый на-

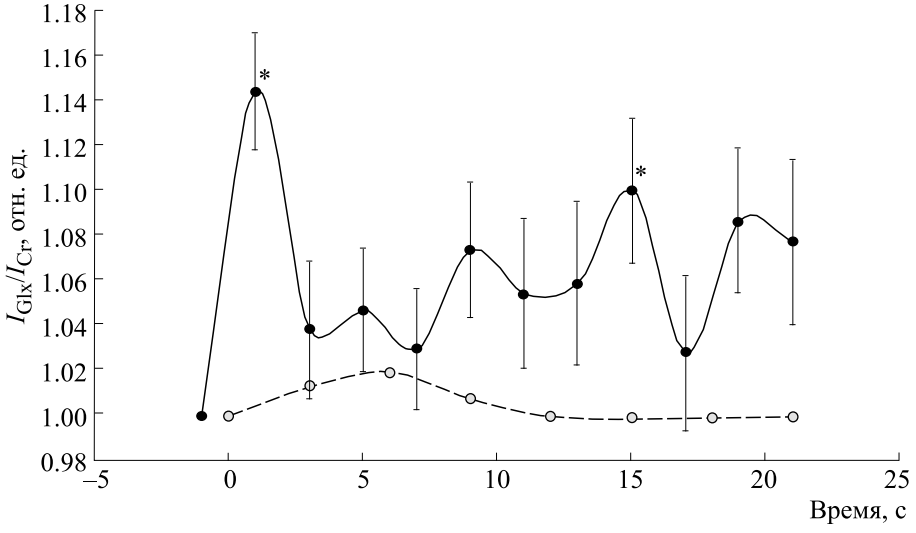


Рис. 6. Зависимость усредненных по группе испытуемых значений отношения интенсивностей Glx/Cr (± ошибка среднего, сплошная линия) и BOLD-сигнала (пунктирная линия), нормированные на исходное значение для каждого волонтера; * – $p < 0.05$.

ми рост [Glx] не является следствием его синтеза из интермедиатов цикла Кребса.

Другой причиной увеличения [Glx]/[Cr] может быть перемещение Glu из невидимого везикулярного пула в видимый. Быстрый рост [Glx] в ответ на стимул может быть вызван наличием клеточных компартментов, содержащих малоподвижный и вследствие этого «ЯМР-невидимый» пул Glu. Методом ^{1}H/^{13}C-ЯМР на срезах мозга морских свинок такой пул обнаружили авторы работы [23] и предположили, что содержащийся в везикулах Glu имеет низкую подвижность и в спектрах не детектируется. Если принять эту гипотезу, обратимый рост [Glx] на первых секундах после стимула является следствием выброса Glu из везикул в синаптическую щель с последующим его включением в цикл нейромедиаторов и возвращением в везикулы через 15 с посредством Glu-Gln-цикла. В таком случае скорость Glu-Gln-цикла должна составлять 6.8 ± 1.5 мМ/мин, что на порядок больше измеренного с помощью ^{13}C-МРС в состоянии покоя значения (0.32 ± 0.05 мМ/мин) [34].

Показано, что оборот одной молекулы Glu через Glu-Gln-цикл требует затраты одной молекулы глюкозы [35]. Таким образом, при нейроактивации с возрастанием потока Glu через цикл можно ожидать как минимум сопоставимого увеличения потока глюкозы. Увеличение скорости потребления глюкозы, измеренное с помощью ^{1}H-МРС в мозге в ответ на постоянную зрительную стимуляцию [36], составляет ~0.1 мМ/мин; это на порядок меньше скорости, необходимой для увеличения Glx, обнаруженного в нашем исследовании на первой секунде. Следовательно, значительная его доля нейромедиаторного Glu возвращается в нейрон не через Glu-Gln-цикл, а посредством обратного захвата. Возможной причиной снижения подвижности является буферизация Glu [37], процесс, в котором возвращение Glu в клетку сопровождается множественными взаимодействиями с транспортером EAAT. Таким образом, этот пул Glu имеет уменьшенное время релаксации T2, следовательно, интенсивность общего сигнала Glx в этой области уменьшается. Ко времени второго пика [Glx] (15 с после стимула) Glu проникает в клетку и быстро упаковывается в везикулы. Возникает вопрос, может ли Glu, возвращенный в нейроны путем обратного захвата, упаковываться в пузырьки за 15 с, теряя подвижность?

Скорость-лимитирующая стадия подготовки новой везикулы, готовой к экзоцитозу, – это эндоцитоз везикулы для Glu [38]. Характерное время эндоцитоза в зависимости от стимула составляет от ~115 мс до 8.3 с [39]. Это означает, что ко времени второго пика [Glx] на пятнадцатой секунде новая везикула уже будет готова к заполнению Glu. Таким образом, можно полагать, что нами впервые обнаружена динамика [Glx], характеризующая процесс выделения Glu из везикул, последующий обратный захват и упаковку в везикулы. Количественно доля высвобождающегося в результате короткой зрительной активации везикулярного Glu относительно доли «видимого» в состоянии покоя Glu составляет 14%.

Несомненно, предположенная интерпретация полученных результатов требует дальнейших доказательств.

Уровни *n*-ацетиласпартата и холинсодержащих соединений. В данном исследовании не наблюдается изменений суммы *n*-ацетиласпартата и *n*-ацетиласпартилглутамата и холинсодержащих соединений, что совпадает с большинством результатов по измерению этого показателя при различных видах стимуляции [7, 8, 22, 40, 41]. Тем не менее, обратимое снижение суммы *n*-ацетиласпартата и *n*-ацетиласпартилглутамата наблюдали в зрительной коре при длительной видеостимуляции [42] и в моторной коре после предъявления единичного моторного стимула [43]. Расхождение в результатах измерения содержания NAA как под влиянием длительной стимуляции, так и в динамике после короткого стимула требует дополнительных исследований и может быть связано с различными условиями экспериментов, разными типами коры, разными видами стимуляции и разной длительностью стимула.

Интенсивность BOLD-сигнала не коррелирует с интенсивностью изменения [Glx]. Корреляционный анализ наших данных не обнаружил достоверной связи между максимальной интенсивностью BOLD-сигнала и максимальной концентрацией Glx. Основной вклад в расширение сосудов, необходимый для возникновения BOLD, вносят производные арахидоновой кислоты, синтез которых активируется в астроцитах глутаматом, транспортирующимся из синаптической щели после высвобождения из везикул [44]. Количественная связь между интенсивностью BOLD-сигнала и [Glx] не доказана. Продемонстрированы одновременные увеличения интенсивности BOLD-сигнала и Glx при периодической видеостимуляции с равными 64 с интервалами покоя и активации [10]. В то же время при предъявлении когнитивной задачи распознавания образов корреляция между амплитудой BOLD-сигнала, моделируемого функцией гемодинамического ответа и изменением [Glx], не выявлена [14].

Взаимосвязь BOLD с нейронной активностью показана нелинейной корреляцией амплитуды изменения BOLD-сигнала с величиной потенциала местного поля (LFP) [45]. Поскольку LFP отражает синаптический входной сигнал, дендритную обработку, подпороговые мембранные колебания [46], изменение LFP связано не только с воздействием возбуждающего нейромедиатора Glu на постсинаптические рецепторы, но и с воздействием тормозного нейромедиатора – ГАМК. Таким образом, BOLD должен быть охарактеризован скорее балансом возбуждения и торможения, чем концентрацией одного из нейромедиаторов, в том числе и [Glx].

Ограничения. Полученные выводы о возвращении Glu в везикулы основаны на идее повторной активации значительного количества одной и той же сети нейронов в первичной зрительной коре. Данное предположение строится нами на основании применения одного и того же стимула. Однако изменение положения глаз может приводить к смещению видимого волонтеру изображения и активации других нейронов, что может занижать оценку времени обратного захвата Glu и заполнения везикул.

Кроме этого, в данной работе мы измеряем сумму Glu и Gln, поэтому не можем подтвердить предположение о недостаточной скорости перехода Glu в Gln (через Glu-Gln-цикл).

ВЫВОДЫ

В настоящей работе впервые показано, что после короткого трехсекундного зрительного стимула уровень Glu в возбужденной области мозга имеет два максимума – на первой и пятнадцатой секундах после начала предъявления стимула. Полученный результат может быть следствием высвобождения Glu из везикул, обратного захвата Glu и заполнения везикул.

Интенсивность BOLD-сигнала не коррелирует с изменением [Glx] в периоде после короткого стимула. Регуляция BOLD-эффекта может осуществляться балансом возбуждения и торможения, что может быть предметом дальнейших исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранта № 19-29-10040) и Российского научного фонда (грант № 18-1300030).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было одобрено комитетом по этике научно-исследовательского института неотложной детской хирургии и травматологии. Участники исследования были проинформированы о деталях исследования и подписали согласие на его проведение. Все процедуры соответ-

ствовали Хельсинкской декларации 1964 года и более поздним поправкам к ней.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. Robinson and C. B. Williams, Clin. Chim. Acta **12** (3), 311 (1965).
2. P. G. Mullins, H. Chen, J. Xu, et al., Magn. Reson. Med. **60** (4), 964 (2008).
3. I. Tkáč and R. Gruetter, Appl. Magn. Reson. **29** (1), 139 (2005).
4. M. Garwood and L. DelaBarre, J. Magn. Reson. **153** (2), 155 (2001).
5. E. Frias-Martinez et al., in *Proc. 16th Scientific Meeting of Int. Soc. for Magnetic Resonance in Medicine* (Toronto, 2008), p. 691.
6. P. O. Wyss, C. Bianchini, M. Scheidegger, et al., Magn. Reson. Med. **80** (2), 452 (2018).
7. P. Bednařík, I. Tkač, F. Giove, et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. **35**, 601 (2015).
8. R. Mekle, S. Kühn, H. Pfeiffer, et al., NMR Biomed. **30** (2), (2017).
9. I. Betina Ip, U. E. Emir, A. J. Parker, et al., J. Neurosci. **39** (40), 7968 (2019).
10. I. Betina Ip, A. Berrington, A. T. Hess, et al., Neuroimage **155**, 113 (2017).
11. N. Lally, P. G. Mullins, M. V. Roberts, et al., Neuroimage **85**, 823 (2014).
12. M. Cleve, A. Gussew, and J. R. Reichenbach, Neuroimage **105**, 67 (2015).
13. A. Gussew, R. Rzanny, M. Erdtel, et al., Neuroimage **49** (2), 1895 (2010).
14. D. Apšvalka, A. Gadie, M. Clemence, and P. G. Mullins, Neuroimage **118**, 292 (2015).
15. K. Kurcyus, E. Annac, N. M. Hanning, et al., J. Neurosci. **38** (46), 9967 (2018).
16. N. Lally, P. G. Mullins, M. V. Roberts, et al., Neuroimage **85**, 823 (2014).
17. S. A. Huettel, A. W. Song, and G. McCarthy, *Funct. Magn. Reson. Imaging*, 3rd ed. (Oxford University Press, 2014).
18. A. Schousboe, S. Scafidi, L. K. Bak, et al., in *Glutamate and ATP at the Interface of Metabolism and Signaling in the Brain* (Springer, Cham, 2014), pp. 13–30.
19. L. K. Bak, A. Schousboe, and H. S. Waagepetersen, J. Neurochem. **98** (3), 641 (2006).
20. S. Mangia, F. Giove, and M. DiNuzzo, Neurochem. Res. **37** (11), 2554 (2012).
21. M. C. McKenna, J. Neurosci. Res. **85** (15), 3347 (2007).
22. S. Mangia, I. Tkáč, R. Gruetter, et al., J. Cereb. Blood Flow Metab. **27** (5), 1055 (2007).
23. R. A. Kauppinen, T. R. M. Pirttila, S. O. K. Auriola, and S. R. Williams, Biochem. J. **298** (1), 121 (1994).
24. P. G. Mullins, Scand. J. Psychol. **59** (1), 91 (2018).
25. T. C. Südhof, Annu. Rev. Neurosci. **27**, 509 (2004).
26. T. Hori and T. Takahashi, Neuron **76** (3), 511 (2012).
27. D. L. Rothman, H. M. de Feyter, R. A. de Graaf, et al., NMR Biomed. **24** (8), 943 (2011).
28. D. J. Heeger and D. Ress, Nat. Rev. Neurosci. **3** (2), 142 (2002).
29. J. M. Chambers, in Statistical Models in S, Ed. by J. M. Chambers & T. J. Hastie (Chapman & Hall, Boca Raton, FL, 1992), pp. 95–144.
30. P. E. Menshchikov, N. A. Semenova, T. A. Akhadov, et al., Biophysics **62** (6), 1009 (2017).
31. J. Near, R. Edden, C. J. Evans, et al., Magn. Reson. Med. **73** (1), 44 (2015).
32. S. W. Provencher, Magn. Reson. Med., **30** (6), 672 (1993).
33. M. Z. Goryawala, S. Sheriff, and A. A. Maudsley, NMR Biomed., **29** (8), 1108 (2016).
34. J. Shen, K. F. Petersen, K. L. Behar, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96** (14), 8235 (1999).
35. L. Hertz and Y. Chen, Front. Integr. Neurosci. **11**, 18 (2017).
36. W. Chen, E. J. Novotny, X. H. Zhu, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** (21), 9896 (1993).
37. A. V. Tzingounis and J. I. Wadiche, Nat. Rev. Neurosci., **8** (12), 935 (2007).
38. S. P. Gandhl and C. F. Stevens, Nature **423** (6940), 607 (2003).
39. J. Y. Sun, X. S. Wu, and L. G. Wu, Nature **417** (6888), 555 (2002).
40. B. Schaller, R. Mekle, L. Xin, et al., J. Neurosci. Res. **91** (8), 1076 (2013).
41. Y. Boillat, L. Xin, W. van der Zwaag, and R. Gruetter, J. Cereb. Blood Flow Metab. **40** (3), 488 (2020).
42. M. H. Baslow, J. Hrabe, and D. N. Guilfoyle, J. Mol. Neurosci. **32** (3), 235 (2007).
43. A. V. Manzhurtsev, N. A. Semenova, M. V. Ublinskii, et al., Russ. Chem. Bull. **65** (6), 1630 (2016).
44. D. Attwell, A. M. Buchan, S. Charpak, et al., Nature **468** (7321), 232 (2010).
45. X. Zhang, W. J. Pan, and S. Keilholz, Front. Neurosci. **13**, 1126 (2019).
46. G. Buzsáki, C. A. Anastassiou, and C. Koch, Nat. Rev. Neurosci. **13** (6), 407 (2012).

Study of the Total Glutamate plus Glutamine Concentrations in the Human Visual Cortex Activated Areas Detected by Functional Magnetic Resonance Imaging upon Short Visual Stimulation

A. Yakovlev*, **, *, A. Manzhurtsev*, ***, ****, P. Menshchikov**, *****, M. Ublinskiy*, ***, I. Melnikov*, D. Kupriyanov*****, T. Akhadov*, ****, and N. Semenova*, **, ***, ****

**Clinical and Research Institute of Emergency Pediatric Surgery and Traumatology, ul. Bolshaya Polyanka 22, Moscow, 119180 Russia*

***Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

****Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow, 119334 Russia*

*****Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/1, Moscow, 119991 Russia*

******LLC Philips Healthcare, ul. Sergeya Makeeva 13, Moscow, 123022 Russia*

Functional magnetic resonance spectroscopy at 3 T with a time resolution of 2 s was used to study the dynamics of the total glutamate plus glutamine concentrations in the human occipital cortex during BOLD response upon short visual stimulation (3 s). It was found that when 25 volunteers were shown the view of chessboard at the flickering frequency of 4 Hz, an increase in the levels of glutamate and glutamine at 1s and 15 s upon stimulation was statistically significant. No correlation between the maximum BOLD response amplitude and maximum glutamate and glutamine levels was found. Changes in the total glutamate plus glutamine concentrations in time upon stimulation do not correspond to the rate of the glutamine-glutamate turnover cycle, but are consistent with the temporal characteristics of the vesicular cycle: the release of glutamate from the vesicles and its reuptake. Thus, it can be assumed that the observed dynamics of glutamate and glutamine is caused by a change in glutamate mobility upon release from vesicles and reverse packing but not metabolic transformations in the cycle of neurotransmitters.

Keywords: ^{1}H-MRS, glutamate, PRESS, visual activation, short stimulus

EDN: HZBKAS
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 354–361

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 612.821:612.822.3

РЕЗОНАНСНОЕ СКАНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММЫ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ ЗРЕЛОСТИ КОРКОВОЙ РИТМИКИ У МЛАДШИХ ШКОЛЬНИКОВ

© 2022 г. Л.В. Савчук*, С.А. Полевая*, С.Б. Парин*, А.Т. Бондарь, А.И. Федотчев****

**Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23*
***Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино, Московской области, ул. Институтская, 3*
E-mail: fedotchev@mail.ru

Поступила в редакцию 31.01.2022 г.
После доработки 31.01.2022 г.
Принята к публикации 02.02.2022 г.

Экспериментально тестируется возможность оценки уровней активности резонансных и адаптационных механизмов и механизмов нейропластичности у школьников семи-восьми лет путем резонансного сканирования и анализа электроэнцефалограммы. При ритмической фотостимуляции с увеличивающейся от 4 до 15 Гц частотой у каждого школьника оценивали наличие электроэнцефалограммных реакций усвоения ритма (резонанс на частоте стимуляции) и реакций мультипликации ритма (резонанс на кратных частотах), а также сформированность и устойчивость альфа-диапазона электроэнцефалограммы. Предложен индекс зрелости корковой ритмики как индивидуальная сумма этих признаков. Установлено, что между индексом зрелости корковой ритмики и уровнем выполнения теста Тулуз-Пьерона, оценивающим когнитивные и исполнительские функции ребенка, существует тесная взаимосвязь. Эти показатели достоверно отличались от контроля у групп школьников, демонстрирующих отклонения от нормы и признаки школьной дезадаптации. Полученные данные свидетельствуют, что индекс зрелости корковой ритмики может служить маркером готовности ребенка к обучению в школе.

Ключевые слова: резонансное сканирование, электроэнцефалограмма, зрелость корковой ритмики, готовность детей к обучению, школьная дезадаптация, когнитивные и исполнительские функции.

DOI: 10.31857/S0006302922020181

Прием резонансного сканирования заключается в динамическом спектральном анализе электроэнцефалограммы (ЭЭГ) при предъявлении человеку ритмических световых стимулов с постепенно возрастающей частотой в диапазоне основных ритмов ЭЭГ [1]. Данный подход позволяет выявлять частотные компоненты в спектре ЭЭГ, характерные и значимые для данного испытуемого [2]. Выявляя тонко настроенные осцилляторы в индивидуальных спектрах ЭЭГ, метод позволяет использовать их в процедурах ЭЭГ-синхронизированной сенсорной стимуляции для нефармакологической регуляции функциональных состояний организма [3, 4].

К настоящему времени ряд закономерностей проявления резонансных ЭЭГ реакций человека на ритмические световые воздействия с изменяющейся частотой уже исследован. Так, показано, что конкретные параметры резонансных ЭЭГ-эффектов проявляют высокую стабильность у каждого индивида [5]. В то же время они демонстрируют значительное варьирование от человека к человеку [6, 7], отражая индивидуальное соотношение уровней активности резонансных и адаптационных механизмов центральной нервной системы (ЦНС) и механизмов нейропластичности [8, 9].

Перечисленные данные позволяют предположить, что закономерности проявления резонансных ЭЭГ-реакций на фотостимуляцию с частотой, изменяющейся в пределах основных ритмов электрической активности мозга, могут быть использованы в качестве маркера сформированности базовых механизмов деятельности ЦНС у отдельных категорий испытуемых. В частности, результаты резонансного сканирования и анализа ЭЭГ могут способствовать решению таких актуальных проблем современной науки и образова-

Сокращения: ЭЭГ – электроэнцефалограмма, ЦНС – центральная нервная система, СДВГ – синдром дефицита внимания с гиперактивностью.

ния, как определение готовности детей к школьному обучению [10] и выяснение причин школьной дезадаптации у учащихся младших классов [11].

Проверка данного предположения осуществлена в ходе выполнения социального проекта «Здоровое будущее», который реализуется в Нижнем Новгороде и предполагает междисциплинарное взаимодействие клиницистов, психофизиологов, школьных психологов и педагогов при комплексном мониторинге учащихся начальных классов, демонстрирующих трудности в обучении и признаки школьной дезадаптации [12]. В ходе клинических исследований у этих детей были диагностированы разнообразные отклонения от нормы, включая органическую задержку мозгового развития (энцефалопатии), синдром дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ) и тревожное расстройство. В качестве контроля к обследованиям привлекались школьники того же возраста без отклонений от нормы, которые не демонстрировали трудности в обучении и признаки школьной дезадаптации.

Задача исследования заключалась в сопоставлении результатов резонансного сканирования ЭЭГ у школьников семи-восьми лет, испытывающих и не испытывающих трудности в обучении, для определения зрелости системных механизмов деятельности мозга у младших школьников и уточнения причин школьной дезадаптации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Испытуемые. В исследовании приняли участие 65 учащихся младших классов в возрасте семи-восьми лет. 45 школьников были направлены на обследования по согласованию с клиницистами, школьными психологами и родителями в связи с трудностями обучения и постановкой предварительного диагноза (энцефалопатии – 12 случаев, СДВГ – 25 случаев, тревожное расстройство – 8 случаев), а 20 школьников составили контрольную группу без признаков отклонений от нормы и школьной дезадаптации.

Схема исследования. Каждое обследование ребенка состояло из нескольких этапов, включая выполнение корректурной пробы, стандартное ЭЭГ-исследование и проведение резонансного сканирования.

Корректурную пробу выполняли в компьютерном варианте, известном как тест Тулуз-Пьерона, который состоял в дифференцировании стимулов, близких по форме и содержанию, при установке на максимальную скорость и точность. Выполнение теста представляет собой интенсивную когнитивную нагрузку, требующую постоянного напряжения внимания. Каждому ребенку присваивается балл от 0 до 2, соответствующий низкому, среднему и высокому уровню выполнения теста на основании известных возрастных норм скорости и точности его выполнения [13].

ЭЭГ-исследование осуществляли при помощи электроэнцефалографа-анализатора ЭЭГА-21-26 «Энцефалан–131–03» компании «Медиком–МТД» (Таганрог, Россия). Запись вели от 16 электродов, расположенных по стандартной схеме «10–20» с референтными электродами на мочках ушей и электродом заземления в вертексе. Частота дискретизации – 250 Гц. Использовали следующие параметры фильтрации исходного сигнала: частота среза фильтра верхних частот – 0.5 Гц, частота среза фильтра нижних частот – 70 Гц, режекторный фильтр на частоте сети – 50 Гц. Экспертная оценка ЭЭГ проводилась опытным специалистом и состояла в определении наличия реакций усвоения ритма фотостимуляции (резонансных ЭЭГ-реакций на частоте стимуляции), наличия нелинейных реакций на кратных частотах или реакций мультипликации (резонансных ЭЭГ-реакций на частоте гармоник), а также в оценке сформированности и устойчивости альфа-диапазона ЭЭГ. При количественном анализе ЭЭГ использовали метод дискретного преобразования Фурье для определения выраженности ЭЭГ в следующих частотных диапазонах: тета (4–8 Гц), альфа (8–13 Гц), бета (13–21 Гц), а также для определения пиковой частоты альфа-ритма.

В процессе резонансного сканирования фотостимуляцию осуществляли с помощью красных светодиодов с длиной волны 650 нм, вмонтированных в очки со светонепроницаемыми линзами. Световые стимулы с мощностью, не превышающей 100 мкВт, подавали на светодиоды через усилитель от компьютера, управляющего стимуляцией по специальной программе. Она предусматривала предъявление серии вспышек со ступенчато нарастающей частотой в диапазоне от 4.0 до 15.0 Гц с шагом 0.25 Гц. Продолжительность стимуляции на каждом шаге с фиксированной частотой составляла 5 с, а общая продолжительность фотостимуляции – 220 с.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ «Сигма-Плот 11.0». После оценки нормальности распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка вычисляли средние для групп значения показателей (M) и стандартные ошибки (m). Для определения уровней значимости различий P каждого группового показателя с контролем использовали непараметрический критерий знаковых рангов для малых выборок Вилкоксона–Манна–Уитни (Mann–Whitney Rank Sum Test). Оценку уровней значимости сдвигов (со знаком) показателей при воздействии относительно фона осуществляли с помощью парного t-критерия Стьюдента. Различия считались статистически значимыми при $p \leq 0{,}05$.

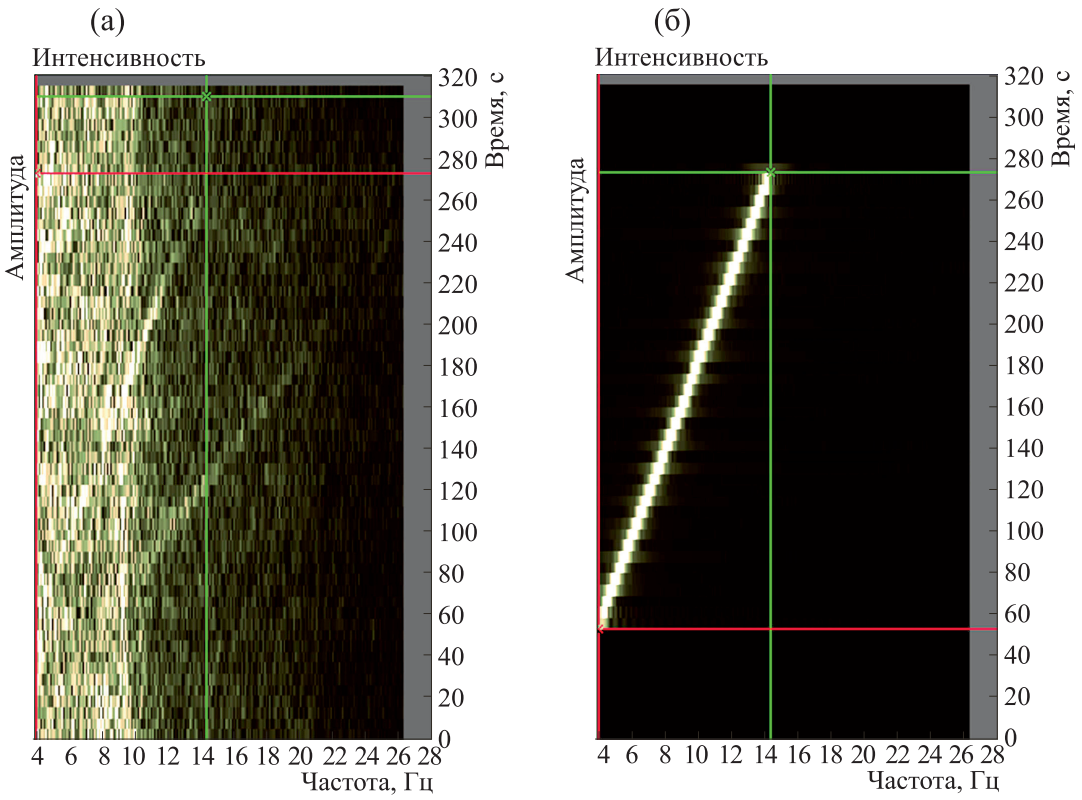


Рис. 1. Динамика спектров ЭЭГ (а) и стимуляции (б) в ходе обследования испытуемого № 310. По оси абсцисс – частота спектра, Гц; по оси ординат – время эксперимента, с. Ось Z – спектральная плотность, отраженная интенсивностью окраски.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Индивидуальные особенности изменений ЭЭГ в ходе резонансного сканирования анализировали путем последовательного вычисления спектров ЭЭГ и спектров стимуляции по ходу каждого обследования, что позволяло наглядно сопоставлять их динамики. Ниже представлен типичный пример такой спектральной динамики для одного из испытуемых (рис. 1).

На рис. 1 можно видеть, что уже при первых световых воздействиях и по мере увеличения их частоты в спектрах ЭЭГ наблюдаются резонансные спектральные пики, точно совпадающие по частоте с действующей в данный момент частотой стимуляции. Кроме того, резонансные спектральные пики наблюдаются также на частоте второй гармоники стимуляции. Эти спектральные пики образуют на левой части рисунка наклонные прямые линии, отражающие резонансную активацию ЭЭГ на частоте стимуляции и ее гармоники. Можно также видеть, что у данного испытуемого альфа-диапазон ЭЭГ сформирован, а альфа-пик устойчиво регистрируется на частоте около 9.5 Гц.

При экспертном анализе полученных записей выяснилось, что описанная спектральная динамика с наличием каждого из трех анализируемых признаков ЭЭГ (усвоение ритма, мультипликация и устойчивость альфа-диапазона) регистрируется не у всех испытуемых. У части обследуемых резонансные ЭЭГ-реакции в ответ на фотостимуляцию не отмечались, а доминирующим являлся не альфа-, а тета-диапазон ЭЭГ. Типичный пример динамики спектров ЭЭГ с отсутствием резонансных ЭЭГ-реакций и несформированным альфа-диапазоном представлен на рис. 2.

На рис. 2 можно видеть, что каких-либо закономерных перестроек в спектре ЭЭГ с увеличением частоты фотостимуляции не происходит, а локальные пики на спектральных кривых регулярно отмечаются в диапазоне тета-ритма ЭЭГ.

В результате экспертного анализа ЭЭГ для всех групп испытуемых была установлена частота встречаемости каждого признака ЭЭГ и проведена оценка отличия соответствующих величин от контроля (табл. 1).

Данные табл. 1 показывают, что в контрольной группе регистрируется максимальная встречаемость каждого из трех анализируемых признаков. В группах с отклонениями от нормы эти признаки были представлены значительно реже, особенно при энцефалопатиях, а уровни различия от

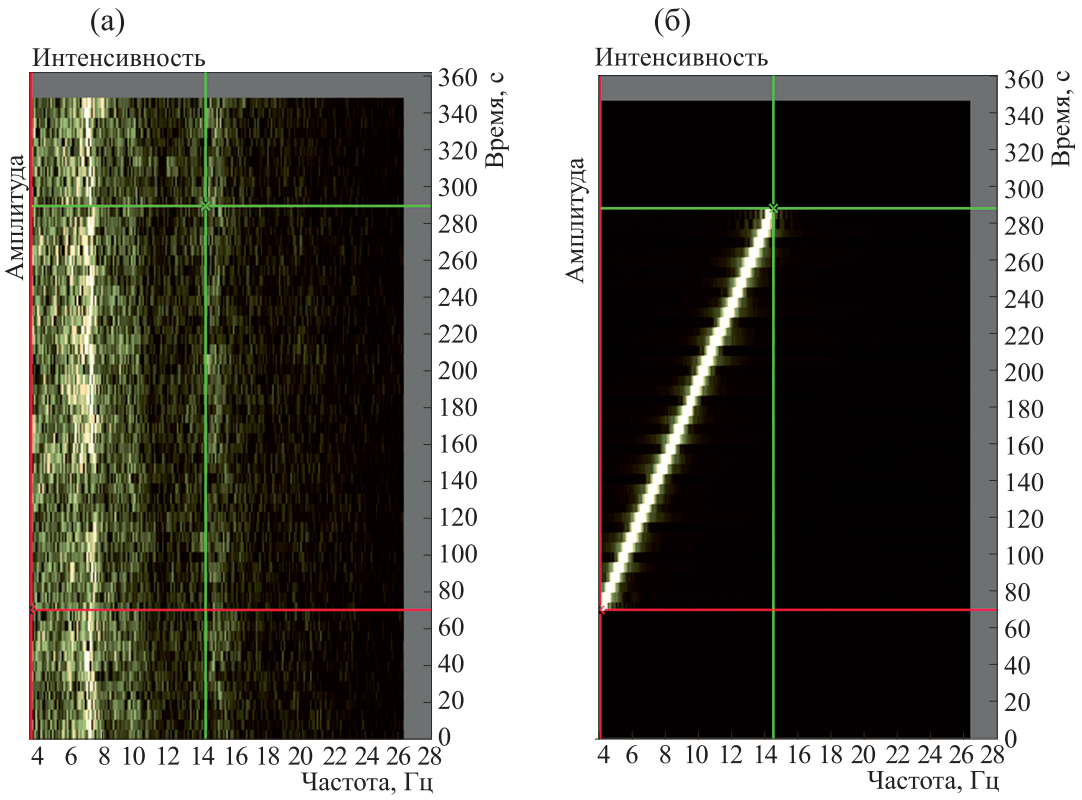


Рис. 2. Динамика спектров ЭЭГ (а) и стимуляции (б) в ходе обследования испытуемого № 307. Обозначения как на рис. 1.

контроля оказались высоко значимыми. Наименьшие различия от контроля зарегистрированы в группе с тревожными расстройствами.

На основании полученных индивидуальных оценок встречаемости признаков каждому ребенку присваивался балл от 0 до 3, равный сумме зарегистрированных у него признаков. Этот показатель рассматривался как интегральный индекс зрелости корковой ритмики, характерный для данного испытуемого.

Таблица 1. Экспертные оценки ключевых признаков ЭЭГ при фотостимуляции и уровень их отличия от контроля в разных группах испытуемых

Признак ЭЭГ	Группа	Наличие признака, %	Уровень отличия *P* от контроля
Резонанс на частоте стимуляции – усвоение ритма	Контроль	95.0±5.0	–
	Энцефалопатии	**50.0 ± 15.1**	**0.002**
	СДВГ	**48.0 ± 10.2**	**0.001**
	Тревожное расстройство	**50.0 ± 18.9**	**0.007**
Резонанс на частоте гармоник – мультипликация	Контроль	65.0 ± 10.9	–
	Энцефалопатии	**8.3 ± 8.3**	**0.002**
	СДВГ	**24.0 ± 8.7**	**0.006**
	Тревожное расстройство	25.0 ± 16.4	0.064
Сформированность и устойчивость альфа-диапазона ЭЭГ	Контроль	95.0 ± 5.0	–
	Энцефалопатии	**41.7 ± 14.9**	**0.001**
	СДВГ	**60.0 ± 10.0**	**0.008**
	Тревожное расстройство	**62.5 ± 18.3**	**0.032**

Примечание. Жирным шрифтом выделены величины с уровнем значимости $P < 0.05$.

Таблица 2. Показатели зрелости корковой ритмики и выполнения корректурной пробы, а также их отличия от контроля в разных группах испытуемых

Показатель	Группа	Среднее значение	Уровень отличия *P* от контроля
Индекс зрелости корковой ритмики (баллы)	Контроль	2.60 ± 0.13	–
	Энцефалопатии	**1.00 ± 0.24**	**0.001**
	СДВГ	**1.32 ± 0.16**	**0.001**
	Тревожное расстройство	**1.25 ± 0.31**	**0.001**
Уровень выполнения теста Тулуз-Пьерона (баллы)	Контроль	1.90 ± 0.06	–
	Энцефалопатии	**0.50 ± 0.15**	**0.001**
	СДВГ	**0.84 ± 0.12**	**0.001**
	Тревожное расстройство	**0.75 ± 0.25**	**0.001**

Примечание. Жирным шрифтом выделены величины с уровнем значимости различий $P < 0.05$.

Выяснилось, что индекс зрелости корковой ритмики тесно взаимосвязан с уровнем выполнения теста Тулуз-Пьерона. Коэффициент ранговой корреляции Спирмена между этими показателями оказался высоким и достоверным ($r = 0.557$, $P < 0.001$). Значения обоих показателей для разных групп испытуемых представлены в табл. 2.

Данные табл. 2 показывают, что у контрольной группы экспертные оценки ЭЭГ и результаты выполнения теста демонстрируют максимальные значения. Оба этих показателя во всех группах с отклонениями от нормы были достоверно ниже, чем в контроле. Наибольшие отличия от нормы зарегистрированы в группе с энцефалопатиями.

У всех исследуемых групп школьников были также сопоставлены количественные показатели ЭЭГ: сдвиги мощности тета-, альфа- и бета-ритмов ЭЭГ, а также пиковой частоты альфа-ритма ЭЭГ при фотостимуляции относительно фона (табл. 3).

Данные табл. 3 показывают, что под влиянием фотостимуляции в группе контроля происходит достоверный рост выраженности альфа- и бета-

Таблица 3. Сдвиги мощности основных ритмов и пиковой частоты ЭЭГ при стимуляции относительно фона и уровень значимости этих сдвигов в разных группах испытуемых

Показатель	Группа	$M \pm m$	Уровень значимости *P*
Сдвиг мощности тета-ритма ЭЭГ (отн.ед.)	Контроль	–0.40 ± 0.60	0.528
	Энцефалопатии	–0.50 ± 0.33	0.203
	СДВГ	–0.96 ± 0.55	0.098
	Тревожное расстройство	–0.50 ± 0.86	0.582
Сдвиг мощности альфа-ритма ЭЭГ (отн.ед.)	Контроль	**1.45 ± 0.65**	**0.025**
	Энцефалопатии	**1.16 ± 0.50**	**0.039**
	СДВГ	**0.96 ± 0.42**	**0.018**
	Тревожное расстройство	0.25 ± 0.31	0.451
Сдвиг мощности бета-ритма ЭЭГ (отн.ед.)	Контроль	**0.40 ± 0.15**	**0.017**
	Энцефалопатии	0.16 ± 0.20	0.438
	СДВГ	0.04 ± 0.15	0.847
	Тревожное расстройство	0.25 ± 0.16	0.170
Сдвиг пиковой частоты ЭЭГ (Гц)	Контроль	**0.40 ± 0.13**	**0.008**
	Энцефалопатии	0.25 ± 0.13	0.250
	СДВГ	0.16 ± 0.09	0.156
	Тревожное расстройство	0.18 ± 0.26	0.504

Примечание. Жирным шрифтом выделены величины сдвигов с уровнем значимости $P < 0.05$.

