

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ПУЩИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

ГРИНЕВИЧ АНДРЕЙ АНАТОЛЬЕВИЧ

**ДИНАМИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ БИОФИЗИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ НА
РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУРНЫХ УРОВНЯХ: ОТ НИЗКОЧАСТОТНОЙ
МОДУЛЯЦИИ К АНАЛИЗУ ДВИЖЕНИЯ КИНКОВ**

1.5.2. - Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

доктора физико-математических наук

Научный консультант:

Доктор физико-математических наук

Якушевич Людмила Владимировна

Пушино – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

I.	ВВЕДЕНИЕ	6
I.1	Актуальность	6
I.2	Научная новизна	8
I.3	Степень разработанности темы исследования	10
I.4	Цель и задачи диссертационного исследования	14
I.5	Объект и предмет исследования	16
I.6	Методология и методы диссертационного исследования	17
I.7	Теоретическая значимость работы	18
I.8	Практическая значимость работы	18
I.9	Положения, выносимые на защиту	19
I.10	Степень достоверности	20
I.11	Личный вклад	20
I.12	Публикации	21
I.13	Апробация результатов	21
I.14	Объем и структура диссертации	21
II.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	22
II.1	Регуляция в биологических системах	22
II.1.1	Общие представления о регулировании в биологических системах	22
II.1.2	Регуляция как динамическая устойчивость	24
II.1.3	Узко специализированная не сетевая регуляция	25
II.1.4	Действие узко специализированной регуляции на примере экспрессии lac-оперона	26
II.1.5	Динамическая регуляция	28

П.2	Вариабельность сердечного ритма и феномен респираторной синусовой аритмии.....	31
П.2.1	Вариабельность сердечного ритма как маркер нарушений вегетативной нервной регуляции	31
П.2.2	Связь ВСР с респираторной системой.....	33
П.2.3	Математическое моделирование 0.1 Гц колебаний в ССС.....	35
П.3	Колебания микроциркуляторного кровотока.....	36
П.3.1	Общая анатомия микроциркуляции	37
П.3.2	Анатомия кожной микроциркуляции	39
П.3.3	Измерение кожной микроциркуляции методом лазерной доплеровской флоуметрии.....	41
П.3.4	Спектральный анализ колебаний микроциркуляторного кровотока и их связь с регуляторными механизмами.....	43
П.3.5	Математические модели микроциркуляторного кровотока	45
П.4	Клетки врожденного иммунитета человека при метаболических нарушениях	50
П.4.1	Полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы).....	50
П.4.2	Метаболические нарушения и сахарный диабет 2 типа	52
П.4.3	Математическое моделирование функциональных свойств нейтрофилов	55
П.5	Ионные каналы в биологических мембранах клеток	57
П.5.1	Структурно-функциональные особенности ионных каналов	58
П.5.2	Структурно-функциональные свойства Ca^{2+} -активируемого и K_v каналов	64
П.5.3	Воротный механизм K^+ -каналов.....	74
П.5.4	Кинетика воротного механизма K^+ -каналов	78

II.5.5	Математические модели воротного механизма и воротной проводимости ионных каналов	82
II.6	Молекула ДНК.....	91
II.6.1	Структура ДНК.....	92
II.6.2	Открытые состояния ДНК.....	95
II.6.3	Транскрипция	97
II.6.4	Механические силы и моменты сил в ДНК-белковых взаимодействиях	101
II.6.5	Модели ДНК	105
III.	РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	116
III.1	Моделирование кровотока в сердечно-сосудистой системе человека	116
III.1.1	Феномен респираторной синусовой аритмии в нестационарных условиях	117
III.1.2	Моделирование низкочастотных колебаний кровотока в микроциркуляторном русле (МЦР) при стохастических воздействиях	138
III.2	Моделирование фагоцитарного ответа гранулоцитов на микробные частицы	159
III.2.1	Описание модели фагоцитарного ответа гранулоцитов на микробные частицы.....	160
III.2.2	Результаты моделирования фагоцитарного ответа нейтрофилов.....	164
III.3	Моделирование одиночного ионного канала в биологических мембранах клетки	169
III.3.1	Базовая модель и ее модификации	170
III.3.2	Анализ модели и методы численного решения уравнений	175
III.3.3	Результаты и обсуждение численных расчетов и анализа моделируемых характеристик	180

III.4 Моделирование конформационной динамики ДНК.....	186
III.4.1 Уравнение Синус-Гордона для неоднородной ДНК, состоящей из двух неодинаковых однородных последовательностей, разделенных границей	186
III.4.2 Моделирование движения кинка в однородных и неоднородных последовательностях ДНК с учетом диссипации	203
III.4.3 Новая неоднородная модель ДНК	212
III.4.4 Эффекты на границе	225
III.4.5 Эффект Касмана	233
III.4.6 Моделирование природных молекул ДНК.....	242
III.4.7 Влияние внешних воздействий.....	265
IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	274
V. ВЫВОДЫ.....	277
VI. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	278
VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	280
VIII.ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	326

I. ВВЕДЕНИЕ

I.1 Актуальность

Известно, что структурные и динамические свойства биологических систем определяют их функционирование. Функционирование живых организмов – результат сложнейших взаимодействий множества процессов, включая биофизические, протекающих на разных структурных и структурно-функциональных уровнях живой материи (Bruggeman and Westerhoff, 2007; Gosak, et al. 2018). Выявление механизмов функционирования и регулирования функциональной активности представляет одну из самых сложных проблем современной биологии, которая до сих пор не решена. Важным, в связи с этим, является понимание динамики биофизических процессов, определяющей динамическую регуляцию функционирования биологических систем на разных уровнях сложности их строения. Различные направления биологических исследований стремятся объяснить, как сложное поведение целого организма возникает из относительно простых закономерностей взаимодействия между его фундаментальными компонентами при различных воздействиях со стороны окружающей среды на разных временных и пространственных масштабах. Взаимодействия во многом обусловлены не только структурными особенностями биологической системы, но и специфичной для рассматриваемого структурно-функционального масштаба динамикой структурных компонент, обуславливающей функциональные свойства системы. Решение этой проблемы во многом зависит от умения отвечать на сложные вопросы. Примерами таких вопросов являются: «Как динамические свойства биологических систем на уровне целого организма (например, респираторной или сердечно-сосудистой системы) определяют характерные особенности их функционирования?», или «Как динамические процессы, протекающие на молекулярном уровне (например, мембранных белков или ДНК), обеспечивают функционирование молекул или макромолекулярных комплексов, которые

определяют функциональные свойства клеток, как базовых единиц строения живой материи?»). Выявление механизмов связи динамики биофизических процессов с функциональными свойствами биологической системы – это важная и актуальная задача.

Ответить на эти вопросы сложно. Для этого требуется сочетание подходов из разных областей знаний. Одним из наиболее удачных способов решения подобных вопросов является использование сочетания экспериментальных биологических методов с математическим моделированием. Было показано, что использование математических моделей оказало фундаментальное влияние на развитие физики в 20-м веке, и многие прогнозируют, что математика будет играть аналогичную роль в продвижении биологических открытий в 21-м веке (Cohen, 2004; Hunter, 2010).

В развитии биологических исследований математические модели играют все более важную роль. Они позволяют преодолеть разрыв между сбором данных и проверкой механизмов, лежащих в основе различных биологических процессов. Математические модели являются удобным инструментом для выявления динамических особенностей биологических систем и оценки роли динамических факторов в формировании биологических функций у живых организмов. Результатом этого являются не только качественные, но и количественные оценки благодаря широкому набору инструментов развитого аналитического и численного формализма. Структурно-функциональный уровень сбора экспериментальных данных изменяется в широком масштабе: начиная от молекулярно-клеточного, продолжая организменным и заканчивая популяционным, включая оценку эпидемиологических рисков. Во многих случаях ученые из различных областей биологии стремятся понять, как процессы и механизмы, которые они наблюдают на микроскопическом уровне, приводят к формированию различных форм поведения, включая патологические, наблюдаемые на макроскопическом уровне целых колоний, тканей или популяций (Banwarth-Kuhn and Sindi, 2020). Применение математических моделей может ускорить это понимание.

В настоящее время в исследованиях биологических процессов наряду с моделями химической кинетики, популяционной динамики, или статистическими моделями все более широко применяются модели физических аналогов. Начиная от использования моделей квантовой механики и классической механики в исследованиях функциональных свойств биомолекул, заканчивая гидродинамическими моделями кровообращения в организме человека. Широкое использование физических моделей в описании биологических систем обусловлено тем, что для физических систем все фундаментальные законы и закономерности имеют строгую математическую формализацию благодаря хорошо развитому математическому аппарату.

Имея математическое описание легко работать с различными системами, в том числе и с биологическими, проверять и прогнозировать их поведение, воспроизводить условия эксперимента. Однако, в отличие от физики, которая имеет дело с неживыми системами, живые системы в биологии являются более сложными, с многочисленными прямыми и обратными связями, включающие нелинейные взаимодействия, и обладающие неоднородным составом. Это накладывает специфику на выбор математических и физических моделей, указывает на ограниченность области применимости и на необходимость их адаптации при описании биологических процессов.

Диссертация посвящена выявлению динамических свойств регуляторных механизмов, определяющих динамическую регуляцию биофизических процессов в различных биологических системах в покое и при внешних воздействиях с использованием методов математического моделирования.

I.2 Научная новизна

Для многих биологических систем на разных уровнях организационной сложности специфика математической формализации структурного и функционального многообразия динамических свойств заключается в адекватном выборе физического аналога и определении основных динамических

характеристик для математического моделирования. В диссертации представлены новые или модифицированные математические модели, описывающие новые регуляторные механизмы функциональной активности биологических систем с учетом динамики их структурных компонентов и оценкой их динамических параметров при аperiodических и периодических воздействиях в норме и при патологии.

С помощью методов имитационного математического моделирования был выявлен новый механизм динамической регуляции резонансно-подобного низкочастотного отклика сердечно-сосудистой системы на респираторное воздействие с контролем частоты дыхания, проявляемого в процессе респираторной синусовой аритмии. Механизм заключается в существовании обратной степенной зависимости симпатической и парасимпатической регуляции сердечного ритма от респираторного водителя ритма. На основе гидродинамической модели сообщающихся эластичных резервуаров предложена гидродинамическая модель сердечно-сосудистой системы человека, включающая 4-х камерное сердце, два круга кровообращения и многоуровневое периферическое микроциркуляторное русло. При помощи этой модели впервые показан новый механизм динамической связи между низкоинтенсивным стохастическим воздействием на сердце и низкочастотными колебаниями кровотока в периферическом микроциркуляторном русле в условиях отсутствия контроля со стороны вегетативной нервной системы. Показана принципиальная возможность прямого вклада центральных регуляторных процессов в низкочастотную регуляцию микрогемодинамики наряду с локальными механизмами.

С помощью разработанной математической модели 4-х стадийного фагоцитарного ответа нейтрофилов на микробную провокацию, учитывающую активацию и функционирование NADPH-оксидазы проведено исследование кинетики продукции АФК как патогенетического фактора, нарушающего регуляцию периферического кровотока при сахарном диабете 2-го типа. Выявлен новый механизм динамической регуляции АФК-зависимого

фагоцитоза и показана связь изменений кинетических параметров респираторного взрыва нейтрофилов с нарушениями молекулярного механизма выработки супероксида у больных.

Предложена математическая модель воротного механизма одиночного ионного канала в биологической мембране, учитывающая динамическую регуляцию скорости вытеснения молекул воды из гидрофобной поры канала и ее зависимость от трансмембранного электрического потенциала. В рамках модели впервые показано, что зависимость параметров немарковской кинетики ионного тока от трансмембранного электрического потенциала обусловлена гидрофобным фактором.

Разработана математическая модель, описывающая угловую динамику азотистых оснований и солитоноподобную конформационную динамику открытых состояний (кинков) в молекуле ДНК и учитывающая ее неоднородную структуру. Предложен новый математический метод оценки энергетического профиля молекулы ДНК и метод визуализации движения кинков – метод траекторий. Впервые была произведена оценка интервала начальных значений энергии кинков, в котором возможно существования эффекта Касмана, а также показана зависимость активации и динамики кинков от различных функционально-значимых участков последовательности ДНК на примере плазмиды pTTQ18. Впервые показана регуляция динамики кинков тепловыми флуктуациями и постоянным торсионным моментом. Показана динамическая регуляция экспрессии генов на примере плазмиды pPF1.

I.3 Степень разработанности темы исследования

Пионерские работы по применению методов математического моделирования с использованием дифференциальных уравнений к исследованию биологических систем можно отнести к середине прошлого столетия (Tomlin and Axelrod, 2007). С тех пор методы математического моделирования бурно развивались, что привело к появлению моделей,

описывающих биологические системы на разных уровнях организации живой материи от биомолекул до клеток, организмов и экосистем (Schlick, 1996; Karr, et al. 2012; Ciarletta, et al. 2016). Несмотря на большой прогресс в математическом моделировании живых систем, многогранный характер биологических процессов по-прежнему представляет собой огромную проблему для их математического описания. Особо остро эта проблема стоит в контексте новых экспериментальных данных, получаемых в результате появления новых технологических достижений. Следует отметить, что математические методы играют все более важную роль в решении ключевых вопросов и парадигм в отношении различных биологических систем, особенно в свете прогнозирования последствий системных воздействий и для их контроля. В связи с чем актуальным остается разработка новых крупнозернистых мезоскопических или гибридных моделей в аспекте выявления особенностей динамической регуляции биофизических процессов, протекающих в биологических системах на разных структурно-функциональных уровнях и определяющих их функциональное поведение.

Одной из важнейших систем для жизнедеятельности человека является сердечно-сосудистая система. Она пример сложной многокомпонентной биологической системы, которая объединяет все ткани и органы человека в единое целое, динамика параметров которой имеет принципиальный колебательный характер, отражающий динамическую регуляцию ее функций, начиная от вариабельности сердечного ритма, заканчивая колебаниями скорости микроциркуляторного кровотока, связанными с колебательными процессами, протекающими на клеточном и субклеточном уровнях микрососудов. Само микроциркуляторное звено, при этом, является хорошим примером мезомасштаба в физиологических системах (Secomb and Pries, 2011). Поэтому математическое моделирование сердечно-сосудистой системы во многом основано на интеграции знаний о процессах, функциях и структурах различных уровней биологической организации: субклеточном, клеточном и организменном (Secomb, et al. 2008; Cheng, et al. 2010). Модели сердечно-

сосудистой системы, описывающие динамику кровотока в размерности 0D/1D и учитывающие многоуровневую структуру микроциркуляторного русла, остаются актуальными до сих пор, особенно в свете понимания механизмов динамической регуляции ее функциональной активности.

Важно понимать также и механизмы нарушений колебаний кровотока, которые отражают патологические изменения регуляторных механизмов на системном и локальном уровнях, и могут быть обусловлены разными факторами, включая метаболические расстройства (Czacowski and Roustit, 2020). Эти расстройства во многом связаны с формированием хронического окислительного стресса, в котором активное участие принимают клетки врожденного иммунитета – нейтрофилы, продуцирующие активные формы кислорода (АФК) (El-Benna, et al. 2016). Избыточная продукция АФК является результатом нарушений механизмов динамической регуляции сборки и активации NADPH-оксидазы – мембранного комплекса, катализирующего производство супероксид-анион радикала. Существующие математические модели иммунных ответов описывают «общую» бактериальную динамику и/или популяционную динамику клеток врожденного иммунитета (Reynolds, et al. 2006; Smith, et al. 2011). В них не рассматриваются молекулярные механизмы генерации АФК гранулоцитами. Поэтому разработка математических моделей, описывающих кинетику респираторного взрыва, и учитывающих этапы сборки и активации NADPH-оксидазы, является важной и актуальной задачей.

Еще один мембранный белок, представляющий один из самых многочисленных классов мембранных белков, и являющийся важнейшим элементом для регуляции функционирования живых клеток всех известных организмов – это ионный канал. Ионные каналы динамическим образом регулируют транспорт ионов через биологические мембраны. Формируемая в результате этого кинетика ионных токов имеет сложный стохастически-подобный вид. Для их моделирования используются разные подходы от моделей молекулярной динамики до моделей броуновской динамики и стохастических марковских моделей (Jensen, et al. 2010; Гриневич и Асташев, 2010; Chen, et al.

2019). Состояния проводимости ионных каналов характеризуются широким временным диапазоном от микросекунд до десятков секунд и определяются работой воротного механизма и особенностями его динамической регуляции (Wawrzkievicz-Jałowiecka, et al. 2018). Последняя может приводить к скоррелированной немарковской кинетике ионного тока (Silva, et al. 2021). Механизм и динамические свойства такого функционального поведения до сих пор остаются не ясными. В связи с этим важно развивать и уточнять мезоскопические модели, описывающие структурно-динамические свойства воротного механизма одиночного ионного канала.

Основа всех регуляторных процессов, протекающих на субклеточном, клеточном и организменном уровнях, связана с функциональной активностью такой фундаментальной молекулы, как ДНК. Она определяет существование всех известных форм жизни и разнообразие их функционального поведения. Динамическая регуляция экспрессии генов лежит в основе такого разнообразия (Bich et al. 2016). Биологические процессы, в которых участвует ДНК, протекают в широком диапазоне пространственных масштабов от нанометров до микрометров. Следовательно, для понимания механизмов, связанных с ДНК-белковыми взаимодействиями, необходимо рассматривать математические модели ДНК, основанные не только на квантовых, но и на классических принципах. Один из способов изучения внутренней подвижности ДНК – рассмотрение торсионной динамики (Yakushevich, 1989, 2004), являющейся результатом угловой динамики азотистых оснований вокруг сахаро-фосфатного остова. Существующие модели торсионной динамики ДНК, учитывающие ее неоднородную структуру, имеют дискретное представление, что делает их математический анализ сложным из-за большого количества уравнений (Cadoni, et al. 2007). Актуальным остается вопрос разработки континуальных моделей неоднородной ДНК.

I.4 Цель и задачи диссертационного исследования

Цель: выявить динамические свойства регуляторных механизмов, определяющих динамическую регуляцию биофизических процессов в различных биологических системах в покое и при внешних воздействиях.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Изучить закономерности динамической регуляции ритмов в сердечно-сосудистой системе человека. В рамках этой задачи:
 - Используя имитационное математическое моделирование на базе модели «PNEUMA» выяснить механизм динамической регуляции вариабельности сердечного ритма в условиях навязанной частоты дыхания.
 - Построить гидродинамическую модель сердечно-сосудистой системы человека, включающую 4-х камерное сердце, два круга кровообращения и многоуровневое микроциркуляторное русло.
 - Определить динамическую связь между низкочастотными колебаниями кровотока в периферическом микроциркуляторном русле и функционированием сердца при случайных воздействиях на желудочки.
2. Изучить динамические особенности регуляции фагоцитарного ответа гранулоцитов на микробную провокацию как патогенетических факторов, нарушающих регуляцию кровотока в периферическом микроциркуляторном русле при сахарном диабете 2-го типа. В рамках этой задачи:
 - Построить математическую модель 4-х стадийного фагоцитарного ответа нейтрофильных полиморфноядерных гранулоцитов (нейтрофилов) на микробную провокацию, учитывающую динамическую регуляцию активации и функционирования NADPH-оксидазы, опосредующую респираторный взрыв.

- Сравнить модельные кинетические кривые респираторного взрыва с экспериментальными, подобрать параметры модели и определить связь кинетических параметров кривых с параметрами модели, отвечающие за различные стадии ответа нейтрофилов.
 - Выявить изменения и нарушения в механизмах динамической регуляции фагоцитарного ответа нейтрофилов в крови здоровых и больных сахарным диабетом 2-го типа при нормальной и высокой концентрациях *D*-глюкозы.
3. Исследовать регуляторную динамику воротного механизма одиночного ионного канала в биологической мембране при воздействии трансмембранного электрического потенциала. В рамках этой задачи:
- Разработать математическую модель одиночного ионного канала, учитывающую динамическую регуляцию скорости вытеснения молекул воды из гидрофобной поры канала трансмембранным электрическим потенциалом.
 - На базе разработанной модели выявить механизм немарковской кинетики ионного тока через канал.
4. Исследовать солитоподобную динамику азотистых оснований в ДНК и их связь с функционально значимыми участками и динамической регуляцией экспрессии генов. В рамках этой задачи:
- Построить математическую модель, описывающую движение локально расплетенных участков с помощью нелинейных волновых возмущений (кинков) в неоднородной ДНК.
 - Разработать математический метод оценки энергетического профиля молекулы ДНК и метод визуализации движения кинка.
 - С помощью этих методов построить траектории движения кинков в искусственных и реальных последовательностях. Выявить зависимость активации и распространения кинков в ДНК от функционально значимых участков в рассматриваемых последовательностях.

- Исследовать влияние внешних воздействий на динамику кинка.
- Оценить динамическую регуляцию экспрессии генов на примере плазмиды pPF1.

I.5 Объект и предмет исследования

Объектом данного исследования являются ССС и периферическое микроциркуляторное русло человека, гранулоциты крови человека и фермент NADPH-оксидаза, воротный механизм одиночного калиевого канала, искусственные и природные молекулы ДНК, включающие плазмиды pTTQ18 и pPF1.

Предметом исследования являются: математическое моделирование респираторной синусовой аритмии в условиях контролируемого дыхания для понимания механизма динамической регуляции резонансно-подобного ответа на частоте 0.1 Гц; моделирование колебаний кровотока в периферическом микроциркуляторном русле как в многоуровневой гидродинамической сети связанных эластичных резервуаров для определения динамической связи между низкоинтенсивными случайными воздействиями на сердце и низкочастотными колебаниями кожного кровотока; моделирование фагоцитарного ответа гранулоцитов крови человека на микробную провокацию у здоровых и больных СД2Т для определения нарушений динамической регуляции активации NADPH-оксидазы при патологии как патогенетических факторов, изменяющих регуляцию микрогемодинамики периферического кровотока; моделирование воротного механизма одиночного калиевого канала с учетом гидрофобных свойств поры и влияния электрического трансмембранного потенциала на динамику воротных частиц для выяснения механизма немарковской регуляции ионного тока через канал; математическое моделирование солитоноподобной динамики азотистых оснований в искусственных и природных молекулах ДНК для выявления зависимости активации и распространения открытых состояний в ДНК от функционально значимых участков в рассматриваемых

последовательностях с учетом внешних воздействий и выявления динамической регуляции экспрессии генов.

I.6 Методология и методы диссертационного исследования

Методология исследования заключалась в выборе адекватных физических аналогов и применении соответствующего математического аппарата к описанию динамических свойств и уникальных функциональных особенностей биологических систем на разных уровнях сложности их структурной и функциональной организации. Выбор физических аналогов обуславливался уникальными структурными свойствами изучаемых биологических систем. Были рассмотрены три уровня сложности, которые далеко не исчерпывают все многообразие сложности биологических объектов, но отражают ключевые подходы к описанию их биофизических свойств на организменном и молекулярно-клеточном уровнях иерархии. Построение математических моделей основывалось на анализе экспериментальных и теоретических данных о структурной организации и динамической подвижности, а также выборе ключевых моментов, достаточных для описания основных функций рассматриваемых систем. Экспериментальные и теоретические данные использовались для параметризации моделей и проверки их адекватности и области применимости. Для выявления механизмов динамической регуляции биофизических процессов, определяющих функционирование рассматриваемых биологических системах, использовались воздействия такие как: стационарные, квазистационарные, стохастические и периодические. Все модели представляют собой нелинейные имитационные модели, описывающие ограниченное число степеней свободы. Все модели, за исключением модели «PNEUMA», представляют собой оригинальные разработки диссертанта с учетом теоретических наработок других авторов.

I.7 Теоретическая значимость работы

Диссертация посвящена выявлению динамических свойств регуляторных механизмов, определяющих динамическую регуляцию биофизических процессов в различных биологических системах в покое и при внешних воздействиях с использованием методов математического моделирования. Как показали результаты исследований, использование математических моделей, основанных на физических аналогах, существенно продвигает нас в понимании фундаментальных механизмов динамического поведения и регуляции процессов функционирования биологических систем. Вместе с тем, в ходе применения физических моделей к живым системам, обнаруживаются ограничения, обусловленные использованием аналогов из неживой природы. Дальнейшее развитие этого направления связано с последовательным снятием этих ограничений и адаптацией физических моделей к описанию биологических динамических систем.

I.8 Практическая значимость работы

Разработанные математические модели сердечно-сосудистой системы человека, фагоцитарного ответа нейтрофилов на микробную провокацию, воротного механизма ионного канала и неоднородной ДНК будут полезны в неинвазивной оценке и прогнозировании состояния сердечно-сосудистой системы в рамках персонализированной медицины, состояния иммунной системы, в драг-дизайне и фармакологии, а также в разработке компьютерных вычислительных чипов на основе ДНК. Построенные модели позволяют уточнить механизмы динамической регуляции сердечного ритма и капиллярного кровотока при низкочастотном и шумовом воздействии, активации и функционирования NADPH-оксидазы в гранулоцитах крови при гипергликемии и развитии СД2Т, проводимости ионных каналов в биологических мембранах при разных электрических стимулах и экспрессии генов в ДНК. Результаты, изложенные в диссертации, несомненно, имеют фундаментальную и

практическую ценность и могут найти применение в учебных курсах для обучения студентов приемам и методам моделирования живых систем.

I.9 Положения, выносимые на защиту

1. Проведено уточнение математической модели «PNEUMA», в рамках которой установлен новый механизм динамической регуляции variability сердечного ритма, зависящей от амплитуды респираторного водителя ритма в условиях контролируемых режимов дыхания.
2. Разработана гидродинамическая модель сердечно-сосудистой системы и микроциркуляторного русла человека. С помощью модели показана динамическая связь между случайными воздействиями на сердце и низкочастотными колебаниями кровотока в периферическом микроциркуляторном русле, формируемая без участия вегетативной нервной системы.
3. Построена математическая модель фагоцитарного ответа гранулоцитов крови на микробную провокацию. Обнаружены нарушения динамической регуляции активации NADPH -оксидазы у больных сахарным диабетом 2-го типа при разных уровнях *D*-глюкозы, которые могут быть патогенетическими факторами, изменяющими микрогемодинамику конечностей у больных.
4. Построена уточненная модель воротного механизма одиночного ионного канала в биологической мембране. Показан новый механизм динамической регуляции скорости вытеснения молекул воды из гидрофобной поры канала, объясняющий колоколообразную зависимость параметров немарковской кинетики ионного тока через канал от трансмембранного электрического потенциала.
5. Предложена модель угловых колебаний азотистых оснований ДНК с учетом ее неоднородной структуры. Разработан новый метод оценки

энергетического профиля молекулы ДНК. Показана взаимосвязь между динамикой локально расплетенных участков (кинков) в ДНК с функционально значимыми участками молекулы и возможность динамической регуляции экспрессии генов.

I.10 Степень достоверности

Предложенные математические модели динамической регуляции функционирования биологических систем разработаны на основе собственных экспериментальных данных и данных литературы. Численный анализ моделей проводился в среде Matlab (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA) с использованием современных методов компьютерного анализа, широко применяемого в мировой практике. Для численного решения уравнений использовались стандартные схемы численного интегрирования: Рунге-Кутты 4 порядка, Dormand–Prince, Кранка-Николсона. Обоснованность полученных результатов подтверждалась согласованностью результатов численного моделирования с полученными экспериментальными данными. Достоверность теоретических результатов, полученных в работе обоснована приведенными доказательствами и корректностью математических преобразований, и дополнительно подтверждена результатами вычислительных экспериментов, приведенных в литературе. Достоверность полученных результатов обусловлена также их обсуждением на научных семинарах и конференциях и экспертизой при публикации в научной печати.

I.11 Личный вклад

Все результаты были получены автором, включая: разработку математических моделей; постановку численных экспериментов и проведение численных расчетов; участие в проведение экспериментов *in vivo* и *in vitro*; разработку методов обработки данных и обработку экспериментальных и модельных данных; участие в написании рукописей.

I.12 Публикации

Всего опубликовано 43 статьи в отечественных и зарубежных рецензируемых научных журналах, из них по теме диссертации 20, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и РИНЦ. Кроме того, опубликована 1 монография и получено 1 свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ.