ритмов, а также увеличение пиковой частоты ЭЭГ. Достоверный рост мощности альфа-ритма при фотостимуляции происходит также при энцефалопатиях и СДВГ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования подтверждают высказанное предположение о том, что при фотостимуляции с частотой, изменяющейся в пределах ЭЭГ-ритмов, появляется возможность оценивать сформированность базовых механизмов деятельности ЦНС у младших школьников. Показано, что в этих условиях можно наглядно наблюдать три признака резонансных ЭЭГ реакций на фотостимуляцию. При этом проявление резонансных ЭЭГ-ответов на частоте стимуляции (усвоение ритма) можно считать критерием адаптационного потенциала мозга, а наличие резонанса на частоте гармоник (мультипликация ритма) – отражением уровня активности механизмов нейропластичности [6]. Кроме того, при резонансном сканировании ЭЭГ можно оценивать также сформированность и устойчивость альфа-диапазона ЭЭГ в соответствии с возрастными нормами становления доминирующей ритмики мозга у младших школьников [14].

Важно подчеркнуть, что индивидуальная сумма анализируемых ЭЭГ-признаков, или индекс зрелости корковой ритмики, демонстрирует высокозначимую взаимосвязь с уровнем выполнения теста Тулуз-Пьерона, который позволяет адекватно оценивать когнитивные и исполнительские функции ребенка [15]. Поскольку оба этих показателя достоверно выше у школьников контрольной группы, не испытывающих трудностей в обучении, индекс зрелости корковой ритмики может быть предложен в качестве объективного маркера готовности детей к школьному обучению.

Полученные в работе данные могут быть также использованы при уточнении возможных причин школьной дезадаптации у учащихся младших классов. Из литературы известно, что успешность ребенка в обучении зависит как от личностных характеристик, так и от психофизиологической зрелости базовых механизмов деятельности мозга [16]. В то же время отсутствуют однозначные данные о том, снижение каких функций наиболее специфично для неуспевающих школьников [17]. Судя по полученным данным, наибольшие отклонения от нормы зарегистрированы у детей с наличием различных органических поражений ЦНС в виде энцефалопатий. Среди выявленных отличительных признаков выделяются такие показатели, как минимальный уровень активности адаптационных и резонансных механизмов ЦНС, значимо сниженный индекс зрелости корковой ритмики, а также минимальный уровень когнитивных и исполнительских функций по тесту Тулуз-Пьерона.

В современной литературе подчеркивается важность проведения сеансов ЭЭГ-мониторинга у детей с органическими заболеваниями головного мозга [18]. В то же время отмечается недостаточность и противоречивость сведений о количественных признаках ЭЭГ при разных типах психопатологий [19] и при энцефалопатиях [20]. Поэтому полученные нами данные об отличительных особенностях ЭЭГ у младших школьников с энцефалопатиями носят приоритетный характер и могут рассматриваться как ЭЭГ-маркеры данного вида мозговой патологии.

Существенные отличительные особенности зарегистрированы также у школьников с СДВГ. У них выявлены значимо сниженные показатели индекса зрелости корковой ритмики и показатели выполнения корректурной пробы. Полученные данные дополняют общепринятые представления об особенностях спектральной структуры ЭЭГ [21] и низком когнитивном темпе [22] у детей с СДВГ.

При тревожных расстройствах у младших школьников, испытывающих трудности в обучении, зарегистрированы наименьшие отклонения от нормы. У них отмечены сниженные показатели индекса зрелости корковой ритмики и менее успешное, чем в контроле, выполнение корректурной пробы. Эти данные позволяют предположить, что тревожность является психологическим аспектом академической адаптации учащихся младшего школьного возраста к обучению, отражающим трудности включения ребенка в образовательную среду [11].

Таким образом, проведенное исследование позволило уточнить, какие функции учащихся младших классов являются главными причинами неуспешного включения ребенка в образовательную среду. Среди наиболее значимых можно назвать такие, как недостаточная зрелость резонансных и адаптационных механизмов ЦНС и механизмов нейропластичности, а также пониженный уровень когнитивных и исполнительских функций.

Важными представляются полученные данные о количественных ЭЭГ-эффектах резонансного сканирования, демонстрирующие достоверный рост мощности альфа-ритма ЭЭГ при фотостимуляции относительно фона у большинства испытуемых. По-видимому, фотостимуляция «высвечивает» посредством резонанса тонкую структуру индивидуального спектра ЭЭГ и выявляет потенциальные резонансно-активные осцилляторы мозга [2]. Такая резонансная активация потенциальных резонаторов в ЭЭГ может служить приемом стимуляции механизмов нейропластичности и повышения отзывчивости мозга к адап-

тивной нейростимуляции. В пользу данного предположения свидетельствуют недавние данные о том, что успешная когнитивная реабилитация пациентов с инсультами достигается только при условии, что лечебным сеансам ЭЭГ-управляемой адаптивной нейростимуляции предшествуют процедуры резонансного сканирования [23].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резонансное сканирование путем предъявления световых ритмических стимулов со ступенчато увеличивающейся частотой позволяет наблюдать у семи-восьмилетних школьников наличие ЭЭГ реакций усвоения ритма (резонанс на частоте стимуляции) и реакций мультипликации ритма (резонанс на кратных частотах), а также сформированность и устойчивость альфа-диапазона ЭЭГ. Индивидуальная сумма этих признаков, или индекс зрелости корковой ритмики, демонстрирует тесную взаимосвязь с уровнем выполнения теста Тулуз-Пьерона, оценивающим когнитивные и исполнительские функции ребенка. Оба этих показателя достоверно отличаются от контроля у групп школьников, демонстрирующих отклонения от нормы и признаки школьной дезадаптации. Резонансное сканирование и анализ ЭЭГ как элементы методологии цифрового психофизиологического картирования являются эффективным инструментом выявления точных количественных признаков, которые определяют психофизиологический статус младших школьников, испытывающих и не испытывающих трудности при обучении. Выявленные особенности каждой из обследованных групп могут способствовать объективному уточнению причин школьной дезадаптации.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Государственного задания Пущинского научного центра биологических исследований РАН (проект АААА-А20-120101390066-3) и Государственного задания Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского (АААА-А20-120122190088-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией (принятой в июне 1964 г. в Хельсинки, Финляндия и пересмотренной в октябре 2000 г. в Эдинбурге, Шотландия). От родителей каждого ребенка получено информированное согласие на его участие в обследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. И. Федотчев, А. Т. Бондарь, А. А. Маевский и Л. П. Якупова, Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова **46** (3), 447 (1996).
2. А. И. Федотчев, Физиология человека **23** (4), 117 (1997).
3. N. Salansky, A. Fedotchev, and A. Bondar. Neurosci. Biobehav. Rev. **22** (3), 395 (1998).
4. А. И. Федотчев. Биофизика **64** (2), 358 (2019).
5. A. I. Fedotchev, A. T. Bondar, and V. F. Konovalov. Int. J. Psychophysiol. **9** (2), 189 (1990).
6. А. И. Федотчев, Биофизика **46** (1), 112 (2001).
7. А. Т. Бондарь, А. В. Ларионова, О. В. Пивоварова и А. И. Федотчев, Биофизика **49** (5), 928 (2004).
8. А. И. Федотчев, А. Т. Бондарь и И. Г. Акоев, Журн. высш. нерв. деятельности им. И.П. Павлова **51** (1), 17 (2001).
9. А. И. Федотчев, С. Б. Парин и С. А. Полевая. Биофизика **66** (2), 408 (2021).
10. Н. Т. Колесник, Новое в психолого-педагогических исследованиях, № 1 (61), 72 (2021).
11. М. В. Григорьева, Р. М. Шамионов, Е. С. Гринина и др., Перспективы науки и образования, № 4 (52), 247 (2021).
12. О. В. Баландина, Е. Д. Божкова, В. В. Дворянинова и др., Мед. альманах, № 2 (59), 24 (2019).
13. Л. А. Ясюкова, *Методика определения готовности к школе: прогноз и профилактика проблем обучения в начальной школе: методическое пособие* (ИМАТОН, СПб, 2006).
14. В. Б. Войнов. Успехи физиол. наук **45** (3), **66** (2014).
15. N. Babkina, Behav. Sci. (Basel) **9** (12), 158 (2019).
16. В. Л. Ефимова, Психология образования в поликультурном пространстве, № 2 (50), 28 (2020).
17. Н. А. Хохлов и Е. Д. Словенко, Вестн. ММГУ. Сер. 14. Психология, № 3, 291 (2020).
18. X. L. Bozarth, J. McGuire, and E. Novotny. Pediatr. Neurol. **101**, 11 (2019).
19. M. McVoy, S. Lytle, E. Fulchiero, et al., Psychiatry Res. **279**, 331 (2019).
20. A. Yuliati and A. R. B. Weber, J. Clin. Neurophysiol. **36** (3), 181 (2019).
21. A. R. Clarke, R. J. Barry, and S. Johnstone, Clin. Neurophysiol. **131** (7), 1463 (2020).

22. Б. М. Коган и Т. Г. Куликова, Системная психология и социология, № 2 (26), 47 (2018).

23. E. A. Mukhina, S. A. Polevaya, S. B. Parin, and A. I. Fedotchev. Opera Med. Physiol. **8** (4), 90 (2021).

Resonance Scanning and Analysis of the Electroencephalogram in Determining the Maturity of Cortical Rhythms in Younger Schoolchildren

L.V. Savchuk*, S.A. Polevaya*, S.B. Parin*, A.T. Bondar, and A.I. Fedotchev****

**National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, prosp. Gagarina 23, Nizhny Novgorod, 603950 Russia*

***Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The possibility of assessing the levels of activity of resonant and adaptive mechanisms and mechanisms of neuroplasticity in schoolchildren 7–8 years old by means of resonant scanning and analysis of the electroencephalogram is being experimentally tested. During rhythmic photostimulation with a smoothly increasing frequency from 4 to 15 Hz, each schoolchildren was assessed for the presence of electroencephalogram reactions of rhythm entrainment (resonance at the stimulation frequency) and rhythm multiplication (resonance at multiple frequencies), as well as the formation and stability of the electroencephalogram alpha range. The maturity index of cortical rhythms is proposed as an individual sum of these features. It has been established that there is a close relationship between the maturity index of the cortical rhythms and the performance level of the Toulouse-Pieron test, which assesses the cognitive and executive functions of the child. These indicators significantly differed from the control in groups of schoolchildren demonstrating deviations from the norm and signs of school maladaptation. The data obtained indicate that the cortical rhythms maturity index can serve as a marker of a child's readiness for schooling.

Keywords: resonant scanning; electroencephalogram; maturity of cortical rhythms; children's readiness for learning; school maladjustment; cognitive and executive functions

EDN: NSFALM
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 362–370

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 571.3

ОЦЕНКА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ТИРЕОИДНЫМИ ГОРМОНАМИ И ТИРЕОТРОПИНОМ ПРИ РАССТРОЙСТВАХ ФУНКЦИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА БАЗЕ ПОПУЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА ДАННЫХ С ЛОГИСТИЧЕСКОЙ МОДЕЛЬЮ

© 2022 г. Т.Р. Ламичхане*, С.П. Пант*, Б. Ламичхане*, С. Паудел, Б.К. Ядав**, Х.П. Ламичхане***

**Центральный физический факультет Университета Трибхуван, Киртипур, Катманду, Непал*
***Факультет биохимии Института медицины при Клинике Университета Трибхуван, Махараджгундж, Катманду, Непал*
**E-mail: tika.lamichhane@cdp.tu.edu.np*

Поступила в редакцию 17.06.2021 г.
После доработки 21.10.2021 г.
Принята к публикации 01.11.2021 г.

Цель данной работы – исследование комплексных корреляций между свободным сывороточным трийодтиронином и тетрайодтиронином и тиреотропным гормоном при расстройствах функций щитовидной железы. В исследование включили 3425 пациентов, у которых проводили анализ функционального состояния щитовидной железы. Пациентов делили на группы с эутиреозом (70.45%), субклиническим гипотиреозом (18.95%), выраженным гипотиреозом (3.30%), субклиническим гипертиреозом (5.11%) и явным гипертиреозом (2.19%). Линейные и нелинейные соотношения между трийодтиронином, тетрайодтиронином и тиреотропином моделировали статистически с целью выявить их роли в функционировании щитовидной железы. Гипотиреоз более распространен, чем гипертиреоз, причем женщины ему подвержены больше, чем мужчины. Корреляция между трийодтиронином и тетрайодтиронином увеличивается от эутиреоза ($r = 0.1$, $P < 0.001$) к выраженным расстройствам щитовидной железы ($r = 0.91$, $P < 0.001$). Сложные нелинейные корреляции между тетрайодтиронином и тиреотропином в значительной мере объясняются хорошо аппроксимирующими сигмоидными кривыми четырехпараметрической логистической модели ($R^2 = 0.97$, $P < 0.001$) в случаях как гипотиреоза, так и гипертиреоза. Кривые четырехпараметрической логистической модели – это траектории ответа гипофизарного тиреотропина, которые показывают ключевые точки расстройств щитовидной железы по отклонению сывороточного тетрайодтиронина. Отрицательные углы наклона и корреляции, наблюдаемые при линейной аппроксимации тиреотропина против трийодтиронина и тетрайодтиронина – индикаторы наличия механизма отрицательной обратной связи в цикле щитовидной железы.

Ключевые слова: расстройства щитовидной железы, тиреоидные гормоны, линейная аппроксимация, нелинейная аппроксимация, логистическая модель, корреляция.

DOI: 10.31857/S0006302922020193

Для описания функций щитовидной железы необходимо исследование, учитывающее возраст, пол, этническую принадлежность и географию проживания пациентов. Референсные значения свободных гормонов щитовидной железы в сыворотке (СТ3 – свободный сывороточный трийодтиронин, СТ4 – свободный сывороточный тетрайодтиронин) и тиреотропного гормона (ТТГ) варьируют между разными лабораториями, что приводит к значительным изменениям в оценке статуса щитовидной железы пациентов [1–5]. Анализ результатов оценки функции щитовидной железы (ОФЩЖ) ведет к сложным корреляциям среди ковариат СТ3, СТ4 и ТТГ под влиянием множества физиологических факторов. Взаимодействие гормонов определяется болезнями щитовидной железы, прочими болезнями, приемом лекарств, индексом массы тела, возрастом, полом и статусом антител [1, 3, 6, 7]. Развиваясь изначально от линейной аппроксимации значений ОФЩЖ, лог-линейные соотноше-

Сокращения: СТ3 – свободный сывороточный трийодтиронин; СТ4 – свободный сывороточный тетрайодтиронин; ТТГ – тиреотропный гормон (тиреотропин); ОФЩЖ – оценка функции щитовидной железы; 4PL – четырехпараметрическая логистическая модель.

ния между ТТГ и СТ4 постепенно вошли в практику [1, 8, 9].

В дополнение к лог-линейным преобразованиям, нелинейные соотношения между ТТГ и СТ4 обсуждались на базе различных моделей, таких, как сигмоидные функции, функция ошибки и полином четвертого порядка [2, 10, 12]. Согласно авторам работы [13], секреция ТТГ тонко регулируется для обеспечения широкого диапазона концентраций СТ4 и существует криволинейная зависимость между ТТГ и СТ4, что поддерживает идею отрицательной обратной связи оси гипоталамус–гипофиз–щитовидная железа. В работе [14] был предложен раздельный анализ эутиреоидных, гипотиреоидных и гипертиреоидных панелей для понимания корреляции между ТТГ и СТ4, поскольку функциональные сегменты, по-видимому, регулируются различным образом при смене трендов между этими состояниями. Авторы работы[2] моделировали клинические данные для разработки сигмоидальных соотношений между ТТГ и СТ4 в двух сегментах зависимости – СТ4 <12 пмоль/л и СТ4 >12 пмоль/л. Однако их значимость для расстройств щитовидной железы не определена. Корреляции между СТ3, СТ4 и ТТГ изменяются при различном статусе расстройств щитовидной железы, для чего мы анализируем большие массивы данных пациентов, проходящих лечение в клиниках. Задействованная в этом исследовании четырехпараметрическая логистическая модель (4PL) была лучше применима для описания сложных корреляций между ТТГ и СТ4, когда расстройство функции щитовидной железы растет от эутиреоза до субклиничного и выраженного расстройства. Модель 4PL дает наклон графика Хилла, точку перегиба и асимптотические значения, которые дают соотношение для траектории ответа гипофизарного ТТГ по отклонению в сывороточном СТ4.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данные ОФЩЖ амбулаторных пациентов были получены из базы данных Отделения биохимии Клиники Университета Трибхуван (Катманду, Непал). ОФЩЖ проводили методом усиленной иммунохемилюминесценции на иммунодиагностическом анализаторе Vitros 3600 (Johnson & Johnson, США) с сентября 2017 г. до декабря 2018 г. В общей сложности были включены в исследование 3425 пациентов возрастом от полугода до 93 лет. Референсные диапазоны значений СТ3, СТ4 и ТТГ составляли 4.26–8.10 пмоль/л, 10.20–28.20 пмоль/л и 0.46–4.68 мМЕ/л соответственно. Этическое одобрение на исследование было получено от Наблюдательного Совета Клиники Университета Трибхуван. Данные, испытывающие аналитическое влияние хронических болезней, не связанных с щитовидной железой, медицинских препаратов, факторов, нарушающих функцию оси гипоталамус–гипофиз–щитовидная железа, а также неполные данные о дате, возрасте, поле или с отсутствием результатов любой ОФЩЖ, исключались из исследования.

Набор данных ОФЩЖ категоризировали на подразделы – эутиреоз, субклиничный гипотиреоз, выраженный гипотиреоз, субклиничный гипотиреоз, выраженный гипертиреоз. Средние значения ОФЩЖ и допустимые ошибки рассчитывали для каждого расстройства. Подразделы данных статистически анализировали методом линейного регрессионного анализа СТ3 и СТ4, а также методом лог-линейной аппроксимации между ln(ТТГ) и СТ3 или СТ4. Также сложные нелинейные корреляции между СТ4 и ТТГ были проанализированы по модели 4PL-регрессии отдельно для гипо- и гипертиреоза на основе эутиреоза. Статистический анализ, включающий и линейную, и нелинейную аппроксимацию, проводили в программах MS Excel 2007 и Origin-2017 (версия 94E, OriginLab Corporation, США). Результаты, полученные с P-значением менее 5%, считались статистически значимыми.

Как предлагалось ранее авторами работ [15, 16] для методов определения связывания лигандов, сигмоидное уравнение модели 4PL, подтверждающее нелинейное соотношение между СТ4 и ТТГ, выражается как

$$y = A + \frac{B - A}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^m}, \quad (1)$$

где y – ln(ТТГ), x – СТ4, A – минимальное асимптотическое значение y или значение ответа на максимальный стандартный уровень СТ4, B – максимальное асимптотическое значение или значение ответа на минимальный стандартный уровень СТ4, x_0 – точка перегиба (значение x, соответствующее половине пути между A и B, а m – коэффициент Хилла (крутизна кривой). Кривая 4PL по своей природе имеет сигмоидальную симметрию.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Из общего количества пациентов (3425 человек), 70.45% (665 М + 1748 Ж) имели клинический эутиреоз, 18.95% (164 М + 485 Ж) – субклиничный гипотиреоз, 3.30% (29 М + 84 Ж) – выраженный гипотиреоз, 5.11% (46 М + 129 Ж) – субклиничный гипертиреоз и 2.19% (17 М + 58 Ж) – выраженный гипертиреоз. Пациенты более часто страдают от гипотиреоза, чем от гипертиреоза, при этом женщины более подвержены заболеваниям, чем мужчины, как сообщалось в предыдущих исследованиях [7, 17–20]. Описательная статистика (среднее, стандартное отклонение (ст.

Таблица 1. Описательная статистика возраста, ТТГ, СТ4 и СТ3 при нормальном и аномальном состоянии щитовидной железы у 3425 пациентов

Статус щитовидной железы	Значения	Возраст, лет	ТТГ, мМЕ/л	СТ4, пмоль/л	СТ3, пмоль/л	N
Эутиреоз	Среднее	35.94	2.30	14.17	5.47	2413 (70.45%) (665 М + 1748 Ж)
	Ст. откл.	16.47	0.98	2.82	0.83	
	минимум	0.50	0.47	10.10	4.20	
	максимум	93.00	4.68	28.20	8.10	
Субклиничный гипотиреоз	Среднее	38.49	7.62	13.53	5.38	649 (18.95%) (164 М + 485 Ж)
	Ст. откл.	17.37	3.74	3.03	0.88	
	минимум	0.50	4.70	10.10	4.10	
	максимум	92.00	35.30	28.00	8.20	
Выраженный гипотиреоз	Среднее	43.32	56.23	5.02	3.10	113 (3.30%) (29 М + 84 Ж)
	Ст. откл.	18.33	37.42	3.17	0.89	
	минимум	2.00	4.72	0.88	1.20	
	максимум	84.00	100.00	10.10	4.20	
Субклиничный гипертиреоз	Среднее	43.03	0.15	17.15	6.05	175 (5.11%) (46 М + 129 Ж)
	Ст. откл.	19.17	0.14	3.97	1.14	
	минимум	0.16	0.01	10.10	4.10	
	максимум	92.00	0.45	27.70	8.10	
Выраженный гипертиреоз	Среднее	37.04	0.02	53.37	20.22	75 (2.19%) (17 М + 58 Ж)
	Ст. откл.	12.37	0.03	21.03	9.52	
	минимум	14.00	0.01	28.50	8.65	
	максимум	73.00	0.26	90.00	35.00	

Примечание. Уровень значимости однофакторного дисперсионного анализа каждой ОФЩЖ составляет $P < 0.001$ между разными группами.

откл.), минимальное и максимальное значение) возраста, ТТГ, СТ4 и СТ3 для каждого подраздела набора данных приводятся в табл. 1. Различия результатов статистически значимы ($P < 0.001$) при сравнении групп с разным статусом щитовидной железы.

Среднее ± ст. откл. для ТТГ, СТ4 и СТ3 составило 2.30 ± 0.98 мМЕ/л, 14.17 ± 2.82 пмоль/л и 5.47 ± 0.83 пмоль/л соответственно у пациентов с эутиреозом возрастом 35.94 ± 16.47 лет. У пациентов с субклиничным гипотиреозом возрастом 38.49 ± 16.37 лет значения ТТГ, СТ4 и СТ3 находятся в пределах 7.62 ± 3.74 мМЕ/л, 13.53 ± ± 3.03 пмоль/л и 5.38 ± 0.88 пмоль/л соответственно. Выраженный гипотиреоз проявляется в более старшем возрасте (43.32 ± 18.33 лет), при этом повышенный уровень ТТГ составляет 56.23 ± 37.42 мМЕ/л, в то время как сниженные уровни СТ4 и СТ3 равны 5.02 ± 3.17 пмоль/л и 3.10 ± 34.20 пмоль/л. Пациенты с субклиничным гипотиреозом имели возраст 43.03 ± 19.17 лет, сниженный ТТГ – 0.15 ± 0.14 мМЕ/л, при нормальных значениях СТ4 – 17.15 ± 3.97 пмоль/л и СТ3 – 6.04 ± 1.14 пмоль/л. Пациенты с выраженным гипертиреозом возрастом 37.04 ± 12.37 (диапазон: 14–73) лет проявляли значительно сниженный уровень ТТГ – 0.02 ± 0.03 мМЕ/л, с подъемом уровня СТ4 до 53.37 ± 21.03 пмоль/л и СТ3 до 20.22 ± 9.52 пмоль/л. Результаты каждой ОФЩЖ имели P-значение < 0.001 по разным группам (табл. 1). Наши наблюдения также показывают, что встречаемость выраженных расстройств щитовидной железы ниже в раннем детстве, чем в пожилом возрасте, что объяснялось в более ранних работах [21–23]. Исследования щитовидной железы показывают, что большинство детей страдает от врожденных расстройств щитовидной железы, тогда как взрослые страдают от

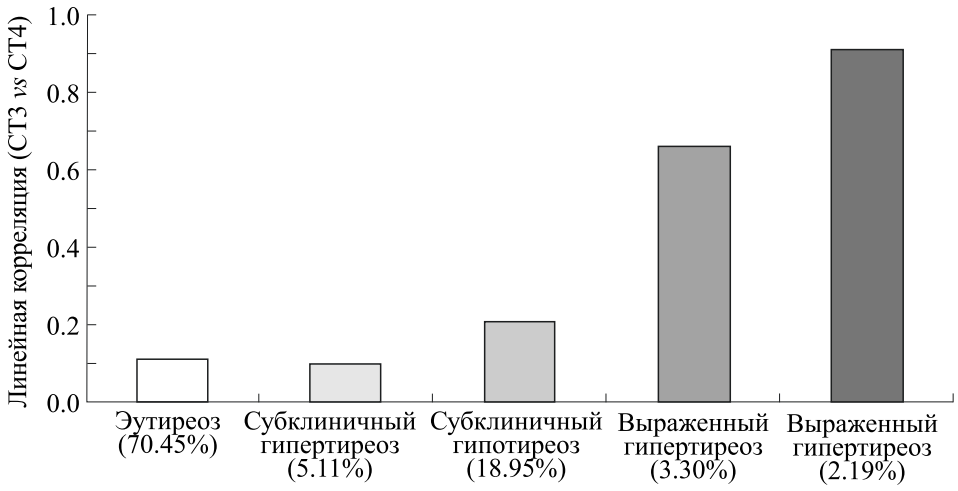


Рис. 1. Увеличивающаяся положительная корреляция между CT3 и CT4 от эутиреоза через субклиничные расстройства к выраженным расстройствам щитовидной железы. Процентные величины в скобках указывают на присутствие нарушений функции щитовидной железы среди 3425 (921 М + 2504 Ж) пациентов.

аутоиммунного тиреоидита, сердечной недостаточности вследствие тиреотоксикоза, гипертонии и тироидных узелков или зоба [24].

Линейная корреляция между CT3 и CT4 сильнее при выраженном гипотиреозе (r = 0.66, P < 0.001) и выраженном гипертиреозе (r = 0.91, P < 0.001), чем при субклиничном гипотиреозе (r = 0.21, P < 0.001), субклиничном гипертиреозе (r = 0.10, P < 0.17) и эутиреозе (r = 0.10, p < 0.001), как показано на рис. 1. Наклон линейной регрессии CT3 от CT4 также повышается в направлении от эутиреоза в сторону гипо- и гипертиреоза, как отмечено в табл. 2. Увеличение наклона означает, что увеличивается скорость монодейодирования CT4 до CT3 из-за дерегуляции ТТГ. При выраженных дисфункциях щитовидной железы крайние значения ТТГ принимаются за 0.01 и 100 мМЕ/л. Мы обнаружили значительную линейность корреляций (r = –0.75, P < 0.001 между ln(ТТГ) и CT4 и r = –0.52, P < 0.06 для ln(ТТГ) и CT3) в случае выраженного гипотиреоза. Однако линейная аппроксимация зависимости ln(ТТГ) от CT4 демонстрирует очень слабую корреляцию в других случаях, при P-значениях от < 0.001 до 0.72, как представлено в табл. 2. Далее, отрицательный наклон и отрицательный коэффициент корреляции указывают на механизм отрицательной обратной связи уровня тиреоидных гормонов с гормонами гипоталамуса и гипофиза. Этот результат подчеркивает нелинейные соотношения между ТТГ и CT4 (или CT3). Обосновывающие их факторы, контролирующие проявление функций организма, способствуют развитию нелинейных соотношений между ТТГ и CT4. Связанные факторы – это возраст, пол, индекс массы тела, функция оси гипоталамус-гипофиз-щитовидная железа, тиреоидные и прочие болезни, генетика, факторы окружающей среды, депрессия, тревожность и прием медикаментов [1, 25–27]. ТТГ-центрированная ОФЩЖ отражает статус щитовидной железы при различных патофизиологических и физиологических условиях.

Нелинейное уравнение зависимости ln(ТТГ) от CT4 как линия тренда между эутиреозом и гипотиреозом выглядит как 4PL-функция (уравнение (2)):

$$\ln(TSH) = 0.81 + \frac{4.20 - 0.81}{1 + \left(\frac{FT4}{8.73}\right)^{5.96}},$$
$$\ln(TSH) = 0.81 + \frac{3.39}{1 + \left(\frac{FT4}{8.73}\right)^{5.96}}. \quad (2)$$

Сравнивая уравнения (2) и (1) и добавляя стандартные ошибки коэффициентов, мы наблюдали минимальную асимптоту (A) = 0.81 ± 0.08, соответствующую максимуму CT4 = 28.20 пмоль/л, максимальную асимптоту (B) = 4.20 ± 0.12, соответствующую минимуму CT4 = 0.88 пмоль/л, точку перегиба (x_0) = 8.73 ± 0.30 пмоль/л и коэффициент угла наклона (коэффициент Хилла m) = = 5.96 ± 1.07. Эта нелинейная аппроксимация симметрична, имеет вид сигмоидальной кривой [2, 28]. У нее корреляция более выражена (R^2 = 0.97 и P < 0.001). Второй член в правой части уравнения (2) происходит из-за эффекта гипотиреоза.

Нелинейная кривая (рис. 2а) интересным образом проходит через соединение J участков эутиреоза, субклиничного гипотиреоза и выраженного гипотиреоза. Точка J может быть интерпре-

Таблица 2. Коэффициенты линейной регрессии: $y = Ax + B$ среди переменных ln(ТТГ) (мМЕ/л), СТ3 (пмоль/л) и СТ4 (пмоль/л) при эутиреозе, гипотиреозе и гипертиреозе

Статус щитовидной железы	Значения	ln(ТТГ) vs СТ4	ln(ТТГ) vs СТ3	СТ3 vs СТ4
Эутиреоз ($N = 2413$)	Наклон (A)	–0.02 ± 0.003	–0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.006
	Свободное слагаемое (B)	0.99 ± 0.05	0.84 ± 0.06	5.00 ± 0.08
	Коэффициент корреляции Пирсона r	–0.11	-0.03	0.11
	P-значение	<0.001	0.07	<0.001
Субклиничный гипотиреоз ($N = 649$)	Наклон (A)	–0.005 ± 0.004	–0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.01
	Свободное слагаемое (B)	2.02 ± 0.06	2.16 ± 0.08	4.56 ± 0.15
	Коэффициент корреляции Пирсона r	–0.04	–0.10	0.21
	P-значение	0.26	0.013	<0.001
Выраженный гипотиреоз ($N = 113$)	Наклон (A)	–0.23 ± 0.02	–0.56 ± 0.09	0.18 ± 0.02
	Свободное слагаемое (B)	4.84 ± 0.11	5.40 ± 0.29	2.17 ± 0.12
	Коэффициент корреляции Пирсона r	–0.75	–0.51	0.66
	P-значение	<0.001	0.06	<0.001
Субклиничный гипертиреоз ($N = 175$)	Наклон (A)	–0.05 ± 0.02	–0.46 ± 0.08	0.03 ± 0.02
	Свободное слагаемое (B)	–1.79 ± 0.46	0.21 ± 0.52	5.53 ± 0.38
	Коэффициент корреляции Пирсона r	-0.13	–0.38	0.10
	P-значение	0.07	< 0.001	0.17
Выраженный гипертиреоз ($N = 75$)	Наклон (A)	0.002 ± 0.003	0.003 ± 0.007	0.41 ± 0.02
	Свободное слагаемое (B)	–4.44 ± 0.19	–4.40 ± 0.16	–1.79 ± 1.25
	Коэффициент корреляции Пирсона r	0.07	0.04	0.91
	P-значение	0.56	0.72	<0.001

Примечание. Концентрации ТТГ выражены в мМЕ/л, СТ3 и СТ4 – в пмоль/л. Указанные ошибки включают стандартные ошибки наклона и свободного слагаемого, а P-значение F-теста получено из линейного регрессионного анализа.

тирована как точка перехода от нормального до аномального состояния щитовидной железы и наоборот. Пациенты, страдающие от выраженного гипотиреоза, должны иметь историю изменения уровня ТТГ и СТ4 по кривой C_1JC_2. Почти постоянный уровень ТТГ вдоль линии AC_1 представляет собой клинический эутиреоз, изгиб C_1J появляется вследствие субклиничного гипотиреоза, JC_2 показывает биохимическую деградацию щитовидной железы в направлении выраженного гипотиреоза, C_2B показывает падение СТ4 до нуля под действием значительно повышенного уровня ТТГ ≥ 100.00 мМЕ/л.

На рис. 2б кривая 4PL-модели (ln(ТТГ) от СТ4) приобретает большую крутизну в направлении от эутиреоза к участкам субклиничного и выраженного гипертиреоза. Более сильная корреляция для кривой 4PL ($R^2 = 0.97$, $P < 0.001$) подчеркивает нелинейные соотношения между ТТГ и СТ4 у пациентов с эутиреозом и гипертиреозом. В этой функции модели 4PL (уравнение (3)) мы обнаружили минимальную асимптоту (A_1) = –4.35 ± 0.09, соответствующую максимуму СТ4 = 90.00 пмоль/л, максимальную асимптоту (B_1) = 0.20 ± 0.19, соответствующую минимуму СТ4 = 10.10 пмоль/л, точку перегиба (x_0) = 28.15 ± 0.76 пмоль/л и коэффициент Хилла (m) = 24.55 ± 12.60.

$$ln(TSH) = -4.35 + \frac{0.20 + 4.35}{1 + \left(\frac{FT4}{28.15}\right)^{24.55}},$$
$$ln(TSH) = -4.35 + \frac{4.55}{1 + \left(\frac{FT4}{28.15}\right)^{24.55}}. \quad (3)$$

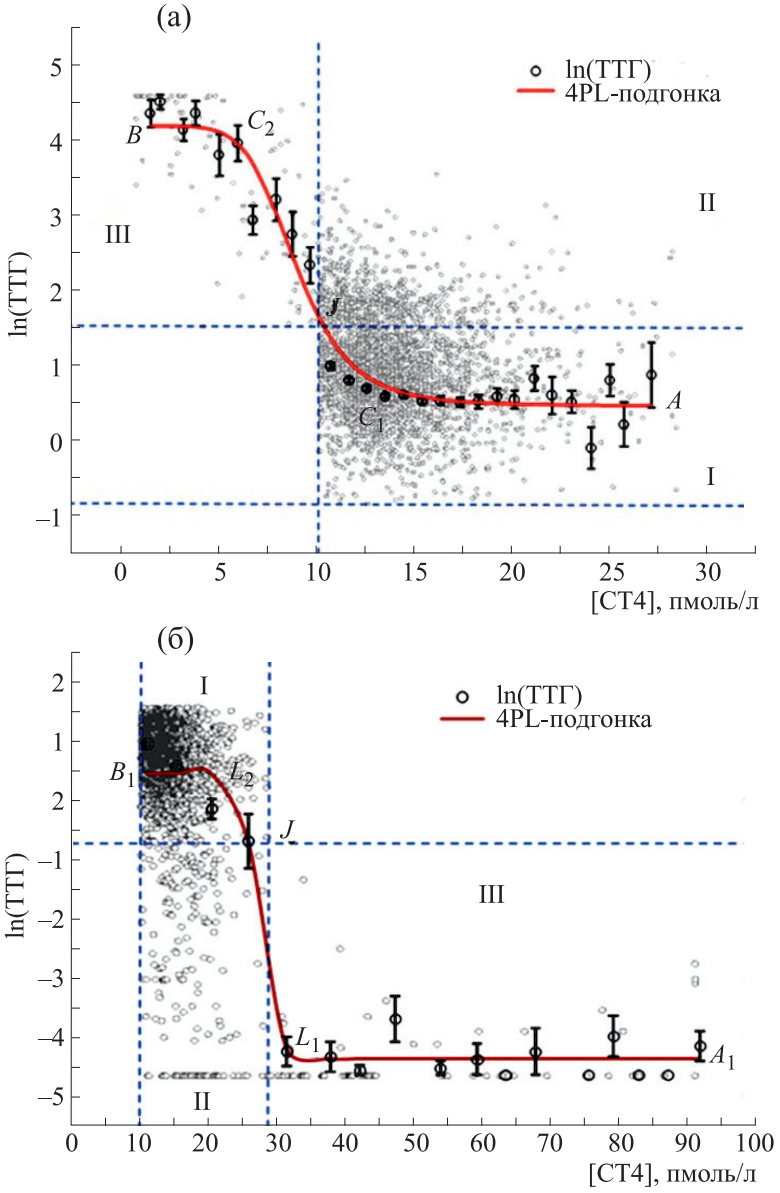


Рис. 2. Нелинейные соотношения между ТТГ (мМЕ/л) и СТ4 (пмоль/л), управляемые функциями 4PL как линии тренда = = 0.97 и $p < 0.001$) между (а) – эутиреозом (участок I) и гипотиреозом (участки II и III), (б) – эутиреозом (участок I) и гипертиреозом (участки II и III). Графики построены по средним значениям с шагом СТ4 в 1 пмоль/л для (а) и 5 пмоль/л для (б); разброс данных показывает стандартные ошибки ln(ТТГ), количество пациентов составляет 3175 (858 М + 2317 Ж) для (а) и 2663 (728 М + 1935 Ж) для (б).

Согласно рис. 2б гипертиреоз развивается у пациентов, начиная от эутиреоза, по кривой $B_1L_2L_1A_1$. В данном случае линия регрессии проходит через соединение J участков эутиреоза, субклиничного и выраженного гипертиреоза, в то время как кривая 4PL проходит через участок субклиничного гипертиреоза. Наклон, выражаемый коэффициентом Хилла, появляется вследствие отрицательной корреляции между ТТГ и СТ4. Изгибы в точках L_1 и L_2 происходят от влияния выраженного и субклиничного гипертиреоза, соответственно. Почти прямая линия L_1A_1 означает непрерывное возрастание СТ4 до 90.00 пмоль/л при самом низком уровне ТТГ ≤ 0.01 мМЕ/л в участке выраженного гипертиреоза.

Можно предсказать, что пациенты, принимающие надлежащие препараты при лечении выраженного гипотиреоза, медленно вернутся в нормальное состояние по кривой BC_2C_1 (рис. 2а). Таким же образом, пациенты с надлежащим лечением выраженного гипертиреоза возвращаются к нормальному состоянию по кривой $A_1L_1L_2$

(рис. 2б). Наконец, промежуток $B–A$ = 3.39 при гипотиреозе (уравнение (2)) абсолютно исчезает при полном излечении этого расстройства щитовидной железы. Ненулевое второе слагаемое в правой части уравнения (1) соответствует гипотиреозу, зависящему от параметров A, B, СТ4, x_0 и m. Очевидно, A равно B, когда коэффициент Хилла $m = 0$. Минимальная асимптота A соответствует нормальному уровню ТТГ, так что максимальная асимптота B должна быть скорректирована до уровня A посредством уменьшения ТТГ у пациентов, страдающих от гипотиреоза. Аналогично, максимальная асимптота B_1 соответствует нормальному уровню ТТГ, так что минимальная асимптота A_1 должна быть скорректирована до B_1 через подъем ТТГ у пациентов, страдающих от гипертиреоза.

Регрессии 4PL-модели устанавливают нелинейные соотношения между ТТГ и СТ4 отдельно для гипотиреоза и гипертиреоза, соединенных с графиками эутиреоза. Кривая 4PL-модели лучше согласуется с наблюдаемыми данными, что дает лучшую возможность биологической интерпретации ответа ТТГ на отклонение СТ4, чем в случае других моделей – линейной, лог-линейной, нелинейной сигмоидальной, функции ошибки и полинома четвертого порядка [1, 2, 8–12, 28].

Гипотиреоз и гипертиреоз стимулируют адаптивные механизмы пациентов к регуляции системы гомеостаза и восстановлению эутиреоза или снижению нарушения статуса щитовидной железы. Эффект разных функциональных состояний системы обратной связи и физиологических переменных, таких, как этническая принадлежность, возраст, потребление иода, характеристики ответа ядерных рецепторов на Т3 и многие другие, осложняют понимание функциональной взаимосвязи между ТТГ и СТ4. Здесь линия тренда ln(ТТГ) от СТ4 различна по своей природе при переходе от эутиреоза к гипо- или гипертиреозу. С другой стороны, гистерезис оси гипоталамус–гипофиз–щитовидная железа представляет собой адаптивный эндокринный ответ эволюционно закрепленных признаков, дающих преимущества для выживания [29]. Временно сохраняющийся подъем уровня ТТГ несмотря на нормализацию уровня СТ4 показывает переходный гистерезис. Тиреотоксикоз – это состояние, ведущее к временной задержке в восстановлении ТТГ и замедленному восстановлению активности генов, регулируемых Т3. Во время перехода от тиреотоксикоза к эутиреозу около 10% генов демонстрируют неполное восстановление активности [29]. во время восстановительного периода после тяжелого гипо- и гипертиреоза, природа кривых ln(ТТГ) от СТ4 меняется, что показывает наличие гистерезиса оси гипоталамус–гипофиз–щитовидная железа. Эти факты в дальнейшем связываются с различными значениями точки перегиба x_0 и коэффициента Хилла m, что в результате дает логистические кривые, подчиняющиеся уравнениям (2) и (3), которые графически аппроксимируются на рис. 2а и 2б для гипотиреоза и гипертиреоза, объединенных с эутиреозом. Авторы работы [30] провели анализ чувствительности построенной модели, выявив зависимость уровня ТТГ и гормонов щитовидной железы от различных параметров системы, встраивая шунт ТТГ–СТ3 в щитовидную железу. В их исследовании заявляется, что достигнуто понимание гомеостаза гормонов щитовидной железы благодаря разработке математической модели петли гипоталамус–гипофиз–щитовидная железа. В нашем анализе отклонение линий тренда ln(ТТГ) от СТ4 между эутиреозом и гипо/гипертиреозом отражает текущее понимание механизма отрицательной обратной связи в цикле щитовидной железы. Т3, Т4 и ТТГ обладают взаимно блокирующим действием на функцию щитовидной железы, метаболическую активность и ее регуляцию, так что между этими переменными существует сложное взаимное влияние.

ОГРАНИЧЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модель 4PL – статистическая нелинейная модель, не имеющая механистичной основы в смысле молекулярных взаимодействий между гормонами щитовидной железы и ТТГ; она, скорее, основана на численных свойствах распределения элементов массива данных. В таком виде эта модель абсолютно применима для описания общей аппроксимации ТТГ (в пределах погрешности) вдоль популяционного диапазона СТ4. В работах по связыванию лигандов коэффициент Хилла представляет собой нижнюю границу количества сайтов связывания лиганда, которые должны быть заняты на поверхности фермента или другого белка для того чтобы выполнить определенную функцию, например, ферментативную реакцию. Использование коэффициента Хилла в исследованиях связывания лигандов малоинформативно с точки зрения феномена молекулярной кооперации. В этой модели отсутствует точность и строгость на уровне разрешения до отдельного индивида, поскольку невозможно точно определить уровень ТТГ какого-либо пациента с определенным уровнем СТ4 и/или СТ3, и она не может быть применена для принятия решения о терапии на уровне клинического применения. Внутренняя гетерогенность в популяциях неизбежно накладывает ограничения на способность модели предсказывать и выявлять корректную взаимосвязь и механистическую основу физиологической регуляции с уровнем разрешения до отдельного индивида, необходимым для постулирования биологических закономерностей с надлежащей научной корректностью и достовер-

ностью. Эта неопределенность заслуживает более детальной оценки со стороны научного сообщества, чтобы заслуживающие доверия ученые сделали вывод об ограничении корректных ожиданий, применимости и универсальности данных, основанных на больших популяциях.

ВЫВОДЫ

В данной работе анализ ОФЩЖ позволяет заключить, что встречаемость гипотиреоза (18.95% субклиничных и 3.30% выраженных случаев у пациентов) выше, чем гипертиреоза (5.11% субклиничных и 2.19% выраженных случаев), при этом женщины подвержены этим заболеваниям чаще, чем мужчины, и частота нарушений растет с возрастом. Линейная корреляция между СТ3 и СТ4 становится сильнее в случае выраженных нарушений функции щитовидной железы ($0.66 \le r \le 0.91$, $P < 0.001$), чем в случае субклиничных нарушений и эутиреоза. Это важно для понимания ферментативной реакции монодейодирования, превращающей Т4 в Т3 при условии дерегулированного уровня ТТГ. Большая часть лог-линейных аппроксимаций между ТТГ и СТ4 (или СТ3), относящихся к этим группам, статистически не значима ($0.001 \le P \le 0.72$ и $-0.03 \le r \le -0.75$). Нелинейное соотношение между ln(ТТГ) и СТ4 подтверждается 4PL-моделью ($R^2 = 0.97$, $P < 0.001$) в случае как гипотиреоза, так и гипертиреоза при их объединении с эутиреозом. Кривизна кривых 4PL-модели ассоциируется с точками перехода от субклиничных и выраженных расстройств к нормальному функционированию щитовидной железы и обратно. Эти кривые можно рассматривать как траектории ответа гипофизарного ТТГ на отклонение уровня сывороточного СТ4. Отрицательные корреляции и отрицательные наклоны лог-линейных графиков указывают на наличие механизма отрицательной обратной связи в цикле щитовидной железы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Данное исследование проводилось согласно этическим нормам, принятым Наблюдательным Советом Института медицины при Клинике Университета Трибхуван (Махараджгундж, Катманду, Непал).

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при частичной поддержке Непальской академии наук и технологий (докторская стипендия для первого автора).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, на которых основано исследование, доступны по запросу у автора для корреспонденции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. R. Hoermann, J. E. Midgley, A. Giacobino, et al., Clin. Endocrinol. **81**, 907 (2014).
2. N. C. Hadlow, K. M. Rothacker, R. Wardrop, et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. **98**, 2936 (2013).
3. G. Kozdag, D. Ural, A. Vural, et al., Eur. J. Heart Fail. **7**, 113 (2005).
4. B. Biondi and D. S. Cooper, Endocr. Rev. **29**, 76 (2007).
5. T. R. Lamichhane, S. P. Pant, B. Lamichhane, et al., J. Biosci. Med. **6**, 59 (2018).
6. E. N. Pearce, A. P. Farwell, and L. E. Braverman, N. Engl. J. Med. **348**, 2646 (2003).
7. C. T. Sawin, D. Chopra, F. Azizi, et al., Jama **242**, 247 (1979).
8. P. R. Larsen, J. E. Silva, and M. M. Kaplan, Endocr. Rev. **2**, 87 (1981).
9. N. Benhadi, E. Fliers, T. J. Visser, et al., Eur. J. Endocrinol. **162**, 323 (2010).
10. R. Hoermann, W. Eckl, C. Hoermann, et al., Eur. J. Endocrinol. **162**, 1123 (2010).
11. M. K. S. Leow, J. Theor. Biol. **248**, 275 (2007).
12. P. M. Clark, R. L. Holder, S. M. Haque, et al., J. Clin. Pathol. **65**, 463 (2012).
13. S. Reichlin and R. D. Utiger, J. Clin. Endocrinol. Metab. **27**, 251 (1967).
14. J. E. Midgley, R. Hoermann, R. Larisch, et al., J. Clinl. Pathol. **66**, 335 (2013).
15. E. Bortolotto, R. Rousseau, B. Teodorescu, et al., Bioprocess Int. **13**, 26 (2015).
16. M. Azadeh, B. Gorovits, J. Kamerud, et al., AAPS J. **20**, 22 (2018).
17. N. Manji, J. D. Carr-Smith, K. Boelaert, et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. **91**, 4873 (2006).
18. J. V. Fade, J. A. Franklyn, K. W. Cross, et al., Clin. Endocrinol. **34**, 77 (1991).
19. Y. Aoki, R. M. Belin, R. Clickner, et al., Thyroid **17**, 1211 (2007).
20. G. J. Canaris, N. R. Manowitz, G. Mayor, et al., Arch. Intern. Med. **160**, 526 (2000).
21. L. M. Prisant, J. S. Gujral, and A. L. Mulloy, J. Clin. Hypertens. **8**, 596 (2006).
22. S. Mariotti, C. Franceschi, A. Cossarizza, et al., Endocr. Rev. **16**, 686 (1995).
23. M. P. J. Van Boxtel, P. P. C. A. Menheere, O. Bekers, et al., Psychoneuroendocrinology, **29**, 891 (2004).

24. S. Rabbiosi, M. C. Vigone, F. Cortinovis, et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. **98**, 1395 (2013).

25. V. Bacci, G. C. Schussler, and T. B. Kaplan, J. Clin. Endocrinol. Metab. **54**, 1229 (1982).

26. A. Engum, T. Bjøro, A. Mykletun, et al., Acta Psychiatr. Scand. **106**, 27 (2002).

27. R. Bunevicius and A. J. Prange Jr, Curr. Opin. Psychiatr. **23**, 363 (2010).

28. J. Jonklaas, N. Kahric-Janicic, O. P. Soldin, at al., Clin. Chem. **55**, 1380 (2009).

29. M. K. S. Leow, Front. Endocrinol. **7**, 64 (2016).

30. J. Berberich, J. W. Dietrich, R. Hoermann, at al., Front. Endocrinol. **9**, 91 (2018).

Evaluation of Thyroid Hormones-Thyrotropin Interrelationships in Thyroid Dysfunction States from Population-Based Data Analysis with a Logistic Model

T.R. Lamichhane*, S.P. Pant*, B. Lamichhane*, S. Paudel, B.K. Yadav**, and H.P. Lamichhane***

**Central Department of Physics, Tribhuvan University, Kirtipur, Kathmandu, Nepal*

***Department of Biochemistry, Institute of Medicine of the Tribhuvan University Teaching Hospital, Maharajgunj, Kathmandu, Nepal*

Objective of this research is to explore the complex correlations among triiodothyronine, teraiodothyronine and thyrotropin in thyroid dysfunction states. A total of 3425 outpatients were included to analyze their thyroid function tests measured at the university teaching hospital. The subjects under study were categorized as euthyroid (70.45%), subclinical hypothyroid (18.95%), overt hypothyroid (3.30%), subclinical hyperthyroid (5.11%) and overt hyperthyroid (2.19%) patients. The linear and non-linear relations among triiodothyronine, teraiodothyronine and thyrotropin were modeled statistically to understand their role in thyroid functions. The prevalence of hypothyroidism is higher than hyperthyroidism in which females are more vulnerable than males. The correlation between triiodothyronine and teraiodothyronine increases from euthyroidism ($r = 0.1$, $P < 0.001$) to overt thyroid dysfunctions ($r = 0.91$, $P < 0.001$). The non-linear complex correlations between teraiodothyronine and thyrotropin are significantly explained by well fitted sigmoid curves of four-parameter logistic model ($R^2 = 0.97$ and $P < 0.001$) in both hypothyroidism and hyperthyroidism interfaced with euthyroidism. The curves in this model are response trajectories of pituitary thyrotropin which exhibit the turning points of thyroid dysfunction states by the deviation in serum teraiodothyronine. The negative slopes and correlations observed in the linear fits in thyrotropin *vs* triiodothyronine or teraiodothyronine are the indicators of negative feedback mechanism in the thyroid cycle.

Keywords: thyroid dysfunctions, thyroid hormones, linear fit, non-linear fit, logistic model, correlation

EDN: HJFHNT
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 371–377

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 612.01.014.43 + 577.4.49

ПУЛЫ АМИНОКИСЛОТ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ЯКУТСКОГО СУСЛИКА *Urocitellus undulatus* НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ГИБЕРНАЦИИ

© 2022 г. М.В. Каранова, Н.М. Захарова

Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, Пущино Московской области, Институтская ул., 3

E-mail: karanovari@mail.ru

Поступила в редакцию 04.02.2022 г.
После доработки 04.02.2022 г.
Принята к публикации 07.02.2022 г.

В процессе зимней спячки у гибернирующих животных отсутствует явление мышечной атрофии. Механизмы этого феномена пока не известны, но их тонкая регуляция должна быть отражена в статусе свободных аминокислот скелетных мышц. В работе изучен состав свободных аминокислот скелетных мышц якутского суслика в зимний период гибернации при 0°С. В процессе зимней спячки наблюдается увеличение количества аланина, который во время кратковременного пробуждения возвращается к летнему уровню. В начале торпора в скелетных мышцах сусликов обнаруживается аспарагиновая кислота, исчезающая при кратковременном пробуждении. Пулы глицина и таурина не изменяются ни в начале, ни в конце торпора. Пулы незаменимых аминокислот в конце торпора увеличиваются, а при кратковременном пробуждении возвращаются к исходному уровню. Взаимосвязанное увеличение и снижение содержания свободных аминокислот – свидетельство отсутствия преобладания процессов катаболизма над анаболизмом.

Ключевые слова: гибернация, торпор, эутермия, скелетные мышцы, аланин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота.

DOI: 10.31857/S000630292202020X

Продолжительное воздействие околонулевых положительных температур на организм не адаптированных к холоду животных изменяет физическое состояние фосфолипидного бислоя мембран (фазовые переходы), изменяет проницаемость для ионов и метаболитов и интенсивность активного транспорта [1, 2]. Выход Ca^{2+} из цитозоля при низких температурах многократно увеличивается [3, 4], электрическое сопротивление мембраны возрастает в десятки раз, изменяется активность ферментов, образуются свободные радикалы и т. д. [1, 5]. Степень отрицательного воздействия этих процессов на структурно-функциональное состояние клетки зависит от времени нахождения биологического объекта в условиях низкотемпературного воздействия. Пойкилотермные животные, обитающие в зоне холодного климата, в процессе эволюции выработали тонкие механизмы, позволяющие выживать при низких температурах в течение длительного времени. Гомойотермные животные не имеют таких механизмов, несмотря на термопродукцию, имеющую ограниченные возможности, но среди них существуют гетеротермные, гибернирующие животные, температура тела которых может понижаться при впадении в спячку или в оцепенение [5]. Гибернация, или зимняя спячка, – это состояние временного глубокого угнетения всех жизненных процессов животных (оцепенение, торпор), в котором они переживают неблагоприятный сезон года. При этом тело животного может охлаждаться до очень низких положительных температур [6–8]. Гибернация состоит из серий – баутов, каждый из которых длится две-три недели и включает следующие стадии: вход в гипобиоз (вступление в торпор) → глубокий торпор → выход из торпора (эутермия). Выход из торпора между баутами (межбаутное пробуждение) сопровождается наибольшими затратами энергии по сравнению с другими этапами цикла и длится около суток или менее [7, 9]. В этот период интенсивной метаболической активности животное использует запасы топлива с максимальной скоростью, пока температура тела не достигнет нормального уровня [8–10]. Переход в состояние гибернации возможен вследствие того, что сопряжен с особыми механизмами повышения устойчивости организмов к экстремальным воздействиям внешней среды. Прегибернационный сезон характеризуется усиленным синтезом гликогена; в конце лета

увеличивается количество бурой жировой ткани и запас липидов, являющихся, наряду с гликогеном, основным топливом для скелетных мышц [9].

У сусликов *Urocitellus undulates* гибернация характеризуется снижением температуры тела с 37–38°C (активное состояние) до 0–4°C (оцепенение), уменьшением частоты сердцебиений до 3–5 уд/мин (при норме 200–300 уд/мин), снижением количества дыхательных движений – до 4–6 вместо 100–200 в норме и 350–400 – в фазе эутермии, снижением скорости кровотока, снижением потребности в кислороде более чем в десять раз [6, 9, 11, 12]. Резкое снижение интенсивности метаболизма до минимального уровня при спячке обеспечивает до 80% экономии энергии [6, 11, 12]. Во время спячки масса скелетных мышц у сусликов и летучих мышей снижается на 14–65% в зависимости от типа мышц и вида, но сохраняется мышечная морфология; в отличие от негибернирующих видов, повышается активность цитратсинтазы [13–15]. У черных медведей *Ursus americanus* количество и размер клеток скелетных мышц остаются постоянными с начала и до конца спячки, а окислительная способность или полностью сохраняется, или незначительно снижается [16]. После 130 дней покоя мышечная сила черного медведя падает только на 23%, что намного меньше, чем это показано для людей при ограниченном постельном режиме или смоделированных условиях космического полета за аналогичный период. У негибернирующих животных в бездействующих мышцах снижается экспрессия многих миофибриллярных белков, включая альфа-актин, легкую цепь миозина и тропонин Т, что приводит к значительной редукции генерации мышечной силы и падению работоспособности [17, 18].

Равновесие аминокислот взрослого организма в норме выполняет функцию создания метаболического фона тканей и органов, который определяет адаптивные возможности организма и их регуляцию [19]. Изменение соотношения аминокислот этого фона сопряжено со значительными перестройками защитно-адаптивных механизмов, и одно из проявлений метаболической адаптации скелетных мышц у гибернирующих животных должно состоять в каком-то изменении состава свободных аминокислот. Показано, что распад белков скелетных мышц способствует циркуляции аминокислот и увеличению азотной нагрузки в оцепенении в большей степени, чем распад коллагена [20], однако нет ни одной работы, посвященной проявлению азотного гомеостаза, – в частности, адаптивному изменению состава свободных аминокислот зимнеспящих животных в процессе оцепенения. Представление о механизмах и результатах этой сложной и феноменально скоординированной работы имеет значение не только для клиники, для поддержания организма в состоянии резко сниженных физиологических функций, но и для понимания молекулярных механизмов гипогравитационной атонии мышц в условиях длительных космических полетов.

Задачей данной работы явилось изучение особенностей изменения состава свободных аминокислот скелетных мышц суслика в начале и в конце торпора, а также в межбаутном состоянии кратковременного пробуждения в сравнении с активным летним состоянием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. В экспериментах использовали половозрелых якутских сусликов *Urocitellus undulatus* мужского пола, массой 613 ± 60 г.

Животных доставляли из Якутии. Во время летней активности их содержали индивидуально в специальном помещении, с соблюдением естественного фотопериода и при достаточном количестве пищи и воды. В период гибернации сусликов содержали в темном помещении при температуре от 0 до 2°C. Регистрацию температуры тела у животных проводили с помощью специализированного датчика RET-2 (Physitemp, США) с точностью ± 0.1°C).

Опыты проводили на четырех группах сусликов, включая контрольную:

1-я группа (n = 6) – бодрствующие активные животные в летний период (июнь), контроль;

2-я группа (n = 6) – торпор, 2–3 дня, при ректальной температуре от 0.2 до 0.4°C;

3-я группа (n = 6) – торпор, 9–10 дней, при ректальной температуре от 0.2 до 0.4°C;

4-я группа (n = 5) – спонтанно пробудившиеся зимние животные; температура 37.6°C.

Перед декапитацией торпидных животных взвешивали и измеряли ректальную температуру, после декапитации измеряли температуру в области сердца. После извлечения миокарда последовательно из каждой группы животных биоматериал гомогенизировали в 0.5 н холодной хлорной кислоте (1 : 9) и центрифугировали при температуре 4°C 20 мин при 20000 об/мин на центрифуге Centricon (США). После осаждения белка супернатант нейтрализовали 2 н KOH и повторно центрифугировали. Последний супернатант до выполнения анализа хранили при –20°C.

Концентрацию свободных аминокислот определяли методом ионообменной жидкостной хроматографии [21], на модульном хроматографе Infinity LC–1260 (Agilent, США). Разделение смеси аминокислот осуществляли на колонке с трехступенчатым градиентом натрий-цитратного буфе-

Таблица 1. Пулы заменимых аминокислот и таурина скелетных мышц суслика *U. undulatus* летом и в период гибернации (мкмоли/г сырой массы)

Аминокислоты	Контроль (лето)	Торпор (начало)	Торпор (конец)	Эутермия
ФС	–	–	0.07 ±0.01*	–
Таурин	6.22 ± 0.49	7.02 ± 0.53	6.91 ± 0.55	6.50 ± 0.44
Аспартат	0.02 ± 0.002	0.45 ± 0.03	0.90 ± 0.08	0.03 ± 0.003
Сер+тре+глн	3.32 ± 0.29	0.45 ± 0.04	0.77 ± 0.07	2.88 ± 0.30*
Глутамат	0.95 ±0.09	1.05 ± 0.08	1.14 ± 0.10	1.15 ± 0.10
Глицин	0.57 ±0.04	0.62 ± 0.05	0.70 ± 0.06	0.57 ± 0.05
Аланин	1.57 ± 0,12	1.97 ± 0.16	2.10 ± 0.18	1.34 ± 0.12
Цистин	–	0.45 ± 0.04	0.60 ± 0.07*	–
γ-Аминомасляная кислота	Сл.	0.11 ± 0.02	0.20 ± 0.02	–
Гистидин	4.28 ± 0.40	3.75 ± 0.32	0.84 ± 0.07	1.65 ± 0.15
Аммиак	1.60 ± 0.17*	1.45 ± 0.16*	0.55 ± 0.05	1.25 ± 0.12
Аргинин	0.04 ±0.004	0.05 ± 0.006	0.33 ± 0.03	0.05 ± 0.05
Сумма	16.97 ± 1.43	15.92 ± 1.28	14.36 ± 1.24	14.17± 1.22

Примечание. Данные получены в 2017, 2018, 2019 и 2021 гг. Контроль – лето, июнь (n = 6); торпор (начало) – декабрь, январь, спящие 2–3 дня (n = 6); торпор (конец) – декабрь, январь, спящие 9–10 дней (n = 6); эутермия – кратковременное пробуждение (n = 5). Ректальная температура спящих сусликов – от 0.2 до 0.4°C; температура сердца – от 1.0 до 2.5°C; температура сердца активных зимних животных – в пределах 37.6°C. Сер+тре+глн – один пик, в котором происходило слияние серина, треонина и глутамина. $P < 0.05$ в сравнении с летним контролем; * – $P > 0.05$.

ра: № 1 – 0.3 н, pH 2.98; № 2 – 0.4 н, pH 3.81; № 3 – 0.45 н, pH 9.97 в градиенте температуры 55–74°C. Стационарная фаза: сульфированный сополимер стирола с дивинилбензолом. Скорость подвижной фазы составляла 0.45 мл/мин. Послеколоночную модификацию аминокислот проводили с нингидрином, интенсивность окрашивания измеряли при 570 нм. Для каждой серии опытов делали хроматограмму стандартной смеси аминокислот, концентрация каждой из вносимых аминокислот 2.5 нмолей. Содержание свободных аминокислот выражали в мкмолях/г сырой массы. Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США).

Статистический анализ выполняли, используя пакет статистических программ Microsoft Excel 2010. Данные выражали как среднее из трех параллельных проб, в каждой из которых использовались 2 особи (n = 6 или n = 5) ± ошибка среднего значения (M ± s.e.m.).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Метаболические процессы, проходящие в скелетных мышцах сусликов *Urocitellus undulates* на разных стадиях гибернации, как показывают данные нашей работы, находят отражение в специфических для скелетных мышц закономерностях изменения количества и состава свободных аминокислот (табл. 1). Состав свободных заменимых аминокислот скелетных мышц в нормальных физиологических и температурных условиях (лето) характеризуется соотношением пулов глутаминовой кислоты и аланина – центральных компонентов аминокислотного обмена – в пользу аланина

(1.57 ± 0.12 и 0.95 ± 0.09 мкмолей/г сырого веса для аланина и глутаминовой кислоты соответственно; соотношение 1.65 : 1). Пул глицина почти в два раза меньше пула глутаминовой кислоты (0.57 ± ± 0.04 мкмоля/г). Аспарагиновая кислота обнаруживается летом лишь в следовых количествах (0.02 мкмоля/г), а уровень гистидина, как обычно и у других животных, высок и составляет 4.28 ± ± 0.40 мкмолей/г. Пул непротеиногенной сульфоаминокислоты таурина (6.22 ± 0.49 мкмолей/г), как и в мышцах других млекопитающих, значительно выше уровня протеиногенных аминокислот.

Во время гипотермии и в периоды промежуточных пробуждений, эутермии, наблюдаются заметные изменения соотношения аминокислот и характерная отрицательная корреляция изменения пулов глутаминовой кислоты и аланина. В начале торпора, уровень аланина увеличивается до 1.97 ± ± 0.16 мкмолей/г, но уровень глутаминовой кислоты почти не изменяется (1.05 ± 0.08 мкмолей/г).

Во время кратковременных пробуждений наблюдаются всплески интенсивной метаболической активности, когда температура тела поднимается до 36°C, сохраняясь в течение 12–24 ч, а затем животное снова входит в торпор (оцепенение). За этот короткий срок происходит значительное изменение соотношения глутамата и аланина: глутамат повышается чуть выше летнего уровня, аланин, наоборот, снижается чуть ниже летнего уровня; их концентрации выравниваются (глу : ала = 1.00 : 1.15).

Обращают на себя внимание ответы аспарагиновой кислоты, которая летом едва обнаруживается, в начале торпидного состояния ее содержание повышается до 0.45 ± 0.03 мкмоля/г, а в конце гипотермии увеличивается еще в два раза. Во время активации анаболических путей, при эутермии, ее количество, как и у других вышеназванных заменимых аминокислот, возвращается к летнему минимуму (0.03 мкмоля/г).

Высокое летнее содержание гетероциклической аминокислоты гистидина, характерное для скелетных мышц, снижается уже в начале торпора до 0.84± 0.07 мкмолей/г, чтобы увеличиться в период эутермии, пусть и не на таком уровне, как летом, а лишь до 1.65 ± 0.15 мкмолей/г. Эти наблюдения представляют собой еще одно яркое свидетельство роли гистидина в двигательной активности скелетных мышц, – вероятно, в качестве предшественника содержащегося в большом количестве в мышцах дипептида карнозина.

Интересны не только изменения количества определяемых субстанций, но и отсутствие таких изменений в то время, когда можно было бы ожидать иной результат. Так, таурин, малоактивный вторичный метаболит, в начале зимнего периода в мышцах рыб в несколько раз увеличивает свое содержание, и рассматривается как протектор пойкилотермных животных при низких температурах [22]. Более того, по мере увеличения срока оцепенения пул таурина увеличивается и в сердце сусликов [неопубликованные данные]. Логично было ожидать, что во время длительного пребывания при околонулевой температуре таурин скелетных мышц сусликов будет, как и у холоднокровных, необходим в качестве антиоксиданта, мембранного протектора, модулятора транспорта Ca^{2+} и т.д., и его концентрация возрастет. Однако таурин остался на прежнем, впрочем, высоком уровне (табл. 1). Следует отметить важную деталь: общая антиоксидантная способность икроножных мышц торпидных животных, по данным авторов работы [23], на 156% выше, чем у летних. Таким образом, роль таурина не связана с антиоксидантным действием – об этом заботятся другие субстанции, среди которых вполне вероятна и аспарагиновая кислота (табл. 1). Можно в связи с этим предположить, что в скелетных мышцах зимнеспящих сусликов и, вероятно, у других гетеротермов функция таурина более специализирована и не связана с падением температуры тела.

Данные об ответах незаменимых аминокислот, присутствующих в свободном виде у позвоночных животных в минимальном количестве, представлены в табл. 2. При увеличении длительности оцепенения, происходит значительное накопление аминокислот с разветвленным строением алифатической боковой цепи: лейцина, изолейцина и валина. Помимо этого, увеличиваются и пулы метионина, треонина, фенилаланина, тирозина, триптофана.

ОБСУЖДЕНИЕ

Соотношение аминокислот метаболического фона, определяющего адаптивные возможности организма и их регуляцию, закреплено эволюционно. Однако перестройка защитно-адаптивных механизмов может менять это соотношение [19]. Изменение состава свободных аминокислот, отмеченное в нашей работе, является одним из ярких проявлений метаболической адаптации скелетных мышц гибернирующих животных (табл. 1). Особый интерес представляет регуляция пулов глутаминовой кислоты и аланина, возможно, отражающая переключение с анаэробного пути гликолиза на аэробный и наоборот. Глутамат и аланин – метаболически взаимосвязанные ключевые аминокислоты, но участвуют в разных путях энергетического обеспечения [24]. Соотношение их количества, при котором уровень аланина, маркера анаэробных процессов, превышает уровень глутамата, является особенностью аминокислотного профиля скелетных мышц суслика и в норме, и во время оцепенения.

Таблица 2. Пулы незаменимых аминокислот скелетных мышц суслика *U. undulatus* летом (контроль) и в период гибернации (мкмоли/г сырой массы)

Аминокислоты	Контроль (лето)	Торпор (начало)	Торпор (конец)	Эутермия
Треонин + ?	Выходил в одном пике с серином и неизвестным веществом			
Валин	155 ± 13	205 ± 30*	534 ± 65*	170 ± 20*
Метионин	23 ± 4*	30 ± 4*	44 ± 6*	30 ± 3
Изолейцин	72 ± 8*	90 ± 9*	280 ± 33*	80 ± 10*
Лейцин	130 ± 13	170 ± 16*	350 ± 27	143 ± 14
Тирозин	140 ± 14	130 ± 12	225 ± 20	130 ± 13
Фенилаланин	55 ± 7*	51 ± 6*	85 ± 10*	66 ± 10*
Триптофан	32 ± 4*	40 ± 4	61 ± 7*	40 ± 5*
Лизин	222 ± 20	255 ± 20	451± 42	270 ± 25
Сумма	829 ± 79	971 ± 101	2030 ± 210	929 ± 100

Примечание. См. примечания к табл. 1; $P < 0.05$ в сравнении с летним контролем; * – $P > 0.05$. Информация по незаменимой аминокислоте треонину приведена в табл. 1.

Содержание глицина, известного своими антиокислительными свойствами и участвующего вместе с глутаминовой кислотой в синтезе глутатиона, также, вероятно, способствует сохранению баланса между катаболизмом и анаболизмом, распадом и синтезом белка.

Аспарагиновая кислота – яркий и интригующий участник адаптации к гипометаболическому состоянию скелетных мышц. Ее мизерное количество в летнее время (табл. 1) может предполагать отсутствие необходимости в этой дикарбоновой аминокислоте в скелетных мышцах в нормальных условиях. Однако неожиданное и многократное возрастание во время гибернации (торпора) и падение до летнего, т.е. минимального, уровня во время кратковременного периода интенсивной метаболической активности (пробуждения) являются доказательством важной роли аспарагиновой кислоты в сохранении метаболической устойчивости мышц. Но в чем эта роль? Известно участие аспартата (как и глутамата) в обезвреживании аммиака; известно, что половина азота, освобожденного при биохимических трансформациях аминокислот, не образует аммиак, так как сразу улавливается аспарагиновой кислотой, транспортирующей и утилизирующей биологически активный азот. Можно предположить, что роль аспарагиновой кислоты во время торпора заключается в связывании токсичного аммиака для его использования в синтезе аминокислот и протеинов, необходимых для функционирования тех органов, которые находятся в активном состоянии, несмотря на общее оцепенение животных. В связи с этим следует обратить внимание и на увеличение орнитина во время оцепенения, участвующего в синтезе мочевины, и на снижение количества аммиака, несмотря на активно идущие в это время процессы протеолиза (табл. 1). Во время оцепенения понижены и процессы катаболизма, однако без регуляторных механизмов они бы шли стихийно. В конце торпора происходит накопление незаменимых аминокислот, указывающее на активно идущие процессы распада протеинов (табл. 2). Красиво выглядит фаза эутермии, когда аминокислоты, снизившие количество в торпоре (гистидин, треонин + серин), а также увеличившие свое количество (аланин, аспартат, аргинин, незаменимые аминокислоты), возвращаются к исходному летнему уровню. Участие в синтезе белка заменимых и незаменимых аминокислот во время пробуждения кажется бесспорным, компенсируя непрерывно протекающий во время гибернации протеолиз.

Полученные данные являются биохимической иллюстрацией роли свободных аминокислот в отсутствии мышечной атрофии у зимнеспящих во время длительного состояния гипобиоза. Гибер-

наторы используют специфические, единые для всех зимнеспящих механизмы для поддержания запасов азота и доставки аминокислот, необходимых для синтеза белка в органах, которые продолжают функционировать, хотя и в экономном режиме [20]. Имеются данные, что серин-треонин-киназа, сывороточная и глюкокортикоид-регулируемая киназа 1 (SGK1), повышены во время спячки и способствуют защите от потери мышечной массы путем понижения регулируемого уровня протеолиза и аутофагии и через увеличение синтеза белка [25]. Представленные в данной статье данные не противоречат высказанной в работе [26] гипотезе о том, что резистивные свойства торпидных мышц летучих мышей против атрофии могут быть достигнуты, главным образом, путем относительно постоянного протеолиза в сочетании с колебательной анаболической активностью, соответствующей частоте возбуждений, возникающих во время спячки.

ВЫВОДЫ

Перестройка защитно-адаптивных механизмов зимнеспящих сусликов сопряжена с изменением соотношения свободных аминокислот скелетных мышц.

Выявлено увеличение содержания свободного аланина во время торпора.

Обнаружено многократное повышение уровня аспартата в торпидный период и его падение до летнего уровня при эутермии, незначительное изменение уровня глицина на всех стадиях и отсутствие изменения уровня таурина.