I.13 Апробация результатов

Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях (статьи в сборниках – 3, тезисы – 16, доклады – 16): 19я, 20я, 21я, 22я Международные конференции «Математика. Компьютер. Образование.» (Дубна, 2012, Пущино, 2013, Дубна, 2014, Пущино, 2015); Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика' 13, 14» (Пущино, 2013, 2014); 18я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2014); Международная междисциплинарная научная конференция с элементами научной школы для молодежи «Синергетика в естественных науках» (Тверь, 2013, 2015); V международной конференции «Математическая биология и биоинформатика» (Пущино, 2014); Saratov Fall Meeting 2016: Laser Physics and Photonics XVII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data III (Saratov, 2016); Научная конференция «День ДНК – 2021» (Пущино, 2021); XVI Международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2021» (Севастополь, 2021); Международная конференция "Самарские чтения" (в память об академике А.А. Самарском) (Москва, 2021).

I.14 Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 521

источник. Диссертация изложена на 330 страницах машинописного текста, иллюстрирована 76 рисунками и 21 таблицей.

II. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

II.1 Регуляция в биологических системах

В ходе развития биологической науки сформировалась точка зрения, что регуляция является общей чертой всех живых существ и играет ключевую роль в существовании жизни на Земле (Bich et al. 2016). Действительно, это хорошо прослеживается в исторической перспективе, начиная от работ Клода Бернара и Кэннона о гомеостазе, кибернетического взгляда на контроль процессов в живых системах Винера и Эшби, продолжая работами Джейкоба и Моно о значимости регуляции в молекулярной биологии и заканчивая сетевыми теориями и теориями самоорганизации, составляющими один из концептуальных взглядов на регуляцию в современной системной биологии (Bernard, 1878; Cannon, 1929; Wiener, 1948; Ashby, 1956; Jacob, 1970; Monod, 1970; Kitano, 2001; Bich et al. 2016). Кроме того, в последние 15 лет сложилась точка зрения, что регуляция представляет собой определяющее свойство жизни, или является ее абсолютным критерием (Bich and Damiano, 2012; Tsokolov, 2010; Griesemer and Szathmáry, 2009).

II.1.1 Общие представления о регулировании в биологических системах

Регуляторные механизмы, общей целью которых является компенсация воздействий, оказываемых на биологическую систему со стороны окружающей среды, очень разнообразны (Bich et al. 2016). В одних случаях эти механизмы определяются свойствами распределенной метаболической сети, в других в основе лежат более сложные обособленные структурированные механизмы. В целом они включают гомеостаз активных метаболитов, генетически контролируемые диауксические сдвиги и метаболическую адаптацию,

аллостерическое ингибирование, действие петель обратной связи, молекулярные переключатели и пороговую активацию процессов, модуляцию активности ферментов посредством каскадов ковалентных модификаций и т.д. (Fell, 1997; Zaslaver, et al. 2004; Monod et al. 1965; Tsokolov, 2010; Chalancon et al. 2012; Ganti, 2003).

На сегодняшний момент активно развивается концепция иерархически организованных архитектур регуляции (узко специализированной регуляции, см. ниже), которые более сложны и отличаются от коллективных или распределенных механизмов управления, действующих в биологических системах (Vich et al. 2016). Важно учитывать это различие для изучения адаптивных способностей живых систем и происхождения их организационной сложности. Проблема состоит в том, что на данный момент исследовано множество условий, при которых живые системы продемонстрировали свои удивительные адаптационные способности, но оказалось, что этого недостаточно для понимания того, как адаптационное поведение на самом деле реализуются в каждом из случаев, особенно когда его реализация очень специфична для разных систем и масштабов структурно-функциональной организации. Решение этой проблемы возможно при использовании подхода, где регуляторные механизмы имеют специфическую структурно-функциональную организацию, ответственную за такое различное поведение. Это означает, что анализ таких компенсаторных механизмов должен проводиться не только на локальном, но и на широком системном структурном уровне, включающем механизмы со сложной архитектурой функциональных отношений, способствующие эффективному функционированию системы при внешних воздействиях. В этом контексте важно различать регулирующие и регулируемые компоненты системы. Это является фундаментальным моментом в изучении и понимании архитектурно спроектированных регуляторных механизмов. Хорошим примером такой регуляции являются бактерии, для которых хорошо известны два основных способа приспособления к изменениям окружающей среды — хемотаксис и контроль синтеза белка.

II.1.2 Регуляция как динамическая устойчивость

Фундаментальным свойством живых систем является то, что биохимические/биофизические процессы, протекающие в них, поддерживают состояния, которые далеки от термодинамического равновесия (Ganti, 2003). Это происходит за счет двух базовых типов контроля: кинетический, определяемый кинетикой ферментативных реакций, и пространственный, определяемый компартиментизацией и избирательной пропускной способностью границ для разных веществ. Эти два вида контроля, осуществляющих локальный контроль процессов в живых системах, должны быть организованы на системном уровне таким образом, чтобы их взаимодействие способствовало поддержанию необходимых для жизнедеятельности условий по циклическому принципу с использованием обратных связей (Moreno and Mossio, 2015). Также это называют конститутивной или сетевой регуляцией (Vich et al. 2016).

Такой вид смешанного контроля способен реагировать и приспосабливаться под внешние воздействия. Это происходит путем перераспределения связей между компонентами сети. Другими словами, система стремится сохранить свое состояние, что, по сути, есть проявление динамической устойчивости (Rosen, 1970). При этом в системе должен быть хотя бы один аттрактор в фазовом пространстве. Выведенная из равновесного состояния внешним воздействием система стремится к этому аттрактору как бы «поглощая» внешнее возмущение (Waddington, 1968). Один из способов представить примитивную форму конститутивной динамической устойчивости, которая могла использоваться протоклетками как примитивный механизм адаптации, был предложен Димером (Deamer, 2009). Это модель везикулы с внутренним метаболическим циклом, скорость которого зависит от проникающих через мембрану малых молекул субстрата, которые используются для синтеза больших молекул, способных взаимодействовать с мембраной и увеличивать ее проницаемость для молекул субстрата. Более сложная модель конститутивной динамической устойчивости с более сложным механизмом

системной организации – это хемотон Ганти (Ganti, 2003a). Хемотон представляет собой гипотетическую систему, организованную как биохимический «часовой механизм», в котором три автокаталитических реакционных петли (метаболический цикл, цикл репликации шаблонов и компартмент) напрямую связаны друг с другом, как химические зубчатые колеса.

II.1.3 Узко специализированная не сетевая регуляция

Считается, что узко специализированный регулирующий контроль требует подсистемы, которая достаточно независима от динамики контролируемых процессов и которую можно изменять, не нарушая эти процессы, но при этом она может быть связана с частями механизма, регулируемой подсистемы, чтобы иметь возможность модулировать ее работу (Bechtel 2007). Так обстоит дело, например, с путем сигнальной трансдукции (регулирующая, R), действующим на конститутивный режим (C) бактерии (метаболизм и жгутик) на примере бактериального хемотаксиса. Вместе с тем, в минимальных живых системах (бактерии) сложно разделить узко специализированную регуляторную подсистему R от конститутивной C по выраженным структурным мотивам. Поэтому используют динамическое разделение, где предполагается, что операционная (регуляторная) активность не определяется метаболизмом конститутивных процессов или «стехиометрически свободна» от активности конститутивной подсистемы C (Griesemer and Szathmáry, 2009). Активность R запускается конкретными изменениями внутренних и/или внешних условий. При этом, активность зависит только от собственной внутренней конфигурации R, а не от изменения уровней концентрации ее компонент, обусловленных работой C. Например, в случае хемотаксиса ключом является структура белка CheY и его переменное сродство к различным молекулярным комплексам (таким как рецептор и жгутик), а не изменение его концентрации. Такая регуляция

функциональной активности С со стороны R качественно отличается от регуляции, основанной на динамической устойчивости.

Таким образом, механизм узко специализированной регуляции, функционально направленный на модуляцию функциональной активности регулируемой конститутивной подсистемы, определяется рядом условий (Vich et al. 2016):

- Регуляторные подсистемы R формируются эндогенно: т. е. они производятся конститутивным режимом С живой системы;
- Чтобы обладать узко специализированной регуляцией, подсистема R должна быть динамически отделена от С, которую она регулирует. Это означает, что R, даже если она является продуктом С, действует в другом динамическом масштабе и при других стехиометрических требованиях, чем С;
- Активация R запускается конкретными изменениями/возмущениями во внутренних или внешних условиях, а не изменением концентрации компонентов в R;
- Функциональная роль R заключается в переключении (обратимом или необратимом) между отдельными конститутивными/метаболическими режимами С, С', С"... доступными для системы, в зависимости от воздействий, которые активируют R;
- Новые метаболические/конститутивные режимы С', создаваемые R, способны справляться с новыми условиями, расширяя диапазон воздействий/стимулов, на которые система может реагировать быстро и эффективно, а также обогащают сферу доступных функциональных возможностей.

III.1.4 Действие узко специализированной регуляции на примере экспрессии lac-оперона

Узко специализированные регуляторные механизмы можно обнаружить в контроле процессов синтеза белков (Davidson, 2006). Организмам необходимо

определить, какие белки/ферменты производить, исходя из наличия определенных аминокислот и других характеристик окружающей среды. Синтезировать все кодируемые белки постоянно просто невозможно из-за внутренних пространственных и энергетических ограничений. Вот почему каждая клетка должна быть способна модулировать пути производства белка, активируя или ингибируя их, в зависимости от ее конкретных внутренних/внешних условий.

Хорошей моделью является регуляция транскрипции *lac*-оперона — набора генов, ответственных за синтез трех ферментов, участвующих в метаболизме лактозы (Jacob and Monod, 1961; Vich et al. 2016). Синтез активируется в присутствии лактозы и, одновременно, при отсутствии глюкозы, предпочтительного исходного субстрата. Узко специализированная регуляция транскрипции *lac*-оперона предполагает активность сложной подсистемы, включающей белки и гены, способной модулировать активность конститутивного процесса (в данном случае метаболизма сахаров), позволяя переключаться между различными сахарами (глюкоза и лактоза) в зависимости от их наличия в окружающей среде. Переключение между режимами транскрипции происходит за счет действия транскрипционных факторов (репрессоров и активаторов). Транскрипция *lac*-оперона подавляется *lac*-репрессором в отсутствие лактозы. В присутствии лактозы репрессор аллостерически ингибируется, и транскрипция *lac*-оперона активируется. Однако, ингибирования *lac*-репрессора недостаточно для транскрипции оперона, поскольку при наличии и глюкозы, и лактозы оперон репрессируется. Существует второй регуляторный белок CAP (белок-активатор катаболита), который положительно контролирует активность РНК-полимеразы, связываясь с промотором. Этот белок аллостерически контролируется циклическим аденозинмонофосфатом (цАМФ). В присутствии высоких концентраций цАМФ из-за отсутствия глюкозы CAP связывается с промотором. В присутствии глюкозы уровень цАМФ снижается и CAP ингибируется. Такая регуляция диауксических сдвигов метаболизма сахаров действительно является узко

специализированной, т.к. она функционально не зависит от функционирования регулируемой конститутивной подсистемы метаболизма сахара, а контролируется только наличием лактозы или глюкозы в среде. Также она не зависит от концентраций *lac*-репрессора и CAP (стехиометрически «свободна»), а зависит скорее от молекулярной структуры регуляторных белков, т.е. их способности связываться с ДНК.

II.1.5 Динамическая регуляция

Термин «динамическая регуляция» активно и широко используется в генной и метаболической инженерии (Venayak, et al. 2015; Brockman and Prather, 2015; Ni, et al. 2021). Он применяется для обозначения динамического контроля метаболических путей и их физиологического состояния при адаптации и функционировании живых систем в динамической среде. Как правило в качестве живых систем рассматриваются микроорганизмы, которые естественным образом сталкиваются с множественными адаптационными компромиссами и управляют ими, динамически регулируя экспрессию генов. Действительно, при анализе тенденций динамической транскрипции в системах биосинтеза аминокислот у *Escherichia coli* было показано, что присутствие аминокислот в среде приводит к снижению транскрипции генов соответствующего метаболического потока (Zaslaver, et al. 2004). В связи с этими, термин «динамическая регуляция» в полной мере можно применять к обозначению узко специализированной регуляции, описанной выше.

В метаболической инженерии часто в одних случаях статическое вмешательство в определенные метаболические потоки, полезные для производства целевых метаболитов (продуктов), может быть вредным для клетки-хозяина (Ni, et al. 2021). В других случаях специфическая природа промежуточного продукта или фермента требует временных задержек при его утилизации или образовании. Для решения этих проблем используют динамический контроль, который может быть реализован либо с помощью

стратегий, специфичных для метаболического потока, либо с помощью стратегий, независимых от потока (Doong et al. 2018). Системы регуляции, специфичные для потока, контролируют экспрессию ферментов потока в ответ на изменения концентрации соответствующего промежуточного или побочного продукта. Для реализации такого динамического контроля требуется биосенсор, который может обнаруживать изменение концентрации субстрата или метаболита, а затем активировать ответ в результате обнаружения (Liu et al. 2015). Стратегии динамической регуляции, не зависящие от потока, основаны или на изменении состава питательной среды, или на регулировании численности популяции клеток (Li et al. 2011; Bothfeld et al. 2017).

Таким образом, концепция динамической регуляции имеет хорошие теоретические перспективы в объяснении и понимании широкого спектра адаптационных механизмов и сложного поведения живых систем. Схематически динамическая регуляция представлена на рисунке II.1.

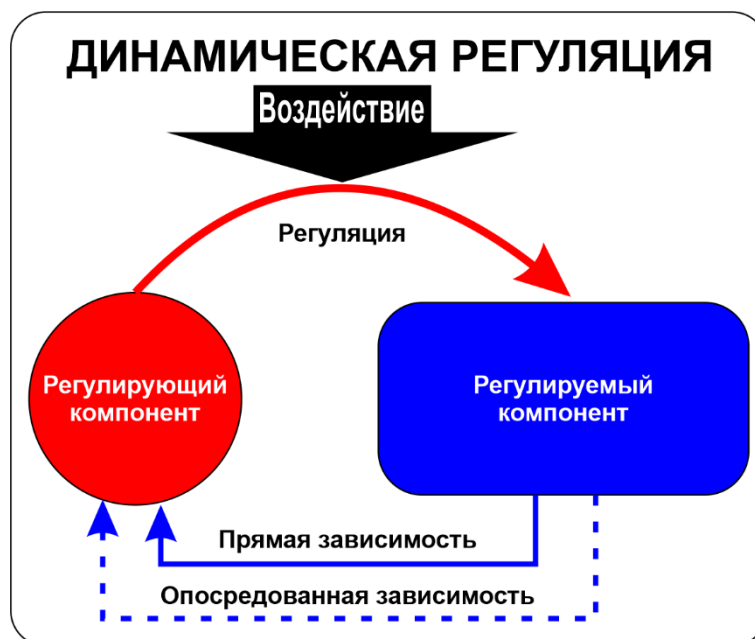


Рисунок II.1. Схема концепции динамической регуляции.

Регулирующий компонент имеет узко специализированную функцию — осуществлять регуляцию регулируемого компонента (например,

конститутивной метаболической сети), и может зависеть прямым или опосредованным образом от его динамических переменных. Однако, динамика самой регуляции зависит только от изменений в окружающей среде, что представляет регуляцию второго порядка и является ключевым моментом в динамической регуляции (Vich et al. 2016).

Динамическая регуляция позволяет живым организмам приспособливаться к более широкому классу воздействий и изменений окружающей среды, что способствует увеличению не только жизнеспособности организмов, но и сложности их структурно-функциональной организации. Если рассмотреть сложную высоко распределённую конститутивную динамически устойчивую сеть без узко специализированных регуляторных модулей внутри нее, то при внешних воздействиях такая сеть будет сталкиваться с адаптационными трудностями как с точки зрения эффективности, так и с точки зрения сложности (Christensen, 2007). В этой ситуации достижение компенсаторного ответа зависит от распространения изменений посредством множества локальных взаимодействий по всей сети. Следовательно время, необходимое для реализации ответа, может быть длительным и, что особенно важно, становится все более продолжительным по мере увеличения размера системы. Вместо этого динамическое регулирование стимулирует более эффективную модель поведения за счет быстрых переключений между доступными режимами посредством специальных механизмов, действующих в отношении конкретных возмущений. Кроме того, степени свободы такой регуляторной динамики не имеют жесткого ограничения со стороны структурно-функциональных ограничений регулируемой конститутивной сети благодаря отсутствию жестких динамических связей. Следовательно, они могут подчиняться собственной автономной динамике и способствовать более высокому уровню организационной сложности. Фактически динамическое регулирование создает основу для иерархии средств контроля и функций, формирующихся в системе (Moreno and Mossio, 2015).

Анализ современного развития концепции динамической регуляции показал, что основные живые системы, рассматриваемые в рамках этой парадигмы, ограничиваются классом микроорганизмов. Важно как расширять это представление на более высокие уровни структурно-функциональной организации живой материи, так и искать новые регуляторные механизмы, чтобы приблизиться к пониманию сложного функционального поведения живых организмов. В дальнейших разделах рассматриваются различные биологические системы, функциональное поведение которых исследуется в диссертации.

II.2 Вариабельность сердечного ритма и феномен респираторной синусовой аритмии

Вариабельность сердечного ритма (ВСР) человека представляет собой изменение интервала времени между началом одного цикла сердечного сокращения и началом другого, следующего, цикла. Она связана с базовыми механизмами человеческого организма, определяющими его адаптационную способность к изменению внешних и внутренних факторов, таких как физические нагрузки, положение тела, психоэмоциональные состояния и др. (Баевский и Берсенева, 1997).

II.2.1 Вариабельность сердечного ритма как маркер нарушений вегетативной нервной регуляции

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения причиной большей части (приблизительно 70%) всех смертей в мире являются неинфекционные хронические заболевания. К ним относятся сердечно-сосудистые заболевания, рак, хронические респираторные заболевания, диабет и др. Несмотря на многочисленные исследования механизмы, приводящие к развитию этих заболеваний, до сих пор остаются не ясными. Кроме того, их глобальная распространенность растет, и это приводит к растущим социальным и экономическим последствиям (Yach, et al. 2004; Fournié, et al. 2021).

Хронические заболевания во многом связаны с нарушениями баланса вегетативной нервной системы (ВНС). Следствием нарушений может быть повышенная симпатическая активность и сниженная парасимпатическая активность (Zalewski, et al. 2018). Такой дисбаланс может быть как результатом болезни, так и основным фактором риска, обуславливающим патогенез заболевания. Патологические изменения могут быть связаны с гиперсекрецией гормонов стресса (например, кортизола, норадреналина), изменением сна, высвобождение провоспалительных факторов (например, IL-6), гипертонией или иммунной дисфункцией, которые, в свою очередь, способствуют ухудшению течения заболевания и развитию сопутствующих осложнений (Chrousos, 2009).

Для оценки функционального состояния вегетативной нервной системы человека используется такой физиологический показатель, как ВСР (Shaffer, et al. 2014). Показано, что ВСР величина не постоянная, а изменяется во времени и представляет из себя сложный колебательный процесс, спектральный состав которого включает в себя несколько частотных диапазонов: очень низкочастотный (VLF, 0.0033–0.04 Гц), низкочастотный (LF, 0.04–0.15 Гц) и высокочастотный (HF, 0.15–0.4 Гц) (Berntson, et al. 1997; Kleiger, et al. 2005). Очень низкочастотный компонент наименее изучен с точки зрения механизмов его формирования. Считается, что он связан с регуляцией сердечного ритма различной природы, включая гуморальную и термальную (Task Force, 1996). Низкочастотный компонент в основном характеризует симпатическую и, отчасти, парасимпатическую систему регуляции сердечного ритма, а высокочастотный компонент обусловлен парасимпатической регуляцией (Shaffer and Ginsberg, 2017; Task Force, 1996). В прогностических целях обычно рассматривают только низкочастотный и высокочастотный компоненты, отношение которых LF/HF определяет симпато-вагальный баланс (Shaffer and Ginsberg, 2017).

II.2.2 Связь ВСП с респираторной системой

Установлено, что ВСП тесно связана с дыханием (Angelone and Coulter 1964; Bernardi, et al. 2001; Cohen and Taylor 2002; Gang and Malik 2003; Tripathi 2004). Эта связь заключается в циклическом увеличении частоты сердечных сокращений (ЧСС) в фазу вдоха и её уменьшении в фазу выдоха. Связь ВСП с дыханием называют респираторной синусовой аритмией (РСА). При этом в спектре плотности мощности формируется спектральная компонента с частотой, совпадающей с частотой дыхания. При спонтанном естественном дыхании она характеризуется высокочастотной HF спектральной компонентой ВСП. РСА является частотно-зависимым физиологическим феноменом. При изменении частоты дыхания выраженность РСА изменяется. Степень выраженности дыхательного ритма в ВСП носит нетривиальный характер. Она снижается с увеличением частоты и изменяется резонансоподобным образом с уменьшением частоты дыхания (Berger, et al. 1989; Kromenacker, et al. 2018, Taylor, et al. 2001; Song, et al. 2003; Киселев и др. 2005; Тюрина и др. 2011; Krasnikov, et al. 2013). Дыхание отличное от спонтанного естественного дыхания называют контролируемым дыханием. Если частота контролируемого дыхания ниже частоты спонтанного дыхания в покое (приблизительно 0.25 Гц), то его называют медленным контролируемым дыханием. Например показано, что при медленном контролируемом дыхании при навязанных частотах дыхания 0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.16 и 0.25 Гц, а также при контроле глубины и формы экскурсий грудной клетки, зависимость спектральных компонент ВСП на частоте дыхания от этой частоты представляет куполообразную кривую с пиком на частоте 0.1 Гц (Krasnikov, et al. 2013). Эта кривая, по сути, описывает зависимость РСА от частоты дыхания.

Существует две основные гипотезы, объясняющие феномен РСА: 1) центрогенная теория; 2) механизм обратной барорефлекторной петли (Bernardi, et al. 2001; Cohen and Taylor, 2002; Киселев и Гриднев, 2011; Clemson, et al. 2022). Последний включает в себя нелинейные компоненты, которые могут приводить к нелинейным эффектам зависимости ВСП от частоты дыхания. Кроме того,

вегетативный контроль сердечного ритма сам может изменяться с изменением частоты дыхания (Taylor, et al. 2001; Киселев и др. 2005). Например, экспериментально было показано (Taylor, et al. 2001), что помимо общепринятой точки зрения, рассматривающей РСА как вагогенный феномен (Kromenacker, et al. 2018), значимую роль в её формировании играет и симпатическая иннервация, особенно при редком дыхании.

Ясного и однозначного понимания механизмов формирования колоколообразной зависимости ВСП от частоты дыхания в условиях контролируемого дыхания нет. Вышеназванные гипотезы не объясняют форму этой зависимости. Например, до сих пор не ясно, является ли куполообразный вид кривой следствием непосредственного контроля со стороны центральной нервной системы или это результат чисто физического взаимодействия двух или нескольких колебательных систем. Возможно, причиной являются оба фактора, тогда каков вклад каждого из них? Что касается вегетативного контроля, то хотелось бы знать, модуляция какого из отделов – симпатического или парасимпатического – может приводить к столь нетривиальной зависимости?

Особый интерес представляет частота 0.1 Гц, на которую приходится максимум резонансно-подобного изменения ВСП при медленном контролируемом дыхании. Считается, что колебания на частотах близких к частоте 0.1 Гц являются одним из основных показателей состояния ССС. Дело в том, что эти колебания широко распространены в ССС и чувствительны к различным факторам. Они присутствуют в вариабельности сердечного ритма (Malpas, 2002; Cohen and Taylor, 2002), в изменениях давления (волны Майера) (Cohen and Taylor, 2002) и в динамике кровотока (Bernardi, et al. 1997; Stefanovska, et al. 1999). Составляющая колебаний кровотока или давлений на этой частоте хорошо чувствует различные по природе воздействия на организм человека в том числе влияние магнитного поля (Yan, et al. 2011), или психоэмоциональные переживания (Bernardi, et al. 2009). Механизмы формирования 0.1 Гц колебаний также объясняют вышеозначенными гипотезами, хотя этот вопрос во многом остается дискутируемым. Особенно

мало изучен этот вопрос для наблюдаемой синхронизации колебаний между различными физиологическими сигналами, включая синхронизацию между колебаниями показателей микроциркуляции на различных участках кожи (Liao and Jan, 2012; Кирилина и др. 2009), давления крови и variability сердечного ритма (Karavaev, et al. 2009), давления крови, variability сердечного ритма и респираторного ритма (Prokhorov, et al. 2003), давления крови и показателя периферической микроциркуляции (Kiselev, et al. 2012).

II.2.3 Математическое моделирование 0.1 Гц колебаний в ССС

Среди большого количества моделей, описывающих механизмы формирования 0.1 Гц колебаний в ССС, можно выделить несколько подходов. Ряд авторов считают, что это низкочастотные возбуждения ствола головного мозга (Seydnejad and Kitney, 2001), другие используют для объяснения низкочастотные флуктуации периферического сопротивления (Ursino and Magosso, 2003a), третьи полагают, что за это ответственны нелинейные эффекты, включая бифуркацию Хопфа (Гринченко и Рудницкий, 2006) и мультифрактальное поведение (Kotani, et al. 2005), а четвёртые основываются на низкочастотной составляющей дыхательного ритма, как следствие его неравномерности (Yildiz and Ider, 2006). В целом, механизмы формирования 0.1 Гц колебаний в ССС рассматриваются, на сегодняшний момент, с точки зрения автономного контроля (Киселев и Гриднев, 2011). Вопрос, связанный с ролью структурных и гидродинамических свойств самого сердечно-сосудистого русла в широкой распространенности 0.1 Гц колебаний в ССС, пока остается открытым. В частности, параметры эластичности и резистивности сосудов и особое расположение сосудов в большом круге кровообращения могут быть основной предпосылкой к формированию колебаний скорости кровотока и давления с частотами, близкими к 0.1 Гц, которые принято называть волнами Майера.

В следующем разделе будут рассмотрены колебания в периферическом кровотоке и их связь с гидродинамическими параметрами сосудистого русла.

II.3 Колебания микроциркуляторного кровотока

Микроциркуляция является важнейшим звеном сосудистой системы и состоит из сосудов малого калибра (артериол, капилляров и венул). Колебательный характер кровотока в микрососудистом русле обусловлен не только сердечной деятельностью, но и различными регуляторными системами. Часть из них связаны с гладкомышечными клетками, окружающими артериолы, ответственными за регуляцию их тонуса. Регуляция микроциркуляторного кровотока является одним из способов поддержания гомеостаза сердечно-сосудистой системы.

Микроциркуляция — это хороший пример мезомасштаба в физиологических системах. Она является соединяющим звеном между макроскопическими (сердце, крупные сосуды, респираторная система, нервная система, другие органы и ткани) и микроскопическими (клетки и субклеточные элементы) системами и процессами в организме. Исследование микроциркуляции представляет собой пример подхода к изучению биологических функций не "сверху вниз" или "снизу вверх", а "из середины наружу" (Secomb and Pries, 2011). Вычислительные и математические подходы могут быть использованы для анализа функционирования микроциркуляции и установления количественных отношений между микрососудистыми процессами и явлениями, происходящими на разных масштабах. Это дает понимание происходящих явлений, которое сложно получить только с помощью узко специализированных биологических экспериментов. Учитывая интегративный подход к процессам, протекающим в разных масштабах, и делая акцент на комплексном использовании теоретических и экспериментальных подходов, исследования микроциркуляции относятся к современным определениям системной биологии.

II.3.1 Общая анатомия микроциркуляции

Микроциркуляторное русло представляет собой разветвленную сеть сосудов, замыкающую большой круг кровообращения между артериями и венами (Guven et al. 2020). Микрососуды, представляют собой сосуды малого калибра диаметром <20 мкм. Они состоят из артериол, капилляров, посткапиллярных венул, и их клеточных/субклеточных компонент (Рисунок II.2.1). Микроциркуляция является конечным функциональным звеном сердечно-сосудистой системы и отвечает за перенос кислорода от красных кровяных телец (эритроцитов) в капиллярах к паренхиматозным клеткам. Кислород необходим для удовлетворения энергетических потребностей клеток тканей в процессе их функционирования. Кроме того, микроциркуляция обеспечивает доставку растворенных в крови гормонов и питательных веществ к клеткам окружающих тканей и отвод метаболитов, а также опосредование функциональной активности иммунной системы и гемостаза. Это, возможно, самый важный отдел ССС, поскольку он находится в прямом контакте с паренхиматозными клетками, которые полагаются на его правильную функцию для поддержания своей жизнеспособности и нормального функционирования органа(ов).