Зарегистрировано значительное увеличение содержания незаменимых аминокислот в конце торпора.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают искреннюю признательность А.В. Петрову и В.В. Меркулову за помощь в выполнении хроматографического анализа аминокислот, А.С. Аверину и С.С. Поповой – за выделение биоматериала.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Отлов и содержание животных, доставленных в лабораторию, осуществляли в соответствии с правилами, принятыми II Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (1986).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. М. Белоус и В. А. Бондаренко, *Структурные изменения биологических мембран при охлаждении* (Наук. думка, Киев, 1982).
2. N. D. Ozernyuk and S. K. Nechaev, Biol. Bull. **29** (4), 373 (2002).
3. A. S. Efremova and V. P. Zinchenko, Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology **2** (4), 372 (2008).
4. A. E. Alekseev, A. F. Korystova, D. A. Mavlyutova, and Y. M. Kokoz, Biochem. Mol. Biol. Int. **33** (2), 365 (1994).
5. N. A. Azzam, J. M. Hallenbeck, and B. Kachar, Nature **407**, 317 (2000).
6. F. Geiser, Annu. Rev. Physiol. **66**, 239 (2004).
7. L. C. H. Wang and T. F. Lee, in *Handbook of Physiology* (Oxford Univer. Press, 1996), v. 4, pp. 507–531.
8. N. M. Zakharova, Biol. Sci. **6**, 1401 (2014).
9. G. R. Izrailova, R. A. Khalilov, and A. A. Adieva. Biol. Sci. Fund. Res. **11**, 1046 (2014).
10. F. van Breukelen and S. L. Martin, J. Appl. Physiol. **92** (6), 2640 (2002).
11. K. L. Drew, M. B. Harris, J. C. LaManna, et al., J. Exp. Biol. **207**, 3155 (2004). DOI: 10.1242/jeb.01114
12. Z. El. Hachimi, M. Tijane, G. Boissonnet, et al., Comp. Biochem. Physiol. B: Comp. Biochem. **96** (3), 457 (1990). DOI: 10.1016/0305-0491(90)90039-v
13. J. M. Steffen, D. A. Koebel, X. J. Musacchia, et al., Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Syst. Environ. Physiol. **99**, 815 (1991).
14. S. J. Wickler, D. F. Hoyt, and F. Van Breukelen, Am. J. Physiol.: Regul. Integr. Comp. Physiol. **261**, R1214 (1991).
15. C. J. Cotton and H. J. Harlow, Physiol. Biochem. Zool. **83**, 551 (2010). DOI: 10.1086/650471
16. D. B. Tinker, H. J. Harlow, and T. D. Beck, Physiol. Zool. **71**, 414 (1998).
17. R. J. Isfort, R. T. Hinkle, M. B. Jones, et al., Electrophoresis **21**, 2228 (2000).
18. Y. Seo, K. Lee, K. Park, et al., J. Biochem. **139** (1), 71 (2006).
19. S. Bröer and A. Bröer, Biochem. J. **474**, 1935 (2017). DOI: 10.1042/BCJ20160822
20. A. Sarah, A. M. Rice, G. ten Have, and J. A. Reisz, Nat. Metab. **2** (12), 1459 (2020). DOI: 10.1038/s42255-020-00312-4
21. D. H. Spachman, W. H. Stein, and S. Moore, Anal. Chem. **30** (7), 1190 (1958).
22. M. V. Karanova, J. Evol. Biochem. Physiol. **45** (1), 67 (2009).

23. R. S. James, J. F. Staples, and J. C. L. Brown, J. Exp. Biol. **216**, 2587, (2013). DOI: 10.1242/jeb.080663
24. O. L. Pisarenko, A. V. Baranov, E. V. Pomerantsev, et al., Int. J. Cardiol. **23**, 43 (1989).
25. E. A. Ivakine and R. D. Cohn, Exp. Physiol. **99** (4), 632 (2014).
26. K. Lee, H. So, T. Gwag, et al., J. Cell. Physiol. **222**, 313 (2010).

Pools of Amino Acids of Skeletal Muscle in Yakutian Ground Squirrel *Urocitellus undulatus* During Different Hibernation Stages

M.V. Karanova and N.M. Zakharova

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia

In the process of hibernation, the muscle mass of hibernators is preserved, but muscle atrophy is absent. The mechanisms of this regulation are not yet known, but their fine regulation should be reflected in the status of free amino acids of skeletal muscle. The paper studied the skeletal muscles concentration of free amino acids in the Yakut ground squirrel in the winter hibernation period at 0°C has been studied. In the process of winter hibernation, there is an increase in the amount of alanine, which during short-term awakening returns to summer levels. At the beginning of the torpor in the skeletal muscles in ground squirrels, aspartic acid is found, which disappears with a short-term awakening. The pools of glycine and taurine do not change either at the beginning or at the end of the torpor. Pools of essential amino acids at the end of the torpor increase, and with a short-term awakening they return to their original level. The interrelated increase and decrease in the content of free amino acids is evidence of the absence of the predominance of the processes of catabolism over anabolism.

Keywords: hibernation, torpor, euthermia, skeletal muscle, alanine, glutamic acid, aspartic acid

EDN: XTZNZE
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 378–385

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 51-73

УРАВНЕНИЕ ГИНЗБУРГА–ЛАНДАУ ДЛЯ АНАЛИЗА НЕЛИНЕЙНОЙ НЕУСТОЙЧИВОСТИ В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ

© 2022 г. И.В. Елюхина

Южно-Уральский государственный университет (национальный исследовательский университет), 454080, Челябинск, просп. Ленина, 76

E-mail: Inna.Elyukhina@susu.ac.ru

Поступила в редакцию 03.02.2021 г.
После доработки 26.04.2021 г.
Принята к публикации 29.11.2021 г.

Построено комплексное амплитудное уравнение для анализа долговременного нелинейного поведения в сердечной ткани после потери устойчивости. Уравнение получено в третьем приближении редукцией системы дифференциальных уравнений для трансмембранного потенциала и переменной восстановления. Разработанное уравнение Гинзбурга–Ландау описывает нелинейные рост и взаимодействие возмущений из непрерывного спектра волновых чисел в этой диспергирующей среде. Найдены выражения для коэффициентов амплитудного уравнения через параметры исходных моделей активных сред, в частности, моделей ФитцХью–Нагумо и Алиева–Панфилова. В общей модели таких систем типа «реакция–диффузия» выполнен учет прямой и перекрестной диффузии.

Ключевые слова: сердечная ткань, нелинейная неустойчивость, уравнение Гинзбурга–Ландау.

DOI: 10.31857/S0006302922020221

В настоящее время интенсивно обсуждается проблема неустойчивых состояний, перехода к турбулентности и самоорганизации в сердечной ткани (см., например, работы [1–11] и ссылки в них). Развиваемые подходы важны для регуляции аномальных процессов и, в частности, желудочковой фибрилляции: для изучения динамического механизма пространственно-временных хаотических состояний и разработки методов их супрессии.

Эффективным инструментом для анализа долговременной нелинейной динамики после потери устойчивости служит уравнение Гинзбурга–Ландау. Теория этого уравнения хорошо разработана (см., например, работы [12–18]), в зависимости от значений коэффициентов оно описывает различные взаимодействия нелинейных волн. Представляет интерес найти явные выражения для этих коэффициентов в терминах характеристик исходной модели электрохимических процессов в сердце. Это дает возможность исследовать эволюцию комплексной амплитуды и спектра несущей волны в зависимости от волнового числа. Варьируя исходные параметры, например, на практике медикаментозно или внешней стимуляцией, можно получить значения коэффициентов уравнения Гинзбурга–Ландау (константы Ландау и пр.) в областях, соответствующих устойчивым состояниям.

Такой подход уже был использован для изучения амплитуды огибающей волны при слабо нелинейных взаимодействиях в системах типа «реакция–диффузия», например, для полного брюсселятора [19] и для экзотермических реакций в неподвижной [20] и движущейся [21] средах. Здесь также применяются разработанные методы параметрической идентификации, апробированные для различных нелинейных химических систем (см., например, работы [22–24]).

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Возбудимую среду в сердечной мышце опишем следующей моделью [25]:

$$\begin{aligned} \frac{\partial u}{\partial t} &= -\eta u(u-\theta)(u-1) - uv + \frac{\partial^2 u}{\partial x^2}, \\ \frac{\partial v}{\partial t} &= -\left(\mu_0 + \frac{\mu_1 v}{u+\mu_2}\right)\left[v + \eta u(u-\theta-1)\right], \end{aligned} \tag{1}$$

где u – трансмембранный потенциал; v – переменная восстановления; константы $\eta = 8$, $\theta = 0.15$, $\mu_0 = 0.01$, $\mu_1 = 0.2$, $\mu_2 = 0.3$.

В качестве примера рассмотрим устойчивость однородного стационарного состояния $u_0 = 0$,

$v_0 = 0$ и одномерный случай: распространение u вдоль волокна. Разложим дробь в степенной ряд, ограничиваясь третьей степенью, и введем малые возмущения $\tilde{u} = \mathrm{u} - \mathrm{u}_0$, $\tilde{v} = \mathrm{v} - \mathrm{v}_0$. Тогда уравнения (1) представляются как

$$\begin{aligned} &\frac{\partial \tilde{u}}{\partial t} - \frac{\partial^2 \tilde{u}}{\partial x^2} + a_1\tilde{u} = b_1\tilde{u}\tilde{v} + b_2\tilde{u}^2 + b_3\tilde{u}^3, \\ &\frac{\partial \tilde{v}}{\partial t} + a_2\tilde{u} + a_3\tilde{v} = b_4\tilde{u}^2 + b_5\tilde{v}^2 + b_6\tilde{u}\tilde{v} + b_7\tilde{u}^2\tilde{v} + b_8\tilde{u}\tilde{v}^2. \end{aligned} \tag{2}$$

где $a_1 = \eta\theta$, $a_2 = -\mu_0\eta(\theta + 1)$, $a_3 = \mu_0$, $b_1 = -1$, $b_2 = \eta(\theta + 1)$, $b_3 = -\eta$, $b_4 = -\mu_0\eta$, $b_5 = -\mu_1/\mu_2$, $b_6 = \mu_1\eta(\theta + 1)/\mu_2$, $b_7 = -\mu_1\eta/\mu_2 - \mu_1\eta(\theta + 1)/\mu_2^2$, $b_8 = \mu_1/\mu_2^2$. При иных значениях u_0 и v_0 или, например, ином сходящемся степенном ряде для выражения дроби модель (1) также можно свести к виду (2) и дальнейший алгоритм не меняется.

В общем случае для удобства приложения результатов к исходным моделям различного вида перепишем (2) как

$$\begin{aligned} &\frac{\partial \tilde{u}}{\partial t} + a_{11}\tilde{u} + a_{12}\tilde{v} - D_{11}\frac{\partial^2 \tilde{u}}{\partial x^2} + D_{12}\frac{\partial^2 \tilde{v}}{\partial x^2} = b_{11}\tilde{u}\tilde{v} + b_{12}\tilde{u}^2 + b_{13}\tilde{v}^2 + b_{14}\tilde{u}\tilde{v}^2 + b_{15}\tilde{u}^2\tilde{v} + b_{16}\tilde{u}^3 + b_{17}\tilde{v}^3, \\ &\frac{\partial \tilde{v}}{\partial t} + a_{21}\tilde{u} + a_{22}\tilde{v} + D_{21}\frac{\partial^2 \tilde{u}}{\partial x^2} - D_{22}\frac{\partial^2 \tilde{v}}{\partial x^2} = b_{21}\tilde{u}\tilde{v} + b_{22}\tilde{u}^2 + b_{23}\tilde{v}^2 + b_{24}\tilde{u}\tilde{v}^2 + b_{25}\tilde{u}^2\tilde{v} + b_{26}\tilde{u}^3 + b_{27}\tilde{v}^3, \end{aligned} \tag{3}$$

где включены все нелинейные слагаемые вида $\sum_{i_u=0}^{3}\sum_{i_v=0}^{3}\tilde{u}^{i_u}\tilde{v}^{i_v}$ $(1 \le i_u + i_v \le 3)$, а также помимо прямой диффузии ($D_{11} \ge 0$, $D_{22} \ge 0$) учтена линейная перекрестная диффузия (D_{12} и D_{21} могут иметь любой знак), характерная для ряда биологических систем, моделируемых уравнениями типа «реакция–диффузия», в том числе и для процессов в возбудимых средах. Так, для модели Фитц-Хью–Нагумо ненулевые коэффициенты в уравнениях (3) следующие: $a_{11} = a$, $a_{12} = 1$, $a_{21} = -\varepsilon$, $a_{22} = \varepsilon$, $b_{12} = 1 - a$, $b_{16} = -1$ и при диффузионных членах, где a и ε – параметры модели (например, см. работу [26]). Для модели (2) ненулевыми коэффициентами будут $D_{11} = 1$, $a_{11} = a_1$, $a_{21} = a_2$, $a_{22} = a_3$, $b_{11} = b_1$, $b_{12} = b_2$, $b_{16} = b_3$, $b_{21} = b_6$, $b_{22} = b_4$, $b_{23} = b_5$, $b_{24} = b_8$, $b_{25} = b_7$.

АЛГОРИТМ РЕДУКЦИИ

Линейная часть. Оставим только линейные члены в (3) и введем возмущение в виде $\tilde{\mathbf{Y}} = \mathbf{y}\exp i(\mathbf{kr} - \omega t)$, где $i = \sqrt{-1}$, $\mathbf{kr} = kx$, $\omega = \omega_r + i\omega_i$, k – волновое число, $\mathbf{k}$ – волновой вектор, $\mathbf{r}$ – радиус-вектор, ω_i и ω_r – инкремент и частота возмущения; $\tilde{\mathbf{Y}} = [\tilde{u} \quad \tilde{v}]^{\mathrm{T}}$. Выполняя преобразования, с учетом того, что

$$d\tilde{\mathbf{Y}} / dt = -i\omega\mathbf{y}\exp i(kx - \omega t) \text{ и } d^2\tilde{\mathbf{Y}} / dx^2 = -k^2\mathbf{y}\exp i(kx - \omega t), \tag{4}$$
$$\begin{vmatrix} -i\omega + k^2D_{11} + a_{11} & -k^2D_{12} + a_{12} \\ -k^2D_{21} + a_{21} & -i\omega + k^2D_{22} + a_{22} \end{vmatrix} = 0,$$

приходим к дисперсионному уравнению для модели (3):

$$\omega^2 + p\omega + g = 0 \tag{5}$$

с коэффициентами $p = ip_i$, $\mathrm{g} = -g_r$, $p_i = p_1k^2 + p_2$, $g_r = g_1k^4 + g_2k^2 + g_3$, $p_1 = D_{11} + D_{22}$, $p_2 = a_{11} + a_{22}$, $g_1 = D_{11}D_{22} - D_{12}D_{21}$, $g_2 = a_{11}D_{22} + D_{11}a_{22} + D_{21}a_{12} + D_{12}a_{21}$, $g_3 = a_{11}a_{22} - a_{21}a_{12}$.

Из дисперсионного уравнения находятся кривая нейтральной устойчивости, фазовая скорость ω_r/k и производные $\partial\omega_r/\partial k$, $\partial^2\omega_r/\partial k^2$, $\partial\omega_i/\partial k$, $\partial^2\omega_i/\partial k^2$, характеризующие соответственно линейную групповую скорость и ее дисперсию, смещение от гармоники с максимальным инкрементом и дисперсию инкремента:

$$\frac{\partial\omega_r}{\partial k}+i\frac{\partial\omega_i}{\partial k}=2k\frac{2g_1k^2+g_2-ip_1\omega}{2\omega+i(p_1k^2+p_2)},$$
$$\frac{\partial^2\omega_r}{\partial k^2}+i\frac{\partial^2\omega_i}{\partial k^2}=-2\frac{(\partial\omega/\partial k)^2-6g_1k^2-g_2+ip_1\omega+2ip_1k(\partial\omega/\partial k)}{2\omega+i(p_1k^2+p_2)}. \quad (6)$$

Нелинейная часть. После потери устойчивости возникают и растут возмущения из непрерывного спектра волновых чисел. В результате их нелинейных взаимодействий формируются монохроматические, квазипериодические или хаотические турбулентные режимы. Сумма двух гармонических волн со слегка различными волновыми числами и частотами может быть представлена в виде квазигармонической волны с амплитудой и фазой, зависящими от медленных переменных (см., например, работу [27]).

Аналогичным образом представим спектрально узкий волновой пакет, введя медленно меняющиеся амплитуду и фазу. Тогда переменные разделятся на медленные и быстрые, отвечающие эволюции огибающей пакета и изменению фазы несущей волны. Такой подход упрощает математическое описание и позволяет анализировать процессы в рамках как взаимодействия нелинейных волн, так и эволюции огибающей волны. Подобное представление было введено в работе [28], где получено линейное параболическое уравнение с малыми членами порядка отношения длины волны к длине волнового пакета. На нелинейные случаи оно впервые было расширено, в частности, в работах [29–32].

Введем следующие допущения [33]:

1) $\Delta k/k_0 << 1$, где k_0 – центр пакета;

2) $\omega_i = \varepsilon^2\varpi_i << 1$ (малый параметр $\varepsilon << 1$), т. е. $\partial\omega_i/\partial k << 1$ на кривой нейтральной устойчивости;

3) $\Delta k/k_0 = O(\varepsilon)$, $\omega_i = O(\varepsilon^2)$, $\partial\omega_i/\partial k|_{\omega_i=0} = O(\varepsilon)$; возмущение $\tilde{\phi}/\phi_0 = O(\varepsilon)$.

Тогда для волнового пакета имеем:

$$\tilde{\phi} = A\exp i(k_0x-\omega t)+к.с., \quad (7)$$

где комплексная амплитуда огибающей

$$A=\int_{-\Delta k}^{\Delta k}F(k_0+\delta k)\exp i\left(\delta k\,x-\frac{\partial\omega_r}{\partial k}\bigg|_{k_0}\delta k\,t-\frac{1}{2}\frac{\partial^2\omega_r}{\partial k^2}\bigg|_{k_0}\delta^2kt-\varepsilon^2\varpi_i t\right)d\delta k+O(\varepsilon^3).$$

Уравнения (3) перепишем в матричной форме как

$$\mathbf{L}\tilde{\mathbf{Y}}=\mathbf{N}, \quad (8)$$

где

$$\mathbf{L}=\begin{bmatrix}L_{11} & L_{12}\\ L_{21} & L_{22}\end{bmatrix},\ \mathbf{N}=\begin{bmatrix}N^{(1)}\\ N^{(2)}\end{bmatrix};$$
$$L_{11}=\frac{\partial}{\partial t}+a_{11}-D_{11}\frac{\partial^2}{\partial x^2},\ L_{12}=a_{12}+D_{12}\frac{\partial^2}{\partial x^2},\ L_{21}=a_{21}+D_{21}\frac{\partial^2}{\partial x^2},\ L_{22}=\frac{\partial}{\partial t}+a_{22}-D_{22}\frac{\partial^2}{\partial x^2},$$
$$N^{(1)}=b_{11}\tilde{u}\tilde{v}+b_{12}\tilde{u}^2+b_{13}\tilde{v}^2+b_{14}\tilde{u}\tilde{v}^2+b_{15}\tilde{u}^2\tilde{v}+b_{16}\tilde{u}^3+b_{17}\tilde{v}^3,$$
$$N^{(2)}=b_{21}\tilde{u}\tilde{v}+b_{22}\tilde{u}^2+b_{23}\tilde{v}^2+b_{24}\tilde{u}\tilde{v}^2+b_{25}\tilde{u}^2\tilde{v}+b_{26}\tilde{u}^3+b_{27}\tilde{v}^3,$$

или, используя присоединенную матрицу $\mathbf{L}^*$ для исключения секулярных членов, как $\mathbf{L}^*\mathbf{L}\tilde{\mathbf{Y}}=\mathbf{L}^*\mathbf{N}$, где $\mathbf{L}^*$ имеет элементы

$$L_{11}^*=\frac{\partial}{\partial t}+a_{22}-D_{22}\frac{\partial^2}{\partial x^2},$$

$$L_{12}^{*} = -a_{12} - D_{12}\frac{\partial^2}{\partial x^2},$$

$$L_{21}^{*} = -a_{21} - D_{21}\frac{\partial^2}{\partial x^2},$$

$$L_{22}^{*} = \frac{\partial}{\partial t} + a_{11} - D_{11}\frac{\partial^2}{\partial x^2}.$$

Амплитуда в уравнении (7) является функцией медленных переменных. Применяя метод многих масштабов [34] и вводя медленные (x_1,t_1; x_2,t_2) и быстрые (x_0,t_0) переменные:

$$\frac{\partial}{\partial t} = \frac{\partial}{\partial t_0} + \varepsilon\frac{\partial}{\partial t_1} + \varepsilon^2\frac{\partial}{\partial t_2} + \ldots,\ \frac{\partial^2}{\partial x^2} = \frac{\partial^2}{\partial x_0^2} + 2\varepsilon\frac{\partial^2}{\partial x_0\partial x_1} + \varepsilon^2\frac{\partial^2}{\partial x_1^2} + 2\varepsilon^2\frac{\partial^2}{\partial x_0\partial x_2} + O(\varepsilon^3),$$
$$\mathbf{L} = \mathbf{L}_0 + \varepsilon\mathbf{L}_1 + \varepsilon^2\mathbf{L}_2 + \varepsilon^3\mathbf{L}_3,\ \mathbf{L}^{*} = \mathbf{L}_0^{*} + \varepsilon\mathbf{L}_1^{*} + \varepsilon^2\mathbf{L}_2^{*} + \varepsilon^3\mathbf{L}_3^{*}, \tag{9}$$
$$\tilde{\mathbf{Y}} = \varepsilon\tilde{\mathbf{Y}}_1 + \varepsilon^2\tilde{\mathbf{Y}}_2 + \varepsilon^3\tilde{\mathbf{Y}}_3,\ \mathbf{N} = \varepsilon^2\mathbf{N}_2 + \varepsilon^3\mathbf{N}_3,$$

сгруппируем члены при равных степенях ε, ограничиваясь ε^3, и получим уравнения для приближений:

$$\varepsilon : \mathbf{L}_0^{*}\mathbf{L}_0\tilde{\mathbf{Y}}_1 = 0;$$
$$\varepsilon^2 : \left(\mathbf{L}_0^{*}\mathbf{L}_1 + \mathbf{L}_1^{*}\mathbf{L}_0\right)\tilde{\mathbf{Y}}_1 + \mathbf{L}_0^{*}\mathbf{L}_0\tilde{\mathbf{Y}}_2 = \mathbf{L}_0^{*}\mathbf{N}_2; \tag{10}$$
$$\varepsilon^3 : \left(\mathbf{L}_0^{*}\mathbf{L}_2 + \mathbf{L}_1^{*}\mathbf{L}_1 + \mathbf{L}_2^{*}\mathbf{L}_0\right)\tilde{\mathbf{Y}}_1 + \left(\mathbf{L}_0^{*}\mathbf{L}_1 + \mathbf{L}_1^{*}\mathbf{L}_0\right)\tilde{\mathbf{Y}}_2 + \mathbf{L}_0^{*}\mathbf{L}_0\tilde{\mathbf{Y}}_3 = \mathbf{L}_0^{*}\mathbf{N}_3 + \mathbf{L}_1^{*}\mathbf{N}_2,$$

где $$\left(L_0\right)_{11} = a_{11} + \frac{\partial}{\partial t_0} - D_{11}\frac{\partial^2}{\partial x_0^2},\ \left(L_0\right)_{12} = a_{12} + D_{12}\frac{\partial^2}{\partial x_0^2},\ \left(L_0\right)_{21} = a_{21} + D_{21}\frac{\partial^2}{\partial x_0^2},$$

$$\left(L_0\right)_{22} = a_{22} + \frac{\partial}{\partial t_0} - D_{22}\frac{\partial^2}{\partial x_0^2};\ \left(L_1\right)_{11} = \frac{\partial}{\partial t_1} - 2D_{11}\frac{\partial^2}{\partial x_0\partial x_1},\ \left(L_1\right)_{12} = 2D_{12}\frac{\partial^2}{\partial x_0\partial x_1},\left(L_1\right)_{21} = 2D_{21}\frac{\partial^2}{\partial x_0\partial x_1},$$

$$\left(L_1\right)_{22} = \frac{\partial}{\partial t_1} - 2D_{22}\frac{\partial^2}{\partial x_0\partial x_1};\ \left(L_2\right)_{11} = \frac{\partial}{\partial t_2} - D_{11}\frac{\partial^2}{\partial x_1^2} - 2D_{11}\frac{\partial^2}{\partial x_0\partial x_2},\ \left(L_2\right)_{12} = D_{12}\frac{\partial^2}{\partial x_1^2} + 2D_{12}\frac{\partial^2}{\partial x_0\partial x_2},$$

$$\left(L_2\right)_{21} = D_{21}\frac{\partial^2}{\partial x_1^2} + 2D_{21}\frac{\partial^2}{\partial x_0\partial x_2},\ \left(L_2\right)_{22} = \frac{\partial}{\partial t_2} - D_{22}\frac{\partial^2}{\partial x_1^2} - 2D_{22}\frac{\partial^2}{\partial x_0\partial x_2};$$

$$\mathbf{N}_2 = \begin{bmatrix} b_{11}\tilde{u}_1\tilde{v}_1 + b_{12}\tilde{u}_1^2 + b_{13}\tilde{v}_1^2 \\ b_{21}\tilde{u}_1\tilde{v}_1 + b_{22}\tilde{u}_1^2 + b_{23}\tilde{v}_1^2 \end{bmatrix},$$

$$\mathbf{N}_3 = \begin{bmatrix} b_{11}\tilde{u}_2\tilde{v}_1 + b_{11}\tilde{u}_1\tilde{v}_2 + 2b_{12}\tilde{u}_1\tilde{u}_2 + 2b_{13}\tilde{v}_1\tilde{v}_2 + b_{14}\tilde{u}_1\tilde{v}_1^2 + b_{15}\tilde{u}_1^2\tilde{v}_1 + b_{16}\tilde{u}_1^3 + b_{17}\tilde{v}_1^3 \\ b_{21}\tilde{u}_2\tilde{v}_1 + b_{21}\tilde{u}_1\tilde{v}_2 + 2b_{22}\tilde{u}_1\tilde{u}_2 + 2b_{23}\tilde{v}_1\tilde{v}_2 + b_{24}\tilde{u}_1\tilde{v}_1^2 + b_{25}\tilde{u}_1^2\tilde{v}_1 + b_{26}\tilde{u}_1^3 + b_{27}\tilde{v}_1^3 \end{bmatrix}. \tag{11}$$

Первое приближение. Для первого приближения (10): $\mathbf{L}_0\tilde{\mathbf{Y}}_1 = 0$,

$$\tilde{\mathbf{Y}}_1 = \mathbf{M}^{(1)}A\exp i\left(kx_0 - \omega_r t_0\right) + к.с., \tag{12}$$

где $\mathbf{M}^{(1)} = [m_0\ m]^{\mathrm{T}}$, примем $m_0 = 1$ и найдем

$$m = \frac{-i\omega_r + k^2D_{11} + a_{11}}{k^2D_{12} - a_{12}},$$

или $$m = \frac{k^2D_{21} - a_{21}}{-i\omega_r + k^2D_{22} + a_{22}},$$

что также следует из выражений (4), представим m как $m = m_r + im_i$, где $m_r \in \mathbb{R}$ и $m_i \in \mathbb{R}$.

Второе приближение. Для второго приближения (10): $\mathbf{L}_0\tilde{\mathbf{Y}}_2 = \mathbf{N}_2$, разыскивая решение в виде

$$\tilde{\mathbf{Y}}_2 = \mathbf{M}^{(2)}A^2\exp 2i\left(kx_0 - \omega_r t_0\right) + к.с., \tag{13}$$

имеем

$$\mathbf{M}^{(2)} = [m_1\ m_2]^{\mathrm{T}},$$

$$m_1 = \frac{c_1\left(b_{22} + b_{21}m + b_{23}m^2\right) - c_4\left(b_{12} + b_{11}m + b_{13}m^2\right)}{c_1c_2 - c_3c_4},$$

$$m_2 = \frac{c_2\left(b_{12} + b_{11}m + b_{13}m^2\right) - c_3\left(b_{22} + b_{21}m + b_{23}m^2\right)}{c_1c_2 - c_3c_4},$$

$$c_1 = a_{12} - 4k^2D_{12},$$

$$c_2 = a_{21} - 4k^2D_{21},$$

$$c_3 = -2i\omega_r + a_{11} + 4k^2D_{11},$$

$$c_4 = -2i\omega_r + a_{22} + 4k^2D_{22}.$$

Решение для второго приближения при ε^2 включает также слагаемое вида

$$\bar{\mathbf{Y}}_2 = \mathbf{M}^{(0)}|A|^2,\ \mathbf{M}^{(0)} = \left[m_1^{(0)}\ m_2^{(0)}\right]^{\mathrm{T}}, \tag{14}$$

где $m_1^{(0)} \in \mathbb{R}$, $m_2^{(0)} \in \mathbb{R}$ и

$$m_1^{(0)} = 2\frac{a_{22}\left[b_{12} + b_{11}m_r + b_{13}(m_r^2 + m_i^2)\right] - a_{12}\left[b_{22} + b_{21}m_r + b_{23}(m_r^2 + m_i^2)\right]}{a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}},$$

$$m_2^{(0)} = 2\frac{a_{11}\left[b_{22} + b_{21}m_r + b_{23}(m_r^2 + m_i^2)\right] - a_{21}\left[b_{12} + b_{11}m_r + b_{13}(m_r^2 + m_i^2)\right]}{a_{11}a_{22} - a_{12}a_{21}}.$$

Вековые члены при первой гармонике определяются из уравнения

$$\left(\mathbf{L}_0^*\mathbf{L}_1 + \mathbf{L}_1^*\mathbf{L}_0\right)\tilde{\mathbf{Y}}_1 = 0, \tag{15}$$

где элементы матрицы

$$\mathbf{L}_0^*\mathbf{L}_1 + \mathbf{L}_1^*\mathbf{L}_0 = \begin{bmatrix} \ell_{11}^{(1)} & \ell_{12}^{(1)} \\ \ell_{21}^{(1)} & \ell_{22}^{(1)} \end{bmatrix}$$

имеют следующие значения:

$$\ell_{12}^{(1)} = \ell_{21}^{(1)} = 0,\ \ell_{11}^{(1)} = \ell_{22}^{(1)} = (L_0)_{11}(L_1)_{22} + (L_0)_{22}(L_1)_{11} - (L_0)_{12}(L_1)_{21} - (L_0)_{21}(L_1)_{12}.$$

Из $\ell_{11}^{(1)}\tilde{u}_1 = 0$ ($\ell_{22}^{(1)}\tilde{v}_1 = 0$) получаем, что

$$\lambda_1\frac{\partial A}{\partial t_1} + \lambda_2\frac{\partial A}{\partial x_1} = 0, \tag{16}$$

где

$$\lambda_1 = \lambda_{1r} + i\lambda_{1i},$$
$$\lambda_2 = \lambda_{2r} + i\lambda_{2i},$$
$$\lambda_{1r} = a_{11} + a_{22} + k^2(D_{11} + D_{22}),$$
$$\lambda_{1i} = -2\omega_r,$$
$$\lambda_{2r} = -2k\omega_r(D_{11} + D_{22}),$$
$$\lambda_{2i} = -2k[D_{11}a_{22} + D_{12}a_{21} + D_{21}a_{12} + D_{22}a_{11} + 2k^2(D_{11}D_{22} - D_{12}D_{21})].$$

Отсюда с учетом выражений (6) следует, что

$$\frac{\partial A}{\partial t_1} + \frac{\partial A}{\partial x_1}\left(\frac{\partial\omega_r}{\partial k} + i\frac{\partial\omega_i}{\partial k}\right) = 0. \tag{17}$$

Так как $\partial\omega_i/\partial k \sim O(\varepsilon)$, это слагаемое переходит в третье приближение; тогда $\partial A/\partial t_1 + (\partial\omega_r/\partial k)(\partial A/\partial x_1) = 0$, т. е. в координатах t_1 и $x_1 - (\partial\omega_r/\partial k)t_1$ производная $\partial A/\partial t_1 = 0$ и изменение амплитуды отсутствует.

Третье приближение. Вековые члены находятся из уравнения

$$\left(\mathbf{L}_0^*\mathbf{L}_2 + \mathbf{L}_1^*\mathbf{L}_1 + \mathbf{L}_2^*\mathbf{L}_0\right)\tilde{\mathbf{Y}}_1 = \mathbf{L}_0^*\mathbf{N}_3, \tag{18}$$

где из $\mathbf{N}_3$ (11) берутся члены только при первой гармонике, а элементы матрицы

$$\mathbf{L}_0^*\mathbf{L}_2 + \mathbf{L}_1^*\mathbf{L}_1 + \mathbf{L}_2^*\mathbf{L}_0 = \begin{bmatrix} \ell_{11}^{(2)} & \ell_{12}^{(2)} \\ \ell_{21}^{(2)} & \ell_{22}^{(2)} \end{bmatrix}$$

имеют следующие значения:

$$\ell_{12}^{(2)} = \ell_{21}^{(2)} = 0,$$
$$\ell_{11}^{(2)} = \ell_{22}^{(2)} = (L_0)_{11}(L_2)_{22} - (L_0)_{12}(L_2)_{21} - (L_0)_{21}(L_2)_{12} + (L_0)_{22}(L_2)_{11} + (L_1)_{11}(L_1)_{22} - (L_1)_{12}(L_1)_{21}.$$

Левая часть уравнения (18) с учетом уравнения (17) для нахождения $\partial A/\partial t_1$ принимает вид

$$\lambda_3\frac{\partial A}{\partial t_2} + \lambda_4\frac{\partial A}{\partial x_2} + \lambda_5\frac{\partial^2 A}{\partial x_1^2},$$

где

$$\lambda_3 = \lambda_{3r} + i\lambda_{3i},$$
$$\lambda_4 = \lambda_{4r} + i\lambda_{4i},$$
$$\lambda_5 = \lambda_{5r} + i\lambda_{5i},$$
$$\lambda_{3r} = a_{11} + a_{22} + k^2(D_{11} + D_{22}),$$
$$\lambda_{3i} = -2\omega_r,$$
$$\lambda_{4r} = -2k\omega_r(D_{11} + D_{22}),$$
$$\lambda_{4i} = -2k[(D_{11}a_{22} + D_{12}a_{21} + D_{21}a_{12} + D_{22}a_{11} + 2k^2(D_{11}D_{22} - D_{12}D_{21})],$$
$$\lambda_{5r} = (\partial\omega_r/\partial k)^2 - 6k^2(D_{11}D_{22} - D_{12}D_{21}) - (a_{11}D_{22} + D_{11}a_{22} + D_{21}a_{12} + D_{12}a_{21}),$$
$$\lambda_{5i} = (D_{11} + D_{22})[\omega_r + 2k(\partial\omega_r/\partial k)].$$

Отсюда, учитывая параметры линейной устойчивости (6) и коэффициенты (16), получаем, что $\lambda_3 = \lambda_1$, $\lambda_4 = \lambda_2$, $\lambda_4/\lambda_3 = \partial\omega/\partial k$, $\lambda_5/\lambda_3 = -i(\partial^2\omega/\partial k^2)/2$, и приходим к уравнению

$$\frac{\partial A}{\partial t_2} + \left(\frac{\partial\omega_r}{\partial k} + i\frac{\partial\omega_i}{\partial k}\right)\frac{\partial A}{\partial x_2} - \frac{i}{2}\left(\frac{\partial^2\omega_r}{\partial k^2} + i\frac{\partial^2\omega_i}{\partial k^2}\right)\frac{\partial^2 A}{\partial x_1^2} = -(\beta_1 + i\beta_2)|A|^2 A, \quad (19)$$

где константы Ландау

$$-(\beta_1 + i\beta_2) = [\gamma_1(c_5b_{11} + c_6b_{21}) + 2\gamma_2(c_5b_{12} + c_6b_{22}) + 2\gamma_3(c_5b_{13} + c_6b_{23}) + \gamma_4(c_5b_{14} + c_6b_{24}) + \gamma_5(c_5b_{15} + c_6b_{25}) + \gamma_6(c_5b_{16} + c_6b_{26}) + \gamma_7(c_5b_{17} + c_6b_{27})]/\gamma_3,$$

$$\gamma_1 = \left[m_1^{(0)}m_r + m_rm_{1r} + m_im_{1i} + i\left(m_rm_{1i} - m_im_{1r} + m_im_1^{(0)}\right) + m_2^{(0)} + m_2\right],$$
$$\gamma_2 = m_1^{(0)} + m_1,$$
$$\gamma_3 = m_2^{(0)}m_r + m_rm_{2r} + m_im_{2i} + i\left(m_rm_{2i} - m_im_{2r} + m_im_2^{(0)}\right),$$
$$\gamma_4 = 3m_r^2 + 2m_rm_ii + m_i^2,$$
$$\gamma_5 = 3m_r + im_t,$$
$$\gamma_6 = 3,\ \gamma_7 = 3m\left(m_r^2 + m_t^2\right),$$
$$c_5 = -i\omega_r + a_{22} + k^2D_{22},$$
$$c_6 = k^2D_{12} - a_{12},$$
$$m_1 = m_{1r} + im_{1i},$$
$$m_2 = m_{2r} + im_{2i},$$
$$m_{1r} \in \mathbb{R},$$
$$m_{1i} \in \mathbb{R},$$
$$m_{2r} \in \mathbb{R},$$
$$m_{2i} \in \mathbb{R}.$$

При учете анизотропии миокардиальной ткани и различных коэффициентах диффузии вдоль и поперек волокна (величина $\mathbf{kr} = k_xx + k_zz$) в полученных выражениях изменятся слагаемые, включающие коэффициенты диффузии, и амплитудное уравнение (19) в левой части будет содержать также такие слагаемые, как $(\partial\omega_r/\partial k_z + i\partial\omega_i/\partial k_z)\partial A/\partial z_2$, $-0.5i(\partial^2\omega_r/\partial k_z^2 + i\partial^2\omega_i/\partial k_z^2)\partial^2 A/\partial z_1^2$, $-i(\partial^2\omega_r/\partial k_x\partial k_z + i\partial^2\omega_i/\partial k_x\partial k_z)\partial^2 A/\partial x_1\partial z_1$.

УРАВНЕНИЕ ГИНЗБУРГА–ЛАНДАУ

В новой системе координат, движущейся с групповой скоростью:

$$\xi = x / \varepsilon\sqrt{2\omega_i / \left|\partial^2\omega_i / \partial k^2\right|},\ A = A_0\varepsilon\sqrt{\beta_1 / \omega_i},\ \tau = t_2\omega_i / \varepsilon^2,$$

где

$$A = A_0 \exp i(\delta k x) \exp\left(-\partial\omega_r/\partial k\big|_{k_0} \delta k t i - 0.5\partial^2\omega_r/\partial k^2\big|_{k_0} \delta^2 k t i\right),$$

амплитудное уравнение (19) перепишется следующим образом:

$$\frac{\partial A}{\partial \tau} + i\alpha_1 \frac{\partial A}{\partial \xi} - \left(i\alpha_2 - \operatorname{sign}\frac{\partial^2\omega_i}{\partial k^2}\right)\frac{\partial^2 A}{\partial \xi^2} = A - (1 + i\alpha)|A|^2 A, \quad (20)$$

где коэффициенты (19) явно выражаются через параметры (1) и служат критериями подобия для нелинейного взаимодействия возмущений: α, α_1, $\alpha_2 \in \mathbb{R}$. Коэффициенты могут быть определены как из этих расчетов, так и из экспериментальных данных с использованием методов параметрической идентификации (см., например, работу [22]). Коэффициенты при линейных членах находятся из анализа линейной устойчивости (6), а при нелинейном члене представляют собой константы Ландау и описывают в том числе перенос энергии по спектру и изменение ширины волнового пакета. Коэффициент α показывает нелинейную зависимость частоты от амплитуды. В отличие от кубического комплексного уравнения Гинзбурга–Ландау уравнение (20) включает слагаемое с $\alpha_1 \neq 0$, что позволяет учесть нелинейное поведение в усложненных случаях: в частности, для волновых пакетов с центрами на различных гармониках, вне гармоники с максимальным инкрементом и для кривых инкремента с точками перегиба. Дальнейший нелинейный анализ неустойчивых состояний выполняется в рамках построенного уравнения (например, как в работе [20]).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Коэффициенты амплитудного уравнения (20) для спектрально узкого и слабо нелинейного волнового пакета выражаются в явном виде через коэффициенты исходной модели (1) для трансмембранного потенциала и переменной восстановления. Это позволяет изучать долговременное нелинейное поведение возмущений из непрерывного спектра волновых чисел в закритических областях, включая общий случай нахождения центра волнового пакета вдали от гармоники с максимальным инкрементом. Для линейного и нелинейного анализов устойчивости используются соответственно дисперсионное уравнение (5) и амплитудное уравнение (20) с коэффициентами, полученными из уравнений (1), (6), (12)–(14), (19). При изучении перехода к самоорганизации и хаосу в сердечной ткани после потери устойчивости применяются хорошо известные критерии для анализа уравнения Гинзбурга–Ландау.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Gagné and V. Jacquemet, Chaos **30,** 033132 (2020). DOI: 10.1063/1.5133077
2. A. Yu. Loskutov and S. A. Vysotskii, JETP Lett. **84**, 524 (2007). DOI: 10.1134/S0021364006210120
3. Z. Wang, Z. Rostami, S. Jafari, et al., Chaos. Sol. Fract. **128**, 229 (2019). DOI: 10.1016/j.chaos.2019.07.045
4. R. Barrio, S. Coombes, M. Desroches, et al., Commun. Nonlinear. Sci. Numer. Simulat. **86**, 105275 (2020). DOI: 10.1016/j.cnsns.2020.105275
5. F. Wu, C. Wang, Y. Xu, and J. Ma, Sci. Rep. **6**, 28 (2016). DOI: 10.1038/s41598-016-0031-2
6. C. B. Tabi, A. S. Eteme, and T. C. Kofane, Nonlinear Dyn. **100**, 3799 (2020). DOI: 10.1007/s11071-020-05750-z
7. N. Iqbal, R. Wu, and B. Liu, Appl. Math. Comp. **313**, 245 (2017). DOI: 10.1016/j.amc.2017.05.072
8. C. D. Marcotte and R. O. Grigoriev, Chaos **27**, 093936 (2017). DOI: 10.1063/1.5003259
9. M. E. Valentinuzzi, *Cardiac Fibrillation-Defibrillation: Clinical and Engineering Aspects* (World Scientific, 2010).
10. *Cardiac Bioelectric Therapy. Mechanisms and Practical Implications*, Ed. by I. R. Efimov, M. W. Kroll, and P. Tchou (Springer, 2009).
11. S. Sinha and S. Sridhar, *Patterns in Excitable Media: Genesis, Dynamics and Control* (CRC Press/Taylor & Francis, 2015).
12. I. S. Aranson and L. Kramer, Rev. Mod. Phys. **74**, 99 (2002). DOI: 10.1103/RevModPhys.74.99.
13. V. Biktasheva, Yu. E. Elkin, and V. N. Biktashev, Phys. Rev. E **57**, 2656 (1998). DOI: 10.1103/PhysRevE.57.2656.

14. C. Huang, X. Cui, and Z. Di, Nonlinear Dyn. **98**, 561 (2019). DOI: 10.1007/s11071-019-05212-1.
15. S. Kumar, R. Herrero, M. Botey, and K. Staliunas, Sci. Rep. **5**, 13268 (2015). DOI: 10.1038/srep13268
16. Л. П. Холпанов, Теор. основы хим. технологии **32**, 355 (1998).
17. J. Ma, J. H. Gao, C. N. Wang, and J. Y. Su, Chaos Sol. Fract. **38**, 521 (2008). DOI: 10.1016/j.chaos.2006.11.039
18. S. V. Gurevich, C. Schelte, and J. Javaloyes, Phys. Rev. A **99**, 061803 (2019). DOI: 10.1103/PhysRevA.99.061803
19. И. В. Елюхина, Теор. основы хим. технологии **48**, 658 (2014).
20. И. В. Елюхина и Л. П. Холпанов, Теор. основы хим. технологии **45**, 309 (2011).
21. I. Elyukhina, J. Math. Chem. **56**, 2617 (2018). DOI: 10.1007/s10910-018-0907-4
22. Л. П. Холпанов и И. В. Елюхина, Теор. основы хим. технологии **43**, 628 (2009).
23. I. Elyukhina, Rheol. Acta **5**, 327 (2011). DOI: 10.1007/s00397-010-0517-y
24. I. Elyukhina, J. Mater. Sci. **48**, 4387 (2013). DOI: 10.1007/s10853-013-7257-1
25. R. R. Aliev and A. Panfilov, Chaos Sol. Fract. **7**, 293 (1996). DOI: 10.1016/0960-0779(95)00089-5
26. E. P. Zemskov, M. A. Tsyganov, and W. Horsthemke, Phys. Rev. E **99**, 062214 (2019). DOI: 10.1103/PhysRevE.99.062214
27. Л. И. Мандельштам, *Лекции по теории колебаний* (Наука, М., 1972).
28. М. А. Леонтович, Изв. АН СССР, сер. физ. **6**, 16 (1944).
29. A. C. Newell and J. A. Whitehead, J. Fluid Mech. **38**, 279 (1969). DOI: 10.1017/S0022112069000176
30. K. Stewartson and J. T. Stuart, J. Fluid Mech. **48**, 529 (1971). DOI: 10.1017/S0022112071001733
31. T. Taniuti, J. Math. Phys. **10**, 1369 (1969). DOI: 10.1063/1.1664975
32. H. C. Yuen, and W. E. Ferguson Jr., Phys. Fluids **21**, 1275 (1978). DOI: 10.1063/1.862394
33. В. А. Елюхин, Биофизика **24**, 1085 (1979).
34. A. H. Nayfeh, *Perturbation methods* (Wiley-VCH Verlag, 2004).

Ginzburg-Landau Equation for Nonlinear Instability Analysis in Cardiac Tissue

I.V. Elyukhina

South Ural State University (national research university), prosp. Lenina 76, Chelyabinsk, 454080 Russia

A complex amplitude equation for the analysis of long-term nonlinear behavior in cardiac tissue after loss of stability has been developed. The equation is obtained in the third approximation by reduction of the system of differential equations for the transmembrane potential and the recovery variable. The developed Ginzburg–Landau equation describes the nonlinear growth and interaction of perturbations from the continuous spectrum of wave numbers in this dispersive medium. Expressions are found for the coefficients of the amplitude equation in terms of the parameters of the original models of active media, in particular, the FitzHugh–Nagumo and Aliev–Panfilov models. In the general model of such systems of the "reaction-diffusion" type, direct and cross diffusion are taken into account.

Keywords: cardiac tissue, nonlinear instability, Ginzburg–Landau equation

EDN: ILTPWB
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 386–408

БИОФИЗИКА СЛОЖНЫХ СИСТЕМ

УДК 595.76, 51.76, 532.22

ГИБРИДНАЯ МОДЕЛЬ КОЛЛАПСА ПРОМЫСЛОВОЙ ПОПУЛЯЦИИ КРАБА *Paralithodes camtschaticus* (Decapoda, Lithodidae) КАДЬЯКСКОГО АРХИПЕЛАГА

© 2022 г. А.Ю. Переварюха
Санкт-Петербургский Федеральный исследовательский центр РАН, 199178, Санкт-Петербург, 14-я линия, 39
E-mail: temp_elf@mail.ru

Поступила в редакцию 11.12.2021 г.
После доработки 17.12.2021 г.
Принята к публикации 19.12.2021 г.

Деградация промысловых популяций остается частым явлением даже с применением методов учета и контроля объема добычи. В практике рыбного хозяйства используется понятие «перелова» с известными признаками этого состояния. Однако ведущие к деградации запасов процессы развиваются достаточно разнообразно. С точки зрения теории нелинейных динамических систем можно классифицировать несколько типов развития кризиса. Особенный интерес представляют явления коллапса – варианты стремительного падения численности, неожиданные для контролирующих промысел организаций. Непосредственно перед коллапсом состояние запаса может оцениваться и как относительно стабильное, но может испытывать флуктуации. После быстрого сокращения вопреки ожиданиям не следовало быстрого восстановления у трески, сига Великих Озер, палтуса и других ценных видов. В работе рассматривается гибридная модель для ситуации коллапса запасов краба Paralithodes camtschaticus у Кадьякского архипелага штата Аляски с необычной отличительной осциллирующей динамикой. Вычислительный сценарий в гибридной системе с уравнениями выживаемости и роста учитывает логику принятия решений при управлении эксплуатацией. Сценарий отличается тем, что после падения уловов популяция краба переходит в режим спорадических флуктуаций, не имеющих регулярного характера и не характерный для данных биоресурсов. Непосредственно коллапс наступает через долгий интервал ведения промысла популяции уже в неустойчивом режиме. Анализ показывает, что большая длительность жизненного цикла вида не становится решающим фактором для исключения риска сценария коллапса. Наличие резервных поколений качественно не изменяет ситуацию, эффективность их воспроизводства у краба и трески у побережья Лабрадора оказалась неожиданно низкой. Необходимо регулярно уточнять критерии состояния запасов крупных хищников, требующих сезонных мораториев на их вылов.

Ключевые слова: нелинейная динамика деградации экосистем, сценарное моделирование, управление эксплуатацией биоресурсов, сценарии коллапса популяций, нерегулярные флуктуации и циклы, кризис популяции краба Paralithodes camtschaticus

DOI: 10.31857/S0006302922020223

В предыдущих работах мы исследовали математическими методами свойства осциллирующих явлений в динамике различных биологических процессов. Удалось описать затухающие колебания для ситуации серий уменьшающихся пиков вспышек численности у насекомых-вредителей в бореальных лесах [1]. Рассмотрены переходные колебательные режимы, ведущие к популяционному кризису «бутылочного горлышка» после активной фазы агрессивной инвазии [2]. Нестационарный по амплитуде осциллирующий процесс иллюстрируется современной эпидемической динамикой. Во многих странах графики заболеваемости COVID-19 приобрели форму череды «волн», накатывающих с интервалами четыре с половиной месяца. Так происходит, в частности, согласно статистике. приводимой по США (рис. 1). Волны вызывают важную психологическую проблему, когда победа над эпидемией видится совсем близкой, но вдруг вновь приходится вводить режимы ограничений.

Режим «эпидемических волн» с интервалом в четыре-шесть месяцев является распространенным, но не единственным вариантом развития сценария. Эпидемические процессы и уровень смертности в регионах существенно отличались. В ряде стран по-прежнему местные жители подвержены болезни сильнее, чем в других. Так, в Бельгии при 80%-й вакцинации граждан возраста 18+ смертность остается немного выше, чем в

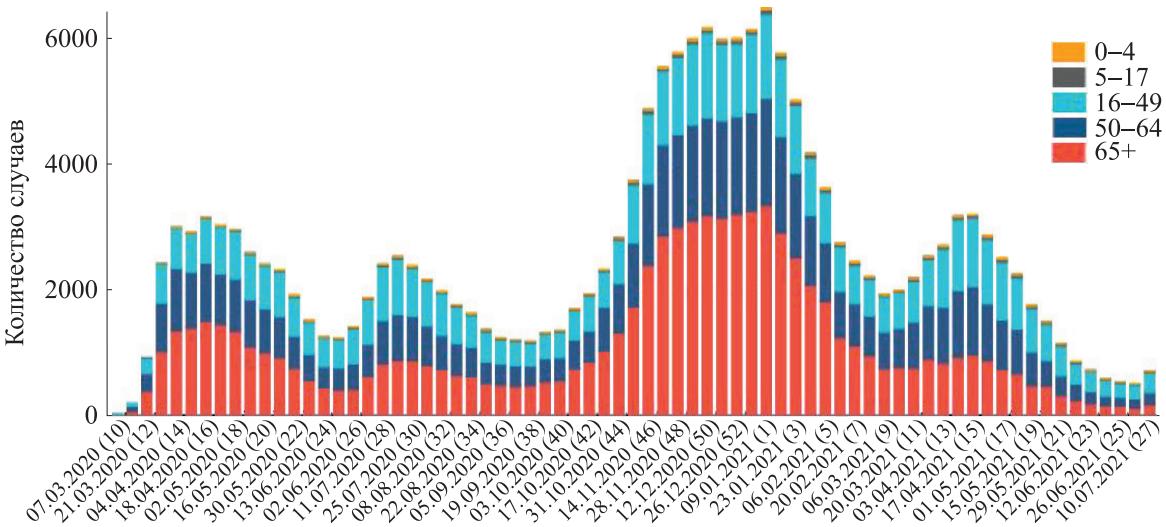


Рис. 1. Динамика волн госпитализаций больных с диагнозом COVID-19 во всех штатах США по неделям с 7.03.2020 г. по возрастным группам (https://gis.cdc.gov/grasp/covidnet).

Словакии при уровне вакцинации 54%. Интересны очевидные различия для людей из одной этнической группы, постоянно живущих в разных регионах. Наша гипотеза об иммунологической причине столь заметных различий из-за влияния в прошлом распространения сезонных коронавирусов, предложенная весной 2020 г. в работе [1], получила обоснование. В работе [3] выявлены и перекрестно-реактивные иммунные Т-клетки, и идентифицирован универсальный иммунодоминантный пептид.

Множество работ еще будет посвящено анализу причин различий характера локальных эпидемий и их моделированию. В Дании видим краткую вспышку числа заражений, переходящую в спорадическую динамику без отчетливых периодических эффектов. Отметим интересный для биокибернетики аспект общности у нелинейных эффектов. Сценарий эпидемии в Дании на графике (рис. 2) динамически схож с картиной развития и быстрого завершения через месяц вспышки размножения у псиллид рода Cardiaspina в Австралии с пороговым сценарием запуска и с вероятностью повторения Λ-образного пика у вредителей при стохастичном поведении популяции [4].

Глобальная динамика пандемии в конце октября 2021 г. демонстрирует промежуточный тренд уменьшения случаев заражения (и доли смертельных исходов) в фазе затухания третьей волны. Из тенденции уменьшения смертности в осенней волне 2021 г. выбивается ряд стран, где ограничения то снова вводят, то отменяют. В других регионах наблюдается начало следующей фазы роста заражений – динамика асинхронна. По графику, приведенному на рис. 3, уже понятно, что заболеваемость на пике четвертой волны в нашей стране ощутимо превзойдет максимум 2020 г.

Предложенные весной 2020 г. модификации SIR-модели эпидемии не смогли предсказать долгой колебательной динамики. В работе [5] авторы даже строго доказали, что их система уравнений не имеет орбитально устойчивых периодических решений. В 2021 г. развиваются нелокальные SIR-модели с решением в форме бегущих волн. Методы, описывавшие локальные вспышки гриппа, для условий пандемии не подходят. Исторические аналогии на основе сценариев «испанки» и «свиного гриппа» не помогут модельным прогнозам, четырех волн у прошлых пандемий гриппа не было. Пандемию «русского гриппа» в 1889–1892 гг. вероятнее всего вызвал коронавирус HCoV-OC43, в дальнейшей эволюции потерявший свою патогенность, но образовавший четыре типа – это путь снижения патогенности вируса при необходимости ускользания от иммунитета.

Необычный в биосистемах сценарий ступенчатых релаксационных осцилляций и без снижения амплитуды мы можем феноменологически описать следующим уравнением:

$$\frac{dN}{dt} = rN(t)\,\mathrm{e}^{-L[A(t)]}\left(\frac{K - N^2(t-\tau)}{\left(K + cN(t-\tau_1)\right)^3}\right)\left(H - N(t-\tau)\right), 0 < H < K. \quad (1)$$

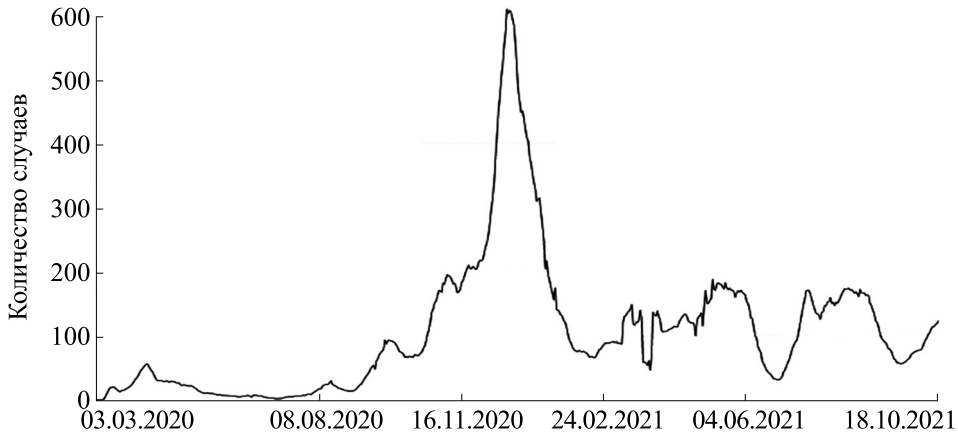


Рис. 2. Динамика случаев заражения COVID-19 в Дании (там отслеживают каждый случай) по неделям с выраженным пиком в декабре 2020 г. (https://coronavirus.jhu.edu).

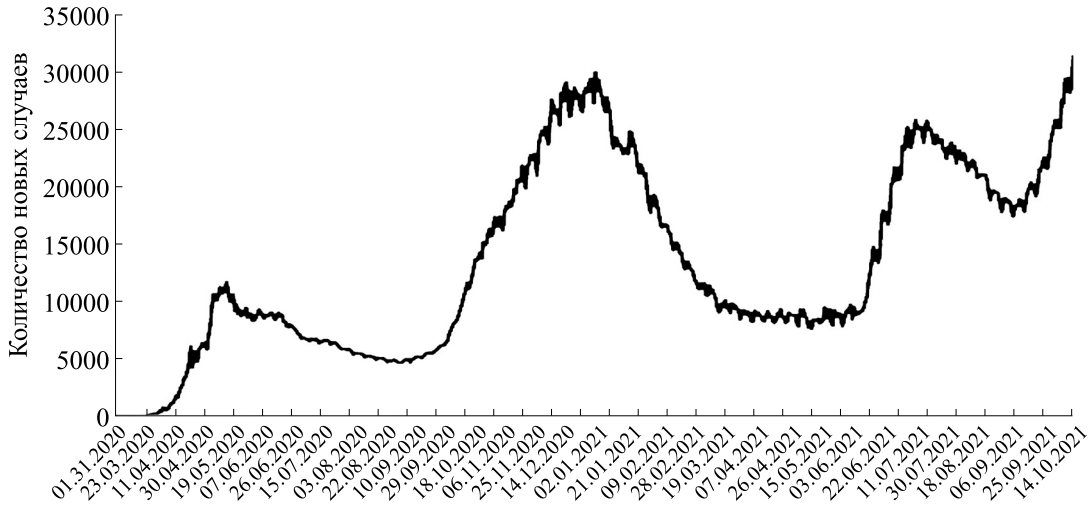


Рис. 3. Динамика волн эпидемии COVID-19 в России по официальной статистике ежедневных регистрируемых случаев заражения (https://coronavirus.jhu.edu).

В уравнении (1) K – величина эпидемического порога для запуска экстремального роста заболеваемости при $r > 1$, H – предпороговое состояние накопления активной группы распространителей. H действует в уравнении (1) по отношению к числу заболевающих в некоторый момент ранее, отстающий на средний интервал времени латентной стадии инфекции. Согласно данным графика на рис. 3 мы оценим $H \approx 5000$. Включим $e^{-L[A(t)]}$ как функционал демпфирования, задающий итоговое затухание волн любой пандемии при $t \to \infty$. Теоретически эффект достигается с пороговым уровнем «коллективного иммунитета» $A(t)$ (по разным прогнозам экспертов от 75% или даже 92% в популяции).

В реальном сценарии вместо фазы затухания третьей «волны» с конца сентября сразу началась четвертая волна, что говорит о воздействии дополнительного возмущающего фактора усиления распространения. Аналогичная динамика нарушения цикличности резкой вспышкой уже наблюдалась в апреле 2021 г. в Бразилии. Предположительно причиной стал «тревожный» штамм (Delta AY.4.2), но сейчас это может быть пока неизвестный вариант. Delta возник еще в 2020 г. В работе [6] показано, что угроза от Delta связана с мутациями не только S-белка, но и с улучшениями структурного N-белка нуклеокапсида, увеличившими процент сборки внутри клетки функциональных вирионов, пригодных для дальнейшего заражения. У ВИЧ только ≈1.5% новых вирионов функциональны.

Мутации продолжат возникать как случайные события в ослабленных организмах носителей, но факторы отбора вариантов не столь стохастичны и могут измениться. Для моделирования инте-

ресно, что накопление мутаций у S1 регистрировали сразу сериями. После множественных мутаций следовали интервалы стабильности. Адаптивная эволюция субъединицы вирусного белка S1 в 2020 г. была коррелирована с увеличением инфекционности – отбором по аффинности его связывания с клеточным рецептором. Опасный сценарий, когда при низких темпах вакцинации провоцируется отбор мутаций у *S*-белка, преодолевающих гуморальный иммунитет, – иммуноглобулины планомерно начнут утрачивать аффинность в связывании с обновленными участками *S*-белка. Роль антителозависимого усиления инфекции в развитии осложнения «цитокинового шторма» анализировали в работах [7, 8]. Эффект ADE для COVID установлен пока только в лабораторных опытах с животными в работе [9]. *Вероятностный* эффект ADE способен приводить к циклическому локальному эффекту подъема заболеваемости, когда наличие антител, выработанных ранее для *некоторых* «дрейфующих» антигенов старых штаммов, способно стать негативным фактором заражения макрофагов. Предлагаемое решение для остановки процесса – ревакцинация населения с вакцинами разных технологий. В Чили получившим инактивированную вакцину решили делать третью прививку дозой мРНК-вакцины.

Обсуждается ряд гипотетических методов инактивации коронавируса [10, 11]. Помимо формирования долгосрочного иммунитета за счет *T*-лимфоцитов CD8+ невыясненной остается мера влияния исходной дозы заражения на дисрегуляцию иммунного ответа [12, 13] и осложнений при COVID [14]. В опасном сценарии выброс цитокинов изначально замедлен из-за ингибирования вспомогательными белками вируса активности интерферонов, но потом резко усиливается, так лавинообразно запуская губительную петлю положительной обратной связи воспалительной реакции.

Для описания приведенных на графиках трех разных сценариев эпидемической динамики требуется использование разного специального математического аппарата, способного генерировать именно нужные нам нелинейные эффекты. Их число ограничено фундаментальными теоремами, что заставляет нас комбинировать методы.

Обсудим другую важную ситуацию стремительных изменений в популяционных процессах – явления деградации при контролируемом вмешательстве. Цель работы – конструирование вычислительной структуры с алгоритмическим представлением событийности в непрерывном времени для сценарного моделирования вариантов деградации запасов, происходящих как неожиданный коллапс при ведении управляемого промысла. Динамика развития кризисов морского промысла аналогично локальным эпидемиям значительно различается по известным примерам, но имеет и важные аспекты сходства ситуаций, которым мы сопоставим нелинейные эффекты.

СЦЕНАРИИ ПРОМЫСЛОВОЙ ДЕГРАДАЦИИ И ПОПУЛЯЦИОННОГО КОЛЛАПСА

Регулируемый согласно квотам допустимого улова промысел нередко приводил к деградации биоресурсов, как локальных [15], так и имеющих огромный океанический ареал [16]. Проблема оптимальной эксплуатации запасов далека от исчерпывающего решения. Иногда выделенные при явном кризисе расчетные квоты для промысла все равно не осваивались даже на 30%, как в Каспийском бассейне в 2006–2010 гг. [17]. Резкой деградации подвержены и короткоцикловые виды, и крупные хищники, но с существенными различиями в их темпах восстановления. Именно типизация по мере сходства/различия в этапах сценариев интересна нам для анализа нелинейной динамики кризисных популяций. Важны случаи с достоверными оценками и данными уловов.

Важнейший аспект, на который мы с математической точки зрения обратили внимание при сравнении разных случаев, – деградация биоресурсов происходит либо постепенно с небольшой (<10%) ежегодной убылью, либо в форме финального коллапса. Пример затянувшейся на полвека деградации, вызванной чрезмерным промыслом и нарушением естественного речного стока Волги, – ситуация с популяциями осетровых рыб Каспийского моря [18]. Четыре вида включены с 2010 г. в «Красную книгу» как находящиеся под угрозой исчезновения. Официальные статистические данные, приведенные на рис. 4 [19], не включают нелегальное изъятие. Сейчас в международных документах ООН призывает страны бороться с *NNN*-промыслом – нелегальным, нерегулируемым и *несообщаемым*. Необходимо знать, сколько в реальности выловил субъект, даже имеющий легальное право на вылов, более того, для прогнозирования необходимо представлять и гендерное, и размерно-возрастное распределение особей улова.

Причина столь длительного истощения запасов при хищническом вылове – сложная внутрипопуляционная структура у этих рыб с сезонными расами [20] и эволюционная адаптация осетровых к размножению на ограниченных русловых нерестилищах [21, 22]. Заходящие в реки Волгу или Урал субпопуляционные группы рыб раньше или позже основной нерестовой группы получали шансы избежать промысла в реке, но эффективность их воспроизводства ниже, чем при оптимальном [23] уровне половодья и

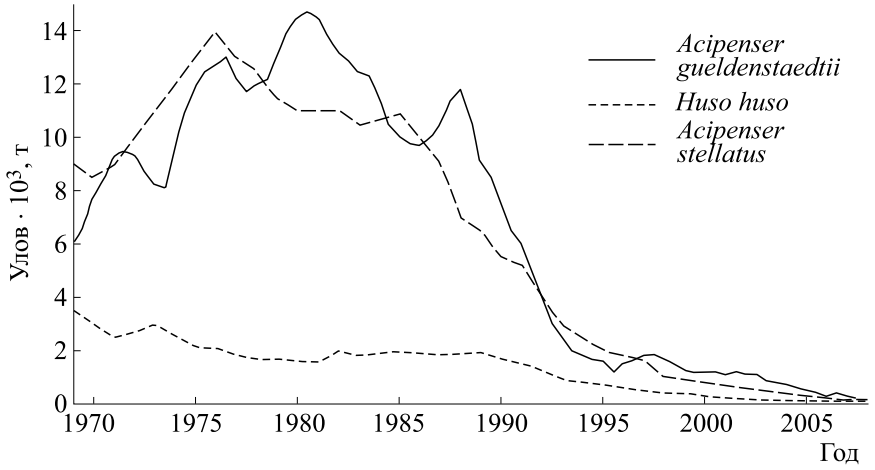


Рис. 4. Динамика деградации трех популяций осетровых рыб Каспийского моря (осетр, севрюга, белуга) по данным объема официальных уловов [19].

температуре. Анализом данных о миграции молоди методами скользящего среднего мы ранее установили наличие двух максимумов для показателя эффективности нереста севрюги *Acipenser stellatus* в Волге. Для осетра *Acipenser gueldenstaedtii* был показан единственный куполообразный максимум с асимптотой на уровне, составлявшем половину от максимального, а форма кривой зависимости запаса и пополнения у белуги *Huso huso* не имела экстремума [24, 25], но наш интервал данных был неполон, так как запасы белуги были истощены еще в начале XX века.

Схожая ситуация с долгой 35-летней деградацией (по данным работ [26, 27]) наблюдалась для судака *Stizostedion lucioperca* в Азовском море. В ситуации с осетровыми рыбами имелись возможности остановить промысел задолго до точки деградации. Искусственный выпуск молоди не оправдал ожиданий по промысловому возврату. Резкий коллапс запасов принципиально отличен от примера затянувшегося вопреки здравому смыслу и очевидного экспертам монотонного истощения ценных запасов, представленного на рис. 4. В работе [28] явление популяционного коллапса трактуется как снижение численности взрослых особей на 90% за три года, и этот кризис длится не менее десяти лет.

Случаям промыслового коллапса гидробионтов, его причинам и выявляемым признакам посвящено много работ для разных объектов промысла, например, для моллюска *Chlamys islandica* [29]. Принципиальная схема развития коллапса запасов по графику уловов при повышении уровня изъятия согласно обзору [30] приведена на рис. 5. Непосредственно перед фактом коллапса уловы прошли пики, но еще достаточно высоки.

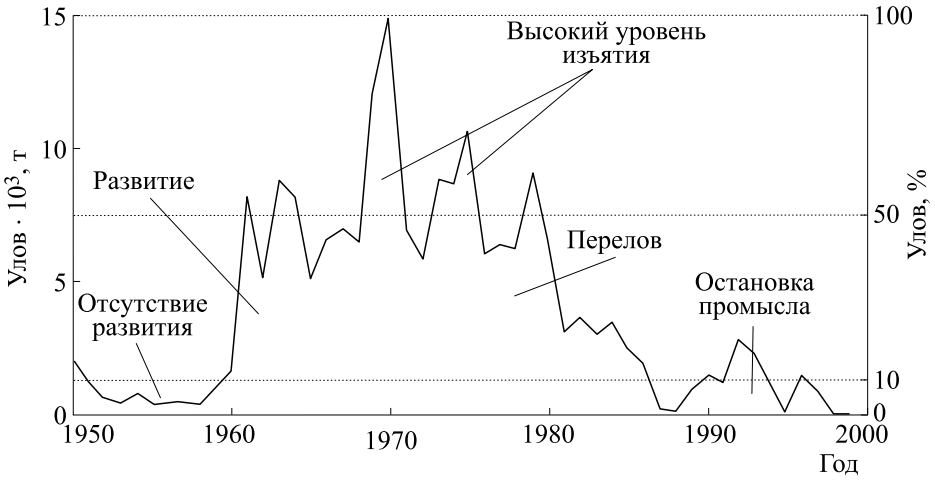


Рис. 5. Динамика уловов для общего сценария схемы коллапса запасов (по данным работы [30]).

Рис. 6. Динамика биомассы нерестового запаса трески у провинции Ньюфаундленд и Лабрадор относительно критического уровня LPR (в млн. т., по оценкам в работе [35]). С 2015 г. отмечается уверенный рост нерестового запаса популяции и к 2030 г. можно ожидать достижения критической отметки запаса.

Следовательно, подобная гипотетическая популяция могла длительное время выдерживать высокий уровень доли изъятия ($q > 0.6$), и это бы считалось нормой. Это подтверждают случаи и с атлантической треской [31], и с волжской севрюгой, где в отдельные маловодные годы изъятие из нерестовой части популяции доходило до $q \approx 0.8$. Надежды на восстановительный резерв за счет еще не вступивших в промысловый возраст поколений в итоге нивелируются долгим созреванием молоди этих видов, которая еще столкнется и с неоптимальным гендерным распределением из-за разного времени созревания у самцов и самок, которые будут представлять в момент первого нереста поколения с существенно отличающейся численностью.

Считалось, что резкому, но краткому сокращению запасов могут быть подвержены короткоцикловые промысловые виды, такие как перуанский анчоус *Engraulis ringens*. Уловы самой вылавливаемой рыбы в мире несколько раз быстро падали и восстанавливались, но в итоге с рекордных 13 млн. т. в 1971 г. сократились до 1.1 млн. т. к 2015 г., в том числе из-за частых появлений теплого течения Эль-Ниньо. Исчерпание промысловых запасов атлантической трески *Gadus morhua* у берегов Канады – сокрушительный коллапс по экономическим последствиям от вынужденного прекращения промысла начиная с 1992 г. [32]. К тому же еще в 1990 г. прогнозы здесь были благоприятными.

Правительства провинций Канады строго регулируют морской промысел, но в сезоны непосредственно перед коллапсом выделенные ими квоты полностью не осваивались, что говорит о системных переоценках состояния запасов. Многие авторы обсуждали ситуацию с деградацией этого массового доминирующего хищника в водах провинций Ньюфаундленд и Лабрадор. Рассматривались ошибки в регуляции рыболовства, недостоверность оценки пополнения поколений из-за погрешности методов учета, селективность изъятия крупных рыб, сопутствующие природные факторы течений у берегов Северной Америки [33]. Селективность изъятия крупных и плодовитых особей приводит к последствию, когда в популяции станут преобладать «тугорослые» и быстросозревающие генетические формы, но они отличаются повышенной посленерестовой смертностью (известный рыбакам пример – балтийская корюшка *Osmerus eperlanus* и ее короткоцикловая форма озерный снеток).

Эксперты не выработали консенсуса о причинах коллапса для случая трески, но было выдвинуто много версий и гипотез, в том числе для оправдания своих просчетов. Значимым неучтенным промысловыми прогнозами фактором стало усиление каннибализма трески при обилии собственной молоди. Изначально мораторий на вылов трески регулирующие органы установили на полтора года. По самым пессимистичным экспертным прогнозам восстановление после коллапса должно было занять девять лет [34], однако промысел не был восстановлен и через 20 лет. Именно отсутствие ожидаемого по модельным прогнозам начала восстановления запасов основная проблема в сценарии кризиса у крупных и долгоживущих видов. Предполагалось скорое восстановление за счет еще неиспользуемых промыслом гипотетически многочисленных резервных поколений трески, но их численности неожиданно не хватило.

График динамики уловов трески с интервалом длительной стабилизации между пиком рекордных уловов и крахом промысла в 1992 г. известен и доступен в Википедии. Приведем другой, более интересный график расчетной динамики биомассы нерестового запаса трески (рис. 6). Современные оценки из работы [35] явно подтверждают действие порогового эффекта, ранее труднообъяснимого для многовозрастного запаса.