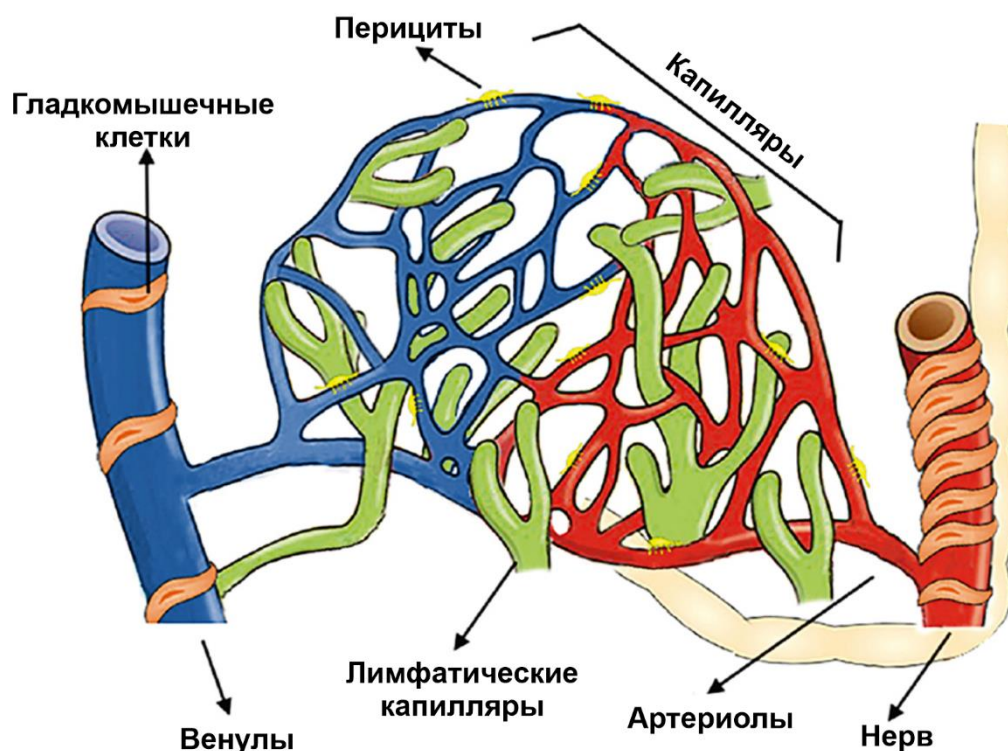


Рисунок П.2.1. Анатомическая структура микроциркуляторного русла.

Сосуды микроциркуляторного русла выстланы эндотелиальными клетками (ЭК). Эти клетки содержат фенестрации и поры и удерживаются вместе различными молекулами, в том числе кадгеринами, а также токопроводящими щелевыми контактами, которые обеспечивают восходящую электрическую связь между ЭК. Эти эндотелиальные структуры могут различаться по плотности и морфологии в разных органах и сосудах. ЭК совместно с гладкомышечными клетками регулируют микроциркуляторный кровоток преимущественно за счет вазомоций артериол и прекапиллярных сфинктеров (Czacowski and Roustit, 2020). Кроме того, в отличие от микроциркуляции внутренних органов, периферическая кожная микроциркуляция имеет анатомические особенности, которые выражаются в наличие артериовенозных анастомоз. Эти структуры также регулируют микроциркуляторный кровоток, обеспечивая терморегуляцию кожи. Считается, что регуляция микроциркуляторного кровотока осуществляется 3-мя основными механизмами: миогенным, метаболическим и нейрогуморальным.

Микроциркуляция имеет ключевое значение для функционирования различных органов, например, почек. В случае почек значимость микроциркуляции связана с важной ролью кислорода в фильтрующей функции почек (Zafrani and Ince 2015; Post et al. 2017). Большая часть (>80%) кислорода, доставляемого в почки, используется для производства АТФ, необходимого Na^+/K^+ -насосам, активность которых необходима для канальцевой реабсорбции натрия (Welch, 2006). Также, микроциркуляция играет важнейшую роль в функционировании кожи, которая является самым большим органом в организме человека. Она занимает примерно 1.8 м^2 площади и составляет 6%, то есть примерно 1/16 от общей массы тела (Leider, 1949). Кожа выполняет ряд важных функций, необходимых для нормальной жизнедеятельности человека: защита и гидроизоляция внутренних органов; сенсорное восприятие; терморегуляция.

II.3.2 Анатомия кожной микроциркуляции

В норме кожная микроциркуляция организована в виде двух сплетений, параллельных поверхности кожи (Рисунок II.2.2) (Braverman, 2000). Верхнее сплетение, расположенное в сосочковом слое дермы, обуславливает питание кожи. Оно состоит из мелких артериол и венул, наружным диаметром около 20 мкм, с капиллярными петлями, которые направлены перпендикулярно поверхности кожи (Yen and Braverman, 1976). Все это находится в пределах 1 мм от поверхности. Нижнее сплетение расположено на границе дермы и гиподермы и состоит из артерий и вен, отходящих от подлежащей мышечной и жировой ткани и перфорирующих фасцию с образованием восходящих артериол и нисходящих венул, соединенных с верхним сплетением (Braverman and Keh-Yen, 1981). Восходящие артериолы располагаются случайным образом, но примерно через каждые 1.5 мм, разветвляясь, образуют микрососудистые сети вокруг потовых желез и волосяных фолликул.

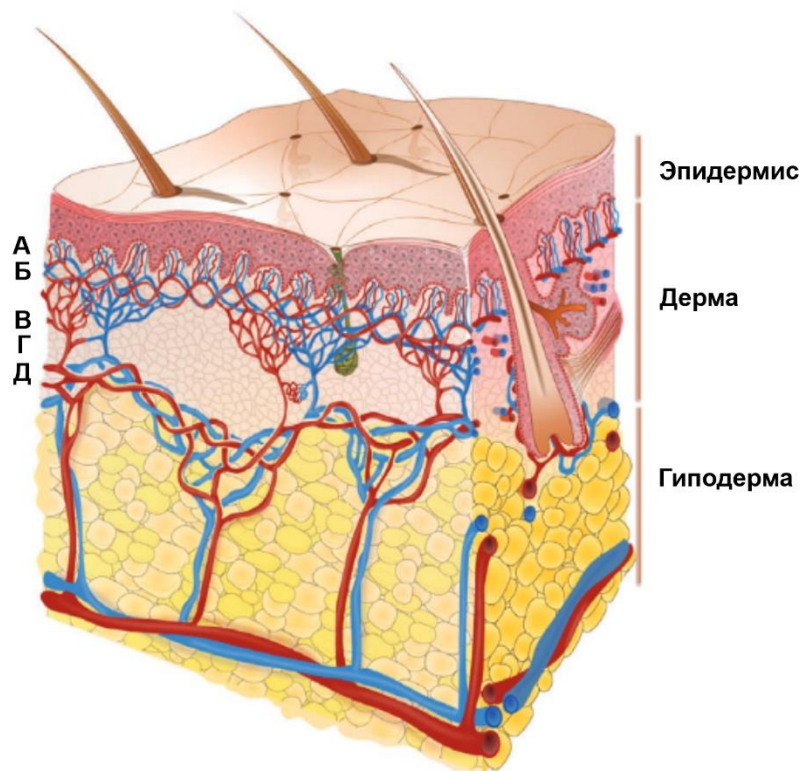


Рисунок II.2.2. Анатомическая структура кожной микроциркуляции (от глубоких слоев к поверхностным): глубокие горизонтальные сплетения (Д), параллельные поверхности кожи на границе дермы и гиподермы; восходящие артериолы (В); поверхностные сплетения (Б), выступающие в дерму; капиллярные петли (А), располагающиеся перпендикулярно поверхности кожи, за исключением определенных областей, таких как ногтевые складки. Артериовенозные анастомозы (Г) проходят через поверхностное сплетение. Они могут иметь как клубочковую, так и продолговатую форму. Другие особенности кожи включают потовые железы (зеленые) и волосяные фолликулы.

Гладкая (не содержащая волосяного покрова) кожа человека содержит артериовенозные анастомозы, специфические терморегуляторные структуры, состоящие из спиральных сосудов с толстыми мышечными и плотно иннервированными стенками, которые соединяют артериолы с венулами в дерме (Рисунок II.2.2) (Flavahan, 2015). Они лежат глубоко в сосочковом сплетении, но ближе к поверхности, чем потовые железы (Sangiorgi, et al. 2004). Артериовенозные анастомозы присутствуют в коже ушей, ладонных

поверхностей кистей и стоп и наиболее многочисленны (около 500/см²) в ногтевых ложах. Однако в коже предплечий или икр они не обнаружены.

По сравнению с другими тканями поверхностный слой артерий кожного микроциркуляторного русла имеет высокую плотность симпатических и парасимпатических нервов, которые не проникают в средний слой (Oaklander and Siegel, 2005). Между тем эти нервные волокна проходят вблизи среднего слоя, который содержит много гладкомышечных клеток (ГМК), что обеспечивает нервную регуляцию тонуса микрососудов кожи (Roustit and Cracowski, 2013).

По мере уменьшения диаметра артерий доля стенки сосуда, занятая ГМК, сохраняется из-за уменьшения количества слоев ГМК до одного слоя в самых маленьких артериолах. Однако фактическая объемная доля ГМК в среде обычно может увеличиваться до 70-85% от общего объема среды, увеличивая способность микроциркуляторных артерий модулировать диаметр сосудов, тем самым контролируя внутрисосудистое давление и, следовательно, поддерживая оптимальную кожную перфузию (Mulvany and Aalkjaer, 1990).

Внутренний слой сосудов выстлан непрерывным одиночным слоем эндотелиальных клеток (эндотелий), который крепится к волнистой внутренней эластичной пластинке, окружающей сосудистую стенку. Сосудистый эндотелий часто выступает через фенестрации во внутренней эластичной пластинке, контактируя с ГМК среднего слоя (Mulvany and Aalkjaer, 1990). Эта важная особенность обеспечивает тесное взаимодействие между эндотелием и ГМК, что имеет решающее значение для регуляции сосудистого тонуса. В коже эндотелий и базальная мембрана сосудов непрерывны (Ono, et al. 2017).

II.3.3 Измерение кожной микроциркуляции методом лазерной доплеровской флоуметрии

Лазерная доплеровская флоуметрия – это метод оптических измерений, который позволяет измерять количество и скорость частиц, переносимых потоком жидкости. С одной стороны, частицы (1–20 мкм) должны быть

достаточно большими, чтобы рассеивать достаточно света для регистрации сигнала, с другой стороны, они должны быть достаточно маленькими, чтобы точно следовать за потоком (Albrecht, et al. 2003). Для регистрации используют когерентный свет (лазеры). При рассеянии когерентного света движением составной среды происходит сдвиг частоты. При воздействии на живую ткань падающий свет рассеивается движущимися красными кровяными тельцами и претерпевает доплеровский сдвиг. Эти сдвиги частоты, происходящие в зондируемом объеме кожи, могут быть соотнесены со скоростью движения эритроцитов. По соглашению, лазерный доплеровский сигнал дает одно значение – величину перфузии, выраженное в произвольных единицах, которое состоит из концентрации эритроцитов в ткани, умноженной на их среднюю скорость (Stern, 1975).

Одноточечная лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) состоит из одного передающего и одного принимающего оптических волокон, разделенных расстоянием 250 мкм в большинстве коммерчески доступных устройств. Это расстояние может быть увеличено для увеличения глубины измерения за счет более высокого отношения сигнал/шум. ЛДФ дает точную количественную оценку быстрых изменений кожного кровотока. Однако региональная неоднородность перфузии кожи приводит к относительно плохой воспроизводимости методики (Roustit, et al. 2010). Даже при контроле местоположения датчика исследования с использованием одноточечной ЛДФ показывают очень плохую воспроизводимость (Shi, et al. 2014).

Использование зондов, состоящих из нескольких собирающих волокон, улучшает воспроизводимость за счет усреднения сигнала от различных объемов рассеяния, тем самым уменьшая пространственную изменчивость за счет более низкого пространственного разрешения и увеличения объема ткани (Agarwal, et al. 2010; Tew, et al. 2011). Важно отметить, что высокая концентрация меланина в коже не оказывает существенного влияния на доплеровский сигнал лазера, что делает его подходящим инструментом для использования на пигментированной коже (Abdulhameed, et al. 2019).

II.3.4 Спектральный анализ колебаний микроциркуляторного кровотока и их связь с регуляторными механизмами

Изучение сигналов кожного кровотока в спектральной области выявляет периодические колебания, которые можно исследовать с помощью различных физических методов (Wacker and Witte, 2013). В отличие от классического преобразования Фурье, оконное преобразование Фурье или вейвлет-преобразование учитывает временную составляющую. Временно-частотные методы являются сложными. Наиболее часто используется непрерывное вейвлет-преобразование для выявления вклада отдельных механизмов регуляции. Другие методы анализа включают: разложение по нелинейным модам для оценки отдельных осцилляторных компонентов, вейвлет-биспектр и кросс-биспектр для выявления нелинейных связей между отдельными осцилляторными модами, вейвлет-амплитудное и фазовое когерентное преобразование для изучения взаимной динамики, а также динамический байесовский вывод для определения функций связи и взаимодействия между отдельными осцилляторными процессами.

Регуляция кожного кровотока сложна и обусловлена влиянием симпатической и сенсорной нервной регуляции с взаимодействием эндотелиальной, миогенной и метаболической регуляции. Считается, что в диапазоне частот от 0.005 до 1.6 Гц существует шесть частотных интервалов (Kvandal, et al. 2006; Kvernmo, et al. 1999, 2003), причем их характерные частоты изменяются со временем. Колебания с самыми высокими частотами приписываются сердцебиению (около 1 Гц), дыханию (0.3 Гц), миогенной активности, также называемой вазомоцией (0.1 Гц), и нейрогенной активности (0.04 Гц). Кроме того, было высказано предположение, что колебания около 0.01 – 0.02 Гц и в интервале 0.005 – 0.0095 Гц являются эндотелий-зависимыми, NO-опосредованными и NO-независимыми, соответственно (Kvandal, et al. 2006; Kvernmo, et al. 1999). Ионофорез с ацетилхолином, эндотелий-зависимым вазодилататором, и нитропруссидом натрия, эндотелий-независимым

вазодилататором, не только увеличивают средний кровоток в несколько раз, но и осцилляторные компоненты. Оба увеличивают амплитуды всех шести упомянутых колебаний по сравнению с нестимулированным кровотоком (Kvernmo, et al. 1999). Однако разница в относительном ответе на оба вещества наблюдалась в пределах двух самых низких интервалов. По этой причине было высказано предположение, что эти колебания являются эндотелий-зависимыми и что неинвазивная методика, основанная на спектральном анализе данных ЛДФ в сочетании с ионофорезом, может быть тестом на функцию эндотелия (Kvernmo, et al. 1999).

Механизмы, обуславливающие низкочастотные колебания, сложны и тесно взаимосвязаны на клеточном уровне (Cracowski and Roustit, 2016; Goodwill and Frisbee, 2012; Roustit and Cracowski, 2013; Shibasaki, et al. 2008; Smillie and Brain, 2011). Эта связь формируется благодаря тому, что гладкомышечные клетки сосудов являются общими эффекторами в процессах эндотелиальной и нейрогенной регуляции. Кроме того, существует прямое взаимодействие между процессами эндотелиальной и нейрогенной регуляции с помощью оксида азота (NO) и пептида, связанного с геном кальцитонина (Shibasaki, et al. 2008; Smillie and Brain, 2011). На сегодняшний момент существуют некоторые противоречия в физиологической трактовке низкочастотных колебаний микроциркуляторного кровотока кожи. Аргументом в пользу эндотелиальной опосредованности колебаний в интервале 0.005-0.021 Гц является тот факт, что амплитуда на частоте 0.01 Гц была выше при стимуляции ацетилхолином, чем нитропруссидом натрия, эта разница исчезала при ингибировании NO-синтазы (NOS) и вновь появлялась после введения L-аргинина, что указывает на участие NO в этих колебаниях (Kvandal, et al. 2003). Дальнейшие доказательства того, что осцилляции в низкочастотном диапазоне зависят от эндотелия, были получены в исследовании с использованием внутрикожного микродиализа для ингибирования NOS, которое выявило значительное подавление осцилляций в диапазоне частот от 0.0095 до 0.021 Гц при стимуляции ацетилхолином, а также при нестимулированном кровотоке (Stewart, et al. 2007). В другом исследовании

влияние ингибирования циклооксигеназы на колебания изучалось путем внутривенного введения аспирина, ингибирующего образование простаноидов (Kvandal, et al. 2003). Однако, не было обнаружено значительного влияния ни на нестимулированный кровоток, ни на ответ на ионофорез ни в одном из частотных интервалов. Колебания с частотами около 0.1 Гц также имеют неоднозначную трактовку. Одни авторы считают, что они могут отражать статус симпатической нервной системы (Meyer, et al. 2003; Stirban, 2014). Другие с помощью симпатэктомии и денервации показывают, что это не так (Krupatkin, 2009). Таким образом, происхождение низкочастотных колебаний и механизмы регуляции кожного кровотока остаются дискутируемым вопросом, исследование которого ведется различными методами, включая методы математического моделирования.

II.3.5 Математические модели микроциркуляторного кровотока

Роль теоретических моделей микроциркуляции была описана в работе (Secomb, et al. 2008). В этой работе сказано, что математическое моделирование микроциркуляции во многом основано на интеграции знаний о процессах функциях и структурах, описывающих системы на различных уровнях биологической организации: субклеточном, клеточном и организменном. В ней дана простая классификация моделей, которые подразделяются на феноменологические, качественные, количественные и прогностические. В обзоре (Arciero, et al. 2017) используется аналогичная классификация, но дополнительно выделяются пространственное измерение моделей (от 0D до 3D) и их математические особенности. На рисунке II.2.3 представлена схематическая иллюстрация классификации и масштаба математических моделей микроциркуляции. Модели размерности 0D/1D позволяют получить очень полезную информацию о сосудистом русле в масштабе целого организма или органов (например, мозг или почка) несмотря на то, что они не описывают детально пространственно-распределенные процессы. С другой стороны,

трехмерные модели могут отражать детальные и специфические для индивидуумов компоненты сосудистой анатомии, но ценой за это является рост вычислительных затрат. Полный спектр моделей между 0D и 3D представлениями предлагает необходимый баланс информации и может быть использован для изучения большого спектра масштабов.

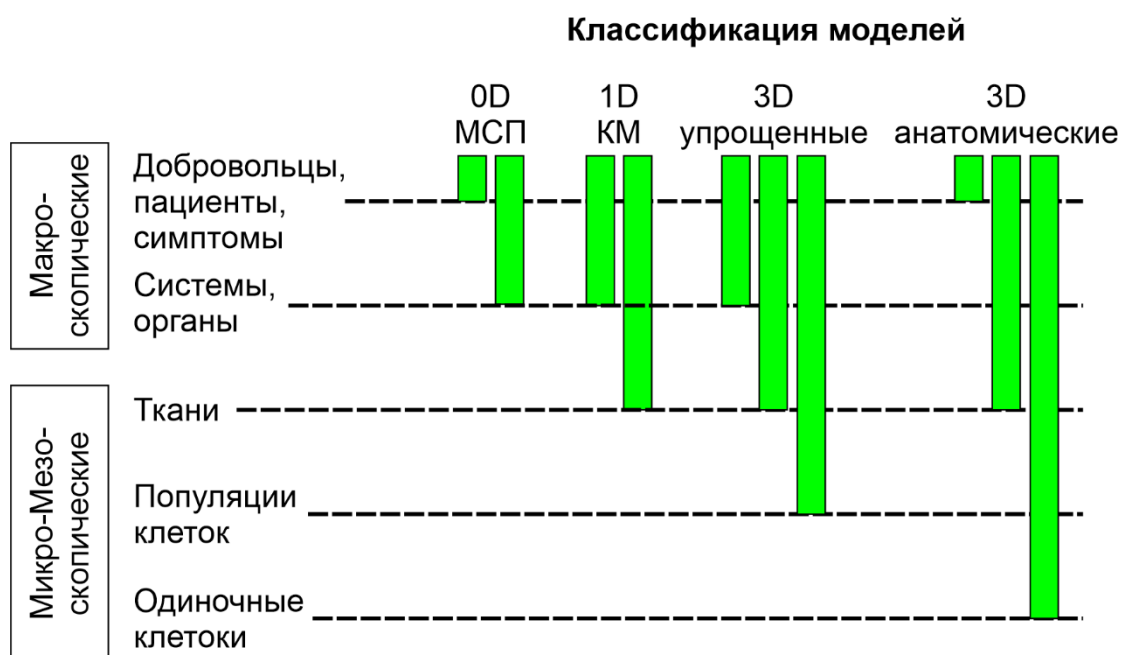


Рисунок П.2.3. Демонстрация различных шкал структурно-функциональной организации ССС, рассматриваемых математическими моделями микроциркуляции (взято из Arciero, et al. 2017 с изменениями). МСП – модели с сосредоточенными параметрами. КМ – компартментальные модели.

Теоретическое моделирование микрососудистых сетей обычно включает несколько этапов. Во-первых, необходимо определить геометрию сети. На этом этапе определяются длина и диаметр (или форма поперечного сечения) сосудов, а также связность сети. Затем объединяются модели гидродинамики и реологии крови для прогнозирования распределения потока, давления и гематокрита по всей сети. Затем изучается транспорт растворителей и их доставка в окружающие ткани вдоль сети. Геометрия сосудов может меняться из-за взаимодействия с потоком крови (проблема "жидкость-структура") или из-за поступления

сигналов авторегуляции. Наконец, вычисленные уровни растворителей и другие стимулы (нейронные, механические) могут учитываться в моделировании регуляции сосудов.

Основой моделирования микроциркуляции, как и всей ССС, является моделирование динамики кровотока по сосудам. Кровь представляет собой плотную взвесь клеток в плазме. Красные кровяные тельца (ККТ) являются основной клеточной составляющей крови, объемная доля которых (гематокрит) обычно составляет 40-45%. Хотя плазма является ньютоновской жидкостью, взаимодействие между клетками и плазмой приводит к сложной динамике, характерной для неньютоновской жидкости. Это особенно проявляется в микроциркуляции, поскольку размеры сосудов сопоставимы с диаметром клеток (Popel and Johnson, 2005). Локализация ККТ в окрестности центра сосуда в кровотоке происходит в результате гидродинамических взаимодействий. В результате вдоль стенки сосуда образуется слой с низким гематокритом или обедненный клетками (Cristini and Kassab, 2005). Это явление лежит в основе нескольких важных реологических эффектов, наблюдаемых *in vitro* и *in vivo* (Gould and Linninger, 2015): 1) эффект Фореуса-Линдквиста, согласно которому кажущаяся вязкость крови уменьшается при уменьшении диаметра сосуда менее 1 мм; и 2) скимминг плазмы в бифуркациях сосудов (также известный как "сетевой эффект Фореуса"), при котором гематокрит в дочерних сосудах меньше, чем в материнском сосуде. Скимминг плазмы приводит к неоднородному пространственному распределению гематокрита в сосудистой сети (Pries and Secomb, 2003).

Кровоток в микрососудах существенно отличается от кровотока в крупных сосудах. В микрососудах, как правило, пренебрегают инерционными эффектами. В подавляющем большинстве моделей кровотока, применяемых для исследования сетей, кровь рассматривается как (многофазная) непрерывная жидкость. В простейшем подходе это ньютоновская жидкость, динамика которой описывается уравнениями Стокса. Закон Пуазейля традиционно используется в качестве первого приближения таких уравнений. В этом

контексте объемный поток Q в сосуде пропорционален перепаду давления ΔP вдоль сосуда и четвертой степени радиуса сосуда R :

$$Q = \frac{\pi R^4 \Delta P}{8 L \mu}. \quad (\text{II.2.1})$$

Параметр μ – это вязкость всей крови. В комплексных моделях системы кровообращения μ обычно задается как константа (Muller and Toro, 2014). Более физиологически значимые выражения для μ были получены из эмпирических уравнений, соответствующих эффекту Фореуса-Линдквиста для ряда гемодинамических измерений (Secomb, 2017). Первоначально данные использовались *in vitro* для определения зависимости между эффективной вязкостью, гематокритом и диаметром стеклянной трубки (Secomb and Pries, 2013; Pries and Secomb, 2005). Впоследствии эта взаимосвязь была модифицирована на основе данных, которые показали большую стабильность *in vivo*. В частности, μ соответствует понятию объемной ("кажущейся") вязкости и формально получается из экспериментальных данных с использованием закона Пуазейля:

$$\mu_{app} = \frac{\pi R^4 \Delta P}{8 L Q}. \quad (\text{II.2.2})$$

Обычно приводится относительное значение кажущейся вязкости (т.е. нормализованное по отношению к вязкости плазмы). Существует также улучшенная модель вязкости, включающая эффекты поверхностного слоя эндотелия (Pries and Secomb, 2005). Альтернативные модели используют эмпирическое уравнение для кажущейся относительной вязкости как функции гематокрита, и как функции радиуса (Lipowsky, et al. 1980; Takahashi, et al. 2009). Дальнейшие попытки разработать физически непротиворечивые конститутивные модели крови, рассматриваемой как неньютоновская жидкость, привели, например, к использованию модели Кассона-Квемады, в которой вязкость зависит от скорости сдвига (Neofytou, 2004).

Значение гематокрита, фигурирующее в феноменологических соотношениях для вязкости, может быть задано явно, или может рассматриваться как неизвестное при моделировании (Liu, 2009; Linninger, et al. 2013; Ganesan, et al. 2010; Hellums, et al. 1996). При вычислении гематокрита в систему необходимо добавить дополнительное уравнение для сохранения массы непрерывной жидкости, представляющей ККТ, и учесть объемные доли для фаз плазмы и ККТ в соответствии с теорией смеси (Hellums, 1977).

Помимо континуального описания крови, достаточного для получения данных о потоке крови, существуют модели, учитывающие корпускулярную природу крови. Это более детальные модели, которые позволяют сравнить и проанализировать механизмы, ответственные за экспериментально наблюдаемые результаты реологии крови. Такие модели принято называть мезоскопическими моделями микроциркуляции. Описание основных подходов, встречающихся в мезоскопических моделях, можно посмотреть в соответствующих обзорах (Cristini and Kassab, 2005; Secomb and Pries, 2011; AlMomani, et al. 2012; Chung, et al. 2007; Ye, et al. 2016).

Нормальное функционирование ССС человека невозможно без ее взаимодействия с другими системами организма. Одной из таких систем является иммунная система и, в частности, клетки врожденного иммунитета человека. Известно, что иммунная система реализует защитную функцию на уровне всего организма. Это достигается за счет того, что элементы иммунной системы (клетки и антитела) могут распространяться по организму с помощью кровотока. Вместе с тем, при патологиях, связанных с ангиопатиями, влияние иммунной системы на регуляцию периферического микроциркуляторного кровотока играет решающую роль (Czacowski and Roustit, 2020).

В следующем разделе будут рассмотрены участие клеток врожденного иммунитета в развитии сахарного диабета 2-го типа и его осложнений и их влияния на регуляцию колебаний в микроциркуляторном русле кожи человека.

II.4 Клетки врожденного иммунитета человека при метаболических нарушениях

II.4.1 Полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы)

Одними из наиболее многочисленных представителей клеток врожденного иммунитета человека являются полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы). Они составляют более 60% всех лейкоцитов (Summers, et al. 2010; Caielli, et al. 2012). Они играют центральную роль во врожденном иммунитете и регулируют адаптивный иммунитет (Mantovani, et al. 2011; Nauseef and Borregaard, 2014; Mocsai, 2013). Их жизненно важное значение в защите организма от бактерий и грибов было известно на протяжении десятилетий, поскольку такие патогены приводят к опасным для жизни инфекциям (Kannengiesser, et al. 2008). Нейтрофилы играют важнейшую роль в развитии заболеваний, сопровождающихся воспалительными реакциями (Segel, et al. 1996). Существует много исследований, показывающих ключевое участие нейтрофилов в формировании воспаления и хронического окислительного стресса при таких социально значимых заболеваниях, как: рак, аллергия и диабет (El-Benna, et al. 2016; Wculek and Malanchi, 2015; Jonsson, et al. 2011; Battaglia, 2014).