После деградации популяции доминирующего хищника изменения произошли в сообществе донных гидробионтов. Промысел у берегов Лабрадора переориентировался на донных беспозвоночных, увеличивших биомассу без пресса основного хищника. Креветки стали значительно крупнее. Аналогичная ситуация наблюдалась и для фауны в Каспийском море, где начался промысел ставших крупными бычков, они заняли нишу после истощения запаса осетровых рыб, их хищников и основных потребителей бентоса. Изменилась размерно-возрастная структура попу-

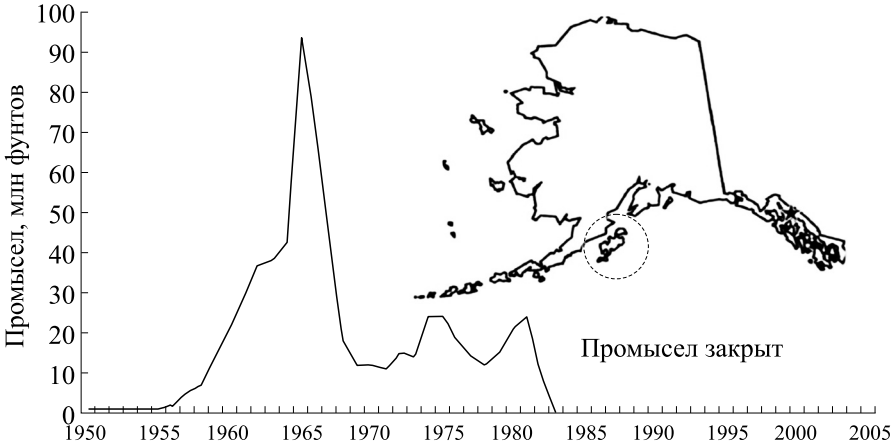


Рис. 7. Динамика промысла краба *Paralithodes camtschaticus* у берегов Алеутского полуострова Аляски и островов Кадьякского архипелага с коллапсом (по данным работы [43]).

ляций моллюсков, которые ранее потреблялись осетровыми. К 2000 г. стали преобладать крупные особи [36]. Однако высокую продуктивность обеспечивают молодые организмы. Исторически запасы осетровых рыб поддерживала кормовая база бентоса с низкой биомассой, но с высокой продуктивностью. Рацион для молоди осетровых и трески в реальности сократился.

С точки зрения нелинейной динамики перед коллапсом трески наблюдалось полуустойчивое состояние равновесия, ниже которого воспроизводство сокращается по ступенчатой функции. Подобные пороговые переходы уже известны и в моделях для динамики насекомых [37]. Ситуацию с прогнозом запасов трески просчитывали многократно, по современным оценкам промысловая численность будет восстановлена к 2030 г. [38]. Анализируя ряд ситуаций в разных регионах, мы обратили внимание на особенно интересные для математической биологии варианты развития коллапса.

СИТУАЦИЯ КОЛЛАПСА ПРОМЫСЛОВОЙ ПОПУЛЯЦИИ КРАБА

Несколько отличных по динамике ситуаций краха промысла случались и ранее, но эти события коллапса привлекли только локальное внимание. Потому мы анализируем более интересный с точки зрения моделирования и не столь известный пример динамики деградации экономически ценных запасов «нерыбного» объекта промысла.

Многим популяциям свойственен естественный колебательный режим [39, 40]. При этом длительность периода их колебаний может не коррелировать с длиной жизненного цикла самого вида [41]. Так, в случае циклических вспышек листовертки *Choristoneura fumiferana* или четвертьвековых периодов колебаний у дальневосточной сардины *Sardinops melanostictus* [42] эти циклы не нарушил современный глобальный климатический тренд потепления. Цикл может быть *альтернативным устойчивым* режимом существования биосистемы, наряду с равновесием в другом диапазоне значений численности ее составляющих (в иной области притяжения аттрактора). Проблема управления в том, что эксперты, определяющие уровень промыслового изъятия (сезонные квоты), не готовы к сменам естественных трендов. Если эксперты отчетливо наблюдали позитивную тенденцию на восходящей «волне» популяционного цикла, то склонны экстраполировать эту тенденцию в прогнозах на следующие сезоны.

На рис. 7 представлен график промысла запасов камчатского краба *Paralithodes camtschaticus* (по-английски этот деликатесный вид-хищник называется «red king crab») с итоговым коллапсом к 1985 г. в регионе Алеутского полуострова Аляски – в проливе Шелихова и водах соседних островов Кадьякского архипелага [43].

Многочисленная в Тихом океане популяция краба деградировала за 35 лет эксплуатации при ведении регулируемого квотами и селективного по размерам особей промысла и не восстановилась, несмотря на все усилия. Пик вылова краба был достигнут в 1966 г. В итоге процесс от пика вылова до точки коллапса и моратория на промысел занял 20 лет (1966–1985 гг.). В сценарии до момента коллапса прошло гораздо больше времени, чем в случае с треской в водах Лабрадора. Перед коллапсом уловы краба в течение пяти лет стабильно росли до локального максимума, популяция считалась благополучной и не было видимых статистикам причин корректировать изъятие. На графике, где показана динамика массы уловов (M, млн. фунтов) краба кадьякской попу-

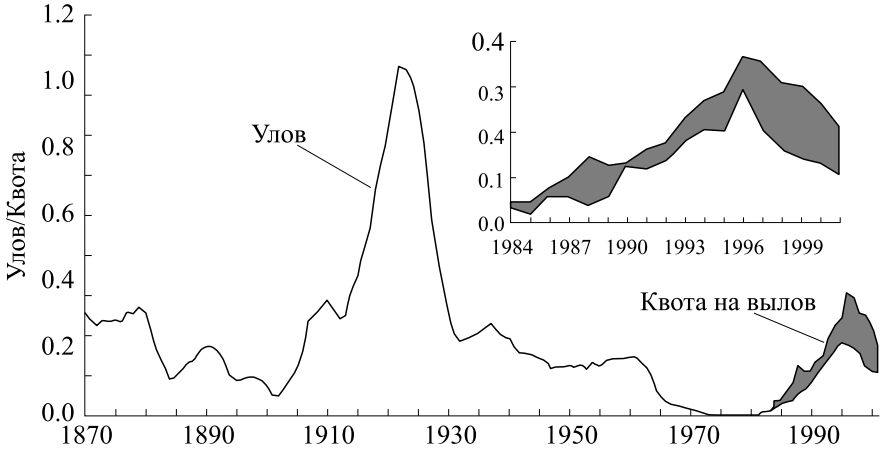


Рис. 8. Динамика уловов сига в озере Онтарио (в млн. кг) с коллапсом в 1965 г. и восстановлением популяции к 1985 г., отдельно показана квота на вылов (по данным работы [44]).

ляции, видны два резких падения, связанные со снижением величины запаса S, когда квота не осваивалась промыслом. Первое падение уловов в 3.8 раза случилось в 1968 г. Аналогичный пик уловов с резким промежуточным падением отмечался и для канадской трески. Между кризисами прошло 17 лет ведения промысла краба с 50%-ми колебаниями величины уловов. Восстановление запасов краба оказалось сложнее, чем у трески, пока нет данных о появлении позитивной динамики в этом промысловом районе. Мешает восстановлению гибель крабов в потерянных ранее сетях. Длительность жизненного цикла камчатского краба и трески Северо-запада Атлантики и их роль доминирующего хищника (усиленного каннибализмом) в сообществе сравнимы.

Промысел регулируется для деликатесных донных беспозвоночных даже в большей мере строго, чем для массовых промысловых видов рыб, таких как как треска и анчоус, где погрешность может быть в тысячи тонн. Однако успешно планировать будущие уловы можно при стабильной доле промыслового возврата от исходных объемов икры, и когда связь нерестового запаса и пополнения $R = f(S)$ удачно аппроксимируется дробно-линейной зависимостью. Для осетровых рыб поправки вносят параметры половодья, рассчитываемые корреляционным методом. Управление эксплуатацией биоресурсов усложняется, когда эффективность воспроизводства у данной популяции подчиняется обусловленной конкуренцией асимптотической зависимости, имеющей экстремумы.

Случай коллапса краба математически сложнее. После сокращения численности из-за перелова в 1965–1967 гг. очевидна резкая потеря равновесия, но сразу возникает колебательный режим у численности запаса между первым и окончательным кризисом промысла. Сценарий локальной деградации популяции камчатского краба отличается от динамики трескового кризиса именно большим осциллирующим переходом. Для трески долго наблюдалась псевдостабилизация запаса, оказавшегося в неустойчивом равновесии. Если сравнить между собой ситуации известных коллапсов, то с точки зрения нелинейной динамики видимые метаморфозы фазовых портретов имеют не только очевидные сходства, но и некоторые отличия. У далеких по таксономической классификации видов гидробионтов регуляция демографических процессов может отражаться математически схожим функционалом. Именно проявление пороговых нелинейных эффектов и режимов спорадических флуктуаций в рассматриваемых сценариях делают нереальным установление некой универсальной стратегии ведения оптимального промысла. Предвидеть быстрый коллапс и понять его причины статистикам оказалось сложно. Атлантическими аналогами являются треска *Gadus morhua* и краб *Paralithodes camtschaticus*; это долгоживущие крупные хищники, имеющие резерв репродуктивного потенциала, как считалось, они не должны незамедлительно коллапсировать подобно анчоусу.

Ошибочные решения в теории управления бывают как случайные, так и систематические. С целью подтвердить гипотезу, что описанный сценарий не является следствием редкого стечения обстоятельств в море или казусом отображения разнородно собранной статистики, мы приведем еще один нетривиальный пример случившегося коллапса после выраженного пика улова и последовавшего двенадцатилетнего интервала промысла с перемежающимся трендом. Схожая ситуация развивалась для промысла сига *Coregonus clupeaformis* в озере Онтарио, но с последующим восстановлением (рис. 8) [44]. Этот вариант прохождения кризиса требует отдельного математи-

ческого обсуждения, так как имеются материалы учета по Великим Озерам.

Дополнительным неучтенным в промысловых прогнозах фактором смертности в случае сига в озере Онтарио стала инвазия в Великие Озера паразита – морской миноги *Petromyzon marinus*. С миногой активно боролись. Через 20 лет популяция сига начала восстанавливаться, вновь открыли промысел, но выделенная квота для вылова снова оказалась чрезмерной, и ситуация с переловом сига повторилась, как и предсказывала принципиальная схема коллапса на рис. 5. Сиг в некоторых озерах не восстановился.

Все три упомянутых нами сценария деградации (каждый по-своему) гораздо сложнее для принимающих решения об уровне эксплуатации специалистов, чем упорно и долго продолжавшееся истощение запасов осетровых рыб Каспийского моря.

Предлагаем сконструировать дискретно-непрерывную модель для анализа динамики перехода от равновесия к колебательному режиму с пороговым эффектом коллапса.

МЕТОДОЛОГИЯ ТЕОРИИ ФОРМИРОВАНИЯ ПОПОЛНЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ

Обоснование моделирования с включением гибридных структур будем строить в рамках методологии теории формирования пополнения. Кратко изложим основные математические положения концепции и подчеркнем неочевидные проблемы из-за применения этого аппарата при оценке данных о динамично меняющемся объекте. Характеристики эффективности воспроизводства в сценарии коллапса должны меняться при большой убыли запаса относительно исторического оптимума согласно заложенным функциям регуляции – сначала гладко снижаться, а потом иметь пороговый эффект, который невозможно описать в традиционных моделях. Модель не должна требовать для описания коллапса «внешнего» изменения параметров при расчетах.

Математическая теория формирования пополнения популяций гидробионтов была обоснована в работах [45, 46]. Основная идея была сформулирована в методе построений по данным наблюдений функциональной зависимости между существующим родительским запасом и получаемым от нереста пополнением. В работе [45] предполагалось, что если оценить форму нелинейности у зависимости, то можно изымать излишек запаса в размере того прироста численности, что окажется выше уровня восполнения – биссектрисы координатного угла. Тогда оптимальное решение очевидно – перевести запас S в такое состояние S_{opt}, когда положение кривой зависимости над биссектрисой будет наибольшее: $\Delta[f(S)-S] \to \max$. Подход работает далеко не для всех промысловых видов. Методика анализа кривых $f(S)$ лучше применима к крупным видам с большой индивидуальной плодовитостью, действие на которых стохастичности факторов среды меньше. Их состояние запасов после интервала уязвимости определяет в основном промысловая и отчасти посленерестовая смертность. Таксономическая близость видов не гарантирует сходства или просто наличия видимых зависимостей, важнее уровень конкуренции за ресурсы и факторы выживаемости их молоди. Одним из важнейших факторов автор работы [45] считал каннибализм. Внутривидовое противоборство увеличивается при высокой плотности запаса на нерестилищах, что было актуально для изучаемых им видов семейства Salmonidae в малых реках Канады. На преодоление этого фактора была направлена эволюционная адаптация осетровых рыб Каспия, для минимизации конкуренции использовавших и отдаленные миграции, и нерест в летние месяцы. Перекрытие миграционных путей нивелировало эту приспособленность.

Если резко изменились условия воспроизводства, то трансформировалось соответственно и положение экстремумов зависимости $f(S)$ относительно биссектрисы, максимум кривой наверняка сдвинулся влево. Из-за таких факторов воздействия необходимы при расчетах более гибкие методы для математического описания многообразия зависимостей и вариативности возможного развития ситуаций.

ДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МОДЕЛЕЙ И АНАЛИЗ ДАННЫХ

В работе [45] была предложена известная функция воспроизводства (пополнения R от запаса S) $R = f(S) = aS\exp(-bS)$ с двумя параметрами: параметр $a > 1$ – репродуктивный, параметр $0 < b < 1$ учитывает действие факторов конкуренции при повышении плотности. Причина немонотонности зависимости, согласно работе [45], исходит не только из-за сильной внутривидовой конкуренции между особями за лучшие места во время нереста в реках, но и гипоксии. При избыточности игры в кладках погибшая икра становится источником для развития патогенных микроорганизмов. Кривая имеет один экстремум максимум при $S = 1/b$ и горизонтальную асимптоту $\lim_{S\to\infty} f(S) = 0$. Исследования в области поиска методов определения зависимости в эффективности воспроизводства продолжаются [47, 48].

Нас интересуют свойства моделей воспроизводства как динамических систем с разными аттракторами, а не способы приближения наборов данных к функциональным кривым. Параметры обычно «неравноправны» по своему влиянию на

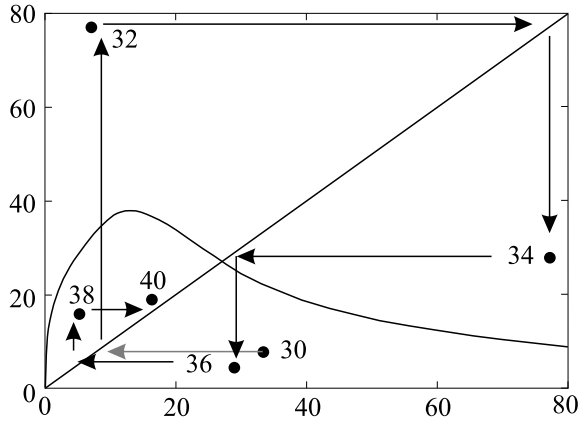


Рис. 9. Данные по динамике запаса горбуши с добавленной нами траекторией и построенная по регрессионному методу Рикера зависимость «запас–пополнение» [51].

качественные изменения фазовых портретов. В итерационной модели $R_{n+1} = aR_n e^{-bRn}$ при $0 < a < e^2$ порождаемая итерацией от R_0 начальной точки $\varphi^n(R_0 > 0)$ траектория будет иметь единственное устойчивое положение $\varphi(R^*) = R^*$ равновесия $R^* = (\ln a)/b > 0$. При увеличении a до $a = e^2 + \varepsilon$ равновесие R^* потеряет устойчивость: $|f'(R^*)| > 1$. Вокруг неустойчивой стационарной точки возникнет цикл с периодом $p = 2$. Однако к этому циклу притягиваются *почти все* точки R_0, кроме R^* и всех ее точек-прообразов $\varphi^{-n}(R^*)$. Если увеличивать a далее, то будут возникать циклы всех степеней числа 2: $p = 2^i$, $i \to \infty$. Эти изменения при бифуркациях составляют известный «универсальный» сценарий хаотизации [49]. Конечное приращение параметра a ведет к тому, что период p станет бесконечным. Потерявшие устойчивость циклические точки R_i^* не притягиваются к аттрактору. Важно отметить, что последовательности бифуркаций с $p = 2^{i+1}$ происходят идентично для всех функций с постоянным отрицательным особым соотношением старших производных – «шварцианом». Характеристика функции, рассчитанная со второй и третьей производными $f(S)$, как и две константы универсальности Фейгенбаума, не имеют экологической интерпретации [50], но определяют тип поведения итераций.

Можно обсуждать, высокий ли репродуктивный потенциал или сильно зависимая от плотности смертность ведут к хаотизации по модельному прогнозу. На самом деле математическая теория образования глобального аттрактора в виде канторовского множества на основе анализа ренормализации группы не имеет биологической интерпретации. В дискретных моделях биосистем хаотизации по М. Фейгенбауму лучше избегать, но даже не из-за появления самого режима хаоса, а из-за ряда эффектов периодических окон. Для этого достаточно нарушить критерии каскада удвоения с $p = \infty$, наиболее приемлемый вариант – специально получить для траектории $\varphi^n(R_0)$ альтернативные аттракторы. Хаотический режим возможен и без аттрактора.

Альтернативная модель нелинейной зависимости «запас–пополнение» с трехпараметрической функциональной итерацией $R_{n+1} = aR_n/(1 + R_n/K)^b$ аналогично испытывает бесконечный каскад бифуркаций удвоения периода, только хаотизация будет происходить при увеличении параметра $b > 1$, устанавливающего интенсивность воздействия компенсационной (увеличивающейся от возрастания плотности) смертности. В модели без экстремумов бифуркаций рождения циклов не возникает, есть только равновесие (возможно, тривиальное) и к нему стремится любая траектория.

Отметим, что построение кривой $f(S)$ по данным наблюдений – задача принципиально труднорешаемая. В работе [45] предлагались регрессионные методы. Однако с точки зрения динамических систем аппроксимация сгущений точек эллиптической формы любой кривой никаких прогностических возможностей не даст. В дискретной динамике циклические траектории (последовательности повторяющихся точек) не похожи на эллипсоиды из непрерывных моделей. Представим, что популяция – естественная динамическая система, которая развивается согласно некоторому математическому закону – оператору эволюции φ. Состояние, в котором в результате действия зависимости оказалась популяция, ограничено подмножеством в фазовой плоскости (поведение диссипативно). В итоге значения численности запаса стягиваются в подобласть фазового пространства – окрестность устойчивого равновесного состояния или предельного цикла конечного периода, но изображающие точки остаются в рамках ограниченного подмножества $\Upsilon \pm \varepsilon$ на фазовой плоскости $R \times S$.

Траектории дискретных динамических систем имеют притягивающие множества, которые для различных функциональных зависимостей могут быть топологически эквивалентными. Набор топологических типов аттракторов ограничен. На рис. 9 представлен пример – график на плоскости $R \times S$ с данными о численности горбуши с двухлетним жизненным циклом в одной из рек из работы [51] с построенной автором *гипотетической куполообразной* формой кривой пополнения. Мы добавили траекторию в форме диаграммы Ламерея. Очевидно, что зависимость между смежными

поколениями горбуши существует, иначе бы точки не лежали под стрелками от биссектрисы, но сложная динамика не может быть объяснима построением такой кривой. Итерация нарисованной автором работы [51] функции с одним максимумом здесь имеет просто устойчивую стационарную точку – пересечение с биссектрисой (угол наклона касательной чуть менее $\pi/4$). Критерий устойчивости для точки R^* – вычисленное значение модуля производной в этой точке – меньше единицы $|\varphi(R^*)| < 1$. При увеличении угла наклона касательной $>\pi/4$ возник бы короткий цикл, но ни одна из присутствующих на рисунке точек не попадает в ту область графика, где могли бы находиться точки такого цикла.

Согласно нашему предположению, кривая для данных на рис. 9 должна иметь и максимум, и минимум, а левая ветвь асимптотически возрастать при $f(S) < S$. Динамика горбуши часто может стать апериодической. Модель на основе $R_{n+1} = aR_n e^{-bRn}$ с $a > 40$ в хаотическом режиме предлагалась в работе [52] для описания изменений трендов флуктуаций у «четных» и «нечетных» популяций горбуши *Oncorhynchus gorbuscha* смежных годов.

Из сгущений точек на графиках нельзя восстановить форму зависимости «запаса и пополнения». Оценить форму кривой можно в специфическом случае – наблюдаемая популяция *постепенно* деградировала под действием промысла. Если промысел вывел популяцию из устойчивого режима и воздействие вылова долго преобладало над естественной зависимостью в восстановлении запаса, то тогда из-за последовательного сокращения запаса можно судить о форме кривой (либо об отсутствии явной зависимости) на графике данных мониторинга о численности молоди, применяя метод скользящего среднего. Именно у таких популяций удавалось подтвердить наличие экстремумов у зависимости на графике в координатах «запас × пополнение» [53]. Корреляционные методы не могут быть надежными в данной задаче. Замечательный пример ложной явной корреляции в трендах популяционных явлений показан в работе [54]. В проведенном исследовании [55] уже при малых размерах поголовья камчатского краба Кадьякского архипелага явной зависимости «запас × пополнение» обнаружено не было. Однако динамика позволяет иногда решать обратную задачу и предположить поведение изучаемой системы.

ФОРМАТ СОБЫТИЙ И КАДРОВ ВРЕМЕНИ В МОДЕЛИ ВОСПРОИЗВОДСТВА

Мы разрабатываем не просто еще одну модельную функцию «запас–пополнение», опишем также методику представления функциональной зависимости для сценарного анализа ситуаций с нелинейными эффектами, необходимыми нам именно для данной задачи.

В экологические модели часто необходимо вводить дополнительные условия и для начала, и для завершения действия фактора, так как ход процессов может меняться скачкообразно при выполнении ряда условий в среде. «Гибридность» сейчас стала слишком широким термином в моделировании (понимаются импульсные, автоматные и др.) [56]. Автор разрабатывал различно записываемые динамические модели, которые относятся к гибридным структурам, разным по типу организации переключений. Мы определяем выбранное построение как переопределяемую предикативно вычислительную структуру с кадрово-событийным временем и используем методы склеенных вычислений.

Важным для методики является адаптация представления модельного времени как последовательности кортежей событий и определение логики переключений. Точки в кадрированном непрерывном времени для событий, которые ведут к перестроениям в системе дифференциальных уравнений, можно определять вероятностными или логическими способами. События требуются для описания структурных качественных изменений как особые состояния в пространстве переменных с нулевой длительностью.

Жизненный цикл стандартной длины развивающегося из икринки водного организма (и рыб, и ракообразных) до полового созревания сопровождают метаморфозы. Последовательность из связанных алгоритмом непрерывных интервалов времени биологически можно обосновать из идей теории этапности развития гидробионтов, развитой научной школой В.В. Васнецова [57, 58]. Для каждого вида есть наиболее значимые метаморфозы в эколого-физиологическом развитии, которые меняют его роль в трофической цепи сообщества и выживаемость, потому зададим разбиение интервала уязвимости на стадии. Изменение доли выживаемости на 1% на стадиях в раннем онтогенезе имеет большое значение. В задачах с переключениями логично задать формат времени с непрерывной и с дискретной компонентой. Для данной задачи выберем формат, который подходит для моделирования процесса с измененным воздействием и особенно в ситуации экспертного управления промыслом.

Используем кадрирование иерархии непрерывных отрезков времени в вычислительных экспериментах с предикативно изменяемой формой воздействия. Внутри основных кадров составим порядок из пронумерованных событий t^i. Гибридное событийное время для вычислительных экспериментов формализуем в форме мультимножества из упорядоченных элементов на фиксированной длине интервала T:

$$\bigcup_n \left\{ \uparrow L_n, \left\{ \bigcup_i [t_0, t^i, t^{i+1}, T] \right\}_n, \downarrow R_n \right\},$$

где i – номер для события внутри кадров перед T, а n – текущий номер кадра в порядке сменяемых поколений. Запись времени с двумя дискретными компонентами оставляет грани $\{\uparrow \mathrm{L}, \downarrow \mathrm{R}\}$ справа и слева от основной единицы – кадра с номером n. Грани между кадрами времени, не входящие в кадр в виде точек $\{\uparrow \mathrm{L}, \downarrow \mathrm{R}\}$ нужны для выполнения перестроений в выделенных условиями пунктах системных переходов. В правой точке $\downarrow$R меняются установки величины воздействия промысла. В левой точке $\uparrow$L проводим переход к расчету развития уже следующего смежного поколения. Цель формализации времени – точно вводить элементы событийности при управлении, так как точки t^1, t^2, t^i укажем из расчетов полностью непрерывных дополнительных переменных. Не всегда время с субинтервалами плавающей длины из-за вычисляемых событий нужно форматировать в фиксированные кадры. Событийность можно вводить и без установки кадра, как в физических задачах с релейными переключениями.

Идея манипуляций со временем в том, что вычислительная модель жизни поколения формируется на основе динамически переопределяемой системы. Факторы убыли численности существенно меняются между стадиями онтогенеза и у ракообразных [59].

БАЗОВАЯ ПРЕДИКАТИВНАЯ ВЫЧИСЛИТЕЛЬНАЯ СТРУКТУРА

Представляемые в модели изменения по своему сущностному генезису бывают строго обязательными, алгоритмически предопределенными во времени, либо необязательными следствиями иных процессов. Выбор альтернативного уравнения в модели проводится только при особом соотношении рассчитываемых величин. Вторая идея метода, которую можно применять к разным популяциям, – из оценки состояния множества предикатов P_i устанавливать события, за которыми следуют изменения в процедуре расчета уравнений. Для отражающей биологическую прерывистость модели мы предлагаем вычислительную структуру с последовательными переопределяемыми формами, сохраняющими преемственность. Значение $N(t)$ в каждом кадре проходит изменение от $N(0) = \lambda S$ и до $N(T)$, где λ – средняя за пять предшествующих сезонов плодовитость. Система формализуется дифференциальным уравнением с набором возможных «сменных форм» для правой части и дополнительно с набором предикатов для смены режима расчетов – булевских функций $P(x,y)$ с множеством значений $\{0;1\}$. Предикат задан математическим отношением непрерывно изменяющихся аргументов. Предикаты по умолчанию при t_0 $P(x,y) = 1$, но обязательно должны будут при t^i принимать значение $P(x,y) = 0$ от состояния своих аргументов (либо наоборот изменять значение с 0). Аргументы $P(x,y,...)$ в нашем методе переменные из вспомогательных, но связанных с динамикой $N(t)$ уравнений, вычисляемых синхронно с уравнениями (2).

Время онтогенеза до вступления в репродуктивный возраст сменяющихся поколений зададим объединением интервалов времени с набором вычисляемых событий:

$$t \in [0, T] \equiv \bigcup_i \{[t_0, t^i, t^{i+1}, T]\}, i = 1...3.$$

Биологически интервал кадра – стандартное время жизни поколения до начала репродуктивной активности. Пронумерованные точки событий в интервале ювенального онтогенеза будут онтогенетическими «прерываниями». Сопоставим эти метаморфозы с уравнениями в правой части для убыли численности поколения от $N(0)$, которое неравномерно на трех основных стадиях раннего онтогенетического развития:

$$\frac{dN}{dt} = \begin{cases} -(\alpha_1 w(t) N(t) + \beta) N(t), & P_1(t) \\ -\alpha_2 N(t) \,/\, w(\tau) - \beta N(t), & P_2(t, w(t)) \\ -\alpha_3 w(t - \xi) N(t - \xi) - \beta, & P_3(t, w(t)). \end{cases} \quad (2)$$

Параметры $\alpha_1 < \alpha_2 < \alpha_3$ и β здесь являются коэффициентами ювенильной смертности в зависимости от численности самого поколения. В третье по порядку из уравнений (2) с α_3 включено малое запаздывание $\xi < \tau$ для учета исчерпания ресурсов ранними стадиями, где τ – длина самой ранней стадии. Для второй стадии подверженной хищничеству фактор роста $w(\tau)$ уменьшает убыль. Предикатами P_1, P_2, P_3 заданы биологически интерпретируемые моменты остановки расчетов каждой из форм правой части – условия завершения активности уравнения и получения промежуточных результатов:

$$P_1(\neg t < \tau),\ P_2(t \geq \tau,\ t \neq T,\ \neg w_t < w_k),\ P_3(t = T,\ w_t < w_k). \quad (2.1)$$

Два предиката в выражениях (2.1) мы записали с логическим отрицанием, таким образом эти события станут возможными при нарушении соотношений. Расчет уравнений (2) с учетом условий (2.1) происходит с алгоритмом цикла до тех пор, пока $P_i = 1$. Предикаты должны однозначно и все-

гда для каждого t определять события переходов в кадре времени. Избегая неоднозначности, можем воспользоваться дополнительно логическими переменными-флагами, меняющими состояние с единицы на ноль, если переход запрещен. Запись непрерывно-событийного модельного времени как мультимножества из элементов $\langle t_0,\ t^i,\ t^{i+1}\rangle$ означает, что в модели считается последовательность кадров для времени жизненного цикла отдельного поколения. Внутри каждого кадра времени с начальной позицией t_0 имеются «внутрикадровые» события, которые мы обозначили верхним индексом t^i. Использован переходный уровень развития w_k для выхода поколения из квадратично определенного уровня смертности. Набор событий можно расширить. Для каждой формы правой части в момент события рассчитываются сопряженные с предшествующими расчетами начальные условия. Для расчета динамики нового $(n + 1)$-поколения происходит реинициализация начальных условий для первого в структуре (2) уравнения:

$$N(0)_{n+1} = \lambda S_n, S_n = (N(T)_n + \sum_{m=1}^{k} \upsilon_m N(T)_{n-m}),$$

где υ_m – показатель посленерестовой выживаемости для серии предшествующих m поколений, а S – численность готового к размножению запаса со средней плодовитостью λ.

Популяционные процессы даже без влияния промысла вариативны. В сценарном применении модели важна оценка текущих значений набора P_1,P_2,P_3. Переходы в уравнениях (2) записаны двух типов: только по отсчетам отрезков единиц времени t и вызванные внутренними соотношениями у рассчитываемых показателей. Тогда смена формы в уравнениях (2) происходит после сравнения соотношений значений по условиям (2.1) у внутренних модельных переменных – по $w(t)$, но можно использовать иную видоспецифичную *динамическую* характеристику. Идея использовать сопутствующие характеристики и расчеты вспомогательных показателей позволяет разнообразно расширять базовую модель. Управление промыслом представляется по специальному алгоритму сценария в гибридной модели. Такое управляющее воздействие удобно варьировать согласно заданной логике сценария при событийности вычислительного эксперимента.

Используем часто отмечаемую у многих видов [60] взаимозависимость между темпами роста молоди гидробионтов и ее смертности, которую предлагалось использовать для моделирования еще в работе [61] с обратной зависимостью $w'(t) = l(N^{-1}(t))$. Предикативная структура набора правых частей уравнения (3) будет решаться численно во взаимосвязи со вспомогательным показателем среднего размерного развития особей поколения $w(t)$:

$$\frac{dw}{dt} = \frac{\sigma}{\sqrt[3]{(N(t)+\delta)^2}} + \chi_C, \qquad (3)$$

где δ – корректирующий показатель, σ – фиксированно отражает обилие пищевых ресурсов, но может быть и сезонной периодической зависимостью $\sigma(t)$. Затрачиваемая на рост энергия у гидробионтов в северных широтах зависит от температуры [62]. Здесь $\chi_C \in [-\varepsilon,\varepsilon]$ – поправка, связанная с температурой, она может быть положительной или отрицательной. Для оптимальных условий нереста в уравнении (3) примем $\chi_C = 0$. Таким образом, наличие доступной кормовой базы влияет на выживаемость в модели опосредованно.

Будем вычислять $R = N(T) = \varphi(N(0))$ для определения свойств фазового портрета итераций $R_{n+1} = \varphi(R_n)$. Нас интересуют границы области притяжения и особые точки.

ПЛАВНО ТРАНСФОРМИРУЕМАЯ МОДЕЛЬНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ

Необходимо отразить действие эффекта агрегированной группы [63], так как мы рассматриваем ситуации для популяций вне исторически сложившейся численности. При малой численности S велика роль неблагоприятных факторов в воспроизводстве [64, 65]. Вводить тут явный минимальный L-порог эффекта Олли, как в уравнении Базыкина [66], методически неправильно. Заранее L-порог экспертам неизвестен, и не все изменения в регуляции бывают жестко предопределенными. По экологическим критериям недостоверно изменять скачком базовые популяционные характеристики.

Мы разработали метод учета изменчивости факторов в форме точечного внедрения в предикативно переопределяемую динамическую систему особых функций как варьирующихся коэффициентов: $\Psi(n) \neq \mathrm{const}$ для итераций $\varphi^n(x_{n-1},\Psi(n))$, но только с ограниченным диапазоном их значений. Такие функции должны быть постоянны на всем кадре $[\uparrow L,\downarrow R]$ непрерывного модельного времени. Менять свое значение функции триггеры в расчетах будут при смене кадра $n := n + 1$. Ψ связана с начальным состоянием.

В уравнении убыли численности поколения разделены коэффициенты смертности: αN^2 и βN. Величина $w(t)$ при параметре α_i учитывает быстрое исчерпание необходимых для развития ресурсов по мере повышения общей биомассы личинок. Важно учитывать потери воспроизводства на стадии с t_0. Эффект потерь может сильно проявиться именно при низкой плотности $S \to \min\varphi$

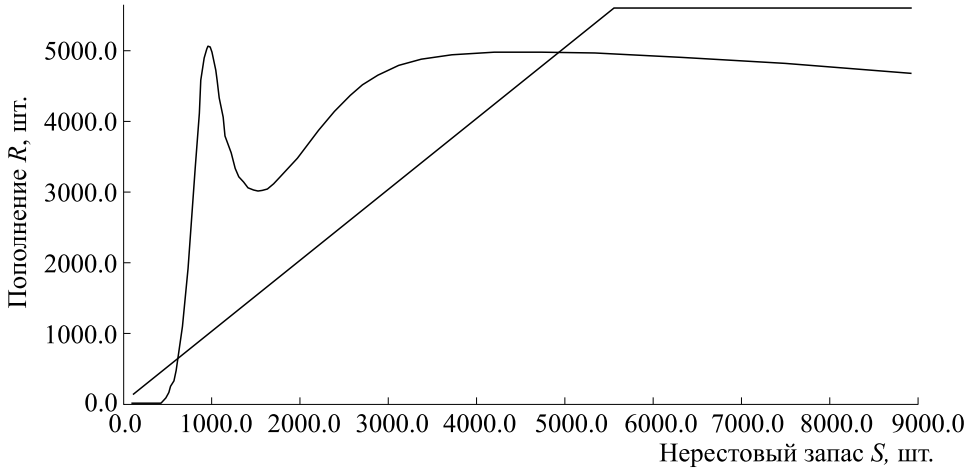


Рис. 10. График модельной зависимости с тремя экстремумами и двумя равновесиями в точках пересечения с биссектрисой координатного угла.

половозрелых особей, больше икры останется неоплодотворенной. Эффект снижения эффективности воспроизводства для малой группы реализован в модели динамическим коэффициентом с βN. Влияние его зависит от величины родительской популяции S, из которого мы рассчитывали начальные условия $N(0)$. Диапазон влияния Ψ на $f(S)$ нужно ограничивать. Область значений «функции-триггера» $E(\Psi)$ справа имеет быстро достижимый конечный предел:

$$\Psi(S) = 1 + \exp(-\zeta\sqrt[3]{S^2} + \varepsilon), \lim_{S\to\infty}\Psi(S) = 1, \Psi(0) = 2.$$

Коэффициент ζ ($\zeta < 1$) отразит уровень экспрессивности эффекта потерь от исходной икры. Далее при оптимальном запасе Ψ не определяет расчеты, что позволит реализовать выключение действия фактора гладко в уравнении (2) для первой стадии:

$$\frac{dN}{dt} = -\alpha w(t)N^2(t) - \Psi[S]\beta N(t). \quad (4)$$

В уравнении (4) мы учли плавные изменения регуляции, тогда как в гибридной системе описали пороговые изменения динамики убыли численности молоди, которые нельзя избежать. Структуру гибридной модели в вычислительной среде Rand Model Designer можно адаптировать для группы совместно живущих и конкурирующих поколений.

МЕТОД АНАЛИЗА ДИСКРЕТНЫХ ИТЕРАЦИЙ ГИБРИДНОЙ МОДЕЛИ

Получив с $N(0) \to N(T) \equiv \varphi(N(0))$ функциональную зависимость после численного решения уравнений (2) и (2.1) вместе с (3) и (4) и с $N(0) = \lambda S$ для биологически допустимых значений $N(0) \in \mathbb{N}$, можно оценить и динамические свойства итераций $\varphi(...\varphi(x_0))$ этой зависимости. Численное решение с вычислением $N(T)$ используем для расчета функциональных итераций: $R_{n+1} = \varphi(R_n) - q_nR_n$, где коэффициент $q \in [0,1)$ – установленная доля промыслового изъятия. При регулируемом промысле q устанавливается экспертами на каждый сезон n, что будет учтено в сценарном исследовании развития ситуации. Важнейшим параметром модели для изменения формы зависимости и поведения итераций оказывается плодовитость λ, но в экологической реальности это медленно изменяющаяся характеристика.

В итерациях мы получим разделение множества доступных начальных точек R_0 траекторий неустойчивой «репеллерной» точкой. Так итерации получат две области притяжения Ω_1 и Ω_2 у двух альтернативных аттракторов. Используемая как оператор эволюции φ зависимость будет обладать более чем одним максимумом (рис. 10). Для нас важно положение относительно друг друга первого от начала координат максимума $R_{\max}$ и локального минимума $R_{\min}$ ($R_{\min} > R_{\max}$), но значимо сохранение $\varphi(R_{\max}) > R_{\min}$.