У здоровых людей нейтрофилы свободно циркулируют в кровеносном русле в неактивном покоящемся состоянии. При попадании инфекции в организм формируется физиологическая воспалительная реакция, в ходе которой в очаге воспаления высвобождаются провоспалительные агенты (медиаторы). Они продуцируются такими клетками, как резидентные макрофаги, резидентные дендритные клетки, тучные клетки и эпителиальные клетки, а также в результате активации комплемента (Witko-Sarsat, et al. 2000; Rabiet, et al. 2007; Ley, et al. 2012). Медиаторы индуцируют изменения свойств эндотелия сосудов, которые сигнализируют циркулирующим нейтрофилам адгезировать к стенкам сосудов и преодолевать эндотелиальный барьер. Затем нейтрофилы

мигрируют к очагу инфекции по градиенту хемоаттрактантов и воспалительных агентов, таких как интерлейкин 8 (IL-8), фактор активации тромбоцитов (PAF), лейкотриен В4 (LTB4), фракция комплемента C5a и бактериальный хемотаксический пептид N-формилметиониллейцилфенилаланин (fMLF). Таким образом, нейтрофилы первыми достигают очага инфекции и воспаления (Soehnlein, et al. 2009).

При встрече с патогеном, нейтрофилы в первый момент распознают эволюционно консервативные мотивы или «патогенассоциированные молекулярные паттерны» (PAMP), обнаруженные у многих микроорганизмов (Prince, et al. 2011; Hayashi, et al. 2003). Для этого задействуется ряд рецепторов распознавания паттернов клеточной поверхности (PRR), такие как Toll-подобные рецепторы (TLR). Затем нейтрофилы прочно связываются с патогеном и поглощают его. Этому процессу способствуют опсонины – присоединенные к патогену иммуноглобулины G (IgG) и белки C3b и C3bi, возникающие как продукция антител и активации системы комплемента соответственно (Witko-Sarsat, et al. 2000). В ходе поглощения плазматическая мембрана окружает патоген, заключая его в фагосому. Фагоцитоз запускает программу активации нейтрофилов, что приводит к внутрифагосомальному высвобождению антибактериальных пептидов, протеаз, миелопероксидазы и супероксид-анион радикала (O_2^-), который вырабатывается посредством активации NADPH-оксидазы. Супероксид-анион радикал в результате химических реакций преобразуется в АФК, включающие перекись водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($OH\cdot$) и хлорноватистую кислоту (HOCl), которые способствуют гибели и разрушению бактерии внутри фагосомы (Hampton, et al. 1998; El-Benna, et al. 2005). Производство АФК фагоцитами впервые было названо "респираторным взрывом" или "окислительным взрывом" из-за быстрого и нечувствительного к цианидам увеличения поглощения кислорода, увеличения потребления глюкозы и немедленного высвобождения АФК. В завершении процесса фагоцитоза нейтрофилы погибают с запуском программы апоптоза или нетоза (El-Benna, et al. 2005). В последнем случае погибающий нейтрофил выбрасывает свою ДНК

во внеклеточное пространство, формируя, таким образом, внеклеточные ловушки, содержащие хроматин и протеазы. Это позволяет захватывать и убивать клетки микроорганизмов.

NADPH-оксидаза фагоцитов, катализирующая выработку O_2^- , принадлежит семейству белков NOX. Ее также называют NOX2 (El-Benna, et al. 2005; Groemping and Rittinger, 2005). Она состоит из шести субъединиц, двух трансмембранных белков (p22phox и gp91phox), образующих флавоцитохром b558, и четырех растворимых белков: p47phox, p67phox, p40phox и малые G-белки – Rac1/2. В покоящихся нейтрофилах мембранные и цитозольные компоненты NOX2 разделены. В момент активации цитозольные субъединицы фосфорилируются и транслоцируются к мембранным, где происходит сборка всего комплекса.

II.4.2 Метаболические нарушения и сахарный диабет 2 типа

Метаболические нарушения, включающие нарушения углеводного и липидного обмена приводят к системным патологическим изменениям в организме, которые характеризуются как сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа). Это хроническое метаболическое заболевание связанное с инсулинорезистентностью, в следствии которой развивается гипергликемия, а также секреторная дисфункция бета-клеток. Считается, что этой форме заболевания в основном подвержены лица средней и старшей возрастной категории, хотя по данным ВОЗ ей могут быть подвержены дети и лица молодого возраста с относительной (а не абсолютной) недостаточностью инсулина и периферической резистентностью к нему. При СД 2 типа не происходит аутоиммунного разрушения бета-клеток. Одним из характерных физиологических проявлений СД 2 типа является избыточный вес или ожирение пациентов (Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes, 2021). Многие осложнения и смертность пациентов связана с развитием макро- и микрососудистых нарушений (Madonna, et al. 2017, 2018). Это приводит к

развитию сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний, включая атеросклероз, ишемическую болезнь сердца и заболевания периферических артерий, а также является фактором, отягощающим течение коронавирусной болезни (COVID-19) (Шестакова и др. 2020).

Нарушение периферической микроциркуляции является основным патогенным фактором у больных СД. Это приводит к ряду осложнений, в числе которых: язвы стоп, ретинопатия, нейропатия, диабетической дермопатия и ослабленное заживление ран (Fuchs, et al. 2017; Carrizzo, et al. 2018). Непосредственный вклад нарушений периферической микроциркуляции в патогенез СД связан с такими изменениями в организме больного, как изменение: метаболизма (Cameron, et al. 2001; Greenman, et al. 2005), участия оксида азота (NO) (Sokolnicki, et al. 2007), периферической микроваскуляризации (Тооке, 1996), кожной нейроваскулярной функции (Vinik, et al. 2001), микрососудистой функции (Kozlov, et al. 2021) и венозного растяжения (Ward, et al. 1983).

Сосудистые патологии связаны с нарушением функционирования эндотелиоцитов, клеток, являющихся основными структурными элементами стенок сосудов. Функциональная активность этих клеток во многом зависит от уровня АФК, которые продуцируются в них различными источниками, такими как NADPH-оксидазы, дыхательная цепь митохондрий, NO-синтазы, ксантиноксидазы, пероксидазы, циклооксигеназы и липоксигеназы (Goncharov, et al. 2017; Kadlec and Gutterman, 2019; Knock, 2019). Считается, что NADPH-оксидаза, катализирующая образование супероксид-анион радикала, является основным источником АФК в эндотелиальных клетках, также как и в нейтрофилах. В нормальных условиях супероксид анион радикал и продукт его дисмутации пероксид водорода регулируют эндотелий-зависимую релаксацию и сократимость гладких мышц сосудов. При патологиях повышенная экспрессия и активность NADPH-оксидазы приводит к понижению уровня NO, ослаблению функций эндотелия, значительному повышению сократимости (Knock, 2019). На работу эндотелиоцитов влияют и АФК экзогенного происхождения. Их уровень

зависит от активности нейтрофилов, которая меняется при СД. Эти изменения могут приводить к нарушению окислительно-восстановительного баланса и последующему окислительному стрессу (Johnson, et al. 2022).

В развитии СД 2 типа окислительный стресс играет важную роль: повышенный уровень АФК в крови является важным патогенетическим фактором, способствующим дисфункции эндотелия и гладкомышечных клеток сосудов (Strain and Paldanius, 2018). Образование АФК, модифицирующих состояние сосудов в различных органах, является результатом активности множества ферментов и биохимических путей как в самих клетках, так и в клетках крови. Основные источники образования АФК при гипергликемии и диабете – аутоокисление глюкозы, полиольный путь метаболизма глюкозы, образование конечных продуктов гликирования, NADPH оксидазы, митохондриальная электронная транспортная цепь, несопряженная активность eNOS, ксантинооксидаза (Schaffer, et al. 2012; Newsholme, et al. 2016; Oguntibeju, 2019). Потенцирование эндогенной антиоксидантной системы и применение терапевтических препаратов, понижающих уровень АФК, может улучшать состояние сосудистой системы в условиях гипергликемии (de Naan and Cooper, 2011). В частности бетаин, способствующий выработке глутатиона, ингибирует патологическую неоваскуляризацию роговицы глаза (Park, et al. 2017). Благоприятное действие на состояние сосудов оказывает также метформин, имеющий множественное терапевтическое действие при СД 2 типа, в том числе в качестве антиоксиданта, осуществляя прямой захват гидроксильного радикала, усиливая активность глутатион редуктазы, каталазы и супероксиддисмутазы и подавляя активность NADPH-оксидазы (Apostolova, et al. 2020).

NADPH-оксидаза является мишенью гипергликемии, которая вызывает нарушения в механизмах активации фермента, связанные с фагоцитозом и состоянием внутриклеточных сигнальных систем, в том числе зависимых от Ca^{2+} (Tikhonova, et al. 2020). Изучение функциональных свойств нейтрофилов, их изменение, как и изменение активности NADPH-оксидазы при патологических нарушениях, является важной задачей. Эффективность решения

этой задачи зависит от развития не только экспериментальных подходов, но и математических моделей.

II.4.3 Математическое моделирование функциональных свойств нейтрофилов

Сложность эксперимента и противоречивость данных затрудняет понимание механизмов генерации АФК в крови только на основе экспериментов. В связи с чем, математическое моделирование широко используется для изучения иммунных реакций при заболеваниях.

Многочисленные модели поведения иммунной системы у животных и человека основаны на описании популяционной динамики клеток иммунной системы и их ответа на патогенные вмешательства в организм хозяина. Например, модели бактериальной кинетики и воспалительных процессов представляют концептуальную основу для изучения таких явлений как порог начальной дозы патогена и обусловленный иммунным ответом исход: полное избавление от патогена; устойчивый рост патогена (Lauffenburger, 1985; Rudnev and Romanyukha, 1995; Pilyugin and Antia, 2000; Reynolds, et al. 2006; Smith, et al. 2011).

Для описания бактериального патогенеза используют системы обыкновенных дифференциальных уравнений. При этом клетки делят на множество различных субпопуляций. В работе (Pilyugin and Antia, 2000) популяция макрофагов была разделена на свободные клетки и клетки, участвующие в активном фагоцитозе бактерий. Было предположено, что время «обработки» бактерий лимитировало способность макрофагов полностью уничтожить бактериальную популяцию.

В других моделях используются два отдельных подмножества фагоцитов: нейтрофилы и макрофаги (Lauffenburger, 1985; Rudnev and Romanyukha, 1995). Показано различное поведение иммунных клеток в зависимости от начальных условий. Однако чаще модели включают только одно подмножество фагоцитов.

Например, в модели (Reynolds, et al. 2006) описывались только макрофаги, чтобы оценить роль длительности воспаления в развитии сепсиса. При этом противовоспалительные цитокины и степень повреждения тканей были главными факторами, влияющими на исход инфекции.

Существуют модели, описывающие кинетику нескольких подмножеств иммунных клеток и их стадий функционального ответа. Например, в модели Смита (Smith, et al. 2011) описывается трех-стадийный ответ клеток врожденного иммунитета на пневмококковую инфекцию легких бактериями *Streptococcus pneumoniae*. В модели рассматриваются альвеолярные макрофаги, нейтрофилы, макрофаги, произошедшие из моноцитов и цитокины. На первом этапе, динамика альвеолярных макрофагов определяет порог начальной дозы инфекции, характеризующий полное уничтожение альвеолярными макрофагами бактерий или их дальнейший рост. На втором этапе, провоспалительные цитокины, производимые альвеолярными макрофагами, рекрутируют нейтрофилы, популяция которых приводит к двум исходам: подавлению инфекции или устойчивому росту бактерий. На последнем этапе, в борьбу с инфекцией вступают макрофаги, происходящие из моноцитов. Модель позволяет понять вклады альвеолярных макрофагов, нейтрофилов, макрофагов, происходящих из моноцитов, провоспалительных цитокинов и апоптотического клеточного материала в избавление легких от пневмококковой инфекции.

Ряд авторов используют математическое моделирование для описания медицинских диагностических показателей полного анализа крови (Chaudhury, et al. 2016). В модели описывается популяционная динамика лейкоцитов, моноцитов и нейтрофилов, что позволяет предсказывать распределение вероятности клеток в зависимости от переменных осевого рассеяния света (axial light loss (ALL)) и интенсивности рассеяния под промежуточным углом (intermediate angle scatter intensity (IAS)) с учетом интенсивности поляризованного бокового рассеяния (polarized side scatter intensity (PSS)). Для этого используется уравнение Фоккера-Планка:

$$\frac{\partial P_i(x_{ALL}, x_{IAS}, t)}{\partial t} = -\nabla(P_i(x_{ALL}, x_{IAS}, t)\mu_i) + \nabla(D_i \nabla P_i(x_{ALL}, x_{IAS}, t)), \quad (\text{II.3.1})$$

где $\mu_i(PSS)$ – вектор сдвига, D_i – коэффициент диффузии, а индекс i индексирует тип клеток: L – лейкоциты, M – моноциты, N – нейтрофилы. Модель количественно оценивает локальные эффекты клеточного функционирования на этапах созревания, активации и старения. С помощью модели было показано, что у пациентов в острой фазе заболевания динамика лейкоцитов существенно отличается от здоровых. Модель может быть полезна при выявлении пациентов, проходящих обследование на наличие сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, на выявление инфаркта миокарда.

Многие из этих моделей описывают «общую» бактериальную динамику и/или популяционную динамику клеток врожденного иммунитета. В них не рассматривается молекулярные механизмы генерации АФК гранулоцитами. Изучение таких механизмов важно как с точки зрения кинетики продукции АФК, так и с точки зрения понимания динамических особенностей многостадийного функционирования клеток врожденного иммунитета.

Еще одним из многочисленных классов мембранных белков, регулирующих ответы различных клеток, включая эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудов, кардиомиоциты, гранулоциты, клетки возбудимых тканей и т.д., на внешние стимулы, являются ионные каналы. Они широко представлены и играют важную функциональную роль в жизнедеятельности различных типов клеток различных организмов. В следующем разделе будут рассмотрены структурно-функциональные свойства ионных каналов, как одних из основных регуляторов ионной проводимости биологических мембран.

II.5 Ионные каналы в биологических мембранах клеток

Считается, что примерно одна треть всего генома кодирует мембранные белки, и более двух третей имеющихся на рынке лекарств нацелены на

мембранные белки, которые служат в качестве мишеней их действия (Liu and Caffrey, 2005). Белки, образующие ионные каналы, являются вторым по распространенности классом мембранных белков, которые, в числе прочего, используются в разработке лекарственных средств (Hutchings et al. 2019).

Ионные каналы представляют собой крупные гликопротеиновые комплексы, встроенные в липидный бислой мембраны живых клеток. Их основная функция – транспорт ионов через клеточную мембрану. Они являются необходимым элементом для жизнедеятельности всех живых клеток, так как ионные токи через клеточные мембраны играют решающую роль в широком спектре физиологических процессов: возбудимости нервов и мышц, генерации потенциалов действия, действию вторичных мессенджеров, секреции клеток и т.д. (Lipscombe and Wyllie, 2018).

В данной главе будут представлены основные структурно-функциональные особенности ионных каналов, в основном калиевых, а также подходы к математическому моделированию активности каналов.

II.5.1 Структурно-функциональные особенности ионных каналов

Ещё в 1890 году Вильгельм Оствальд показал, что электрические токи в живых тканях могут быть вызваны ионами, которые перемещаются через клеточную мембрану. В начале XX-го столетия Бернштейн выдвинул гипотезу (Bernstein J., 1902), согласно которой клеточная мембрана пропускает внутрь клетки ионы K^+ и они накапливаются в цитоплазме. Таким образом, между внешней и внутренней сторонами мембраны формируется разность потенциалов, которую Бернштейн впервые назвал трансмембранным потенциалом. Британские физиологи Ходжкин и Хаксли в 1939 г., используя метод введения электрода внутрь гигантского аксона кальмара, открытого Янгом в 1936 г., провели серию экспериментов, где впервые измерили значение трансмембранного потенциала, составлявшего ~ -70 мВ. Этот так называемый «потенциала покоя» типичен не только для нервных клеток, но и наблюдается во

многих других клетках, например, в эритроцитах. В мышечных клетках он достигает -90 мВ. Из гипотезы Бернштейна в последствии сформировалась мембранная теория возбуждения, одним из положений которой было формирования потенциала действия, возникающего при переходе мембраны в возбуждённое состояние при воздействии на неё раздражающих стимулов: электрической, химической, или механической природы.

Дальнейшие исследования Ходжкина и Хаксли (Hodgkin and Huxley, 1952, 1952a, 1952b), связанные с изучением потенциала действия, привели к первым попыткам описания ионных токов через клеточную мембрану. Они предположили, что ионный ток течет через некоторые трансмембранные структуры, которые формируют в мембране ионную пору, обладающую механизмом управления проходящих через неё ионов. Эти структуры, отвечающие за проводимость определенных типов ионов, были названы ими ионными каналами. Они считали, что у Na^+ -каналов существует два состояния проводимости – активированное (ионы Na^+ проходят через канал) и инактивированное (ионы Na^+ не проходят через канал). Эти состояния были описаны ими при помощи безразмерных величин m и h , подчиняющихся кинетическим уравнениям вида:

$$\begin{aligned} \frac{dm}{dt} &= \alpha_m(1-m) - \beta_m m \\ \frac{dh}{dt} &= \alpha_h(1-h) - \beta_h h \end{aligned} \quad , \quad (\text{II.4.1})$$

где α и β - потенциалозависимые константы скорости прямой и обратной реакций. Сама же проводимость мембраны для ионов натрия описывалась уравнением: $g_{\text{Na}} = \bar{g}_{\text{Na}} m^3 h$, где \bar{g}_{Na} - максимальная проводимость на единицу площади поверхности мембраны.

В отличие от натриевых каналов калиевые каналы, по мнению Ходжкина и Хаксли, не имели механизма инактивации и оставались открытыми в течение всего процесса деполяризации. Проводимость мембраны по калию и кинетика активации канала, описывалась ими уравнениями вида:

$$g_K = \bar{g}_K n^4$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n (1 - n) - \beta_n n$$
(II.4.2)

где \bar{g}_K - максимальная проводимость мембраны по K^+ на единицу площади поверхности. Таким образом, ими было впервые предложено существование не только ионных каналов, но и дано математическое описание функционирования их так называемого «воротного» механизма.

Далее, благодаря серии опытов Хилле (Hille B., 1975), было показано наличие селективного фильтра для натриевых каналов и предложен возможный механизм его работы. Он определил средний размер канала, составляющий 3-5 Å, и пришёл к выводу, что пора канала окружена кольцом атомов кислорода, входящих в состав карбоксильных групп мембранного белка. Хилле считал, что селективность зависит не только от размеров проникающих ионов, но и от их способности образовывать водородные связи. На основании этих и других данных Хилле заключил, что ионы натрия проникают в канал не путём простой диффузии, а в результате последовательных стадий дегидратации и связывания с компонентами канала. Это означает преодоление энергетических барьеров, из которых наиболее существенный барьер формируется в фильтре селективности (Рисунок II.4.1).

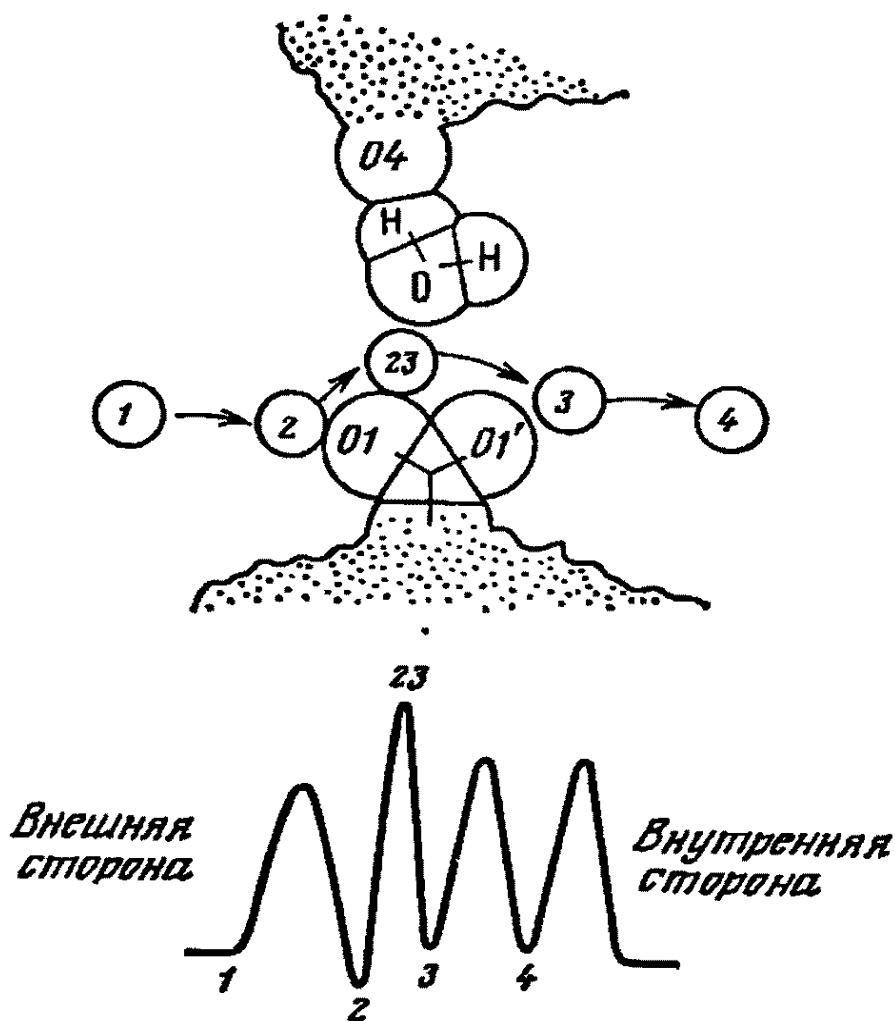


Рисунок П.4.1. Модель Хилле ионного транспорта через натриевый канал. Свободный ион (1) связывается (2) и десольватируется (23). Затем он ресольватируется на внутренней стороне мембраны (3) и диссоциирует из открытого канала (4). Внизу – энергетический профиль данного процесса: стадией, определяющей скорость, является преодоление энергетического барьера (23), функционирующий как селективный фильтр.

Одним из аргументов в пользу существования ионных каналов в клеточных мембранах рассматривалась простая оценка коэффициента распределения K , показывающего соотношение концентрации вещества вне мембраны и внутри неё. Согласно теории Борна, высота потенциального барьера, который необходимо преодолеть одному молю ионов при переходе из раствора с диэлектрической проницаемостью ϵ_s в мембрану с ϵ_m , определяется

соотношением: $\Delta W = \frac{(Ze)^2 N_A}{4\pi\epsilon_0 r} \left(\frac{1}{\epsilon_m} - \frac{1}{\epsilon_s} \right)$, где e - заряд электрона, а r - радиус

иона. Для ионов Na^+ и K^+ величина ΔW составляет 350-400 кДж/моль, при этом энергия тепловых колебаний для 300 К составляет всего $RT \approx 2.4$ кДж/моль.

Вероятность перехода ионов из раствора в липидную фазу $P \sim e^{-\frac{\Delta W}{RT}} \approx e^{-160}$, следовательно в этом случае коэффициент распределения K очень мал. Таким образом, непосредственный перенос ионов через липидный бислой только за счёт диффузии, маловероятен.

Для многих ионных каналов характерной особенностью является наличие «ворот», или «воротного» механизма, который, закрываясь или открываясь, регулирует транспорт ионов через пору канала по электрохимическому градиенту. Ворота изменяют свое состояние в ответ на различные стимулы (воздействия): электрической, химической, тепловой, или механической природы.

Ионные каналы имеют следующие общие свойства:

- 1) проводимость каналов различается для разных ионов, соответственно различают K^+ -, Na^+ -, Ca^{2+} - и другие типы каналов;
- 2) каналы обеспечивают пассивный транспорт ионов по электрохимическому градиенту;
- 3) каналы функционируют по принципу «всё или ничего», время между переключениями варьируется в диапазоне от 3 мкс до нескольких секунд;
- 4) вероятность перехода канала между стационарными состояниями проводимости (открытыми и закрытыми) изменяются под действием внешних управляющих факторов, например, изменения трансмембранного потенциала, механического воздействия, связывания лиганда (например, Ca^{2+}), соответственно различают потенциалозависимые, Ca^{2+} -управляемые и другие типы каналов.

В соответствии с вышеназванными свойствами и на основании многочисленных экспериментов была разработана механистическая модель

ионного канала (Рисунок П.4.2). Она основана на предположении о том, что за каждое свойство канала отвечает часть его молекулярной структуры. При этом выделяют следующие структурные элементы: *пора* – заполненная водой полость, которая пронизывает мембрану и обеспечивает пассивный транспорт ионов в направлении электрохимического градиента; *селективный фильтр* – опознавательная аминокислотная последовательность, отвечающая за избирательное пропускание проникающих ионов; *воротный механизм* – механизм «отсечки» потока ионов, функционально связанный с *управляющими структурами канала*, такими как *сенсор напряжения* и *рецептор лиганда* (Hille, 1992).

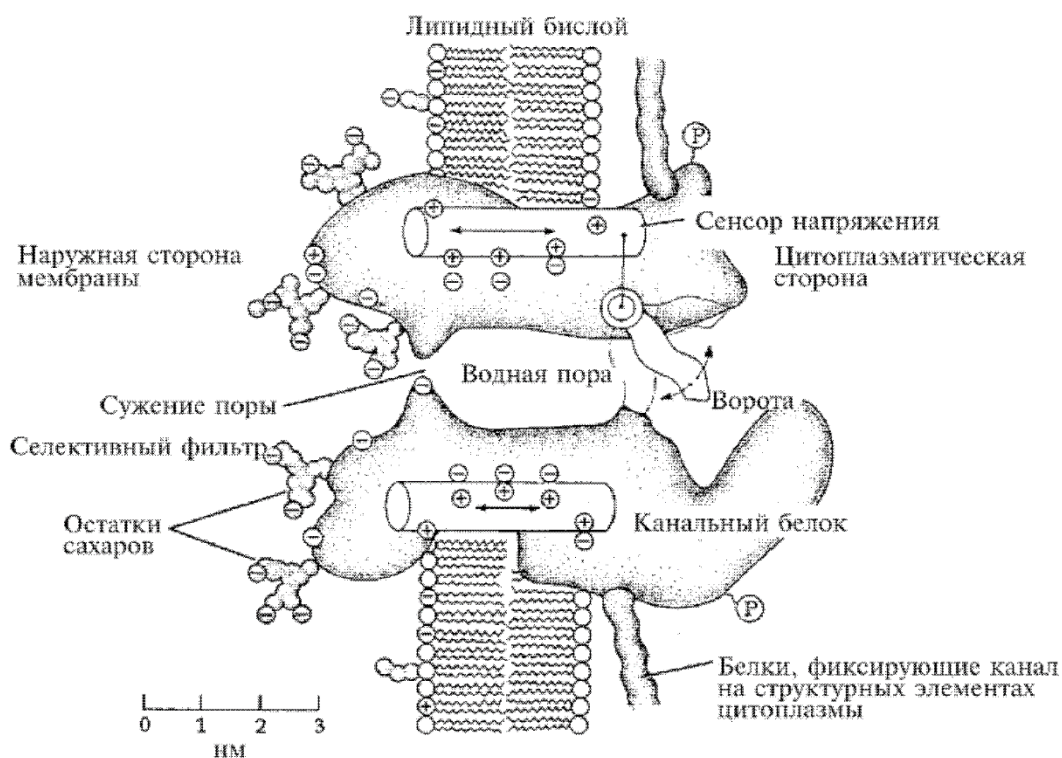


Рисунок П.4.2. Функциональная схема ионного канала (Hille, 1992)

Согласно вышесказанному, ионные каналы определяют как крупные гликопротеиновые комплексы, интегрированные в липидный бислой мембран живых клеток и обеспечивающие управляемый пассивный транспорт ионов,

благодаря чему они играют ключевую роль в процессах мембранного электрогенеза и клеточной сигнализации.

II.5.2 Структурно-функциональные свойства Ca^{2+} -активируемого и K_v каналов

K^+ -каналы, как и другие типы каналов, организованы в мембране по модульному типу. Они являются тетрамерами и обычно образованы из двух видов субъединиц: каналообразующих α -субъединиц и регуляторных β -субъединиц (Hille, 2001).

Строение порообразующих субъединиц всех типов K^+ -каналов имеет много общего (Рисунок II.4.3).