Мы получим семейство актуальных для задачи нелинейных кривых с экстремумами и горизонтальной асимптотой, изменяя только воздействие Ψ и не меняя значения параметров убыли поколения в уравнении (2). Математическую основу

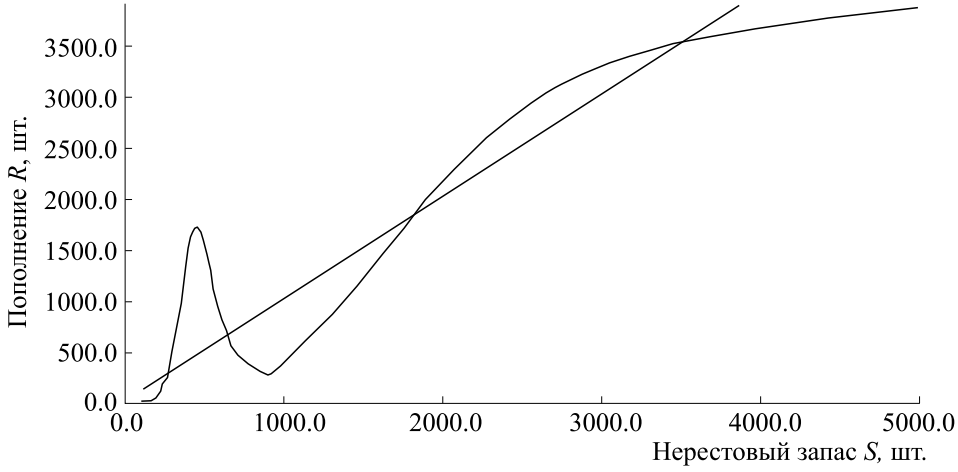


Рис. 11. Модельная зависимость с нетривиальными равновесиями $R_1^* < R_2^* < R_3^* < R_4^*$, пересечениями с биссектрисой координатного угла при $\min\varphi(S) < R_2^*$, $\max\varphi(S) > R_3^*$.

анализа их итераций составит развитая в работе [67] теория динамики отображений со значением шварциана, меняющим знак при изменении аргумента. Для итераций функции $x_{n+1} = \varphi(x)$ с тремя экстремумами не выполняются условия теоремы Д. Сингера [68], необходимые для реализации сценария перехода к глобальному хаотическому аттрактору через каскад бифуркаций удвоения периода цикла $p \to \infty$ по теории Фейгенбаума–Коллет–Трессера [69], так как при плавном изменении параметра у такой итерации $x_{n+1} = \varphi(x)$ возникнут два альтернативных устойчивых цикла четного периода ($p = 2$). Соответственно каскад не будет бесконечен и канторовское множество не образуется.

Арсенал описательных средств у динамики итераций широк, но ограничен [70]. Для итераций $R_{n+1} = \varphi(R_n)$ доступны три топологические формы аттракторов: цикл конечного периода или точка равновесия $x^* = \varphi(x^*)$, аттрактор, подобный канторовскому множеству, и интервальный аттрактор в виде конъюгации несчетного множества отрезков. Для итераций (с учетом изменяющегося внешнего возмущения) $x_n = \varphi(x_{n-1}) \pm \Theta(n)$ есть три типа бифуркаций – перестроений типа и числа аттракторов, которые бывают прямые и обратные. Аттракторы, отличные от точек равновесий, могут моментально терять свойство инвариантности $f(\Lambda) \in \Lambda$, что зависит от положения границы $\partial\Omega$ у их области притяжения Ω. Аттрактор может разбиться на части или пересечься с границей $\partial\Omega \notin \Omega$ своей области притяжения Ω: $\forall x_0 \in \Omega$, $\lim_{n\to\infty}\varphi^n(x_0) = \Lambda$ и в этом момент фиксируется ситуация кризиса. Так теория отображений пересеклась с задачей биокибернетики.

АНАЛИЗ НЕЛИНЕЙНОГО СЦЕНАРИЯ КОЛЛАПСА

Сценарное моделирование, позволяющее сравнивать и оценивать варианты ситуаций, – это актуальный подход при регулировании многовидового промысла [71]. Рассмотрим динамику коллапса в сценарном эксперименте с логикой экспертного управления промысловым изъятием. Математической основой сценария станут метаморфозы фазового портрета итераций, вызванные трансформацией экстремумов зависимости. В сценарной модели лучше рассчитывать вместо массы число особей Y_n, изымаемых из запаса S в сезон промысла n, что и составит наблюдаемую величину.

Для нашей задачи получим зависимость при решении трех склеенных по $N(0)_i$ задач Коши из уравнения (2) с непостоянным из-за уровня внешнего воздействия q числом нетривиальных стационарных ($\varphi(R_i^*) = R_i^*$) состояний, но их число должно оставаться не менее двух для каждого n. Пусть в исходной ситуации кривая $\varphi(S)$ без значимого воздействия характеризуется четырьмя возрастающими точками $0 < R_1^* < R_2^* < R_3^* < R_4^*$ – равновесными состояниями (рис. 11) (положение графика модельной зависимости относительно биссектрисы координатного угла), не совпадающими с экстремумами кривой. Зависимость с выраженным минимумом была установлена ранее для волжской севрюги [72].

Для целевого перестроения фазового портрета в сценарии нужны три неустойчивые стационарные точки при устойчивости $R = 0$ для каждого n. Первый метаморфоз получим, плавно увеличив q,

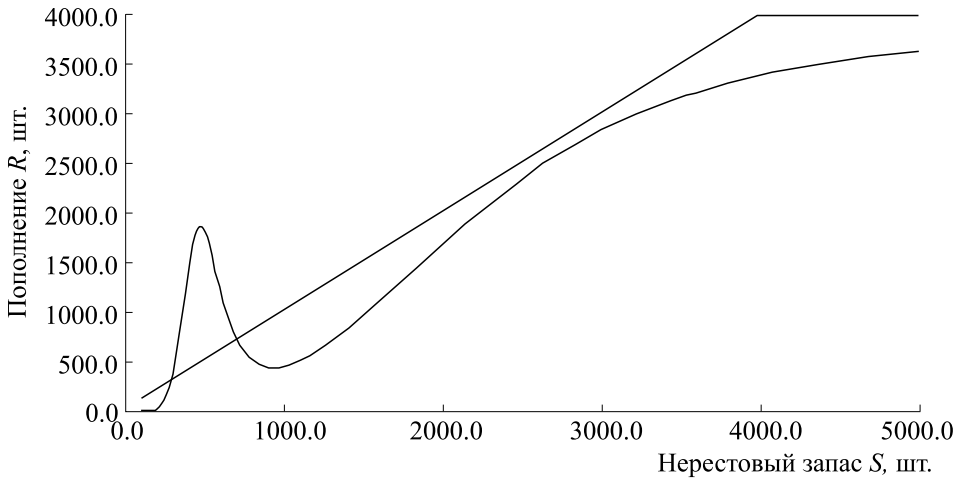


Рис. 12. Кривая модельной зависимости после обратной касательной бифуркации с двумя неустойчивыми равновесиями и $\min\varphi(S) > R_2^*$.

что вызовет обратную касательную бифуркацию – слияние устойчивого R_4^* с неустойчивым равновесием R_3^*. В результате мы наблюдаем потерю наибольшего состояния равновесия – ранее притягивающей точки траектории для области Ω_2 (рис. 12).

Структура гибридной системы уравнений позволяет масштабировать оператор эволюции φ вдоль оси абсцисс в вычислительных сценариях и изменять положения экстремумов φ соответственно воздействию внешних условий. Функция Ψ не меняет относительное положение у четвертого устойчивого равновесия R_4^*, но действует на положение $\min\varphi(S)$ относительно предкритического неустойчивого репеллера R_2^*. R_1^* выполняет роль критического репеллера и границы областей притяжения $\partial\Omega$. У проекций точек экстремумов локального максимума и минимума имеется важное свойство: максимум отображается по абсцисс правее минимума ($\varphi(R_{\max}) > R_{\min}$). Возможна трансформация экстремумов и нетривиальных равновесий у $\varphi(\lambda S)$ из $\min\varphi(S) < R_2^*$, $\max\varphi(S) > R_3^*$ в форму $\min\varphi(S) > R_2^*$, $\max\varphi(S) > R_4^* > R_3^*$. Изменения этих соотношений у зависимости $\min\varphi(S)$ резко влияют на качественное поведение траектории итераций.

Составим набор параметров вычислительного эксперимента для ситуации, когда промысловая популяция краба после нестабильного существования восстановилась до устойчивого равновесия, оптимального для своей кормовой базы. Основой для оценки станет модельный сезон из 12 модельных месяцев. Уловы краба $Y_n = R_n q_n$ без форсирования промысла плавно увеличиваются. После спонтанного роста эксперты принимают обоснованное по их логике решение о поднятии годовой квоты ($\overline{q}_n = 0.62$). Совершенно логично, что уловы краба за четыре первых сезона после увеличения доли изъятия показывают исторически рекордные для промысла значения ($Y \to \max$). После «удачных» сезонов уловы резко падают. Объемы промысловых запасов краба минуют локальный минимум у кривой воспроизводства φ, избегая попадания в ε-окрестность R_1^*-критического состояния. Эксперты видят стабилизацию, так как привыкли усреднять Y_n. В логике прогнозов экспертов в этом сценарии учтена хорошая эффективность воспроизводства за предыдущие сезоны сразу после потери равновесия и установлено прохождение локального минимума ($q = 0.35$). Уловы после первого падения достоверно начали возрастать. У экспертов согласно статистической методике нет причин для корректировки управления промыслом для дальнейшего снижения.

Величина запаса после усиления промыслового давления срывается в апериодический режим, но в ограниченной области значений. В результате время роста величины уловов Y после минимума непредсказуемо. Эксперты увидят изменения, похожие на вызванные нестабильностью условий среды колебания. Решение о минимизации доли изъятия до $q = 0.2$ в режиме колебаний отвергается. При установленном $q > 0.33$ после прохождения траекторией окрестности R_1^* в вычислительном сценарии реализуется популяционный коллапс (рис. 13). Промысел прекращается, хотя

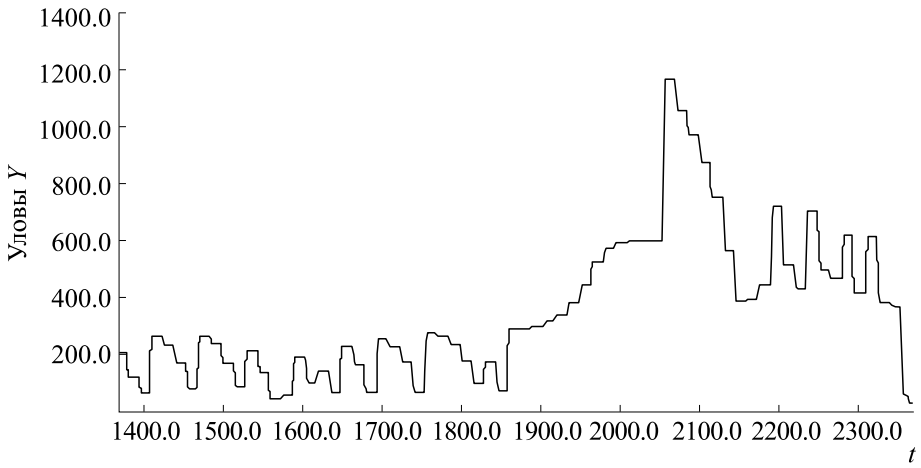


Рис. 13. Вычислительный сценарий динамики уловов с эффектом коллапса запасов.

квота вылова на сезон была выделена, как это произошло с треской в 1992 г.

Заключительное падение уловов и получило название «коллапса», тогда как на первое сокращение уловов краба мало обращали внимание как на временное, хотя в абсолютном выражении первое падение уловов было больше. При первом кризисе уловы краба резко сократились, что не повлекло сезонный полный мораторий на промысел. Промысел был продолжен при нестабильных флуктуациях с неизменным промысловым давлением и умеренно благоприятном прогнозе. По принципам нелинейной динамики такое поведение расценивается как признак наличия критических точек, но методы статистики не могут установить точки для запаса, где функция, связывающая запас и пополнение, изменяется практически вертикально.

Моделирование показало, что путь к финальному кризису состоит из переходных режимов. В вычислительном эксперименте сценарий коллапса промысловых запасов камчатского краба развивается из двух фаз, их продолжительность зависит от повышения Δq при интенсификации морского промысла. Если не был введен своевременный мораторий, то вторая фаза деградации неминуемо произойдет через одиннадцать модельных сезонов в формате времени вычислительной среды с переходом через порог R_1^* критического неустойчивого равновесия. В модели воспроизводство популяции после фазы деградации $R_1^* > \min\varphi(\lambda S)$ не восполняет естественную убыль родительских поколений, поэтому необходима интродукция взрослых крабов из других мест.

ФАЗОВЫЕ ПОРТРЕТЫ СЦЕНАРИЯ КОЛЛАПСА С ОСЦИЛЛЯЦИЯМИ

Для функциональных итераций известны три нелинейных явления, называемые «кризисами» [73]. Помимо кризиса столкновения с границей (basin-boundary crisis) выделены внутренний кризис и кризис слияния (merging crisis), специфичный для сценария удвоения периода циклов ($p = 2^i$, $i \to \infty$) [74]. Кризисы не обусловлены трансформациями топологических типов самих аттракторов и бифуркациями, но связаны с перестроениями положения аттрактора относительно соседних с ним неустойчивых инвариантных множеств, отдельной точки или фрактального множества.

Используемый метаморфоз фазового портрета в сценарии – граничный кризис интервального аттрактора Λ, который остается после слияния устойчивого и неустойчивого равновесий. В порядке списка теоремы Гукенхаймера [75] этот топологический тип замкнутых ω-предельных множеств итераций – № 3 из трех возможных типов аттракторов. Эффект кризиса происходит при соприкосновении Λ с границей его области притяжения. Изначально окрестность локального максимума, где значение $\max\varphi$ немного превосходит значение φ в точке третьего репеллера, – $\varphi(\max\varphi(N(0)) \pm \varepsilon) > R_3^*$. Когда происходит касательная бифуркация, то неустойчивая и устойчивая точки R_3^* и R_4^* сливаются в одну критическую точку R_C^* ($\varphi(R_C^*) = 1$), которая исчезает. Так мы моделируем первое падение улова краба. Устойчивость точки итерации $\varphi(R^*) = R^*$ можно оценить по положению касательной из известного свойства $|\varphi'(R^*)| < 1$. Обозначим совокупное

множество точек-прообразов у второго репеллера R_2^* как $\{\varphi^{-n}(R_2^*)\}$, а обратную итерацию функции φ в правый прообраз точки R_2^* – как $\varphi^{-1}(R_2^*) = R_2^{-1*r}$. Эти прообразы исключены из области притяжения, они никогда не притягиваются к аттракторам. Если для R_2^* есть прямые прообразы и справа, и слева от точки, это сделает несвязной Ω_2-область притяжения R_4^*. Репеллер R_2^* существует во всех модельных сценариях и имеет прообразы и справа, и слева для каждого n. Точки R_3^* и R_4^* возникают/исчезают после прямой/обратной касательной бифуркации. Равновесие R_1^* у φ существует для каждого n, но наличие прообраза у репеллера R_1^* зависит от значений Ψ, увеличивающихся по мере приближения $R_{n+1}^* \to R_1^*$. Когда начальное положение R_0 точки траектории оказывается $R_1^* < R_0 < R_2^* < R_3^*$ и соответствует подмножеству из интервала $R_0 \in (R_1^*, R_3^*) \cap \{\varphi^{-n}(R_2^*)\}$, то через режим псевдостохастических флуктуаций популяция в сценарии достигнет уровня высокой устойчивой численности за конечное число шагов: $\varphi^{\vartheta}(R_0) = R_4^*$, $\vartheta < \infty$. Потому сценарий восстановления численности при своевременном моратории с $q = 0$ в модели реален: $0 < R_0 < R_2^*$, $\lim_{n\to u}\varphi^n(R_0) = R_4^*$, а граничный кризис возможен и при соприкосновении с R_3^*.

В настоящее время принято считать, что для конечномерных гладких динамических систем мы можем наблюдать три принципиально различных формы хаоса [76]. Характеристики нерегулярных колебаний точек, порождаемых нашей $\varphi^n(R_0)$ – следствие формы кривой с тремя экстремумами и свойство нестабильности получаемых при расчетах промежуточных результатов при разном положении начальной точки траектории R_0. Это связано с изрешеченной «riddling»-областью I в фазовом пространстве. Явление изрешечивания возникает, когда образуются вложенные инвариантные множества [77]. Отрезок I включает рассеянное континуальное множество субинтервалов из областей притяжения Ω_1, Ω_2 двух аттракторов. Границы всех субинтервалов не принадлежат к этим областям притяжения и формируют отдельное множество, «странный репеллер» – инвариантное замкнутое множество, в любой ε-окрестности которого есть точки, принадлежащие области Ω_1, Ω_2. Границы «изрешеченной» области I определят отображения точек $R_{\min} > R_{\max}$, так что $I = [\varphi(R_{\min}), \varphi(R_{\max})]$ для двух экстремумов модельной зависимости, но не фиксированный интервал $[R_1^*, R_3^*]$, так как само существование R_3^* зависит от q_n. Начальные точки $R_0 \in [\varphi(R_{\min}), \varphi(R_{\max})]$, которые могут притягиваться к аттрактору, всюду соседствуют с никогда не притягивающимися к R_4^*. Из интервала I исключены объединения множеств тех точек R_0, которые под действием итераций φ отображаются в неустойчивые репеллерные положения равновесия. Когда неустойчивые стационарные точки на графике у зависимости эффективности пополнения φ имеют более одного прямого прообраза, такой точки R_2^{-1*}, которая при первой итерации отобразится в репеллер $\varphi(R_2^{-1*}) = R_2^*$, то из-за изрешеченности I возникает наблюдаемый в вычислительных сценариях апериодический режим и неопределенность поведения траектории.

Интервал I между отображениями экстремумов функции φ будет включать внутри себя и интервальный аттрактор $\Lambda \subset [\varphi(R_{\min}), \varphi(R_{\max})]$. I содержит в себе именно аттрактор интервального типа $\Lambda \subset I$, где Λ – замкнутое инвариантное подмножество I, но Λ несвязно, так как любая ε-окрестность точки $\forall R_0 \in \Lambda$ содержит непритягивающиеся точки из инвариантного и континуального множества Υ, минимально состоящего из всех прообразов R_2^* и имеющего и правый, и левый прямые прообразы: $\{\varphi^{-n}(R_2^{-1*r}), \varphi^{-n}(R_2^{-1*l})\}$. Подмножество странного репеллера составит все объединение рассеянных в I точек R_0 без притяжения:

$$\Upsilon = \bigcup_{n}^{\infty} \varphi^{-n}(R_2^*), \varphi^{-n}(R_1^*), \varphi^{-n}(R_3^*).$$

Траектории начальной точки $\{\varphi^n(R_0)\}$, $R_0 \notin \{\varphi^{-n}(R_2^*)\}$ обладают возможностью попадания в ε-окрестность хаотического репеллера Υ, состоящего из множества всех непритягивающихся точек и возникающего при изменении положения экстремумов зависимости $\varphi(R)$. Далее при выполнении условий $\exists R_0$, $R_0 \in I$, $R_0 \notin \Upsilon$ и $\varphi(R_0) < R_1^*$ уже интервалы в Λ не будут более замкнутым и инвариантным подмножеством, где выполняется условие $\varphi(\Lambda) \in \Lambda$. В I хаотическое движение в конечном числе итераций φ^k, $0 < k < \infty$ наблюдаем с окончанием режима хаотизации $\lim_{n\to d}\varphi^n(R_0) = 0$, $k < d < \infty$. Длительность апериодических режимов несколько варьирует из-за чувствительности к возмущениям $R_0 \pm \varepsilon$ у точки, которую мы выберем как начальную в вычислительном экспе-

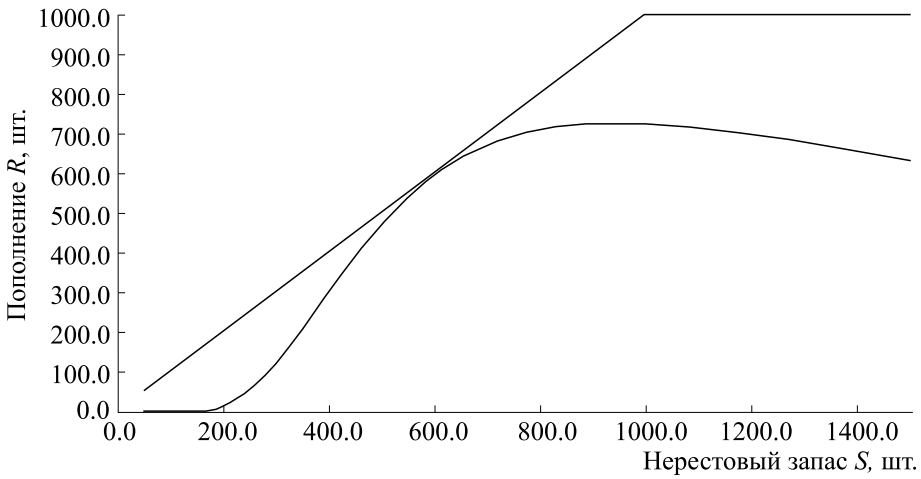


Рис. 14. Трансформация унимодальной модельной зависимости после одной касательной бифуркации.

рименте. Свойство хаотизации, ограниченной и во времени, и в области I значений $\varphi(R)$, отражает естественную неопределенность для морского объекта промысла.

Мы отметили, что другие сценарии коллапса могут развиваться и без флуктуаций. Для таких ситуаций в модели можно получить менее сложную зависимость, изначально имеющую пару стационарных точек. Устойчивая и неустойчивая точка начинают сливаться в критическое равновесие, как на рис. 14. В этот момент траектория стабилизируется, но вплоть до исчезновения единственной стационарной точки R_C^*.

Данный вариант коллапса математически описывается проще, без сложных переходных режимов, и требует одного метаморфоза фазового портрета. При состоянии зависимости $\forall 0 < R$, $R \neq R_C^* \varphi(R) < R$ непредсказуемое заранее малое внешнее давление и увеличение естественной смертности способно приводить популяцию к коллапсу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотрен вариант промысловой деградации запасов после нахождения популяции в состоянии нестабильных осцилляций. Разработана методика математической формализации нетривиально изменяющейся эффективности воспроизводства в традиционной форме зависимости: запаса и получаемого пополнения. Представлен вычислительный сценарий с реализацией двух метаморфозов в фазовом портрете у итерационной динамической системы для учета выявленных особенностей процесса промысловой деградации запасов краба. Сценарий коллапса в модели подтвердил, что идеи организации оптимальной, наиболее выгодной стратегии эксплуатации биоресурсов в реальности опасны. Оптимальное для промысла состояние близко к критическому порогу, где воспроизводство перестает с большой вероятностью восполнять запас. Хаотизация в новой гибридной модели удачно имитирует стохастическое возмущение условий среды размножения.

Канадский тресковый кризис рассматривался досконально, но ключевую его причину так и не установили. Коллапс камчатского краба, как и трески у берегов Лабрадора, спровоцирован искаженными представлениями о благополучном состоянии данных биоресурсов и, главное, – завышением оценки эффективности восполнения запасов. Реальная зависимость при интенсификации промысла лежала ближе к биссектрисе $R=S$, чем предполагалось экспертами. Причина ошибки завышения в том, что у немонотонной зависимости сдвигаются экстремумы по мере истощения численности запаса в интервале значений $S \in [\varphi(R_{\min}), \varphi(R_{\max})]$. При интенсивном вылове происходит смещение значения $\varphi(R)$ у экстремума $R_{\min}$ по оси ординат вниз таким образом, что $\varphi(R_{\min}) < R_1^*$. Далее реализуется граничный кризис для аттрактора Λ, составленного из множества интервалов: $\exists y \in \Lambda, \varphi(y) \notin \Lambda$. После кризиса появляются точки траектории $\exists x_{0i} \in \Lambda$, $\lim_{n\to\infty}\varphi^n(x_{0i}) = 0$. Точка R_1^* – неустойчивое равновесие для популяции при критической численности; если $\varphi(R_{n+1}) < R_1^* - \varepsilon$, то реализуется необратимая деградация запаса за конечное k число итераций $\varphi^k(R_n) = 0$. Итоговый коллапс отражен

в простой форме $R_0 \notin \Upsilon$, $\varphi^k(R_n) \to 0$, $k < \infty$. В диапазоне $S \in (R_2^*, R_2^*)$ эффективность воспроизводства согласно нашей модели еще достаточно высока за счет локального максимума. Это вносит обманчивые ожидания продолжения тренда восстановления воспроизводства. Показано, что при небольшой дальнейшей убыли запаса эффективность воспроизводства в сценарии непропорционально резко сокращается вплоть до достижения окрестности критического порога восполнения запасов.

Достаточно небольшой систематической ошибки в оценках запаса в диапазоне $S \in (R_2^*, R_2^*)$ для обрушения промысла, так как реальная доля изъятия будет выше той, которая планировалась, более того, расхождение будет нарастать со временем. После первого падения численности для популяции наблюдается резкий переход в состояние сильных нерегулярных флуктуаций с выраженными локальными пиками, но это пока обратимое состояние. Популяция сможет восстановиться, если немедленно принять неочевидное управленческое решение и уменьшить изъятие в два раза.

Рациональной тактикой при регуляции вылова мы полагаем ограничение технических возможностей для промысла (размеры орудий лова, запас горючего на судах, тоннаж судов), но не лимит объема добычи, – жесткие квоты не спасают. Парадоксально, но пришло время придумать, как временно снижать эффективность орудий лова на сложные объекты промысла. Регистрация сокращения уловов в 20% для нециклических популяций крупных доминирующих хищников является основанием для введения сезонного моратория на вылов. У промысла не должно быть мотивации занижать реальные уловы в отчетности. Для точного выбора допустимого уровня эксплуатации необходимы данные мониторинга о выживаемости молоди, какие, в частности, были получены при наблюдениях за нерестом волжской севрюги [78, 79], но оценены уже после деградации.

Оригинальность метода гибридного моделирования с включением событийных изменений состоит в анализе путей развития сложившихся ситуаций. Явление коллапса в сценарии развивается по внутренней логике традиционного для многих стран способа экспертного управления рыболовством при выдаче сезонных квот [80] на основе оценок с использованием статистических сглаживаний и аппроксимации численности распределенной популяции гидробионтов на большую акваторию [81]. Разработанную вычислительную структуру перспективно использовать как блок расчетов воспроизводства в составе современных многовидовых моделей биосистем [82]. Проблема применения агрегированных полимодельных комплексов для прогнозирования и оптимизации промысла – сложная параметризация и интерпретация результатов, когда малое возмущение одного из множества бифуркационных параметров качественно изменит поведение итогового решения, тогда как изменение величин других коэффициентов не вызовет существенной ответной реакции. В структуру можно включать стохастическую компоненту для отдельных ситуаций [83].

Примеры кризисов и стремительных вспышек у разных популяций требуют расширения представления динамических моделей для задач экологии. Сходство ситуаций подтверждает нашу гипотезу о существовании конечного набора форм сценариев для развития экстремальных изменений в экодинамике. Тогда известные нам формы меняющихся процессов (вспышек, кризисов, образования и разрушения нерегулярных колебаний с большой амплитудой) мы сможем классифицировать (независимо от их природы), сопоставив им в качестве набора инструментов для описания сценариев известные типы метаморфозов (бифуркаций аттракторов или перестроений границ их областей притяжения) фазовых портретов у дискретных либо непрерывных динамических систем. Общность нелинейности и типизацию сценариев создает функционал регуляции. Понятие динамического коллапса было применено в работе [84] уже не только к отдельным популяциям, но и к целым биоценозам.

Пристальное внимание в задачах прогнозирования процессов с нелинейной регуляцией необходимо уделять математическому описанию пороговых состояний и быстрых трансформаций [85], что актуально сейчас, например, для возрастных изменений в эффективности функционирования адаптивной иммунной системы, отмеченных в работе [86]. В работе [87] для выбора оптимальной антигенной мишени и прогнозирования дальнейшей эволюции штаммов SARS-CoV-2 генерировали синтетические «полимутантные» псевдотипы S-белка и в частности показали, что способность к нейтрализации антител, выработанных ранее у пациентов при заражении исходным вариантом вируса, уменьшается при накоплении мутаций S-белка резко и пороговым образом.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А. Ю. Переварюха, Биофизика **66** (6), 1144 (2021).
2. А. Ю. Переварюха, Биофизика **65** (1), 138 (2020).
3. L. Loyal, J. Braun, L. Henze, et al., Science **374** (6564), eabh1823 (2021). DOI: 10.1126/science.abh1823
4. L. R. Clark, Austral. J. Zool. **12** (3), 362 (1964).
5. R. ud Dina, A. R. Seadawyb, and K. Shah, Results in Physics **19** (12), 103468 (2020).
6. A. M. Syed, T. Y. Taha, T. Tabata, et al., Science **374** (6575), 1626 (2021). DOI: 10.1126/science.abl6184
7. Ю. Д. Нечипуренко, А. А. Анашкина и О. В. Матвеева, Биофизика **65** (4), 824 (2020).
8. Т. А. Зайчук, Ю. Д. Нечипуренко, А. А. Аджубей и С. Б. Оникиенко, Молекуляр. биология **54** (6), 922 (2020).
9. T. Maemura, M. Kuroda, T. Armbrust, et al., mBio **12** (5), e01987-21 (2021). DOI: 10.1128/mBio.01987-21.
10. А. Ф. Ванин, А. В. Пекшев, А. Б. Вагапов и др., Биофизика **66** (1), 183 (2021).
11. А. Ф. Ванин, Биофизика **65** (4), 818 (2020).
12. A. R. Kathryn, R. K. Bewley, and S. A. Fotheringham, Nat. Commun. **12** (1), 81 (2021).
13. А. Ю. Переварюха, Биофизика **66** (2), 384 (2021).
14. W. van Damme, R. Dahake, and R. van de Pas, Med. Hypotheses **146** (1), 110 (2021).
15. Т. И. Корнилова, Рыбоводство и рыбное хозяйство, № 8, 34 (2011).
16. Н. И. Реус и С. В. Петрова, Арктика: общество и экономика **8**, 115 (2012).
17. Приказ Федерального агентства по рыболовству от 19 декабря 2006 г. № 443, https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/2067316/
18. Г. И. Гутенева, С. С. Фомин и Т. Н. Дедикова, Рыбное хозяйство **3**, 103 (2015).
19. Г. П. Рубан, Р. П. Ходоревская и В. Н. Кошелев, Астраханский вестн. экологич. образования, № 1, 42 (2015).
20. Т. Ю. Борисова, дисс. ... канд. биол. наук (Астрахань, АГТУ, 2010).
21. Т. Н. Соловьева, Информационно-управляющие системы **6**, 58 (2017).
22. Т. Н. Соловьева, Информационно-управляющие системы **4**, 60 (2016).
23. П. В. Вещев и Г. И. Гутенева, Экология, № 2, 123 (2012).
24. А. Ю. Переварюха, Экологические системы и приборы, № 8, 41 (2008).
25. А. Ю. Переварюха, Нелинейный мир **10** (4), 255 (2012).
26. Ю. В. Тютюнов, И. Н. Сенина, Л. И. Титова и Л. В. Дашкевич, Биофизика **65** (2), 390 (2020).
27. А. В. Никитина, А. И. Сухинов, Г. А. Угольницкий и А. Б. Усов, Математич. моделирование **28** (7), 96 (2016).
28. K. Aagaard and J. L. Lockwood, Biol. Invasions **18**, 1667 (2016).
29. A. S. MacDougall, K. S. McCann, and G. Gellner, Nature **494**, 86 (2013).
30. K. Kleisner and D. Pauly, in *The state of biodiversity and fisheries in Regional Seas. Fisheries Centre Research Reports*, Ed. by V. Christensen, S. Lai, and M. Palomares (University of British Columbia, Vancouver, 2011), pp. 37–40.
31. A. May, Newfoundland Quarterly **102** (2), 41 (2009).
32. J. Roughgarden and F. Smith, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**, 5078 (1996).
33. R. A. Myers, Ecol. Applications **7**, 91 (1997).
34. A. Hutchings and R. A. Myers, Canad. J. Fish. Aquatic Sci. **51**, 2126 (1994).
35. *Report of the Standing Committee on Fisheries and Oceans*, www.ourcommons.ca/Content/Committee/421/FOPO/Reports/RP8826804/foporp10/foporp10-e.pdf
36. М. Г. Карпинский, Экология бентоса Среднего и Южного Каспия (Изд-во ВНИРО, М., 2002).
37. А. Ю. Переварюха, Журн. общ. биологии **81** (3), 174 (2020).
38. S. Rowe and G. A. Rose, Nature **556**, 436 (2018).
39. А. Е. Бобырев, В. А. Бурменский, Е. А. Криксунов и др., Биофизика **57** (1), 140 (2012).
40. А. Е. Бобырев, В. А. Бурменский, Е. А. Криксунов и др., Биофизика **48** (2), 324 (2013).
41. В. А. Дубровская, Проблемы механики и управления: Нелинейные динамические системы **48**, 74 (2016).
42. Ю. И. Зуенко, Известия ТИНРО **166**, 103 (2011).
43. B. Dew and R. McConnaughey, Ecol. Applications **15** 919 (2005).

44. J. Hoyle, in *Proc. of the Workshop on the Dynamics of Lake Whitefish (Coregonus clupeaformis) in the Great Lakes* (2005), pp. 47–61.

45. W. E. Ricker, J. Fish. Res. Board of Canada **11**, 559 (1954).

46. R. J. H. Beverton and S. J. Holt, Great Britain Fish Investigation Ser **19**, 1 (1957).

47. А. И. Михайлов, А. Е. Бобырев, Т. И. Булгакова и А. Д. Шереметьев, Журн. общ. биологии **80** (6), 418 (2019).

48. В. В. Михайлов и Ю. С. Решетников, Информационно-управляющие системы, № 4, 31 (2018).

49. W. De Melo and S. van Strien, Bull. Amer. Math. Soc. **18** (2), 159 (1988).

50. Т. Ю. Борисова и И. В. Соловьева, Математические машины и системы, № 1, 71 (2017).

51. W. E. Ricker, Bull. Fish. Res. Board of Canada **1**, 191 (1975).

52. Л. А. Животовский, В. В. Храмцов и М. К. Глубоковский, Вопр. ихтиологии **36** (3), 369 (1996).

53. D. K. Kimura, ICES J. Marine Sci. **44** (3), 253 (1988).

54. T. Höfer and H. Przyrembel, Paediatric and Perinatal Epidemiology **18** (1), 88 (2004).

55. W. R. Bechtol and G. Kruse, Marine and Coastal Fisheries Dynamics Management and Ecosystem Science **1** (1), 29 (2009).

56. В. В. Михайлов, Нелинейный мир **16** (4), 45 (2018).

57. Е. Ф. Еремеева, в кн. *Теоретические основы рыбоводства* (Наука, М., 1965), сс. 129–138.

58. В. В. Васнецов, в кн. *Очерки по общим вопросам ихтиологии* (Изд-во АН СССР, 1953), сс. 207–217.

59. Р. Р. Борисов, Биология моря **33** (4), 267 (2007).

60. М. В. Чурова, О. В. Мещерякова, Н. Н. Немова и М. И. Шатуновский, Изв. РАН. Сер. биол. **3**, 289 (2010).

61. E. A. Kriksunov, J. Ichthyol. **35** (7), 10 (1995).

62. Л. И. Карамушко, Успехи соврем. биологии **128** (2), 180 (2008).

63. Ю. В. Тютюнов, Л. И. Титова и С. В. Бердников, Биофизика **58** (2), 349 (2013).

64. Г. С. Розенберг, Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии **29** (3), 77 (2020).

65. А. Ю. Переварюха, Владикавказский математич. журн. **21** (1) 51 (2019).

66. А. Д. Базыкин и Ф. С. Березовская, Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем **2**, 161 (1979).

67. А. Н. Шарковский, Докл. АН СССР **160**, 1036 (1965).

68. D. Singer, SIAM J. Applied Math. **35**, 260 (1978).

69. P. Coullet and C. Tresser, J. Physique Colloques **539**, 5 (1978).

70. A. Y. Perevaryukha, Biophysics **61** (2), 334 (2016).

71. Т. И. Булгакова, Рыбное хозяйство, № 5, 70 (2009).

72. В. А. Дубровская, А. Ю. Переварюха и И. В. Трофимова, Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология, № 3, 76 (2017).

73. C. Grebogi, E. Ott, and J. A. Yorke, Physica D: Nonlinear Phenomena **7** (3), 181 (1983).

74. B. Reisner, A. Kittel, S. Lück, et al., Zeitschrift für Naturforschung **50** (12), 1105 (1995).

75. J. Guckenheimer, Comm. Mathem. Physics **70**, 133 (1979).

76. А. С. Гонченко, С. В. Гонченко, А. О. Казаков и А. Д. Козлов, Изв. вузов. Прикладная нелинейная динамика **25** (2), 4 (2017).