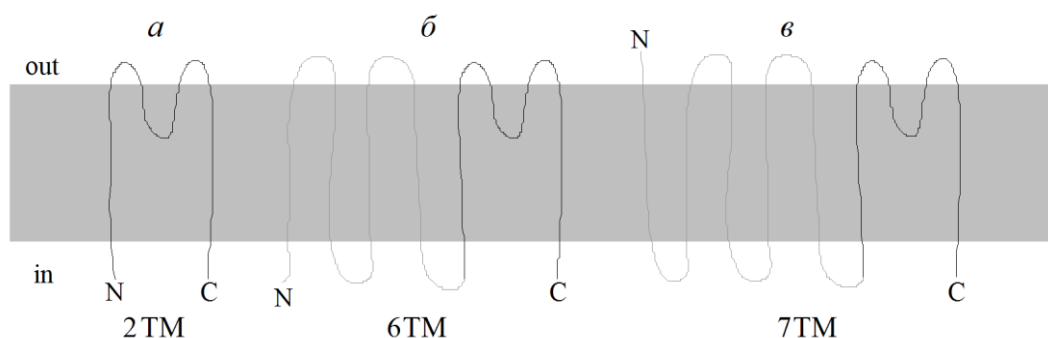


Рисунок II.4.3. Архитектура формирования трансмембранной (ТМ) части α -субъединиц K^+ -каналов (с изменениями из Hille, 2001). *a* – 2ТМ-архитектура, присущая K_{csA} - и K_{IR} -каналам. *б* – 6ТМ- архитектура, характерная для K_v -, $KCNQ$ -, CNG - и TRP -каналов. *в* – 7ТМ- архитектура $ВК$ -каналов (Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов большой проводимости). Черные линии – «ядро» каналов, схожее с K_{csA} -каналом. Серые линии – дополнительные сегменты.

Простейшая структура канала, например, бактериального рН-чувствительного K_{csA} -канала из бактерии *Streptomyces lividans*, включает два α -спиральных трансмембранных сегмента (2ТМ-архитектура), соединённых формирующей селективный фильтр петлёй (P-loop), при этом N- и C- концы полипептида обращены в цитозоль (Рисунок II.4.3a). K_v –каналы имеют четыре

дополнительных трансмембранных сегмента, присоединённых к N-концу. Они формируют *сенсор напряжения* и окружающую его вспомогательную структуру (6ТМ-архитектура, Рисунок П.4.3б). Порообразующая часть α -субъединицы K_{Ca} -канала по отношению к 6ТМ-архитектуре K_V -канала имеет дополнительный сегмент на С-конце (7ТМ-архитектура, Рисунок П.4.3в) и дополнительные сегменты цитозольной части (сегменты S7-S10, Рисунок П.4.4). *Пора* формируется в мембране из четырёх α -субъединиц.

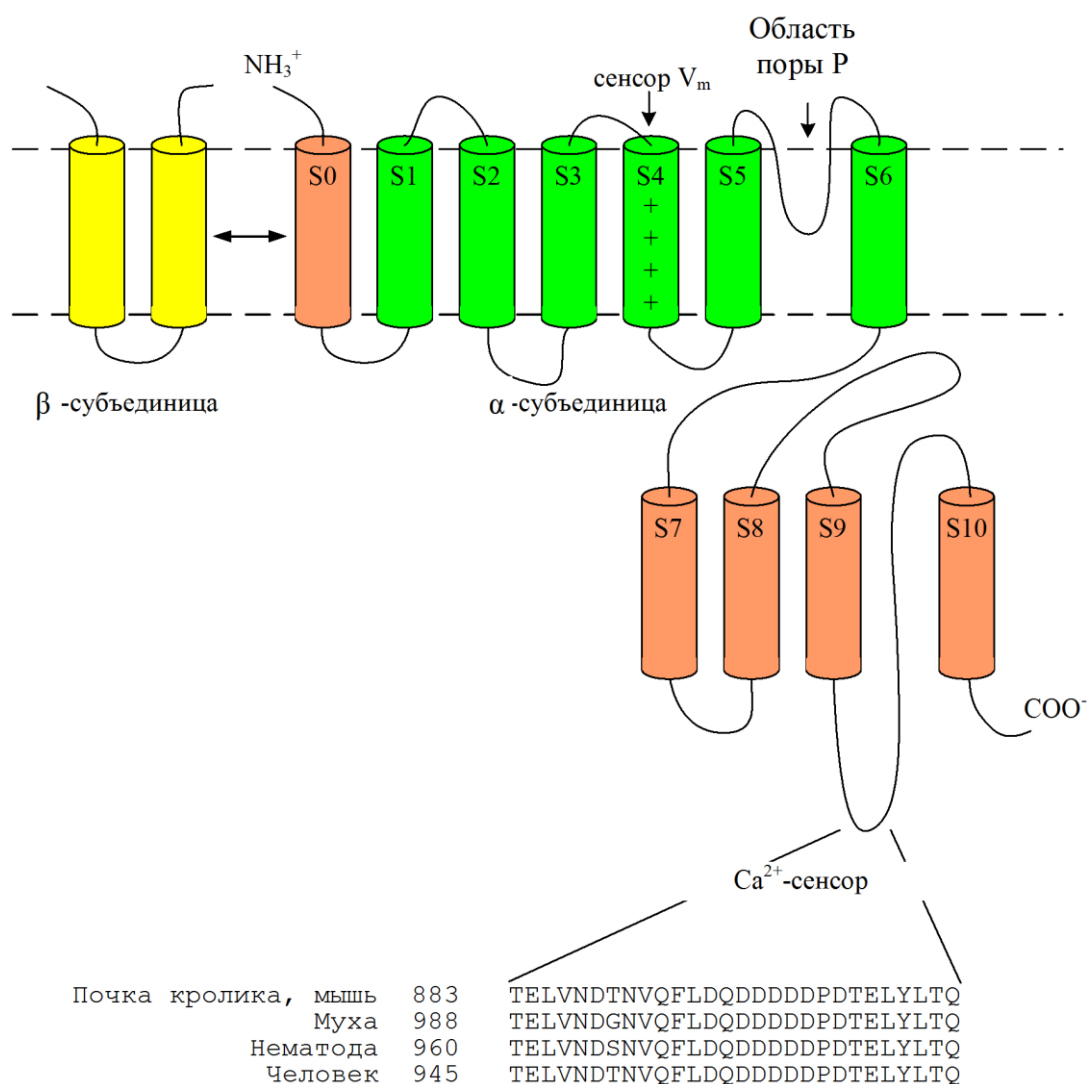


Рисунок П.4.4. Схема последовательности трансмембранных и цитоплазматических сегментов α - и β -субъединиц макси- K_{Ca} -канала (с изменениями из Vergara et al., 1998). Канал формируется при свертке в мембране

четырёх структур, показанных на рисунке. Зеленым цветом показаны сегменты, характерные для K_V -канала.

II.5.2.1 Область поры

Как полагают, K^+ -канал образуется путём свёртки четырёх субъединиц (в случае макси- K_{Ca} -канала это 4 α -субъединицы), так что внутри образуется ионопроводящая полость (*пора*). Выстилка этой поры создаётся четырьмя петлями – по одной от каждой субъединицы. Каждая петля содержит около 20 аминокислотных остатка, соединяющих в субъединице сегменты S5 и S6 (Рисунок II.4.4). Эту часть структуры канала называют *областью поры* (*P-область*). Она идентична в различных K^+ -каналах (Heginbotham et al., 1997). В P-области имеются 8 последовательно расположенных аминокислотных остатков весьма схожих между собой. Для K^+ -каналов *Shaker*, *Shab* и др. это T M T T V G Y G, для *fSlo* и *mSlo* соответственно T N S T V G Y G и T M S T V G Y G. Ввиду большого сходства эту последовательность определяют как «опознавательную» (“signature sequence”) для K^+ -каналов. Полагают, что именно она во многом определяет ионную селективность K^+ -каналов. В пользу этого свидетельствуют данные, полученные на *Shaker* K^+ -канале. А именно, мутации некоторых аминокислот нарушают K^+ -избирательность канала (Heginbotham et al., 1997).

Прорывом в понимании структуры и функционирования K^+ -каналов явилась работа Дойла и соавт. (Doyle et al., 1998), которые впервые, используя метод рентгеноструктурного анализа, получили трёхмерную структуру бактериального K^+ -канала ($KcsA$ -канала). Это наименьший по структуре из известных каналов (м.м. субъединицы – 16-17 кДа (Schrempf et al., 1995). В отличие от потенциалозависимых K^+ -каналов эукариот каждая из четырёх субъединиц $KcsA$ канала имеет не 6, а только 2 трансмембранных сегмента: TM1 и TM2 (Heginbotham et al., 1997; Cortes et al., 1997). Аминокислотные последовательности TM1 и TM2 имеют небольшое сходство с аминокислотными последовательностями идентичных сегментов (предположительно S5 и S6)

потенциалозависимых каналов эукариот, однако Р-область у них такая же, как и у других каналов. Например, она на 67% идентична Р-области канала K_v1 (тип *Shaker*). Это делает KcsA пригодным для исследования общих принципов организации ионной поры.

Канал KcsA представляет собой тетрамер с симметрией 4-го порядка, окружающий ионную пору (Рисунок П.4.5а,б).

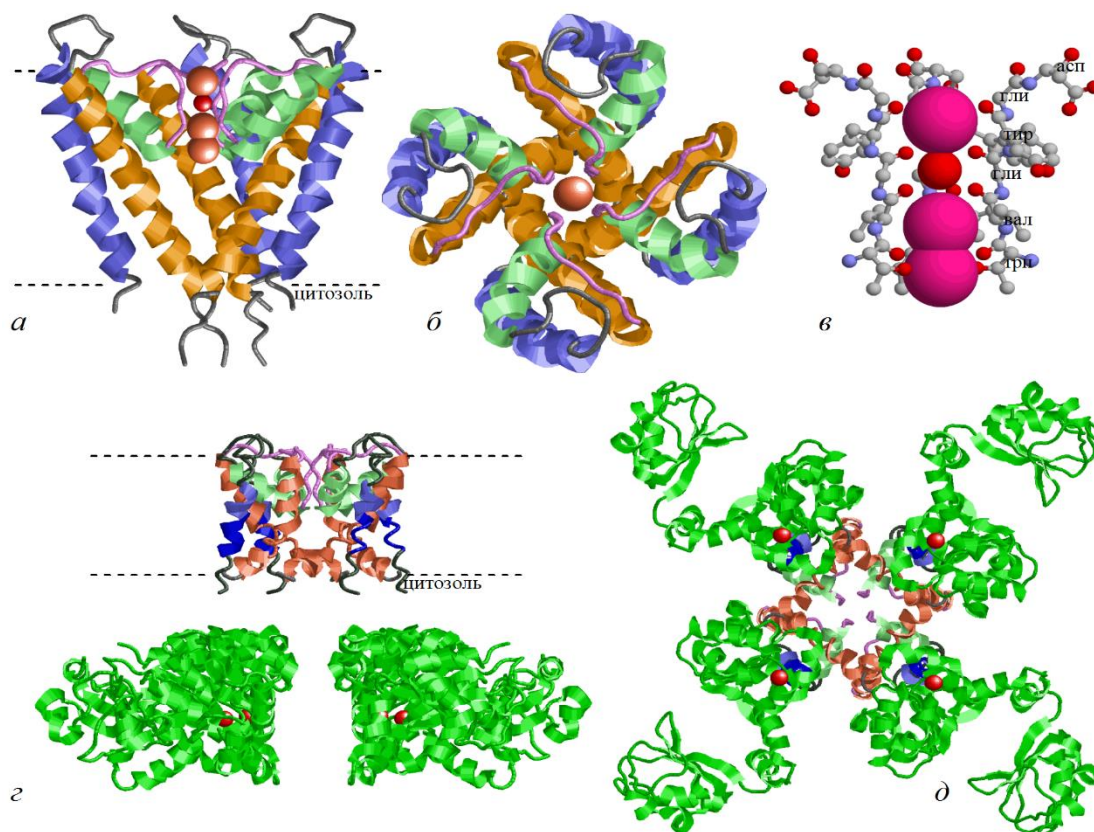


Рисунок П.4.5. Структуры простейших K^+ -каналов. *a*-*в* – структура бактериального KcsA-канала из *Streptomyces lividans* (Doyle et al., 1998). *a* – вид сбоку. Оранжевым цветом обозначены ионы K^+ в селективном фильтре канала. *б* – вид на канал с внеклеточной стороны. Канал показан в закрытом состоянии. *в* – селективный фильтр K^+ -канала образован консервативной последовательностью -TVGYG-, формирующей вокруг ионов калия кольца атомов кислорода (маленькие красные шарики), энергетически эквивалентных гидратной оболочке атома в водном растворе. Селективный фильтр имеет 4 места связывания K^+ , одно или несколько мест связывания могут быть заняты

молекулами воды (большой красный шарик во второй сверху позиции, протоны не показаны). ε - δ – структура калиевого Ca^{2+} -активируемого MthK-канала из *Methanobacterium thermoautrophicum* (Jiang et al., 2002). ε – вид на канал сбоку. Зеленым цветом обозначена цитозольная Ca^{2+} -связывающая «чаша». Красные шарики – ионы Ca^{2+} в местах связывания. Структуры построены на основе рентгеноструктурных данных с сайта www.pdb.org. Файлы 1b18(KcsA) и 1LNQ (MthK).

Субъединицы в тетрамере расположены таким образом, что одна трансмембранная α -спираль обращена в область поры (внутренняя спираль), а другая, внешняя α -спираль – к липидному матриксу мембраны. Трансмембранные сегменты соединены возвратной петлёй, содержащей «опознавательную последовательность» («signature sequence»). Внутренние спирали наклонены к нормали мембраны под углом 25° , так что пора образует конусообразную структуру, обращённую широкой частью к наружной поверхности мембраны. Наружное устье и селективный фильтр несут отрицательные электростатические заряды, обеспечивающие сродство K^+ к поре (Рисунок II.4.5в). Выстилку поры формирует петля и ближайший к карбоксильному концу α -спиральный трансмембранный сегмент. Общая длина поры около 43 \AA и её диаметр изменяется вдоль оси.

Внутренняя пора (её диаметр достаточен для пропускания ионов K^+ в гидратированном состоянии) имеет гидрофобную выстилку, относительно инертную к проникающим гидратированным ионам. Предполагается, что выстилка увеличивает пропускную способность поры путём снижения взаимодействия ионов со структурой канала в тех местах, к которым K^+ имеет сродство (Doyle et al., 1998). Внутри поры обращены 4 петли (по одной от каждой субъединицы), которые состоят из 19 аминокислотных остатков каждая, и соединяют сегменты TM1 и TM2. Петля является высоко консервативным участком. В последовательности петли есть 8 аминокислотных остатков, которые присущи практически всем K^+ -каналам. Она называется

«опознавательной последовательностью». Мутации в данной последовательности нарушают K^+ -селективные свойства канала (Heginbotham et al., 1997).

Рентгеноструктурные данные подтверждают важность «опознавательной последовательности» для обеспечения высокой селективности каналов (Doyle et al., 1998). Было обнаружено, что эта последовательность обращена внутрь поры в самой узкой её части и формирует вокруг ионов K^+ (постоянно удерживаемых внутри селективного фильтра) кольца из атомов кислорода карбоксильных групп основной цепи. Такая структура энергетически эквивалентна гидратной оболочке атома K^+ в водном растворе (Рисунок П.4.5в). Поэтому иону Na^+ , например, для проникновения в селективный фильтр необходимо преодолеть потенциальный барьер на 18 кТ более высокий, чем иону K^+ , что приводит к вытеснению натрия из селективного фильтра (Allen et al., 1999). Селективный фильтр имеет 4 места связывания K^+ , одно или несколько мест связывания могут быть заняты молекулами воды. В среднем же, в селективном фильтре удерживается 2 иона K^+ (Zhou and MacKinnon, 2003). Это обеспечивает поддержание постоянного диаметра фильтра и препятствует его смыканию. Кроме того, система из расположенных последовательно мест связывания обеспечивает «синхронную» передачу ионов вдоль селективного фильтра, когда дегидратация иона на входе совпадает по времени с гидратацией на выходе селективного фильтра, что снижает энергетические затраты на весь процесс в целом (Morais-Carbal et al., 2001; Chung et al., 2002).

Такая структура позволяет каналу совмещать два уникальных и, казалось бы, взаимоисключающих свойства – высокую избирательность к ионам калия (около 1:1000 для некоторых каналов по отношению к Na^+) и высокую проницаемость для них (скорость передачи ионов через одиночную пору $\sim 10^7$ ионов в секунду).

В целом пора имеет сложный профиль вдоль канала, где самая узкая её часть – селективный фильтр – составляет в диаметре всего 3 Å, а самая широкая

(в заполненной водой полости, расположенной примерно посередине толщины мембраны) – в диаметре 10 Å. Кроме того, сегменты KcsA канала сходятся к цитоплазматическому выходу поры и имеют там большое количество гидрофобных аминокислотных оснований, что даёт основание предполагать, что ближайшая к цитоплазме часть сегмента TM2 является воротной частицей (Рисунок П.4.5а).

II.5.2.2 Ca^{2+} -рецептор

Показано, что K_{Ca} -каналы большой проводимости (BK-каналы) могут открываться и в отсутствие Ca^{2+} , но при V_m более 100 мВ (Cox et al., 1997; Cui et al., 1997). Присутствие во внутренней среде ионов Ca^{2+} снижает порог активации каналов. В структуре α -субединицы BK-каналов обнаружен высоко консервативный участок из 28 аминокислот, находящийся между сегментами S9 и S10 (Рисунок П.4.4) и примыкающий непосредственно к сегменту S10 (Morita et al., 1997). Он содержит большое число отрицательных зарядов (преимущественно, на аспартате). Показано, что этот участок является наиболее вероятным Ca^{2+} -сенсором (Schreiber and Salkoff, 1997; Schreiber et al., 1999). Основанием для этого послужили эксперименты с точечными мутациями в последовательности DQDDDDDPD, приводящими к существенным изменениям в активации канала ионами Ca^{2+} . Например, замена в этой последовательности даже одного аспартата на аспарагин или его удаление в подчёркнутых позициях приводила к смещению потенциалозависимости $P_o(V_m)$ в сторону положительных значений V_m более, чем на 50 мВ (при концентрациях $[Ca^{2+}]_i$ в диапазоне от 4 до 100 мМ). Мутации за пределами Ca^{2+} -сensors мало влияли на чувствительность канала к кальцию.

Дополнительным доказательством в пользу того, что идентифицированный участок действительно является местом связывания Ca^{2+} и управляет активностью канала, являются эксперименты с каналом *mslo3* – структурным аналогом канала *mslo*, не зависящим от $[Ca^{2+}]_i$

потенциалозависимым каналом большой проводимости. Замена в *mslo* C-концевого участка, содержащего Ca^{2+} -сенсор, на аналогичный участок из *mslo3*, превращала исходно Ca^{2+} -зависимый ВК-канал в не управляемый ионами Ca^{2+} потенциалозависимый канал (Schreiber M., et al., 1999). Из этого можно сделать вывод, что Ca^{2+} -сенсор в отсутствие Ca^{2+} является ингибитором потенциалозависимого макси- K^+ -канала. Согласно аллостерической модели (Cox et al., 1997), присоединение Ca^{2+} изменяет (снижает) свободную энергию ΔG перехода канала из закрытого состояния в открытое, и канал открывается при физиологических значениях мембранного потенциала.

Ca^{2+} -связывающий участок макси- K^+ -канала имеет некоторое сходство с Ca^{2+} -связывающей протеазой (Moss et al., 1996), но не с белками типа “EF-hand”. К белкам данного типа скорее относится Ca^{2+} -зависимый K^+ -канал малой проводимости, имеющий в своей структуре кальмодулин (Xia et al., 1998; Persechini A., et al., 1989). Как правило, в молекуле белка ионы Ca^{2+} , координируются с 6-8 кислородосодержащими лигандами. Атомы кислорода, участвующие в связывании Ca^{2+} , обычно принадлежат карбоксильным группам аспартата (D) и глутамата (E). Как видно из рисунка II.4.4 Ca^{2+} -сенсор содержит около 10 таких групп. Кроме того, в связывании Ca^{2+} участвуют атомы кислорода амидных групп ($-\text{CO}-\text{NH}_2$) аспарагина (N) и глутамина (Q), спиртовых групп ($-\text{OH}$) в серине (S) и треонине (T), а также карбонильный кислород пептидной цепи ($-\text{CO}-\text{NH}-$) (Гусев 1998). При связывании с Ca^{2+} происходит переориентация аминокислот, связывающих эти ионы. С одной стороны, это стабилизирует Ca^{2+} в его «чаше», а с другой – вызывает малые изменения в одном из концов белка, что по принципу домино приводит к глобальным изменениям в структуре всего белка. Стоит заметить, что смещение положения отдельных аминокислот при связывании Ca^{2+} могут быть малыми (менее 1 Å), однако они могут передаваться на большие расстояния (десятки ангстрем) (Vajroath et al., 1989). Это в свою очередь приводит к снижению свободной энергии перехода канала (сенсора напряжения) из закрытого состояния в открытое.

Таким образом, согласно рентгеноструктурному исследованию бактериального K_{Ca} -канала (MthK-канала), четыре его субъединицы своими цитозольными сегментами образуют Ca^{2+} -связывающее управляющие кольцо. Эта структура не является самостоятельным воротным механизмом, но способна управлять воротным механизмом поры. Каждая α -субъединица способна связать два иона Ca^{2+} , таким образом, каждый канал способен связать до 8 ионов Ca^{2+} (Рисунок П.4.5д).

II.5.2.3 Сенсор напряжения

Одним из наиважнейшим структурным элементом ионного канала, управляющим его активностью, является сенсор напряжения. В своё время Ходжкин и Хаксли предположили, что ионный канал должен содержать компонент, который в зависимости от приложенного потенциала либо открывает канал для катионов (что означает активацию в электрофизиологическом смысле), либо блокирует его (инактивация). Зависимость от потенциала указывает на то, что компонент несёт электрический заряд (в виде подвижного заряда или диполя) и может смещаться при изменении трансмембранного потенциала под действием кулоновских сил. Эти перемещения зарядов могут быть экспериментально зафиксированы, если измерения производить через 1 мкс после деполяризации в виде очень небольших положительных токов, направленных изнутри наружу мембраны и не чувствительных к действию обычных ингибиторов ионных токов. Впервые они были зарегистрированы в скелетной мышце (Schneider and Chandler 1973) и в аксоне кальмара (Armstrong and Bezanilla 1977), и были названы «воротными» токами. При совместном использовании методов регистрации воротных токов и анализа шума на K^+ -канале *Shaker-IR* удалось измерить воротный заряд одиночного канала, который составил от 12 до 13 элементарных зарядов (Zagotta and Aldrich 1990). Как показали многочисленные эксперименты, в структуре потенциалозависимых K^+ -каналов сенсором напряжения является сегмент S4 (Noda et al., 1984). Он содержит в последовательности фрагмент с повторяющимися через каждые 3

позиции аргинином или лизином R362, R365, R368, R371, K374, R377, K380 для последовательности *Shaker*В-канала (Tempel et al., 1987). Данная последовательность обеспечивает сегменту положительный заряд. Таким же образом устроена последовательность сенсора напряжения потенциалзависимых Na^+ и Ca^{2+} -каналов (Bezanilla, 2000).

Раньше считали, что K_{Ca} -каналы относятся к типу лиганд-управляемых каналов, в которых потенциалозависимость действия Ca^{2+} обусловлена увеличением его константы связывания с каналом при увеличении V_m (Moczydlowski and Latorre, 1983). Позже путём химической модификации было показано, что K_{Ca} -канал может открываться в отсутствие Ca^{2+} в ответ на деполяризующий потенциал (Pallotta, 1985). Более того, было показано, что в диапазоне 10^{-12} - 10^{-7} М $[\text{Ca}^{2+}]_i$ активность канала и потенциал $V_{1/2}$, при котором $P_O=0.5$, не зависит от концентрации Ca^{2+} , что не совпадает с ожидаемой линейной зависимостью $V_{1/2}$ от $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в случае лиганд-управляемого канала (Cui et al., 1997). Таким образом, данные указывают на исходно потенциалзависимую природу воротного механизма канала, где роль Ca^{2+} заключается в снижении свободной энергии перехода канала из закрытого состояния в открытое (модуляции).

В структуре α -субъединицы K_{Ca} -канала имеется трансмембранный сегмент S4 (Atkinson et al., 1991; Wallner et al., 1999), аналогичный сегменту S4 в сенсоре напряжения потенциал-управляемых ионных каналов. В последовательности S4 K_{Ca} -канала имеется три положительно заряженных аминокислотных остатка (аргинины R207, R210, R213) и отрицательно заряженный глутамат E219 (в сенсоре напряжения канала находится $4 \times 4 = 16$ заряженных аминокислот). Точечные мутации аминокислот в S4 показали, что только две аминокислоты (R210 и R213) дают вклад в потенциалозависимость воротного механизма K_{Ca} -канала *hSlo* (Diaz et al., 1998). При этом эквивалентный воротный заряд (Z_{eq}) составлял $1.6e_0$. Мутации R210N или R213Q снижали Z_{eq} приблизительно в 2 раза.

Чувствительность канала к потенциалу в целом зависит от числа воротных зарядов и степени кооперативности их взаимодействия (Sigworth, 1994). Обычно она определяется как величина смещения V_m , при котором P_o изменяется в e раз (ΔV_e). Для K_{Ca} -каналов ΔV_e варьируется в диапазоне от 8 до 17 мВ как для нативных каналов (Latorre et al., 1989), так и для экспрессированных клонов (Hanaoka et al., 1999). Однако для *Shaker* K^+ -канала, имеющего значительно больший воротный заряд, ΔV_e также лежит в этом диапазоне. Это может быть обусловлено тем, что потенциалозависимость характеристик канала обеспечивается не только зарядами S4, но и другими не идентифицированными зарядами (Sigworth, 1994).

Мутации других заряженных аминокислот в S4 канала *hSlo* показали, что R207 создаёт высокий потенциальный барьер для перехода канала из закрытого состояния в открытое (мутации R207Q или R207E снижают этот барьер приблизительно на 30 кДж/моль). Напротив, R210 (предположительно этот аргинин также может быть включён в структуру S4) и E219 локализованы, по-видимому, вне зоны действия мембранного потенциала, так что их мутации не вызывают значительных изменений в активности канала (Diaz et al., 1998).

II.5.3 Воротный механизм K^+ -каналов

II.5.3.1 Активация

Работа канала представляет собой обратимое изменение конформационного состояния канала, которое приводит к изменению силы тока проникающих ионов от нулевого значения (закрытое состояние) до некоторого постоянного значения (открытое состояние). Для реализации такого поведения воротный механизм должен иметь «заслонку», сопряжённую с управляющей структурой (сенсором трансмембранного потенциала, рецептором лиганда). Физической интерпретацией переходов канала между стационарными состояниями является модель движения частицы в потенциальном поле сил, энергетический профиль которого имеет несколько минимумов с барьерами

между ними. Управляющие компоненты воротного механизма должны обеспечивать изменение этого профиля для возникновения возможности конформационных переходов или изменять активационный барьер.

Источником свободной энергии для осуществления воротного процесса в потенциалозависимом канале является потенциальная энергия электростатического взаимодействия заряженных аминокислотных групп с трансмембранным потенциалом (примерно 10 кДж/моль для элементарного заряда при разности потенциалов 100 мВ). Для открывания лиганд-зависимых каналов используется энергия связи лиганда с рецептором (Hille, 2001). При снижении активационного барьера до определённого уровня открыванию или закрыванию канала способствуют тепловые флуктуации.

В структуре Ca^{2+} -активируемых макси- K^+ -каналов присутствует как сенсор напряжения, так и рецептор Ca^{2+} . Наличие рецептора Ca^{2+} в структуре канала в отсутствие Ca^{2+} сильно увеличивает энергию, необходимую для открывания канала, и он открывается только при очень больших ($V_m > 100$ мВ) значениях трансмембранного потенциала. Присоединение иона Ca^{2+} к рецептору снижает этот порог на 30 кДж/моль (Diaz et al., 1998), вследствие чего канал открывается при физиологических значениях V_m .

Существует много гипотез об устройстве воротного механизма (Unwin and Zampighi, 1980). Это может быть некая поворотная или перемещающаяся заслонка, т.е. перемещению подвергается не весь канал, но лишь малая его часть. Возможно, сама пора канала подвергается деформации на сжатие или кручение. Канал мог бы блокироваться частицей, либо растворённой в цитоплазме и свободно плавающей, либо связанной с каналом (механизм «шарик на цепочке» (Armstrong and Bezanilla, 1977)). Канал может частично или полностью выходить из мембраны или собираться для каждого срабатывания из субъединиц, свободно диффундирующих в мембране. Возможно, также и частично полевого управление происходит проникновением ионов через пору, когда электростатическое поле отталкивает проникающий ион, как в полевом транзисторе.

Использование метода точечной фиксации потенциала (пэтч-метода), рентгеноструктурного анализа, флуоресцентных и спиновых меток позволило составить примерную картину конформационных изменений при работе K^+ -канала. В частности, были исследованы структурные изменения в *Shaker*- K^+ -канале. В этом канале сегменты S2 и S4 имеют заряженные аминокислоты (два остатка глутамата в S2, пять остатков аргинина и два остатка лизина в S4), которые составляют сенсор напряжения (Seoh et al., 1996; Aggarwal and MacKinnon, 1996). Было показано, что при подаче на мембрану ступеньки напряжения именно эти структуры подвергаются первичным конформационным изменениям, которые затем распространяются на весь канал (Cha and Bezanilla, 1998), и, в частности, на сегмент S6, который, вероятно, является активационной воротной частицей (Holmgren et al., 1997). Методом лантанид-зависимого переноса энергии было установлено, что мембранный потенциал вызывает смещение субъединиц K^+ -канала относительно друг друга на расстояние до 3.2 Å, при этом сегмент S4 отклоняется от оси канала и подвергается вращению (Cha et al., 1999). Методом флуоресцентного резонансного переноса энергии было показано, что сегмент S4 в закрытом состоянии наклонён к оси канала и при переходе в открытое состояние изгибается вдоль собственной оси (Clauner et al., 1999). В целом данные совпадают в том, что при активации канала происходит смещение сегмента S4 к наружной стороне мембраны с одновременным его закручиванием на 180°. При этом смещения отдельных аминокислот не превышают 5 Å. Предполагают, что это конформационное изменение распространяется дальше на воротный сегмент S6.

Методом рентгеноструктурного анализа были исследованы структурные изменения простого рН-зависимого бактериального K^+ -канала KcsA (Doyle et al., 1998). При нейтральных рН этот канал закрыт, а при закислении наружной среды он открывается. Этот канал является лиганд-управляемым и самым простым из известных каналов. Каждая из четырёх его субъединиц состоит не из 6, а из 2 трансмембранных сегментов TM1 и TM2, которые аналогичны сегментам S5 и S6 K^+ -каналов эукариот. Методом спиновой метки было показано, что при

переходе канала из открытого состояния в закрытое, конформационные изменения его структуры, начинаясь в H^+ -рецепторе на наружной части канала, распространяются затем на весь канал. Таким образом, структура канала претерпевает существенные изменения, при которых сегменты TM1 и TM2 движутся как твёрдое тело. Движения включают как смещения субъединиц, так и вращение сегментов. Изменения не затрагивают лишь селективный фильтр и наружное устье канала. В результате перестроек сближенные как в вершине конуса гидрофобные концы сегментов TM2 расходятся и открывают гидратированным ионам K^+ доступ во внутреннюю полость поры и к селективному фильтру (Perozo et al., 1999). Более того, рентгеноструктурный анализ показывает, что трансмембранная структура бактериального Ca^{2+} -зависимого MthK-канала в основном повторяет структуру, предсказанную для открытого KcsA-канала (Рисунок II.4.5e). Аналогичная модель первичного воротного механизма предложена и для *Shaker*-каналов (Cha et al., 1999; Clauner et al., 1999).

II.5.3.2 Инактивация

В некоторых типах каналов вслед за активацией (открыванием канала) развивается инактивация (закрывание канала), которая может быть полной или частичной.

Согласно представлениям Ходжкина и Хаксли (Hodgkin and Huxley, 1952), у канала предполагалось наличие одной инактивационной частицы. В дальнейшем была выявлена связь инактивационного процесса с активацией канала (Kortis and Goldin, 1997; Marban et al., 1998) и существование быстрой и медленной фаз инактивации.

В потенциалозависимых K^+ -каналах (*Shaker*, *Shot*) быструю инактивацию (N-тип) осуществляет структура типа «шарик на цепочке», состоящая приблизительно из двадцати аминокислотных остатков и находящаяся с цитоплазматической стороны канала на N-конце субъединицы (Hoshi et al., 1990; Zagotta and Aldrich et al., 1990). Поскольку канал представляет собой тетрамер,

состоящий из одинаковых субъединиц, у канала есть четыре инактивирующие частицы, хотя для блокады достаточно лишь одной (Gomez-Lagunas and Armstrong, 1995; MacKinnon et al., 1993). При добавлении в раствор пептида, соответствующего блокирующей частице, наблюдается блокада и других типов каналов (Toro et al., 1992; Hoshi et al., 1990). Рецептором для блокирующей частицы является петля между сегментами S4 и S5 (Isakoff et al., 1991; Holmgren et al., 1996). Инактивация N-типа сопряжена с инактивацией C-типа (Hoshi et al., 1991), которая развивается медленнее и зависит от аминокислотного состава в P-области и наружной части сегмента S6. Предположительно инактивация C-типа включает перестройку экстраклеточного устья поры, происходящей в результате кооперативного конформационного изменения субъединиц канала (Ogielska et al., 1995; Panyi et al., 1995; Liu et al., 1996).

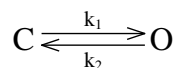
Во многих типах тканей макси- K_{Ca} -каналы не имеют инактивационного механизма. Однако клетки надпочечников и нейроны гиппокампа содержат макси- K_{Ca} -каналы с быстрой инактивацией (Wallner et al., 1999; Solaro et al., 1992; Solaro et al., 1997; Hicks and Marrion, 1998). Было установлено, что в макси- K_{Ca} -каналах клеток человека быстрая инактивация вызывается пептидом, состоящим из 19 аминокислот и входящим в состав N-конца P-субъединицы определённого типа, а механизм инактивации напоминает N-инактивацию в потенциалозависимых каналах.

Таким образом, исходя из приведённых выше данных, можно сказать, что структура K^+ -каналов, будь то K_{Ca} -каналы или просто потенциалозависимые каналы, сложна и организована по модульному принципу. Воротный механизм такой структуры представляет собой цепь конформационных изменений, распространяющихся по всей глобуле.

II.5.4 Кинетика воротного механизма K^+ -каналов

Ионный канал может находиться в двух основных состояниях проводимости – закрытом и открытом. Процесс перехода между состояниями

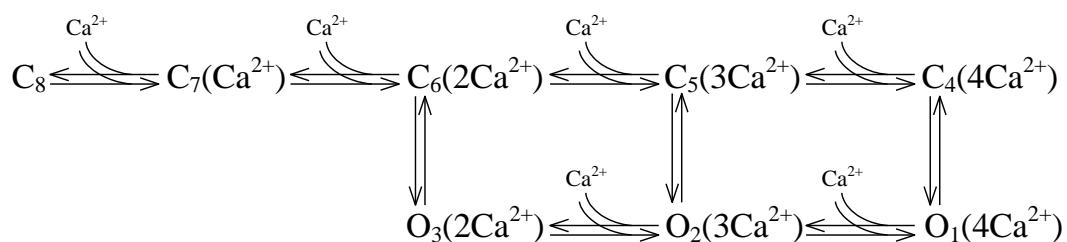
проводимости определяет кинетику воротного механизма. Для его описания используют диаграммы состояний (Hille, 2001). В простейшем случае диаграмма имеет два состояния: закрытое (C) и открытое (O).



Переходы между такими состояниями описываются кинетикой первого порядка и, следовательно, одноэкспоненциальной релаксацией при ступенчатом возмущении (Eigen and Hammes, 1963):

$$P(t) = P_0 - (P_\infty - P_0) \exp[-(k_1 + k_{-1})t], \quad (\text{II.4.3})$$

где P_i – вероятность нахождения канала в открытом (закрытом) состоянии; $1/(k_1 + k_{-1})$ – постоянная времени релаксации. Каналам в биологических мембранах соответствуют более сложные кинетические диаграммы. Это обусловлено большим числом кинетических подсостояний и существованием дополнительно к активации других процессов (например, задержка активации, инактивация, деактивация). Так, макси- K^+ -канал в скелетной мышце хорошо описывается кинетикой с 5-ю закрытыми и 3-мя открытыми состояниями (McManus and Magleby, 1991):



Числа в скобках обозначают число связанных с каналом ионов Ca^{2+} .

С усовершенствованием разрешающей способности метода точечной фиксации потенциала (Hamill et al., 1981) удаётся измерять более быстрые стадии воротного процесса, так что число регистрируемых кинетических состояний может возрастать. Например, по меньшей мере, три дополнительные быстрые

стадии воротного процесса наблюдали Ротберг и Маглеби (Rothberg and Magleby, 1998) в макси- K_{Ca} -канале скелетной мышцы и Мосс с соавт. (Moss et al., 1999) в *dslo* K_{Ca} -канале. В некоторых каналах число кинетических состояний, используемых для описания воротных процессов, может быть очень большим (Liebovitch and Krekora, 2002). Это число определяется количеством экспоненциальных компонент, составляющих распределения времён жизни канала в открытом (τ_o) или закрытом (τ_c) состояниях. Для такого анализа созданы достаточно точные методы (Horn and Lange, 1983; Ball and Samson, 1989; Colquhoun et al., 1996; Rothberg et al., 1997; Moffatt, 2007).

Каналообразующая α -субъединица макси- K_{Ca} -каналов представляет собой тетрамер, поэтому многие из моделей воротного процесса могли бы соответствовать аллостерическим механизмам, ранее предложенным для тетрамерных белков. В этих моделях каждая субъединица может связывать лиганд. Аллостерическая модель Моно-Уаймена-Шанжо (Monod-Wyman-Changeaux (MWC)) (Monod et al., 1965) имеет 10 состояний с согласованными переходами между ними (Рисунок П.4.6а,б), а модель Кошланда и соавт. (Koshland et al., 1966) – имеет 5 состояний с последовательными переходами между ними. Обе модели находятся в рамках обобщенной схемы Эйгена (Eigen, 1968) с 35 состояниями, предложенной для тетрамерных белков. Согласно данным (Rothberg and Magleby, 1998), модель Моно-Уаймена-Шанжо и Кошланда с соавторами не вполне соответствует экспериментальным данным.

Более адекватными являются расширенные модели. Например, двух-ярусная модель с 50 состояниями (Рисунок П.4.6в), воспроизводящая зависимость активности макси- K_{Ca} -каналов от величины трансмембранного потенциала V_m и связывания Ca^{2+} в широких пределах значений напряжения на мембране и концентраций управляющего лиганда (Ca^{2+}).

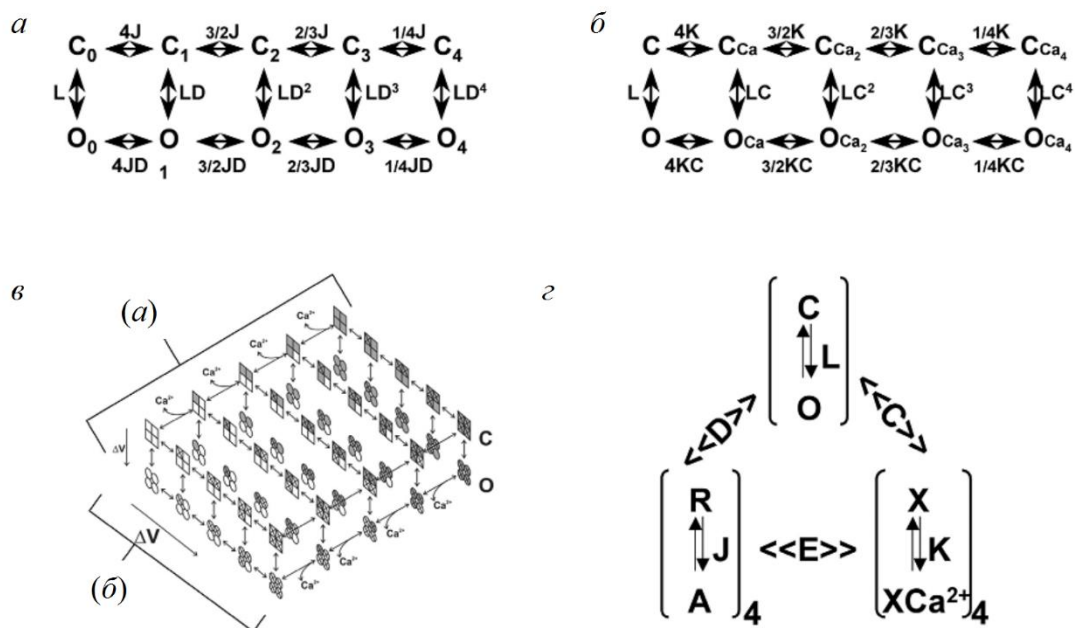


Рисунок П.4.6. Модель аллостерической активации ВК-канала (с изменениями из (Latorre and Brauchi, 2006)). *a* – схема аллостерического механизма активации канала при изменении трансмембранного потенциала V_m , построенная на основе МВС-модели с 10 состояниями. Здесь D – аллостерический фактор и J – равновесная константа. *б* – схема аллостерического механизма активации канала при связывании лиганда (Ca^{2+}), также построена на основе МВС-модели с 10 состояниями. Для каждого акта связывания Ca^{2+} равновесная константа открывания канала L умножается на аллостерический фактор C . *в* – двухъярусная модель с 50 состояниями, являющиеся комбинацией (*a*) и (*б*). *г* – полная модель с 70 состояниями, включающая взаимодействие между активацией сенсора напряжения и связыванием Ca^{2+} (аллостерический фактор E). При $E = 1$ полная модель редуцируется к модели с 50 состояниями (*в*).

Модель хорошо описывает воротную кинетику макси- K_{Ca} -каналов, даже при очень низкой активности канала ($P_o \sim 10^{-6}$). В некоторых случаях (например, (Orio and Latorre, 2005)), для описания воротной кинетики K_{Ca} -каналов с учётом взаимосвязи между движением сенсора напряжения и связыванием Ca^{2+} , используют более полную модель, уже с 70 состояниями (Horrigan and Aldrich,

2002) (Рисунок II.4.6z), где E - некоторый аллостерический фактор, обуславливающий эту взаимосвязь.

При построении моделей активности одиночных ионных каналов на основе кинетических схем, физическую природу воротных процессов, как правило, не учитывают и рассматривают канал как «чёрный ящик», т.е. корректность модели оценивают по совпадению каких-либо её выходных параметров с экспериментальными данными.

II.5.5 Математические модели воротного механизма и воротной проводимости ионных каналов

II.5.5.1 Модели на основе марковского процесса

Как правило, для описания воротного процесса в соответствии с изложенными выше кинетическими схемами используется допущение, что переходы канала между состояниями являются случайными, при этом вероятность перехода в другое состояние не зависит от предыстории, т.е. времени пребывания канала в предшествующих состояниях (Colquhoun and Hawkes, 1981; Aldrich et al., 1983; Horn and Lange, 1983; Sine et al., 1990; McManus and Magleby, 1991; Auerbach, 1993; Bezanilla et al., 1994; Zagotta et al., 1994; Rothberg and Magleby, 1998; Moss et al., 1999; Chen et al. 2019). В целом, воротный процесс в марковском приближении основан на следующих представлениях (Liebovitch and Krekora, 2002):

- 1) белок ионного канала имеет несколько (2-20) стабильных конформационных состояний с фиксированными и неизменными во времени энергетическими барьерами между ними;
- 2) переходы между состояниями обусловлены случайными событиями: тепловыми флуктуациями и/или связыванием лиганда;
- 3) как следствие, вероятность перехода между состояниями может быть определена, но момент перехода не может быть предсказан, так как последующие события не зависят от предшествующих.

Для марковских стационарных процессов переходы между состояниями описываются экспоненциальными функциями. Например, если канал имеет N закрытых (открытых) состояний, то функция плотности вероятности нахождения канала в этих состояниях $f(t)$ является суммой N экспонент:

$$f(t) = \sum_{i=1}^N (\alpha_i / \tau_i) \exp(-t / \tau_i) \quad (\text{II.4.4})$$

Здесь τ_i – постоянные времени экспонент, α_i – весовые коэффициенты.

Имеются следующие экспериментальные обоснования таких моделей.

1. Распределения кинетических параметров (τ_o и τ_c) достаточно хорошо аппроксимируются суммой экспонент.
2. В экспериментах с определением условной вероятности для пары соседних событий (τ_o и τ_c) наблюдалась независимость констант скоростей последующих переходов от длительности предшествующего события (McManus and Magleby, 1989; Gibb and Colquhoun, 1992).
3. Число регистрируемых состояний (экспонент) ограничено.
4. Наблюдается кажущееся термодинамическое равновесие процесса: характер условных распределений не зависит от направления (прямого или обратного), в котором производится обработка данных.

Частными случаями, подтверждающими случайность воротного процесса (отсутствие временной корреляции в событиях), является также: 1) независимость постоянной времени спада токов концевой пластинки (Magleby and Stevens, 1972) и релаксации неинактивирующегося Na^+ -тока (Hahn, 1988) от предшествующего мембранного потенциала (т.е. активности канала) и 2) независимость быстрых переходов в закрытое состояние от степени инактивации в макси- K^+ -канале (Pallotta, 1985).

Вместе с тем, наряду с приведёнными выше экспериментальными данными, говорящими в пользу марковского подхода, существует достаточно большое количество теоретических расчётов и экспериментальных наблюдений, которые ставят под сомнение обобщение этого приближения на все типы ионных каналов.

Как было показано выше, в структуру ионных каналов входят тысячи аминокислотных остатков и сотни углеводных групп, организованных в субъединицы и домены. Каждый атом такой структуры взаимодействует с другими атомами ближнего и дальнего окружения с помощью электростатических, гидрофобных и других сил, а третичная структура белка столь гибка, что атомы могут иметь огромное число почти идентичных энергетических состояний. В такой системе должно быть много путей перехода от одного конформационного состояния к другому, вследствие чего маловероятно, чтобы белки имели только несколько фиксированных энергетических барьеров. В силу этих же причин каждый более или менее выраженный барьер должен расщепляться на серию более мелких барьеров, образуя тем самым фрактальную структуру (Lopez-Quintela and Casado, 1989).

Непрерывное движение атомов, аминокислотных остатков, боковых цепей и доменов не соответствует представлению о неизменных во времени, статических активационных барьерах. Методами флэш-фотолиза, ЯМР, протонного обмена, флюоресценции и др. показано, что глобулярные белки являются очень гибкими структурами, компоненты которых совершают движения в широких масштабах временной и пространственных координат. Следовательно, белки имеют много конформационных состояний с близко расположенными энергетическими минимумами. У них имеется множество параллельных разветвлённых путей переходов через активационные барьеры. При этом высота барьеров может изменяться и флуктуировать во времени (Austin et al., 1975; Careri et al., 1975; Karplus and McCammon, 1981).

В ряде случаев экспериментальные распределения кинетических параметров представляли собой не сумму экспонент, а степенные или иного рода функции (Blatz and Magleby, 1986; Liebovitch and Sullivan, 1987). Кроме того, экспоненциальными функциями могут описываться не только марковские, но и другие процессы, например, детерминированный хаос (Liebovitch and Toth, 1991).

Имеется довольно много данных о том, что проникающие через канал ионы модифицируют кинетику воротного процесса, что означает сопряжение конформационных изменений в канале с ионным потоком. Например, Рихард и Миллер (Richard and Miller, 1990) показали, что в Cl⁻-каналах переходы между тремя подсостояниями проводимости, во-первых, являются термодинамически неравновесным процессом, а во-вторых, они сопряжены с трансмембранным электрохимическим градиентом ионов Cl⁻. Методом ЭПР показано сопряжение конформационных изменений в селективном фильтре KcsA-канала с конформационными переходами «ворот», образованных пучком сегментов TM2 (Perozo, 2001).

В ряде работ теоретически исследовано взаимодействие проникающих ионов с ионной порой канала. Чинаров и соавт. (Chinarov et al., 1992) показали, что при некоторых значениях параметров модели ионная пора находится в стационарном режиме с некоторыми флуктуациями состояния. При других значениях параметров система бистабильна: она переходит между закрытым и открытым состояниями благодаря воздействию ионов. Чен с соавт. (Chen et al., 1992, 1995) показали, что проникающие через канал ионы обмениваются значительным количеством энергии со стенками поры, в результате чего может происходить её нагрев.

Было показано, что кинетика ионных каналов проявляет сложное поведение, характеризуемое наличием долговременных корреляций (Nogueira et al. 1995; Varanda et al. 2000; Siwy et al. 2001; Bandeira et al. 2008; De La Fuente et al. 2017; Wawrzkievicz-Jałowiecka et al. 2018). Наличие таких корреляций в кинетике ионных каналов или памяти означает, что переход канала в открытое или закрытое состояние не происходит случайным образом, а подчиняется некоторым детерминистическим законам (Silva et al. 2021).

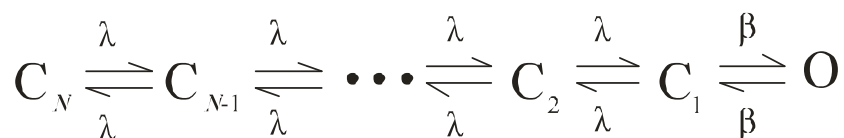
Таким образом, приведённые данные указывают на то, что сложная структура ионного канала, динамика тепловых флуктуаций компонентов этой структуры, взаимодействие ионных потоков со структурой канала и наличие долговременных корреляций в его кинетике в целом не очень согласуются с

положениями марковского подхода. Это даёт основания для создания альтернативных моделей воротного процесса.

II.5.5.2 Диффузионные модели

В этих моделях канал рассматривается «диффундирующим» вдоль большого числа закрытых состояний, в которые он переходит из единственного открытого состояния. Кратко рассмотрим два типа диффузионных моделей: одномерную (D1) модель Мильхаузера (Millhauser et al., 1988) и трёхмерную (D3) модель Лейгера (Lauger, 1988).

D1-модель представляет линейную цепочку из N ($N \geq 50$) закрытых состояний (C) и одного открытого (O) состояния:



где β – константа скорости открывания канала, а λ – константа скорости взаимопереходов между закрытыми состояниями. Строго говоря, это ещё марковский процесс с большим числом состояний, поэтому можно точно определить матрицу переходов между закрытыми состояниями (Q_{CC}) и рассчитать константы α_i и τ_i ($i = 1, \dots, N \geq 50$, см. ур. (II.4.4)). Однако эта модель даёт степенную зависимость функции плотности вероятности от времени (Millhauser et al., 1988).

Модель D3 аналогична модели D1 (λ и β определяются аналогично), но в ней закрытые состояния организованы в трёхмерную решётку. Используя симметричность матрицы Q_{CC} , трёхмерную модель можно редуцировать до линейной D1 с тем же числом состояний, что и в D3, и рассчитать α_i и τ_i (Lauger, 1988).

II.5.5.3 Модель Вильяма-Уотта

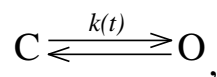
Этот класс моделей используется для интерпретации неэкспоненциальной релаксации в сложных твердотельных системах, например, полимерах и стёклах (Shlesinger and Montroll, 1984; Klafter and Shlesinger, 1986). Как отмечалось Фраунфельдером и соавт. (Frauenfelder et al., 1988), стекло и белки имеют сходные конформационные подсостояния, поэтому уместна попытка использовать данную модель для описания релаксационных процессов в белках. Модель Вильяма-Уотта описывает процессы, характеризующиеся «растянутой» (stretched) экспоненциальной кинетикой. Функцию плотности вероятности распределения времён жизни каналов в открытых (закрытых) состояниях можно записать следующим образом:

$$f(t) = \frac{\beta}{\tau \Gamma(1/\beta)} \exp[-(t/\tau)^\beta] \quad (\text{II.4.5})$$

Здесь $0 < \beta \leq 1$, а Γ является гамма-функцией. При $\beta=1$ $f(t)$ является одноэкспоненциальной функцией, а при уменьшении β она как бы растягивается, покрывая всё больший диапазон t .

II.5.5.4 Экспо-экспоненциальная модель

Первоначально эта модель была предложена Истоном (Easton, 1978) для описания кинетики макроскопических Na^+ и K^+ -токов в аксоне кальмара. В её основе лежит зависимость констант скоростей от времени нахождения канала в предшествующем состоянии:



$$\text{где } k(t) = A \exp(-Dt) \quad (\text{II.4.6})$$

A и D – константы. Эта модель имеет сходство с фрактальной моделью (см. ниже), а обозначения A и D выбраны, чтобы подчеркнуть это сходство. Хорн (Horn, 1987) предположил, что зависимость (II.4.6) можно объяснить тем, что скорость открывания канала пропорциональна уровню некоторого

диффундирующего вещества, концентрация которого экспоненциально снижается после закрывания канала. Функция плотности вероятности для этой модели имеет вид:

$$f(t) = A \exp(-Dt) \exp[(A \exp(-Dt) - 1) / D] \quad (\text{II.4.7})$$

II.5.5.5 Фрактальная модель

Модель была достаточно подробно исследована Лейбовичем и соавт. (Liebovitch et al., 1987; Liebovitch, 1989; Liebovitch and Todorov, 1996; Liebovitch and Krekora, 2002). В этой модели, как и в экспо-экспоненциальной модели, скорость открывания канала $k(t)$ зависит от времени его пребывания в закрытом состоянии:

$$k(t) = At^{1-D} \quad (\text{II.4.8})$$

Здесь A – константа, определяемая из кинетических условий, а D – фрактальная размерность ($1 \leq D \leq 2$). При $D = 1$ $k(t) = A$, что соответствует простейшей марковской модели с одним закрытым и одним открытым состоянием. Функция плотности вероятности имеет вид:

$$f(t) = At^{1-D} \exp[-At^{2-D} / (2-D)] \quad (\text{II.4.9})$$

При увеличении D $f(t)$ покрывает всё больший диапазон значений t .

II.5.5.6 Модели детерминированного хаоса

Понятие «детерминированный хаос» определяет нерегулярное, хаотическое движение, порождаемое нелинейными системами, для которых динамические законы однозначно определяют эволюцию во времени данной системы при известных начальных условиях. Первопричиной нерегулярного поведения таких систем является их высокая чувствительность к начальным условиям, в результате чего первоначально близкие траектории экспоненциально расходятся во времени. Описание «детерминированного хаоса» и физические примеры приведены, например, в монографиях Шустера и Муна (Шустер, 1988; Мун, 1990).

Коротко рассмотрим две модели, обладающие свойствами детерминированного хаоса, которые могут быть использованы для описания нерегулярной воротной кинетики ионных каналов.

Одна из этих моделей была предложена Лейбовичем и соавт. (Liebovitch and Czegledy, 1992). Они предложили простую детерминированную (не включающую, какие-либо стохастические элементы) модель, основанную на физических принципах классической механики. На рисунке II.4.7 схематически представлен ионный канал в двух конформационных состояниях (открытом и закрытом). В этой модели переход канала между конформационными состояниями происходит непрерывным образом, динамика которого описывается переменной $X(t)$.

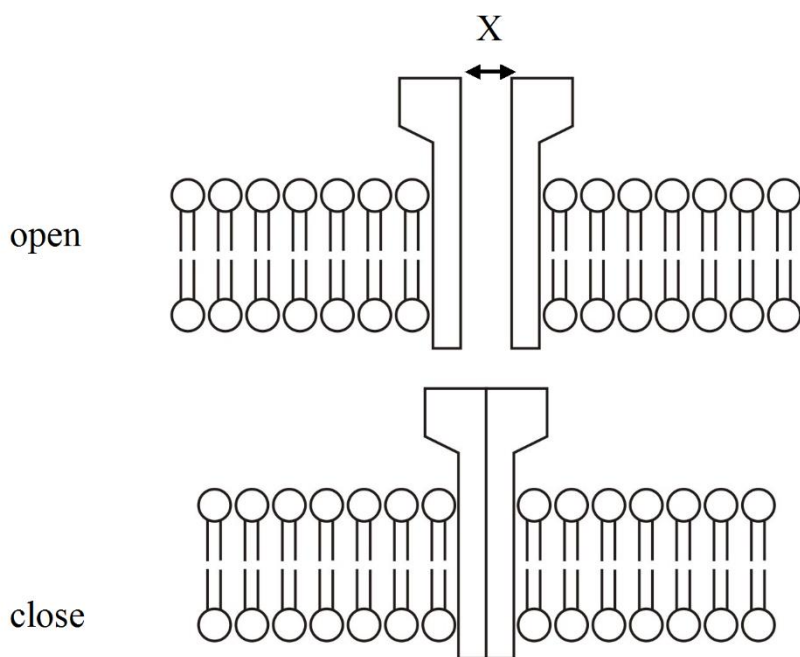


Рисунок II.4.7. Схематическое изображение ионного канала в модели Лейбовича в открытом и закрытом состояниях.