77. П. В. Купцов и С. П. Кузнецов, Нелинейная динамика **2** (3), 307 (2006).

78. П. В. Вещев, Г. И. Гутенева и Р. С. Муханова, Рыбное хозяйство, № 6, 45 (2010).

79. П. В. Вещев, Вопросы ихтиологии **49** (5), 681 (2009).

80. А. И. Абакумов, Л. Н. Бочаров и Т. М. Решетняк, Вопр. рыболовства **10** (2), 352 (2009).

81. И. Н. Лепилина и Т. И. Булгакова, Труды ВНИРО **177**, 58 (2019).

82. А. Е. Бобырев, Е. А. Криксунов и Т. И. Куга, Вопросы ихтиологии **45** (6), 820 (2005).

83. А. С. Маслаков, Т. К. Антал, Г. Ю. Ризниченко и А. Б. Рубин, Биофизика **61** (3), 464 (2016).

84. T. J. Murchie, A. J. Monteath, M. E. Mahony, et al., Nature Commun. **12**, 7120 (2021). DOI: 10.1038/s41467-021-27439-6

85. В. А. Дубровская, Проблемы механики и управления: Нелинейные динамические системы **49**, 8 (2017).

86. J. M. Murray, G. R. Kaufmann, and P. D. Hodgkin, Immunology & Cell Biology **81** (6), 487 (2003). DOI: 10.1046/j.1440-1711.2003.01191.x.

87. F. Schmidt, Y. Weisblum, M. Rutkowska, et al., Nature **600**, 512 (2021). DOI: 10.1038/s41586-021-04005-0

Simulation of Scenarios of the Deep Population Crisis of the Rapidly Growing Population

A.Yu. Perevaryukha

St. Petersburg Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, 14-ya Linia 39, St. Petersburg, 199178 Russia

The paper addresses the use of simulation modeling to develop crisis and threshold levels for managing population growth during the formation of a new population in competitive environment. In the process of species distribution across an area, biotic factors can cause a deep population crisis for a new species before initial declines in abundance are detected. Many populations including the human beings went through a bottleneck effect in the period of the Neolithic population crash. Invasive species with high reproductive activity often have severe impacts on biosystems. The occurrence of effective competition can cause not only classical cyclic fluctuations, but also the complete extinction of the population after time series displaying abundance fluctuations with high peak numbers. Examples for situations of an induced population crisis can be two alternative scenarios: the first scenario on Gause's experiments with the introduction of predatory ciliates and the extinctions of ciliate species, the second scenario on experiments with the introduction of bacteriophages into colonies of actively dividing bacteria that possess a dynamically adaptive antiviral mechanism. We have proposed modifications of the model for currently topical scenarios of crisis effects in population dynamics. The equations with time caused by deviating arguments were written taking into account a threshold level for activating the effects of biotic factors on reproduction of invasive species and an aggregated nature of the lagging regulation with two time factors. The computational scenarios described both the effect of the completion of the process after repeated outbreak and successful passage of the population crisis due to rapid adaptation. The phenomena of a deep crisis are typical of local population dynamics in case when species interact with viruses that are new to them.

Keywords: invasion scenarios, modeling of extreme population dynamics, biotic resistance, lagged threshold regulation, species extinction, Neolithic crash, biological pest control, immune response, CRISPR-Cas9

EDN: PWHTWU
БИОФИЗИКА, 2022, том 67, № 2, с. 409–416

ДИСКУССИИ

УДК 577.38 + 577.359

К БИОФИЗИКЕ ЭВОЛЮЦИИ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫХ СИСТЕМ

© 2022 г. А.Л. Еремин*, **, *

**Кубанский государственный университет, 350040, Краснодар, ул. Ставропольская, 149*
***Кубанский медицинский институт, 350015, Краснодар, ул. Буденного, 198*
****Научно-исследовательский институт гигиены и экологии, 350040, Краснодар, ул. Таманская, 180*
E-mail: aeremin@yandex.ru

Поступила в редакцию 08.11.2021 г.
После доработки 09.11.2021 г.
Принята к публикации 12.11.2021 г.

Прошло 150 лет с первой публикации, посвященной ноогенезу – эволюции интеллекта. Но только в XXI веке благодаря результатам фундаментальных исследований в физике, биологии, медицине и междисциплинарных сферах стало возможным определение количественных измерений некоторых параметров, способствующих в естественных науках пониманию эволюции интеллектуальных систем. Анализ параметров интеллектуальных систем, закономерностей появления и эволюции, отличительных черт, констант и лимитов их структур и функций, продемонстрировал: измеряемость и сравнительный анализ развертки скорости коммуникаций (~100 м/с – 300 млн м/с); квантификация количества компонентов интеллектуальных систем (10–100 млрд); подсчет связей, обеспечивающих кооперацию (от 150 до 1 трлн связей). Синтез моделей может иметь прогностическую ценность при изучении феномена происхождения и эволюции: мозга, как популяции нейронов в ходе биологической эволюции *Homo sapiens* с появлением мышления; мозга каждого человека при индивидуальном анатомо-физиологическом развитии с появлением творчества, мысли, сознания, идеи, инсайта, интуиции, эврики; «ноо» в гипотезе морфофункциональной эволюции популяции человечества.

Ключевые слова: биофизика развития и эволюции, нейроинформатика, психофизика, нейрофизика, параметры интеллектуальных систем, ноогенез

DOI: 10.31857/S0006302922020235

В 1871 г. доктором медицины Х. Доэрти в главе «Ноогенез» книги «Органическая философия» впервые упоминается понятие «ноогенез» [1]: «Рост разума в человеческой расе идет в ногу с постепенной эволюцией наук, и его легко проследить в истории, в то время как происхождение умственных способностей и их постепенное развитие в индивидуальном разуме – болезненный вопрос психологии... Мы не можем проследить формирование экспериментального разума в утробе матери, как мы можем проследить формирование тела... Эмпирические способности ума более или менее проявляются во всех науках, как органы тела во всех физических проявлениях; но, как и эти органы, они должны быть сформированы в утробе матери, прежде чем они смогут развиваться во взрослой жизни. Институциональные призвания ограничиваются опытом и работой на поверхности земного шара, в то время как разум исследует все локации природы вселенной, ограниченной только бесконечностью... Каков фиксированный цикл социогенетической эволюции коллективного организма человечества по сравнению с циклом индивидуального эмбриогенеза?..».

150 лет назад появление понятия «ноогенез» произошло одновременно с «абиогенезом» - естественным процессом возникновения жизни из неживой материи [2]. Однако если в XX веке система знаний по абиогенезу бурно развивалась с выдвижением гипотез, постановкой экспериментов, обоснованием теорий, многочисленными изданиями, то по ноогенезу, согласно публикациям, наблюдались длительные паузы с возвращением к активным исследованиям примерно через 70 лет.

Так, в 1955 г. антропологом П.Т. де Шарденом в книге «Феномен человека» ноогенез упомянут в нескольких местах [3], но не было дано его точной формулировки, и в ряде последующих тезаурусов интерпретации понятия велись вокруг «появление и эволюция разума». Следует отметить, что эмерджентность разума является одним из пяти главных феноменов в эволюционном появлении принципиально новых форм: (1) происхождение жизни; (2) появление простейших, не-

сущих ядро; (3) происхождение форм, размножающихся половым путем; (4) возникновение животных с нервной системой; (5) появление мыслящих животных, а именно людей.

Только в 2005 г. было предложено современное понятие: «Ноогенез – процесс развертки в пространстве и развития во времени интеллектуальных систем. Ноогенез представляет собой совокупность закономерных, взаимосвязанных, характеризующихся определенной временной последовательностью структурных и функциональных преобразований всей иерархии и совокупности взаимодействующих между собой относительно элементарных структур и процессов», – такая формулировка появилась в монографии, посвященной ноогенезу [4]. В данном исследовании была предложена концепция «интеллектуальных систем», «информационной логистики», «интеллектуальной энергии», ускорения, силы, потенциала, объединенных в «теорию интеллекта». Благодаря этому «... понятие «ноогенеза» активно введено в научный обиход, как понятие об эволюции интеллектуальных систем» [5], выделены биофизические параметры интеллектуальной энергетики – объем информации, количество ускорения (частота, скорость) и расстояние ее передачи [6], «... предложена аналогия между человеческим мозгом, состоящем из большого числа параллельно работающих нейронов, и человеческим сообществом, состоящем из людей» [7]. Между тем на момент публикации оценки количеств нейронов в головном мозге различались на три порядка – от 10^9 до 10^{12}. Только к 2020-м годам более точная квантификация по ряду параметров позволила перейти к построению и изучению моделей процессов развертки структуры и функций реально существующих интеллектуальных систем с целью получения объяснений этих феноменов, возможных прогнозов для естественного интеллекта и бионики для искусственного интеллекта.

Была поставлена цель исследования: с применением биофизического инструментария и современных данных отдельных параметров предпринять опыты по моделированию развертки сложных интеллектуальных систем:

– эволюции и появлении разума у *Homo sapiens* (филогенез);

– развертки интеллекта при индивидуальном развитии (онтогенез);

– оценки гипотезы стремления популяции человечества к объединению в глобальную интеллектуальную систему.

НЕКОТОРЫЕ ПАРАМЕТРЫ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫХ СИСТЕМ, ИХ КВАНТИФИКАЦИЯ И РАЗВЕРТКА ВО ВРЕМЕНИ

Этиология и семантика терминологии. Ноогенез (от древнегреч. νόος – разум и γένεσις – происхождение, рождение) – появление и эволюция разума. Следует отметить, что Ноо- (рус.), noo- (англ), 智慧 (китайский) – не только самый ранний термин, известный от древнегреческого «νόος», но и по словарным значениям – объединяющий феномены «ум, разум, интеллект, мысль, инсайт, мудрость» в единое явление.

Эволюция скорости передачи-обмена материальных объектов, физических сигналов-носителей информации. Анализ показывает увеличение скорости адаптации, рефлексии, движения, обмена веществом и информацией, которая возрастает на каждом новом уровне эволюции и организации биологических систем, при этом приспособляемость организма (популяции) улучшается с увеличением скорости реагирования (в том числе скорости связи между интеллектуальными компонентами) на изменения окружающей среды. Одноклеточный организм – скорость движения ионов через мембрану одноклеточного организма ~10^{-10} м/с, воды через мембрану ~10^{-6} м/с, внутриклеточного (цитоплазма) ~$2\cdot10^{-5}$ м/с; крови по сосудам многоклеточного организма ~0.05 м/с. В 1849 г. Г. Гельмгольцем [8] впервые измерена скорость, с которой сигнал проходит по нервному волокну (в диапазоне 24.6–38.4 м/с). По современным данным измеренные скорости нервного импульса составляют 0.5–120 м/с. Скорость звука и скорость света были определены еще раньше, в XVII веке. К XXI веку стало ясно, что они определяют в основном скорости физических сигналов-носителей информации, между интеллектуальными системами и их компонентами: звук (голос, аудиосигнал) ~ 300 м/с; квантово-электронные устройства ~$3\cdot10^8$ м/с (скорость радиоэлектромагнитных волн, электрического тока, светового, оптического потока, телекоммуникационного взаимодействия, в том числе через телевидение, телефонию, распространившийся интернет и появившееся множество портативных коммуникационных устройств). Построена сжатая графическая модель эволюции скорости (рис. 1).

Эволюция количества компонентов. Интеллектуальные системы могут образовываться при достижении критических количеств составляющих их интеллектуальных компонентов и коммуникаций между ними. При достижении количества интеллектуальных компонентов $n \geqslant 1$ млрд может наблюдаться феномен ноореволюции — перехода количественной развертки информационной си-

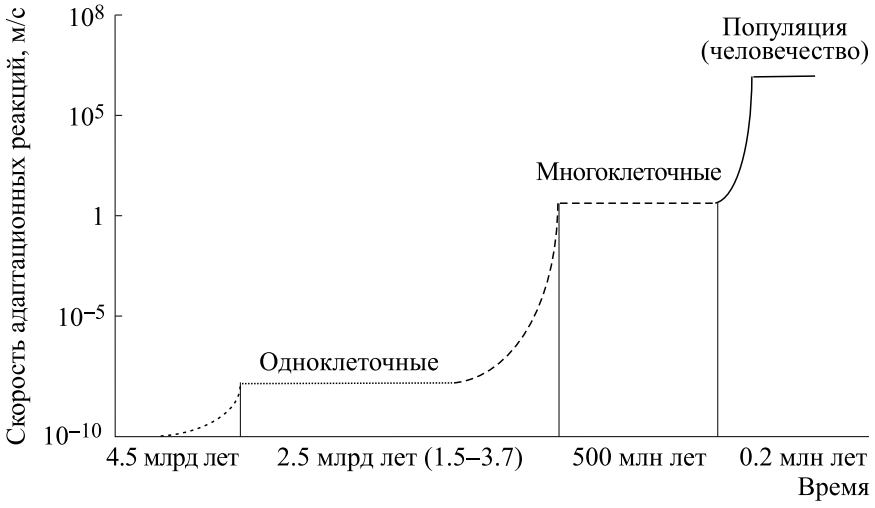


Рис. 1. Эволюция скорости материальных объектов, физических сигналов-носителей информации.

стемы в качественно новую автономно-интеллектуальную систему. Интеллектуальная система – это совокупность взаимодействующих между собой относительно элементарных структур и процессов, объединенных в целое выполнением функции интеллекта, не сводимой к функции ее компонентов. Признаки интеллектуальной системы: она взаимодействует со средой и другими системами как единое целое и состоит из иерархии подсистем более низкого уровня [4].

Ноогенез при индивидуальном развитии (онтогенезе) мозга человека берет свое начало от одной-двух первичных эмбриональных клеток, увеличивающихся в количестве при дроблении и делении

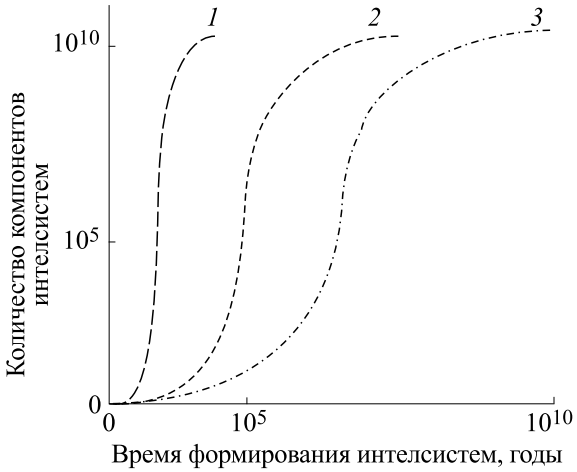


Рис. 2. Эволюция количества компонентов интелсистем: *1* – количество нейронов при индивидуальном развитии (онтогенезе) интелсистемы мозга, *2* – количество людей популяции человечества, *3* – количество нейронов при историческом развитии (филогенезе) нервных систем организмов.

на стадиях морулы–бластулы–гаструлы, формирующих соответствующий зародышевый лепесток и его дифференцировку. Формируется нервная система зародыша. К моменту рождения объем головного мозга плода человека по некоторым данным достигает 375 см^3, к 10 годам жизни — 1300 см^3. Морфофункциональное созревание структур мозга заканчивается к 13 годам, а окончательное морфофункциональное становление относится к 16–17-летнему возрасту.

В 1889 г. С. Рамоном-и-Кахалем был открыт нейрон, в дальнейшем была развита нейронная доктрина – концепция, согласно которой нервная система состоит из дискретных отдельных клеток [9]. Подсчитать количество нейронов удалось только в XXI веке – в мозге *Homo sapiens* в результате филогенеза и онтогенеза у взрослого человека насчитывается 86 миллиардов нейронов [10]. Это позволяет смоделировать в сравнении сжатые графические модели эволюции количеств компонентов интелсистем (рис. 2).

Здесь можно отметить для сравнения, что в процессе эволюции численность человечества возрастает от двух первочеловеков до ~70 млн человек (XX век до н.э.), ~300 млн (к началу н.э.), ~1 млрд (к 30-м годам XX века н.э.), 6 млрд к концу XX века, в соответствии с математическими моделями количество человечества может достигнуть 12.5—14.0 млрд в XXI–XXII веках [11].

Эволюция количества связей. Методы исследования связей и сотрудничества (cooperation). Актуальность изучения в этом направлении подтверждают как современные комплексные исследования сотрудничества, и связей информационных, генетических [12], обусловленного структурами на нейрональном уровне мозга [13], так и значение сотрудничества при развертке популяции че-

ловечества. В связи с этим нами был проведен анализ известных данных по эволюции количества связей для сотрудничества в интеллектуальных системах и информационном обществе [14]. Связи, контакты между биологическими объектами, можно считать появившимися с многоклеточностью ~ 3.0–3,5 млрд лет назад [15]. Система скоростных связей специализированных клеток, передающих информацию с помощью электрических сигналов, – нервная система – за всю историю жизни возникла только в одной крупной эволюционной ветви, у многоклеточных животных (Metazoa), и появилась в эдиакарском периоде (около 635–542 млн лет назад) [16].

Термин «синапс» – от греческого синапсиса (συνάψις), что означает «соединение», в свою очередь от συνάπτειν [συν («вместе») и ἅπτειν («крепить»)] – был введен в 1897 г. Ч. Шеррингтоном [17]. В ходе эволюции (филогенеза) количество связей между нейронами возрастало от одной до ~7000 синаптических связей каждого нейрона с другими нейронами в мозге человека. В связи с освоением современных физических методов визуализации (функциональная магнитно-резонансная томография) стала возможна регистрация энергичного роста коннектома мозга человеческого плода в возрасте от 22 до 37 недель беременности [18]. По некоторым подсчетам мозг трехлетнего ребенка имеет около 10^{15} синапсов (1 квадриллион), при индивидуальном развитии (онтогенез) число синапсов уменьшается с возрастом до ~ 10^{14} [19]. По другим данным расчетное количество неокортикальных синапсов в мужском и женском мозге снижается в течение жизни человека с ~$1.4 \cdot 10^{14}$ до ~$1.2 \cdot 10^{14}$ [20].

Количество контактов человека сложно подсчитать, но в науке закрепилось «число Данбара» ~150 устойчивых связей человека с другими людьми, предполагаемый когнитивный предел количества людей, с которыми можно поддерживать стабильные социальные отношения [21], по данным других авторов этот диапазон составляет 100–290. В мозге определены структуры, ответственные за социальное взаимодействие [22]. С появлением *Homo sapiens* ~50–300 тыс. лет назад актуальность кооперации в ходе эволюции в популяции человечества возрастала количественно. Еще 2000 лет назад на Земле проживал ~0.1 млрд людей, 100 лет назад ~1 млрд, к середине XX века ~3 млрд, а к настоящему времени человечество составляет 8 млрд. Таким образом, общее количество «устойчивых связей» между людьми, социальные взаимоотношения внутри популяции, может оцениваться ($150 \cdot 8 \cdot 10^9$) числом в ~10^{12} (рис. 3).

Из графиков на рис. 1–3 можно проанализировать количественные аналогии: в эволюции

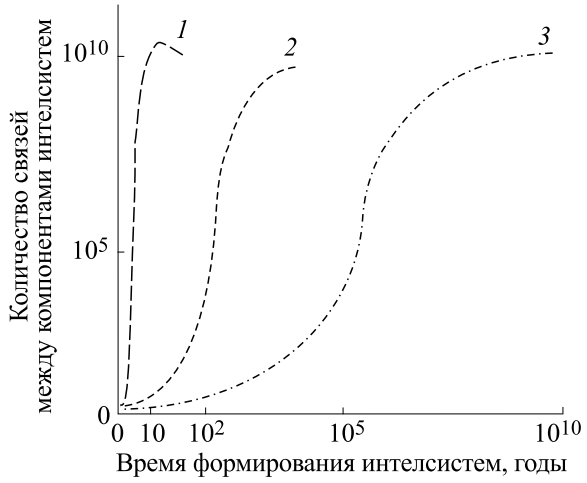


Рис. 3. Эволюция количества связей интеллектуальных систем: *1* – количество синапсов между нейронами при индивидуальном развитии (онтогенезе) интелсистемы мозга человека, *2* – количество связей между людьми в динамике роста населения популяции человечества, *3* – количество синапсов между нейронами при эволюционном развитии (филогенезе) нервных систем животных до мозга человека.

интеллектуальной системы человечества проявляются в кратком повторении отдельные черты филогенеза (эволюции) мозга и в длительном повторении – некоторые характеристики онтогенеза (индивидуального развития) мозга человека. Повторяющиеся черты – рост количества компонентов, связей между ними, скорости обмена информацией и пр. Можно рассматривать предполагаемую интеллектуальную итерацию (лат. iteratio – повторение) – повторение действия – образования интеллектуальной функции в едином по размерам материальном ряду (интеллекты людей); повторение явления – зарождение интеллектуальных систем на более высоком в иерархии материи размерном ряду [4].

ПЕРСПЕКТИВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ В БИОФИЗИКЕ ПАРАМЕТРОВ ЕСТЕСТВЕННОЙ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

Известна единственная интеллектуальная (разумная) система *Homo sapiens*, общепринятая из «Системы природы» (1735 г.) [23].

С тех пор ведется поиск параметров интеллектуальных систем для их более полного биофизического описания, который должен быть продолжен. Следует отметить, что в ряде работ рассматриваются закономерности появления и параметры отличительных особенностей интеллектуальной системы человека: объем рабочей памяти 7 ± 2 [24], способность к прогнозирова-

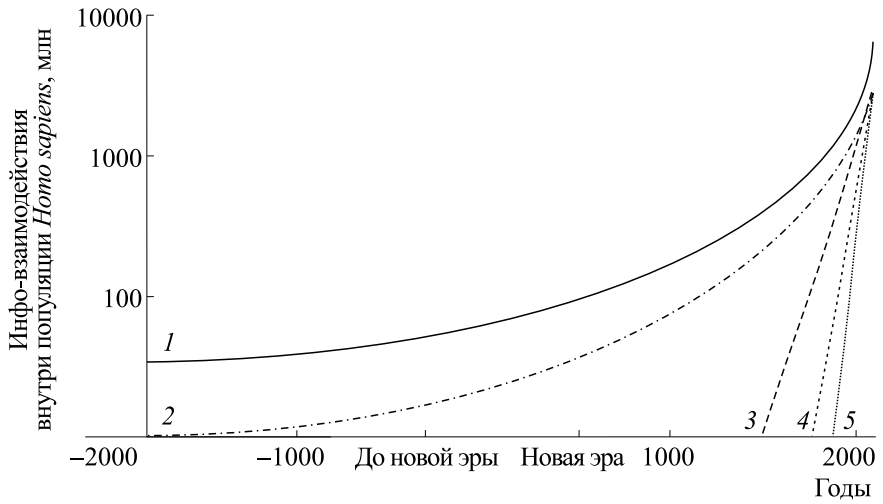


Рис. 4. Развертка связей, инфо-взаимодействия внутри популяции *Homo sapiens*: *1* – общее население Земли; *2* – количество грамотного населения; *3* – количество читающих книги (с книгопечатанием); *4* – количество радио- и телевизионных приемников; *5* – количество телефонов, компьютеров, пользователей сети «Интернет».

нию [25], многоуровневая (шесть слоев нейронов) иерархия системного отбора ценной информации [26], сознание [27], память, концепция появления инсайта-озарения [28], лимиты некоторых физических параметров интеллекта человека [29] и пр.

Эта область энергично развивается, особенно в связи с реализацией ряда мегапроектов (Blue Brain Project, Allen Brain Atlas, Human Connectome Project, Google Brain), – в попытке лучше понять функции мозга, а также в целях развития когнитивных функций человека в будущем с помощью искусственного интеллекта, информационных, коммуникационных и когнитивных технологий [30]. «Международная инициатива по изучению мозга» в настоящее время объединяет инициативы по исследованию мозга на национальных уровнях (Brain Initiative (США), Human Brain Project (Европейский Союз), China Brain Project, Japan Brain/MINDS, Canadian Brain Research Strategy, Australian Brain Alliance, Korea Brain Initiative) с целями поддерживания взаимодействия между странами и обеспечения синергетического взаимодействия с междисциплинарными подходами, вытекающими из последних исследований в области нейробиологии, искусственного интеллекта, вдохновленного мозгом [31]. Между тем остается обширный ряд нерешенных проблем в нейрофизике: нейронный код, феномен объединения информации, уровень упрощения для описания обработки информации в мозгу, расчет по кортикальным столбцам, точное время потенциалов действия для обработки информации в неокортексе, количественная оценка долговременной памяти и др.

ОПЫТ ОЦЕНКИ ГИПОТЕЗЫ СТРЕМЛЕНИЯ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕЛОВЕЧЕСТВА К ГЛОБАЛЬНОЙ БИОТЕХНИЧЕСКОЙ ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СИСТЕМЕ

Гипотеза стремления к ноосфере (по В.И. Вернадскому и др.), мировому мозгу, всемирному разуму, глобальному интеллекту, суперинтеллекту и пр. не нова, первые упоминания относятся к началу XX века. Однако общепризнанная теория не сформировалась. Попробуем рассмотреть на современном этапе ее некоторые аспекты по проверяемым количественным параметрам и качественным феноменам. Трудность опыта принимается из теории Гёделя – описание системы изнутри может быть или противоречивым, или неполным.

Количественные измерения. Первые попытки описания структурных и функциональных параметров можно основывать на известных цифрах: на 7.5 млрд человек приходилось 6 млрд телевизионных установок, 6 млрд телефонов, 2 млрд компьютеров, 4 млрд пользователей интернета («We Are Social», «HootSuite», 2018), 3.2 млрд пользователей зарегистрировано в социальных сетях («GlobalWebIndex», 2017). Эволюция биотехнологических связей в популяции представлена на рис. 4.

К началу века человечество стало производить за год $18 \cdot 10^{18}$ байт (18 эксабайт) информации, обозначены параметры и объемы производимой человечеством и запоминаемой в различных средах информации, которые в мире возрастали ежегодно на 30% [32] и достигли $2.5 \cdot 10^{18}$ байт в день («IBM», 2017).

Оценка появления новых качественных феноменов. Автономность свойственна когнитивным системам [33] и характеризуется способностью принимать самостоятельные решения. Попробуем определить такие действия человечества, которые являлись результатом совместной глобальной высокоинтеллектуальной деятельности людей и/или характеризовали популяцию как единую автономную систему, способную к действенным рациональным решениям.

Во второй половине XX века к примерам таких глобально-значимых решений-действий можно отнести создание ООН и ее специализированных учреждений, победу над оспой с помощью вакцинации, мирное использование атомной энергии, запреты на ядерные и бактериологические испытания, выход в космос с полетами на околоземной орбите и к Луне, интернет и спутниковое телевидение [4].

К появлению в 2001 г. феномена Википедии следует отметить, что еще в 1938 г. футурист и биолог-эволюционист Г. Уэллс в эссе «Мировой мозг» [34] описал свое видение новой бесплатной, синтетической, авторитетной, постоянно обновляемой мировой энциклопедии, которая могла бы помочь гражданам мира наилучшим образом использовать универсальные информационные ресурсы. Википедия к настоящему времени существует на ~300 языках, содержит более 40 млн статей, только в enWiki >4 млн редакторов, число пользователей в мире – 6.3 млрд; она способствует распространению новых научных работ и помогает исследователям, имеющим ограниченный доступ к научным журналам; отмечается, что энциклопедия не только отражает текущее состояние науки, но и частично влияет на ее формирование в будущем [35].

Для XXI века характерны реагирование на глобальное потепление, контрактное балансирование добычи углеводородов, преодоление экономических кризисов, мегапроекты для совместных исследований космоса, наномира, атома, мозга; создание универсального искусственного интеллекта, обозначенного в национальных и международных стратегиях [36, 37]. С новым вызовом человечеству – пандемией COVID-19 – в гиперинформационном обществе проблема была обозначена как выбор «инфопандемия или ноогенез»; «рост глобального коллективного разума» [38].

При оценке следует отметить, что такой признак ноосферы по В.И. Вернадскому, как «человечество избавилось от войн» [39] не достигнут. Хотя справедливости ради следует отметить, что для естественных интеллектуальных систем характерны и психические заболевания и инсульты.

Обобщая результаты анализа новых качественных феноменов, автор склоняется к мнению, что с биофизической точки зрения человечество сегодня, проявляя отдельные черты рациональности, не может характеризоваться строго интеллектуальной «системой», «организмом», а скорее приближается к биотехнической «колонии», «популяции».

Ценность, важность прогноза дальнейшей эволюции интеллектуальных систем. Способность к прогнозу – одно из наиболее ценных качеств, присущих интеллекту [25, 40]. Риски феномена количественно-качественного «взлета и падения видов» известны из биологической эволюции [41] и имеют множественные подтверждения в виде инволюции-деградации тысяч исчезнувших видов от губок до динозавров.

В эволюции многие процессы не предопределены. В связи с этим возможны и прогнозируемые прогрессивные варианты и бифуркации:

– преобладание направления «эволюция эгоистического индивидуального интеллекта» с борьбой за выживание,

– преобладание тренда «эволюция альтруистического коллективного интеллекта» общества, социума, человечества, с кооперацией его компонентов,

– совместное сбалансированное развитие индивидуального-коллективного интеллекта.

Эволюция индивидуального интеллекта. В ней, помимо биолого-генетических механизмов морфофункционального усовершенствования мозга, биоинформатики, психотехник и ноофармакологии, возможен путь «чемоданчика с дополнительными мозгами» – с инструментами-органами (виджетами, гаджетами), увеличивающими скорости производства-передачи информации, совершенствующими поиск актуальных знаний, обеспечивающими эффективное кодирование-сжатие информации, надежность и объемы ее хранения.

Эволюция коллективных биотехнических интеллектуальных систем социума, человечества. Здесь многое зависит от формирования мотиваций (инстинктов, побуждений) людей – многокомпонентной популяции. Цели человечества прояснятся и совместные действия станут эффективнее, если и индивидуумам станет ясно, что для противостояния космическим, планетарным, климатическим катастрофам, освоения преимуществ ресурсов коллективного потребления, борьбе с агрессивными изменениями физики атмо-, лито-, гидросферы, смертельными вызовами от микроорганизмов биосферы необходимо объединение в единую интеллектуальную систему.

Дальнейший успех на национальном уровне могли бы обеспечить: достижение максимально возможного уровня количества населения; создание объективных условий по повышению интеллектуальности членов общества; стремление к

максимальному охвату всевозможными скоростными коммуникационными системами всего населения на всей территории и интеллектуальному ускорению социальных взаимодействий; развитие коннектома между гражданами, интеллектуальной энергетики; повышение эффективности общественного интеллекта, аккумуляции и использования интеллектуального наследия; меры по накоплению и долгосрочному хранению «памяти» на материальных носителях; высокомотивированная деятельность по совершенствованию законодательства; формирование деятельных орудий и инжиниринга инструментов, необходимых и достаточных для эффективных актов реагирования на вызовы окружающей природы, микро и макрокосмоса.

Биофизические междисциплинарные исследования могли бы способствовать пониманию закономерностей разума. Формирование знания в этой сфере сравнимо с познанием квантовой физики и развертки Вселенной, происхождения жизни и биологической эволюции. Поиск должен быть обязательно продолжен: он может дать основу для уверенности, что интеллектуальные системы справятся с самыми неожиданными и порой опасными проблемами, возникающими в ходе их развития.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Doherty, *Organic Philosophy; Or, Man's True Place in Nature...: Epicosmology* (Trübner & Company, London, 1871).
2. T. H. Huxley, *Biogenesis and abiogenesis* (Macmillan & Co, London, 1873).
3. P. Teilhard de Chardin, *Le phénomène humain* (Editions du Seuil, Paris, 1955).
4. А. Л. Еремин, *Ноогенез и теория интеллекта* (СовКуб, Краснодар, 2005).
5. И. С. Домбровская, Культурно-историческая психология **6** (3), 57 (2010).
6. А. Л. Еремин, Биофизика **48** (3), 573 (2003).
7. В. Д. Орехов, *Прогнозирование развития человечества* (МИМ ЛИНК, Жуковский, 2015).
8. H. Helmholtz, in *Archiv für Anatomie, Physiologie und Wissenschaftliche Medicin* (Veit & Comp., Berlin 1850), pp. 71–73.
9. S. Ramón y Cajal, *Manual de histología normal y técnica micrográfica. Manual of normal histology and micrographic technique* (Libreria de Pascual Aguilar, Valencia, 1889).
10. S. Herculano-Houzel *The Human Advantage: A New Understanding of How Our Brain Became Remarkable* (MIT Press, 2016).
11. С. П. Капица, Новая и новейшая история, № 4, 42 (2004).
12. B. Voorhees, at al. Current Anthropology **61** (2), 194 (2020).
13. J. K. Rilling, D. Gutman, T. Zeh, et al., Neuron **35**, 395 (2002).
14. А. Л. Еремин и Е. В. Зибарев, Медицина труда и пром. экология **60** (12), 951 (2020).
15. R. K. Grosberg and R. R. Strathmann, Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. **38**, 621 (2007).
16. G. E. Budd, Phil. Trans. Roy. Soc. B: Biol. Sciences **370** (1684), 201500372015 (2015).
17. M. Foster and C. S. Sherrington, *Textbook of Physiology* (Macmillan, London, 1897).
18. S. Wilson, M. Pietsch, L. Cordero-Grande, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **118** (20), e2023598118 (2021).
19. D. A. Drachman, Neurology **64** (12), 2004 (2005).
20. T. Nguyen, Undergraduate J. Math. Model.: One + Two **3** (1), 26 (2010).
21. R. I. M. Dunbar, J. Human Evolution **22** (6), 469 (1992).
22. J. Walbrin, P. Downing, and K. Koldewyn, Neuropsychologia **112**, 31 (2018).
23. C. Linnaeus, *Systema naturae sive regna tria naturae systematice proposita per classes, ordines, genera, & species* (Haak, Leyden, 1735).
24. G. A. Miller, Psychol. Rev. **63** (2), 81 (1956).
25. M. Каку, *Будущее разума* (АНФ, М., 2015).
26. Д. Хокинс и С. Блейксли, *Об интеллекте* (И. Д. Вильямс, М., 2007).
27. В. С. Рамачандран, *Рождение разума* (Олимп-Бизнес, М., 2006).
28. Э. Кандель, *Век самопознания* (АСТ: Corpus, М., 2016).
29. D. Fox, Sci. Am. **305** (1), 36, 2011.
30. С. Сеунг, *Коннектом* (Лаборатория знаний, М., 2018).
31. A. Adams, S. Albin, K. Amunts, et al., Neuron **105** (2), 212 (2020).
32. P. Lyman, H. R. Varian, *How Much Information* (University of California, 2003).
33. U. Maturano, F. Varela, *Autopoiesis and cognition: the realization of the living* (Springer, 1980).
34. H. G. Wells, *World Brain* (Doubleday, Doran & Company, NY, 1938).
35. N. Thompson and D. Hanley, MIT Sloan Research Paper 5238-17 (2018).

36. *Communication Artificial Intelligence for Europe* (European Council, 2018).
37. *Национальная стратегия развития искусственного интеллекта на период до 2030 года* (Указ Президента РФ от 10.10.2019 г. № 490).
38. M. Santolini, The Conversation (May 20, 2020).
39. Ф. Яншина, Общественные науки и современность, № 1, 163 (1993).
40. Р. Курцвел, *Эволюция разума* (Изд-во «Э», М., 2015).
41. А. Марков, *Эволюция человека. Обезьяны, нейроны, душа* (Астрель, М., 2011).

To the Biophysics of the Evolution of Intellectual Systems

A.L. Eryomin*, **, *

**Kuban State University, Stavropolskaya ul. 149, Krasnodar, 350040 Russia*

***Kuban Medical Institute, ul. Budennogo 198, Krasnodar, 350015 Russia*

****Scientific Research Institute of Hygiene and Ecology, Tamanskaya ul. 180, Krasnodar, 350040 Russia*

The 150 years have passed since the first publication dedicated to noogenesis, a new concept in understanding the evolution of intellect. However, only in the XXI century, thanks to the results of fundamental research in physics, biology, medicine, and interdisciplinary work, it became possible to perform quantitative analysis of some parameters that contribute to the understanding of the evolution of intellectual systems in the natural sciences. Analysis of the parameters of intellectual systems, patterns of appearance and evolution, distinctive features, constants and limits of their structures and functions showed that this analysis can be used to measure and compare the capacity of communications (~100 m/s – 300 million m/s); to quantify the number of components of intellectual systems (10–100 billion); to calculate successful links (from 150 to 1 trillion links). Prognostic models can be developed while studying a phenomenon of the origin and evolution of: the brain as a population of neurons within biological evolution of *Homo sapiens* in the realm of cognition and linguistic expression; the brain of any individual by tracking anatomy and physiology of the human body via creativity, thought, consciousness, idea, insight, intuition, eureka; "noo" in the hypothesis of morphological and functional evolution of the human population.

Keywords: biophysics of development and evolution, neuroinformatics, psychophysics, neurophysics, parameters of intellectual systems, noogenesis