Предполагается, что ток через канал, в этой модели, пропорционален величине X . Динамика конформационной переменной $X(t)$ подчиняется уравнению:

$$d^2x/dt^2 = -\gamma dx/dt - \partial V(x)/\partial x + f \cos(\omega t) \quad (\text{II.4.10})$$

Здесь первый член в правой части описывает силу трения, которая пропорциональна скорости dx/dt (Welch, 1986; McCammon and Harvey, 1987) с коэффициентом пропорциональности γ ; второй член описывает воздействие на воротную частицу канала потенциальных сил со стороны всей белковой глобулы, определяемых функцией потенциальной энергии $V(x)$ с двумя локальными минимумами; третий член является управляющей силой, описывающей воздействие на канал внешнего окружения.

Модель Лейбовича и соавт. позволяет получить последовательности времён жизни модельного канала в открытом (закрытом) состоянии, распределения которых аппроксимируются одной экспонентой $\exp(-kt)$.

Вторая модель была предложена Кавальканти и Фантанацци (Cavalcanti and Fontanazzi, 1999). Они предложили физическую детерминистическую модель, в которой хаотическое поведение системы возникает при действии на воротный механизм внутренних сил, обусловленных задержанным во времени взаимодействием тока проникающих ионов со структурой ионной поры. Эта модель достаточно хорошо имитирует видимую случайность активности ионного канала, экспоненциальные распределения времён жизни канала в закрытом или в открытом состояниях, фрактальные свойства. Ограниченность модели в том, что она описывает только антиперсистентный процесс (значение показателя Хёрста $H = 0.2$).

В целом, функция плотности вероятности для кинетических параметров «детерминированного хаоса» может быть экспоненциальной (как в стохастическом процессе) или «растянутой» экспонентой:

$$f(t) \sim \exp(-t^\alpha), \quad 0 < \alpha < 1, \quad (\text{II.4.11})$$

она также может быть пропорциональной t^{-2} (Liebovitch and Toth, 1991).

В следующем разделе будут рассмотрены структура и функции молекулы ДНК, которая является фундаментальной молекулой с точки зрения существования всех известных форм жизни на Земле. ДНК определяет базовые регуляторные механизмы функционирования живых клеток, и представляет

несомненный интерес как динамическая биологическая система молекулярного уровня структурно-функциональной организации живой материи.

II.6 Молекула ДНК

Молекула ДНК, как уникальный элемент хранения, реализации и передачи генетической информации в живых клетках, представляет несомненный интерес для широкого круга исследователей из различных областей биологии и медицины. Особенностью строения ДНК является ее относительно простое устройство.

Структура этого биополимера, состоящего всего из четырех мономеров, различающихся между собой типами азотистых оснований (аденин, гуанин, тимин, цитозин), представляет собой двуцепочечное спиральное образование, каждая цепочка которого образуется полимеризацией соответствующих нуклеотидов по фосфодиэфирным связям между 3'-гидроксильной группой дезоксирибозы одного нуклеотида и 5'-фосфатной группой другого соседнего нуклеотида. Объединение цепочек в двойную спираль происходит по принципу комплементарности азотистых оснований (аденин-тимин, гуанин-цитозин), соединяемых между собой водородными связями (Watson, Crick, 1953; Ghosh, Vansal, 2003). Последовательность азотистых оснований в цепочках уникальна для каждого живого организма. Система из четырех оснований ДНК с их пространственным и временным регулированием управляет биологией на всей шкале уровней организации живой материи, начиная с ферментативных реакций внутри бактерий, заканчивая эмбриогенезом у людей. В настоящее время существует точка зрения, что ключевые функции ДНК обусловлены не только ее структурой, но и внутренней динамикой ее структурных элементов: оснований, сахаров, фосфатов и фрагментов полинуклеотидных цепочек (Parker and Tullius, 2011; Duzdevich et al. 2014).

В данном разделе будут показаны основные структурные особенности строения молекулы ДНК как идеального биополимера. Будут описаны основные

моменты ДНК-белковых взаимодействий с точки зрения энергетических ландшафтов и физического поведения ДНК с учетом внешних воздействий. Будут продемонстрированы общие представления о процессе транскрипции, как об основном процессе реализации генетической информации с точки зрения физического и биохимического взаимодействия РНК полимеразы с ДНК. Будут представлены оценки основных механических параметров ДНК-белковых взаимодействий: сил и моментов сил. Также в главе будут описаны основные теоретические подходы и модели физического поведения ДНК при различных взаимодействиях.

II.6.1 Структура ДНК

Современное представление о строении ДНК в основном базируется на рентгеноструктурных данных (Watson and Crick, 1953; Siggers et al. 2005). Физиологически преобладающей обычно считается В-форма двойной спирали. Каждый виток спирали имеет диаметр 2 нм и высоту 3.4 нм. Виток включает приблизительно 10.5 оснований. В спирали нити ДНК закручиваются друг вокруг друга в противоположных направлениях. При этом образуются две бороздки: малая шириной 1.2 нм и большая – 2.2 нм. Важно, что ДНК-связывающиеся белки через эти бороздки могут получать разную информацию о последовательности оснований. Например, атомные сигнатуры оснований в большой бороздке позволяют различать все комбинации пар оснований (п.о.), в то время как в малой бороздке пары G-C и C-G или A-T и T-A не различаются по атомным сигнатурам. Считается, что ДНК по гибкости и форме соответствует идеальному полимеру. Поэтому базовая физика полимеров дает оптимальное представление о физическом поведении ДНК при внешних воздействиях.

В клетке из-за динамичной внутриклеточной среды, ДНК подвергается внешним воздействиям постоянно. Силы, воздействующие на ДНК, изменяются в диапазоне от единиц до десятков пиконьютонов. Они могут формироваться благодаря различным процессам. Например, растяжение ДНК может

происходить в процессе деления клеток при вытеснении дочерней хромосомы через перегородку моторными белками или во время сегрегации хромосом (Reyes-Lamothe, et al. 2012; Ferraro-Gideon, et al. 2013).

Важный момент в функционировании ДНК играют механические воздействия положительно (увеличивающие спирализацию) или отрицательно (уменьшающие спирализацию) скручивающие ДНК. Даже небольшие такие воздействия изменяют структуру ДНК, приводя, например, к отрицательной суперспирализации, что снижает стабильность водородных связей между комплементарными основаниями и увеличивает вероятность временного локального расплетания молекулы. В бактериальных хромосомных ДНК локальная суперскрученность снижает энергетический барьер для доступа к информации о последовательности оснований во время процесса транскрипции, регулируя, тем самым, экспрессию генов (Sobetzko, 2016; Pyne, et al. 2021). В процессах транскрипции или репликации обязательно участвуют топоизомеразы, которые ослабляют локально положительно суперскрученные участки, формирующиеся перед активными полимеразми (Chen, et al. 2013; Kouzine, et al. 2013; Ganji, et al. 2016). Следует отметить, что суперспирализация это локальное топологическое изменение структуры ДНК и не может быть устранено вращением вокруг оси по длине молекулы.

Объединение полинуклеотидных цепочек в двойную спираль имеет свою функциональную специфику. С одной стороны, обеспечение защитной функции для сохранения генетической информации. В двойной спирали азотистые основания направлены внутрь, что ограничивает к ним доступ различным соединениям, в том числе и повреждающим мутагенам. С другой стороны, наличие двух полинуклеотидных цепей является ключевым моментом в процессах репарации и репликации ДНК [Razqallah, 2008; Bell and Dutta, 2002].

Считается, что все функции ДНК напрямую связаны с процессами ДНК-белкового взаимодействия (Ptashne and Gann, 2001). А именно, процессами репарации, репликации, транскрипции (при синтезе мРНК) и рекомбинации. Узнавание определенных участков на молекуле ДНК различными белково-

ферментными комплексами — это ключевой момент ДНК-белкового взаимодействия. Например, при транскрипции генов РНК-полимераза должна знать, откуда начинать транскрипцию (узнавание промоторной последовательности) и где ее заканчивать (узнавание терминаторной последовательности) (Cheetham, Steitz, 2002).

Физико-химические факторы, определяющие процессы узнавания, до сих пор до конца не раскрыты. Наиболее широко распространенная гипотеза, объясняющая способы взаимодействия протеинов (например, транскрипционных факторов) с молекулой ДНК, предполагает неспецифическое связывание определенного белка с одной из нитей открытого (расплетенного) участка двойной спирали, образующегося в результате ее спонтанного открывания из-за тепловых флуктуаций. Эти же тепловые флуктуации способны перебрасывать связавшийся белок с одного открытого участка на другой, приводя к его «скольжению» вдоль молекулы ДНК. Такое движение происходит до тех пор, пока белок не встретит соответствующую операторную последовательность, где он может реализовать свою функцию (Berg, et al. 1981; Berg and von Hippel, 1985; von Hippel and Berg, 1989; Shimamoto, 1999; Halford and Szczelkun, 2002; Gerland, et al. 2002; Halford, et al. 2004). В экспериментах с одиночными молекулами было показано, что в процессе поиска промотора РНК-полимераза тратит около 85% времени на неспецифическое взаимодействие с ДНК (Stracy and Karanidis, 2017).

В координатах «структура»-«последовательность», где «структура» подразумевает конформационные состояния ДНК, а «последовательность» — текущую последовательность оснований рассматриваемого участка ДНК, процесс ДНК-белкового взаимодействия разбивается на два ландшафта: ландшафт случайных встреч, и ландшафт связывания (Duzdevich, et al. 2014). Эти ландшафты взаимосвязаны и характеризуются кинетикой изменения свободной энергии взаимодействия ДНК с белком, которая зависит как от конформационных состояний белка и ДНК, так и от последовательности оснований.

ДНК в клетке не является «голой», а с большой вероятностью покрыта различными белками, например, нуклеосомами или белками, связывающимися с нуклеотидами (NAPs), у эукариот и прокариот, соответственно. Можно сказать, что в концепции ландшафтов сами ландшафты меняются при связывании белков с ДНК, что, в свою очередь, меняет условия для связывания других белков. Показано, что при связывании белков с ДНК ее структура искажается в месте связывания и может сильно отличаться от классической В-формы (Gaudier, et al. 2007; Chen, et al. 2008; Montaño, et al. 2012). Например, связывание с ДНК физиологически значимых белков может приводить к изгибам ДНК до π радиан (Moure, et al. 2002; Kim, et al. 1993; Rice, et al. 1996).

Каким образом происходит неспецифическое связывание белков с ДНК на этапе ландшафта встреч — не вполне ясно. Известно только, что оно в значительной степени зависит от концентрации солей в окружающем растворе и во многих случаях обладает кооперативным эффектом (Barkley, 1981; von Hippel, 2007). Также, изменение концентрации солей может приводить к изменению стабильности двойной спирали и, соответственно, к формированию локальных расплетенных участков (Podgornik, et al. 2000; Yakovchuk, et al. 2006). Кроме того, не до конца понятно, что играет решающую роль в изменении структуры ДНК, ее физическая лабильность или силовое действие со стороны белка. Но что более важно, нет полного представления о роли внутренней динамики структурных элементов молекулы ДНК в ДНК-белковых взаимодействиях. Все это говорит о том, что понимание механизмов, связанных со структурно-функциональными особенностями ДНК-белковых комплексов, является важной и актуальной на сегодняшний день проблемой молекулярной и клеточной биологии.

II.6.2 Открытые состояния ДНК

Для понимания связи между динамическими и функциональными свойствами ДНК необходимо изучение конформационной динамики молекулы,

которая сводится к внутренней динамике ее структурных элементов. Одно из наиболее интересных проявлений внутренней динамики является образование открытых состояний или локально расплетенных участков или пузырей денатурации, характеризуемых разрывом водородных связей между комплементарными основаниями (Hanke and Metzler, 2003; Altan-Bonnet, et al. 2003).

В физиологических условиях локальное расплетание происходит спонтанно из-за флуктуаций, «дыхания» двуцепочечной ДНК, что приводит к образованию открытых состояний из десяти и более пар оснований (Guéron, et al. 1987). Функционально, открытые состояния формируются, например, в процессе транскрипции при образовании транскрипционного пузыря в результате взаимодействия РНК полимеразы с промоторным участком последовательности ДНК. Известно, что кинетика формирования пузыря и скорость его движения вдоль молекулы ДНК в процессе транскрипции являются ключевыми факторами, обуславливающими вариацию в уровне экспрессии различных генов в диапазоне 10000 раз (Record, et al. 1996). Формирование транскрипционного пузыря – это многостадийный процесс, сопровождающийся образованием промежуточных состояний и торсионной динамикой отдельных оснований (Boyasi, et al. 2019; Chen, et al. 2020; Ruff, et al. 2015; Winkelman, et al. 2016).

В образование открытых состояний, формируемых в результате «дыхания» ДНК, могут дополнительно участвовать белки, которые связываются с одноцепочечными участками, тем самым снижая стабильность комплементарной пары оснований ДНК (Revzin, 1990). Пузырьки денатурации также могут быть вызваны закручиванием двойной спирали ДНК (Strick, et al. 1996). Исследование динамики пузырей, вызванных скручиванием, в случайной последовательности ДНК показало, что маленькие пузыри (менее нескольких десятков пар оснований) распределяются вдоль ДНК, тогда как более крупные пузыри локализуются в областях богатых АТ парами (Hwa, et al. 2003). Наконец, при нагревании в двуцепочечной ДНК в процессе плавления образуются пузыри

денатурации, увеличивающиеся в размерах и количестве, в результате две нити полностью разделяются (Poland and Scheraga, 1970; Wartell and Benight, 1985). Так, исследование динамики пузырей в одиночной двуцепочечной ДНК с помощью флуоресцентной корреляционной спектроскопии показало, что в «дышащем» домене сконструированной последовательности ДНК (ряд из 18 пар оснований АТ, запечатанных более стабильными парами оснований GC) при температуре ниже температуры плавления АТ-участка образуются флуктуационные пузырьки размером от 2 до 10 пар оснований (Altan-Bonnet, et al. 2003).

Изучение динамики пузырей представляет интерес с точки зрения лучшего понимания процессов взаимодействия белков с одноцепочечными ДНК. Такие взаимодействия включают зависимости между различными временными масштабами, например, временем релаксации пузырей и временем стерических перестроек белков в процессе связывания (Karpel, 2002). Таким образом, динамические исследования, такие как силовая спектроскопия одиночных молекул (Williams, et al. 2002) и анализ молекулярных маяков (Krichevsky and Bonnet, 2002), могут пролить свет на биохимию, лежащую в основе таких процессов. Особое место в ДНК-белковых взаимодействиях занимает РНК-полимераза, которая является главным ферментом в процессе транскрипции генетической информации. Этот процесс является фундаментальным для существования и развития живых организмов. Поэтому изучение динамики открытых состояний важно, в том числе, и для лучшего понимания процесса транскрипции.

II.6.3 Транскрипция

Транскрипция – процесс, при помощи которого генетическая информация для каждого гена в молекуле ДНК переписывается на соответствующую молекулу посредник РНК, которая называется матричной РНК (мРНК). Далее, в процессе трансляции генетической информации мРНК используется как

информационная матрица для синтеза белков, реализующих разные функции, необходимые для жизнедеятельности клетки. Транскрибирование генетической информации происходит при помощи РНК-полимеразы и сопутствующих белков, называемых транскрипционными факторами. Транскрипционные факторы связываются с участками последовательности ДНК, называемыми энхансеры и промоторы, и регулируют (способствуя или препятствуя) связывание РНК-полимеразы с промотором (Alberts, et al. 2002).

Для прокариотических клеток существует одна РНК-полимераза (RNAP). Для эукариотических клеток их три: RNAPI, RNAPII, RNAPIII, из которых за транскрипцию генетической информации и создание мРНК отвечает RNAPII. Для транскрибирования генетической информации необходима связь РНК-полимеразы с промоторным участком ДНК. Эту связь обеспечивают транскрипционные факторы. При связывании транскрипционных факторов и РНК-полимеразы с ДНК образуется комплекс инициации транскрипции (Watson, et al. 2013).

Для прокариотических клеток процесс транскрипции является более простым и наиболее изученным по сравнению с эукариотическими клетками. Основная структура (ядро) RNAP представляет собой 5-ти субъединичный фермент: две α -субъединицы, β -субъединица, β' -прайм субъединица и ω -субъединица (Murakami and Darst, 2003). По форме RNAP представляет собой клешню краба. Связывание RNAP с промотором осуществляется при помощи σ -фактора. Известно, что существуют промоторы, для которых специфичен свой σ -фактор. Например, у *Escherichia coli* (*E. coli*) существует не менее семи σ -факторов, основным из которых является σ^{70} (Gruber and Gross, 2003). В ДНК *E. coli* имеется приблизительно 2000 σ^{70} специфичных промоторов (Shimada, 2014). Эти промоторы состоят из основной последовательности длиной приблизительно 40 п.о. и двух коротких консенсусных последовательностей: TTGACA и TATAAT, расположенных в 35 позиции выше (-35) и в 10 позиции выше (-10) сайта начала транскрипции, соответственно. В совокупности по длине эти промоторы составляют не более 2% от всей длины ДНК (Wang, 2013).

Это говорит о том, что для поиска промотора RNAP должна уметь отличать специфические сайты среди огромного количества неспецифической ДНК. Каждый σ -фактор помогает связаться RNAP со своей группой специфичных для него промоторов, активируя промоторы, ответственные за экспрессию тех генов, которые позволяют бактериальным клеткам приспосабливаться к различным стрессовым условиям окружающей среды (Feklistov, et al. 2014). Присоединение σ -фактора к RNAP образует холофермент, который, в свою очередь, связывается с промотором, образуя закрытый комплекс инициации транскрипции (Murakami and Darst, 2003; Karpen and deHaseh, 2015; Stracy and Karanidis, 2017). Отметим, что между бактериальным холоферментом и комплексом RNAPII с фактором транскрипции TFIIB в эукариотических клетках имеется много общего (Decker and Hinton, 2013).

После формирования закрытого комплекса формируется открытый комплекс инициации транскрипции, в котором двойная спираль ДНК раскрывается, образуя транскрипционный пузырь размером 12–14 п.о. (Siebenlist and Gilbert, 1980; Kirkegaard, et al. 1983; Sasse-Dwight and Gralla, 1989; Karpen and deHaseh, 2015). Далее RNAP начинает синтезировать РНК, двигаясь от 3' к 5' концу матричной нити ДНК, которая является комплементарной к синтезируемой РНК нити (Basu, et al. 2014). Вторая нить ДНК называется кодирующей, так как ее последовательность оснований идентична последовательности синтезируемой РНК с точностью до замены тимина на урацилы. Сама РНК-последовательность синтезируется от 5' конца присоединением новых нуклеотидов к 3' концу.

В первые моменты транскрипции RNAP синтезирует короткие молекулы РНК длиной 2-8 нуклеотидов, так называемые abortивные транскрипты (Hsu, 2002, 2009; Goldman, et al. 2009). Такая abortивная инициация может включать до сотен повторов (Gralla, et al. 1980; Hsu, 2002, 2009). Если транскрипт достигает пороговой длины, приблизительно 10 нуклеотидов, наступает фаза избегания промотора (Hsu, 2002, 2009). Считается, что abortивная инициация и процесс избегания промотора происходят за счет механизма сжатия (сморщивания) ДНК

внутри RNAP (Revyakin, et al. 2006). Именно энергия сжатой в RNAP ДНК используется для разрыва связей RNAP с промотором в фазу избегания и инициации фазы элонгации. Этот же механизм, сжатие/растяжение ДНК внутри RNAP, используется RNAP при адаптивном поиске сайта старта транскрипции (Winkelman, et al. 2016). У эукариотических клеток избегание промотора происходит за счет клиренса промотора и последующего фосфорилирования ферментом TFIIH серина 5 на карбоксиконцевом домене большой субъединицы Rpb1 RNAPII, что приводит к связыванию с ней копирующего фермента (Greenleaf, 2003; Fabrega, et al. 2003; Mandal, et al. 2004).

Фаза избегания промотора переходит в фазу элонгации. Элонгация наиболее производительная фаза транскрипции. Скорость транскрипции здесь достигает до 100 нуклеотидов/с (Bremer and Dennis, 1996; Proshkin, et al. 2010). У эукариот элонгация транскрипции может регулироваться факторами транскрипции такими как TFIIH (Fitz, et al. 2016).

Терминация транскрипции – один из важнейших моментов правильной экспрессии генов. В бактериях терминация может происходить как в присутствии Rho-фактора, так и без него (Richardson, et al. 1996, 2002). Rho-белок активно участвует в терминации транскрипции у прокариот. Он использует энергию АТФ для диссоциации транскрибированной РНК. Чтобы опосредовать высвобождение РНК-транскрипта, Rho-белок связывается с ним и механически, используя энергию АТФ, вырывает его из комплекса элонгации транскрипции. Таким образом, Rho-белок это молекулярная машина, управляемая АТФ. У *E. coli* Rho-зависимые терминаторы расположены на концах генов, оперонов и в регуляторных сайтах (аттенюаторах), предшествующих генам (Richardson, et al. 1996). Rho-независимые терминаторы также расположены на концах генов и аттенюаторов. Несмотря на то, что RNAP формирует высоко стабильные комплексы элонгации транскрипции с ДНК, их стабильность значительно снижается внутри Rho-независимой терминаторной последовательности (Mooney, et al. 1998). Это приводит к диссоциации РНК-транскрипта и распаду

комплекса. У эукариот процесс терминации транскрипции сложнее и менее изучен.

Взаимодействие RNAP с ДНК в процессе транскрипции, как и другие ДНК-белковые взаимодействия, во многом характеризуются такими механическими параметрами как силы и моменты сил. Оценка этих параметров является важным моментом в изучении внутренней динамики ДНК и ее механических свойств, которые играют фундаментальную роль в поиске, узнавании и связывании различных ферментов с ее активными сайтами и последовательностями.

II.6.4 Механические силы и моменты сил в ДНК-белковых взаимодействиях

Одним из ключевых моментов в исследовании механических параметров как самой ДНК, так взаимодействия с ней различных ферментов, является открытие и использование методов механических манипуляций с одиночными молекулами (Ha, 2014; Miller, et al. 2018). Это стало возможным благодаря революционному развитию таких методов как: оптический пинцет, магнитный пинцет, метод отслеживания шариков на роторе, угловая оптическая ловушка, пинцет с магнитным моментом и свободно вращающийся магнитный пинцет (Bryant, et al. 2003; Oberstrass, et al. 2013; La Porta and Wang, 2004; Lipfert, et al. 2010, 2011). Возможность манипулирования с одиночной ДНК представила ДНК-связывающиеся ферменты в новом свете. Оказалось, что эти ферменты являются мощными молекулярными двигателями, способными развивать значительные механические усилия.

В экспериментах с *E. coli* по изучению возможности преодоления РНК-полимеразой внешних нагрузок при помощи оптического пинцета было показано, что этот фермент может генерировать силы, превышающие силы цитоскелетных моторов, которые управляют транспортными процессами внутри клетки (Yin, et al. 1995; Wang, et al. 1998; Davenport, et al. 2000; Vale and Milligan 2000). Скорость РНК-полимеразы оставалась неизменной против внешних сил

до ~ 20 пН (Wang, et al. 1998; Davenport, et al. 2000), демонстрируя, что пошаговая транслокация фермента (которая должна быть чувствительной к внешней силе) не ограничивает его скорость. В тоже время, противодействующая внешняя нагрузка может увеличивать вероятность появления паузы во время транскрипции (Davenport, et al. 2000). Приложенные силы, направление которых совпадает с направлением движения фермента, снижают вероятность паузы (Forde, et al. 2002). Возможно, что такие силы могут предотвращать скольжение полимеразы назад по шаблону во время входа в неактивные состояния (Landick, 1997). Наоборот, при увеличении противодействующей силы выше ~ 20 пН, феномен «отката» может быть ответственным за наблюдаемое резкое падение скорости транскрипции (Wang, et al. 1998).

У эукариот силы, генерируемые РНК-полимеразой или ферментами ремоделирования хроматина, могут быть ответственными за вытеснение нуклеосом, которые, в противном случае, препятствовали бы транскрипции. В поддержку этой гипотезы свидетельствуют результаты экспериментов по вытягиванию одиночных волокон хроматина (Cui and Bustamante, 2000; Bennink, et al. 2001; Brower-Toland, et al. 2002). Было обнаружено, что нуклеосомы могут быть вытеснены из ДНК, применяя натяжение ~ 20 пН. Если развивать слабые усилия (~ 6 пН), то наблюдаются обратимые модификации структуры хроматина, такие как частичное высвобождение ДНК или нарушение межнуклеосомных взаимодействий (Cui and Bustamante, 2000). Эти инициируемые натяжением структурные перестройки могут использоваться РНК-полимеразой или другими регуляторными факторами для модуляции доступа транскрипционного аппарата к хромосомной ДНК.

Суперспирализация ДНК – еще одно важное конформационное состояние молекулы, связанное с формированием избыточного механического напряжения, характеризуемого появлением нескомпенсированного момента сил или торсионного момента (Ma and Wang, 2016). На сегодняшний момент существует представление о модели двойных суперспиральных доменов (Liu and Wang, 1987). Считается, что РНК-полимераза в процессе транскрипции,

отслеживая бороздку ДНК, перекручивает двойную спираль молекулы вниз по течению и не докручивает вверх по течению. Биохимические исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что в системах с торсионным ограничением и дефицитом топоизомеразы транскрипция может приводить к накоплению значительного торсионного стресса в ДНК (Krasilnikov, et al. 1999; Samul and Leng, 2007; Tsao, et al. 1989; Wu, et al. 1988). Накопление этого торсионного напряжения может препятствовать элонгации транскрипции и должно своевременно сниматься либо топоизомеразами, либо посредством релаксации вращения ДНК. Считается, что суперспирализация это динамичный конформационный параметр ДНК, который тесно связан с транскрипцией и может регулировать ее в реальном времени (Matsumoto and Hirose, 2004; Kouzine, et al. 2004, 2008). Избыточный торсионный момент может инициировать переходы одних форм ДНК в другие (Leng, et al. 2004; Herbert and Rich, 1996; Oberstrass, et al. 2013; Mizuuchi, et al. 1982; Oussatcheva, et al. 2004; Deufel, et al. 2007). Это также может препятствовать транскрипции или связыванию транскрипционных факторов.

Отрицательная и положительная суперспирализация ДНК по-разному действует на экспрессию генов. Отрицательная суперспирализация способствует плавлению ДНК в промоторных областях, увеличивая вероятность связывания транскрипционных факторов и образования открытых комплексов с РНК-полимеразой и увеличивая время их жизни (Kouzine, et al. 2004, 2008; Tabuchi, et al. 1993; Revyakin, et al. 2004). Кроме того, распространяющаяся волна отрицательной суперспирализации может влиять на активность транскрипции на удаленном промоторе (El Hanafi and Bossi, 2000). В отличие от отрицательной суперспирализации, которая, в основном, увеличивает экспрессионную активность генов, положительная суперспирализация играет обратную роль. На дрожжах было показано, что искусственно вызываемое накопление положительного торсионного момента снижает синтез мРНК (Gartenberg and Wang, 1992). Вместе с тем, положительная суперспирализация, вызываемая РНК-полимеразой, может способствовать вытеснению препятствующих нуклеосом у эукариот (Sheinin, et al. 2013).

Количественные измерения в экспериментах с одиночными молекулами показали, что модуль кручения ДНК ~ 400 пНнм² (Bryant, et al. 2003; Forth, et al. 2008). Приложение к ДНК искусственных торсионных моментов, положительных (+) или отрицательных (–), приводило либо к образованию плектоном, либо к изменению ее структурной формы. Например, для перехода от В-ДНК к Р-ДНК необходимо $\sim +34$ пНнм, от В-ДНК к Z-ДНК необходимо ~ -3 пНнм, чтобы расплавить В-ДНК необходимо ~ -10 пНнм (Bryant, et al. 2003; Forth, et al. 2008; Oberstrass, et al. 2013; Sheinin, et al. 2011). Положительный торсионный момент $\sim +19$ пНнм в ДНК эукариот может приводить к изменению структуры нуклеосом от гексамеров к тетрамерам (Sheinin, et al. 2013). При помощи магнитных шариков и флуоресцентных меток было показано, что нижний предел торсионного момента, создаваемого РНК-полимеразой во время транскрипции в *E. coli*, составляет ~ 5 пНнм (Harada, et al. 2001). С использованием угловой оптической ловушки был определен торсионный момент, необходимый для остановки элонгирующей РНК-полимеразы в *E. coli*. Было показано, что для этого достаточно чтобы накопленное торсионное напряжение положительное перед, или отрицательное позади РНК-полимеразы, составляло бы ~ 11 пНнм (Ma, et al. 2013). Этот торсионный момент приблизительно совпадает с моментом, необходимым для плавления ДНК произвольной последовательности (Bryant, et al. 2003; Forth, et al. 2008; Oberstrass, et al. 2013). Кроме того, Ma et al. показали, что торсионный момент может влиять на скорость и паузу транскрипции, управляя процессом элонгации.

Таким образом, механические свойства ДНК и ДНК-белковых комплексов играют важную роль в хранении и реализации генетической информации. Функционирование ДНК обусловлено не только ее структурными, но и динамическими особенностями. Использование методов математического моделирования для ответа на вопрос, как развитие крупномасштабных структурных изменений, включающих десятки пар оснований, и порождаемых локальной динамикой отдельных нуклеотидов, может зависеть от типа этих нуклеотидов, является актуальным подходом.

II.6.5 Модели ДНК

Для изучения конформационной динамики ДНК наряду с экспериментальными широко используются теоретические подходы. Ключевым моментом здесь является выбор адекватного модельного представления исследуемого объекта или адекватного физического аналога. Большинство биологических процессов, в которых участвует ДНК, протекают в широком диапазоне пространственных масштабов от субмолекулярных (около 1 нм) до микроскопических (10 мкм). Следовательно, для достижения полного понимания процессов, связанных с ДНК-белковыми взаимодействиями, необходимо рассматривать математические модели ДНК, основанные не только на квантовых, но и на классических принципах. Несмотря на то, что современные вычислительные возможности позволяют рассматривать динамику молекул на атомном, или даже на квантово-химическом уровнях, использование таких детальных моделей для описания крупномасштабных структурных изменений в биомолекулах требует огромных вычислительных ресурсов и может быть избыточным. Кроме того, существующая проблема поиска глобальных минимумов, соответствующих основным состояниям динамической системы, до сих пор корректно не решена (Adcock and McCammon, 2006). В разделе будут описаны основные теоретические подходы и модели физического поведения ДНК при различных взаимодействиях.

II.6.5.1 ДНК как червеобразная цепочка

Для малых воздействий, растяжение и изгиб ДНК можно описывать физической моделью полимера с червеобразной цепью, в которой используются такие переменные как: жесткость k – сопротивление на изгиб; персистентная длина A – длина (приблизительно 150 п.о.), на которой можно пренебречь изгибом молекулы; радиус кривизны R и длина L полимера (Bustamante et al. 2003). Это крупнозернистая или мезоскопическая модель, которая позволяет

описывать физическое поведение ДНК, как упругого стержня, во многих биологических контекстах.

Соотношение между персистентной длиной A и жесткостью упругого стержня k описывается простой зависимостью:

$$k = k_B TA, \quad (\text{II.5.1})$$

где k_B и T – постоянная Больцмана и температура, соответственно. В соответствии с этим соотношением энергия, необходимая для изгиба молекулы ДНК длиной L на малый угол θ равна:

$$E(\theta) = \frac{k_B TAL}{2R^2} = \frac{k_B TA}{2L} \theta^2. \quad (\text{II.5.2})$$

Данная модель предсказывает, что плавно изгибать молекулу ДНК, распределяя деформацию на более длинные участки, энергетически более выгодно по отношению к резким изгибам на коротких фрагментах.

Связывание ДНК с белками во многих случаях сопровождается ее изгибами. Биологическая значимость таких деформаций подтверждается ускорением процессов транскрипции генов или рекомбинации ДНК при замене специфических сайтов связывания с белковыми факторами на внутренне изогнутые последовательности ДНК (Goodman and Nash, 1989) или на последовательности не родственные к ДНК-изгибающим белкам в их присутствии (Perez-Martin and Espinosa, 1993).

ДНК-связывающиеся белки при связывании преобразуют часть своей энергии связи в механическую работу, производимую ими при деформации ДНК. Как было показано в работе с использованием фактора транскрипции ТВР, предварительно изогнутая последовательность, по форме изгиба аналогичная ТВР-индуцированному изгибу, увеличивала сродство ТВР с сайтом связывания в 300 раз по сравнению с последовательностью, изогнутой в противоположном направлении (Parvin et al. 1995).

Одним из возможных механизмов преобразования энергии связи ДНК-связываемых белков в механическую работу является нейтрализация

электрического заряда на одной из нитей. Фосфатные группы нитей ДНК несут на себе отрицательный заряд, который приводит к электростатическому отталкиванию нитей, уравниваемому водородным связыванием оснований и стекинговым взаимодействием. Эксперименты по асимметричной замене фосфатных групп на нейтральные фосфатные аналоги или связыванием катионов с фосфатами одной из нитей показали сжатие и изгиб ДНК в сторону нейтрализованной нити (Strauss and Maher 1994).

Модель червеобразной цепочки имеет ряд ограничений. Она не учитывает сильные деформации и перенапряжение полимера, возникающее при таких деформациях (Bustamante, et al. 2000). Также модель дает противоречивые результаты на коротких масштабах, меньших длины персистентности (Peters and Maher, 2010; Vafabakhsh and Ha, 2012). Модель не применима для описания внутренней динамики ДНК, учет которой необходим для понимания роли локальных механических свойств ДНК в различных ДНК-белковых взаимодействиях, например, в процессах транскрипции или репликации.

II.6.5.2 Торсионные модели ДНК

Торсионные модели описывают нелинейные эффекты в торсионной динамике ДНК. Торсионная динамика, по существу, описывает упрощенную внутреннюю динамику структурных элементов ДНК. Обычно к таким элементам относят основания, сахара, фосфаты и фрагменты полинуклеотидных цепочек (Yakushevich, 2004). В торсионной динамике рассматривается одна степень свободы – это вращение оснований вокруг сахаро-фосфатного остова. Она представляет частный случай более общей модели, где учитываются дополнительные степени свободы – продольные и поперечные колебания (Yakushevich, 1989, 2004).

II.6.5.2.1 Модель Ингландера

Впервые описание торсионной динамики молекулы ДНК было предложено Ингландером (Englander et al. 1980). Он рассмотрел упрощенную

структуру ДНК, которая представляла плоскую без учета спирализации молекулу. Рассматривалась только одна степень свободы – это вращение оснований вокруг сахаро-фосфатного остова. Вращательная динамика оснований в модели была эквивалентна механистической модели, в которой каждая нить представляла собой последовательность связанных маятников, колеблющихся в среднем поле другой нити. В континуальном приближении угол отклонения маятников от положения равновесия $\phi(z, t)$ описывался уравнением синус-Гордона:

$$I \frac{\partial^2 \phi(z, t)}{\partial t^2} - K' a^2 \frac{\partial^2 \phi(z, t)}{\partial z^2} + V \sin(\phi(z, t)) = 0. \quad (\text{II.5.3})$$

Здесь z – координата, определяющая положение основания в последовательности, I – момент инерции основания, V – эффективный потенциал взаимодействия с комплементарной цепочкой, $K' = KR^2$ – крутильная жесткость сахаро-фосфатного остова (K – жесткость сахаро-фосфатного остова), R – расстояние от сахаро-фосфатного остова до центра масс основания (радиус основания), a – расстояние между соседними основаниями.

Недостатком модели является то, что она некорректно описывает торсионную динамику оснований в неоднородных последовательностях. По сути, данная модель описывает торсионную динамику оснований только в однородных молекулах ДНК, когда коэффициенты уравнения – константы. Этого недостаточно для выявления связи между динамическими и функциональными свойствами ДНК, так как молекула существенно неоднородна.

II.6.5.2.2 Модель Якушевич (Y-модель)

Еще одна широко используемая модель торсионной динамики ДНК – это Y-модель (Yakushevich, et al. 2002). В модели рассматривается В-форма ДНК, фрагмент которой представлен на рисунке II.5.1. Линии на рисунке

соответствуют каркасу двойной спирали, черные и серые прямоугольники соответствуют комплементарным основаниям (АТ и GC).

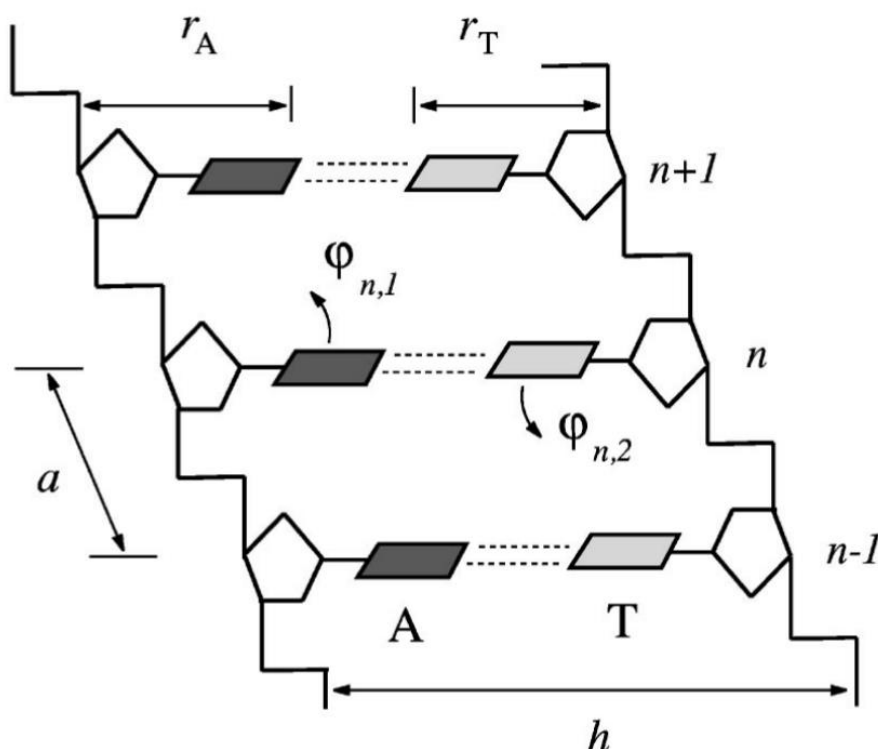


Рисунок П.5.1. Фрагмент двойной цепи ДНК, состоящий из трех пар оснований АТ (взято из Yakushevich, et al. 2002). Продольный шаг спирали $a = 3.4 \text{ \AA}$, поперечный шаг $h = 16.15 \text{ \AA}$.

Рассматриваются только вращательные движения оснований вокруг сахаро-фосфатных остовов цепей в плоскости перпендикулярной оси спирали. Для удобства в модели цепи нумеруются: первая и вторая.

В модели рассматривается плоская структура ДНК, в которой цепи молекулы образуют две параллельные прямые линии, расположенные на расстоянии h друг от друга, а основания совершают только вращательные движения вокруг сахаро-фосфатного остова собственной цепи, находясь все время перпендикулярно к ней. Если обозначить угловое смещение n -го основания первой цепочки через $\varphi_{n,1}$, а второй цепочки через $\varphi_{n,2}$, то можно записать следующий Гамильтониан:

$$H = \sum_n \left\{ \frac{1}{2} I_{n,1} \dot{\varphi}_{n,1}^2 + \frac{1}{2} I_{n,2} \dot{\varphi}_{n,2}^2 + \varepsilon_{n,1} \sin^2 \frac{\varphi_{n+1,1} - \varphi_{n,1}}{2} + \right. \\ \left. + \varepsilon_{n,2} \sin^2 \frac{\varphi_{n+1,2} - \varphi_{n,2}}{2} + V_{\alpha\beta}(\varphi_{n,1}, \varphi_{n,2}) \right\}. \quad (\text{II.5.4})$$

Здесь первые два члена соответствуют кинетической энергии n -й пары оснований, где $I_{n,1}$ – момент инерции n -го основания первой цепи, $I_{n,2}$ – момент инерции n -го основания второй цепи, точка – производная по времени t . Для пары оснований $\alpha\beta$ ($\alpha\beta = \text{AT}, \text{TA}, \text{CG}, \text{GC}$) момент инерции равен $I_{n,1} = m_\alpha r_\alpha^2$, $I_{n,2} = m_\beta r_\beta^2$.

Третий и четвертый члены описывают взаимодействие соседних оснований в каждой цепочки. Параметр $\varepsilon_{n,i}$ характеризует энергию взаимодействия n -го основания с $n+1$ -м основанием i -й цепи ($i=1,2$). При оценке значение этого параметра учитывается то, что угловое смещение одного основания сопровождается как преодолением энергетического барьера стекинг-взаимодействия, так и деформацией двугранного и валентного углов. Это дает основание считать, что энергия смещение $\varepsilon_{n,i}$ заведомо больше, чем стекинг 40–60 кДж/моль (Volkenstein, 1975), и должна слабо зависеть от типа основания. Таким образом, предположительно, $\varepsilon_{n,1} \equiv \varepsilon_{n,2} \equiv \varepsilon > 60$ кДж/моль.

Пятый член Гамильтониана (II.5.4) соответствует энергии взаимодействия комплементарных оснований разных цепей, которая моделируется потенциалом:

$$V_{\alpha\beta}(\varphi_{n,1}, \varphi_{n,2}) = \frac{1}{2} K_{\alpha\beta} |\mathbf{R}_n - \mathbf{R}_n^\circ|^2, \quad (\text{II.5.5})$$

где \mathbf{R}_n – вектор, соединяющий конец основания $(n,1)$ с концом основания $(n,2)$, \mathbf{R}_n° – вектор основного состояния цепи, когда $\varphi_{n,1} = \varphi_{n,2} = 0$. Коэффициент $K_{\alpha\beta}$ определяет жесткость взаимодействия.

Уравнения движения для Гамильтониана (II.5.4) представляют собой дифференциальные уравнения второго порядка по времени от $\varphi_{n,i}$ и имеют вид:

$$\begin{aligned}
I_{n,1}\ddot{\varphi}_{n,1} &= -\frac{\partial H}{\partial \varphi_{n,1}}, \\
I_{n,2}\ddot{\varphi}_{n,2} &= -\frac{\partial H}{\partial \varphi_{n,2}}, \\
n &= 0, \pm 1, \pm 2, \dots
\end{aligned}
\tag{II.5.6}$$

Как и в модели Инглэндера, уравнения (II.5.6) предполагают существование солитонных решений. В данном случае это три типа топологических солитонов, которые описывают торсионную динамику оснований и движение локализованных открытых состояний в ДНК. Солитоны могут двигаться вдоль молекулы с постоянной скоростью, меньшей скорости звука. В неоднородной ДНК характер движения солитона зависит от последовательности пар оснований в молекуле. Y-модель получила дальнейшее развитие в работах Геты и Кадони (Gaeta, 1990, 1994, 2006, 2007; Cadoni, et al. 2007, 2011).

II.6.5.2.3 Композитная модель Якушевич (CY-модель)

Расширением Y-модели является CY-модель (Cadoni, et al. 2007, 2011), которая рассматривает торсионную динамику оснований с учетом дополнительной степени свободы. В ней рассматривается как вращение оснований вокруг сахаров, так и вращение сахаро-фосфатных групп вокруг оси каждой цепочки ДНК. Таким образом, CY-модель описывает состояние каждого нуклеотида двумя независимыми угловыми переменными (Рисунок II.5.2). Моделирование двойной цепи ДНК с учетом вращения как сахаров, так и оснований дает возможность более подробного по отношению к Y-модели описать геометрию ДНК и взаимодействие ее внутренних структурных элементов.

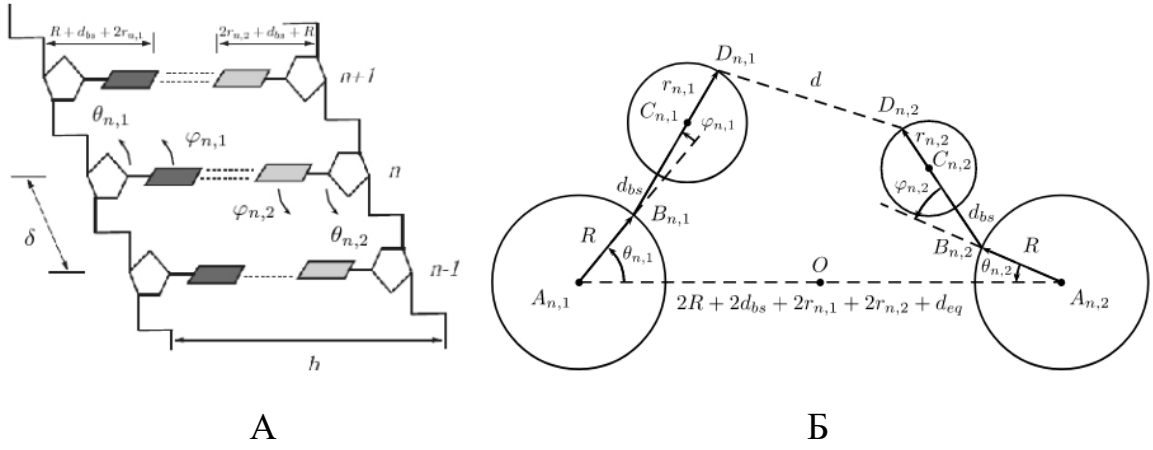


Рисунок П.5.2. (А) Фрагмент неоднородной СУ-модели двойной цепи ДНК: в каждом узле цепи имеется четыре степени свободы, по две на каждую сахаро-фосфатную группу $\{\theta_{n,i}\}$ и по два на каждое основание $\{\varphi_{n,i}\}$. (Б) Подробное описание узла цепи. Каждое основание $\{n,i\}$ может вращаться вокруг атома соответствующего сахара, представленного точкой $\{B_{n,i}\}$, только на угол между $[-\varphi_0, \varphi_0]$, где $\varphi_0 < \pi$ из-за физического ограничения, представленного сахарным пятиугольником. Это стерическое ограничение реализуется в модели динамически через эффективный потенциал. Рисунок взят с изменениями из (Cadoni, et al. 2011).

На рисунке П.5.2 показана структура модели (слева) и геометрия отдельного узла (справа). Координаты точек А, В, С и D относительно системы координат с центром на оси симметрии ДНК и с осью x , направленной вдоль центров сахаров, определяются следующим образом:

$$\begin{aligned}
 A_{n,i} &= \left((-1)^i h_{n,i}, 0, n\delta \right), \\
 B_{n,i} &= A_{n,i} + R \left((-1)^{i+1} \cos \theta_{n,i}, (-1)^{i+1} \sin \theta_{n,i}, 0 \right), \\
 C_{n,i} &= B_{n,i} + (d_{bs} + r_{n,i}) \left(\cos(\theta_{n,i} + \varphi_{n,i}), \sin(\theta_{n,i} + \varphi_{n,i}), 0 \right), \\
 D_{n,i} &= C_{n,i} + r_{n,i} \left(\cos(\theta_{n,i} + \varphi_{n,i}), \sin(\theta_{n,i} + \varphi_{n,i}), 0 \right),
 \end{aligned} \tag{П.5.7}$$

где $h_{n,i} = R + d_{bs} + 2r_{n,i} + d_{eq}/2$, $n = 1, \dots, N$, $i = 1, 2$, d_{eq} – равновесное расстояние между основаниями, d_{bs} – расстояние между основанием и сахаром, δ – расстояние между узлами в цепи.

С точки зрения механики СУ-модель ДНК представляет собой консервативную систему с $4N$ -мерным тором с координатами $(\theta_{n,i}, \varphi_{n,i})$, $n = 1, \dots, N$, $i = 1, 2$, где $\{\theta_{n,i}\}$ – углы вращения сахаро-фосфатного остова, а $\{\varphi_{n,i}\}$ – углы вращения оснований. Однако основания не могут совершить полный оборот вокруг группы, так как они столкнутся с ней (см. Рисунок II.5.2), а электростатические силы не допустят этого. В модели этот факт моделируется через эффективный потенциал V_c (см. ниже), энергетические барьеры которого достаточно высоки, чтобы ограничить диапазон изменения углов оснований $\varphi_{n,i}$ интервалом $I = [-\varphi_0, \varphi_0]$, $\varphi_0 < \pi$. В результате, сахаро-фосфатные углы называются топологическими, а углы оснований — нетопологическими.

Гамильтониан модели имеет следующую форму:

$$H = T + U_t + U_s + U_p + U_h + U_c, \quad (\text{II.5.8})$$

Где T – кинетический потенциал (кинетическая энергия) системы, U_t – потенциал вращения сахаро-фосфатного остова (торсионный потенциал), U_s – потенциал стекинг-взаимодействия, U_p – потенциал взаимодействия комплементарных пар оснований, U_h – потенциал спирализации, U_c – потенциал конфайнинга.

Кинетическая энергия системы имеет следующее выражение:

$$T = T_t + T_s, \quad (\text{II.5.9})$$

где T_t – кинетическая энергия сахаро-фосфатного остова, а T_s – кинетическая энергия оснований. Выражения для них имеют следующий вид:

$$\begin{aligned}
T_t &= \sum_{n,i} \frac{1}{2} I_t \dot{\theta}_{n,i}^2, \\
T_s &= \sum_{n,i} \frac{1}{2} I_{s_{n,i}} \left[\delta_{n,i}^2 \dot{\phi}_{n,i}^2 + 2\delta_{n,i} (\delta_{n,i} + \alpha \cos \varphi_{n,i}) \dot{\phi}_{n,i} \dot{\theta}_{n,i} + \right. \\
&\quad \left. + (\delta_{n,i}^2 + 2\alpha \delta_{n,i} \cos \varphi_{n,i} + \alpha^2) \dot{\theta}_{n,i}^2 \right],
\end{aligned} \tag{II.5.10}$$

где $I_t = m_s R^2$ – момент инерции сахара-фосфатного остова, m_s и R – его масса и радиус, $I_{s_{n,i}} = m_{b_{n,i}} r_{n,i}^2$ – момент инерции основания, $m_{b_{n,i}}$ и $r_{n,i}$ – его масса и радиус, $\delta_{n,i} = (d_{bs} + r_{n,i}) / (d_{bs} + \bar{r})$ и $\alpha = R / (d_{bs} + \bar{r})$ (\bar{r} – среднее значение $r_{n,i}$, см. ниже).

Торсионный потенциал U_t моделирует взаимодействие между следующими друг за другом соседними сахара-фосфатными группами в одной и той же цепи. Он описывает торсионную эластичность остова. Эта сила является результатом сложных молекулярных взаимодействий на уровне остова, и ее следует рассматривать как «эффективное» взаимодействие между структурными элементами остова. Выражение для торсионного потенциала имеет форму:

$$U_t = K_t \sum_{n,i} \left[1 - \cos(\theta_{n+1,i} - \theta_{n,i}) \right], \tag{II.5.11}$$

где K_t – константа торсионной связи.

Потенциал стекинг-взаимодействия U_s моделирует π - π -связи между кольцами, составляющими основания. Это взаимодействие гораздо лучше изучено, чем предыдущее, и, в частности, ясно, что оно зависит только от относительного смещения между соседними основаниями, быстро стремящегося к нулю вместе с перекрывающейся частью их поверхности, например, как в потенциале Морзе. Для простоты в модели рассматривается простая гармоническая связь на расстоянии « x_{xy} » между центрами оснований:

$$U_s = \frac{1}{2} K_s \sum_{n,i} l_{n,i}^2, \tag{II.5.12}$$

где $K_s = k_s (d_{bs} + \bar{r})^2$, k_s – константа связи стекинг-взаимодействия, а $l_{n,i}^2 = d_{xy}^2 (C_{n+1,i}; C_{n,i}) / (d_{bs} + \bar{r})$.

Потенциал взаимодействия между комплементарными парами U_p описывает ионные связи между парами оснований. Как и в случае стекинг-взаимодействия оно хорошо изучено, при этом известно, что оно быстро стремится к нулю с отклонением от положения равновесия на несколько ангстрем. Потенциал взаимодействия между комплементарными парами оснований в гармоническом приближении имеет следующую форму:

$$U_p = \frac{1}{2} K_p \sum_n k_{b_n} (d_{bs} + 2\bar{r})^2 (l_p - l_0)^2, \quad (\text{II.5.13})$$

где K_p – константа связи между комплементарными парами, k_{b_n} – коэффициент неоднородности (равный 1 для $b_n = \text{A, T}$ и 1.5 для $b_n = \text{G, C}$), $l_p = d_{xy}(D_{n,1}; D_{n,2})$. В контактном приближении $l_0 = 0$.

Потенциал спирализации U_h моделирует силы между нуклеотидами в растворе, обусловленные нитями Бернала-Фаулера. Рассматриваются только те, которые находятся на противоположных спиралях на расстоянии половины шага, поскольку они достаточно близки в трехмерном пространстве благодаря геометрии двойной спирали, и только те, которые находятся между сахаро-фосфатными группами. По мере движения нуклеотида водородные связи в этих нитях и в связях, соединяющих нити с нуклеотидами, растягиваются и, таким образом, сопротивляются независимому движению двух соединенных нуклеотидов. Поскольку шаг спирали соответствует 10 основаниям в равновесной конфигурации В-ДНК, то форма потенциала спирализации имеет вид:

$$U_h = K_h \sum_{n,i} \left[1 - \cos(\theta_{n+5,i+1} - \theta_{n,i}) \right], \quad (\text{II.5.14})$$

где K_h – константа связи при спиральном взаимодействии.

Потенциал конфайнинга U_c моделирует «эффективное» взаимодействие, представляющее собой стерическое ограничение сахаров, которое препятствует полному вращению связанных с ними оснований вокруг них. Потенциал имеет форму:

$$U_c = K_c \sum_{n,i} (\sin \varphi_{n,i})^{2M}, \quad (\text{II.5.15})$$

где M – некоторое целое число много больше 1, K_c – константа связи, которая должна быть достаточно большой, чтобы предотвратить преодоление основаниями барьеров в положениях $\pm\pi/2$, и достаточно малой, когда $\varphi_{n,i}$ находится в близи положения равновесия.

Если приравнять нетопологические углы $\varphi_{n,i}$ тождественно к нулю, что соответствует приближению, когда основания жестко связаны с сахарами и вращаются вместе с ними относительно оси симметрии сахаро-фосфатного остова, то координатное пространство сведется к $2N$ -мерному тору. Тогда энергии, пренебрегая спиральным взаимодействием, сведутся к трем слагаемым, характеризующим гамильтониан Y -модели. Таким образом, Y -модель является частным случаем SU -модели.

Численные расчеты показали, что SU -модель воспроизводит нелинейную торсионную динамику нуклеотидов – движение кинка вдоль одной из нитей ДНК – как в однородном случае аналогично Y -модели, так и в неоднородном (Cadoni, et al. 2011). С одной стороны, SU -модель более точно предсказывает значения констант связей (Cadoni, et al. 2007), с другой стороны, она требует больших вычислительных ресурсов, а результаты сложнее интерпретировать по сравнению с Y -моделью. В связи с этим, представляется удобным и обоснованным использование более простых моделей ДНК, которые, тем не менее, учитывают характерные динамические особенности отдельных нуклеотидов.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

III.1 Моделирование кровотока в сердечно-сосудистой системе человека

Сердечно сосудистую систему человека (ССС) можно рассматривать как сложный многомодульный комплекс, функционирование которого

обеспечивается процессами, протекающими на разных уровнях организации, начиная от субклеточного, клеточного, тканевого, органного и заканчивая системным уровнем организма, как единого целого. Кровообращение в ССС моделировалось с использованием замкнутой системы связанных эластичных резервуаров, включая упрощенную модель сердца, сосудов крупного и среднего калибров и разветвленной системы сосудов малого калибра и капилляров.

Фундаментальная особенность ССС заключается в том, что ее функционирование сопровождается ярко выраженным колебательным характером ее параметров в широком диапазоне частот (Cohen and Taylor 2002; Киселев и Гриднев 2011; Draghici and Taylor 2016). При этом важно учитывать, что колебания в ССС обусловлены не только ритмической деятельностью сердца, но и более низко частотными системными и локальными процессами, обеспечивающими регуляцию скорости кровотока как в крупных сосудах, так и на уровне капилляров.

III.1.1 Феномен респираторной синусовой аритмии в нестационарных условиях

РСА в спектре ВСР формирует характерную спектральную компоненту, которая приходится на частоту дыхания. Степень выраженности этой компоненты может носить нетривиальный характер, что особенно видно в нестационарных условиях контролируемого дыхания. Было показано, что при контролируемой частоте и глубине дыхания, а также формы экскурсии грудной клетки, амплитуда спектральной компоненты на частоте дыхания меняется с изменением этой частоты резонансно-подобным образом (Taylor, et al. 2001; Song and Lehrer 2003; Гриднев и др. 2006). При этом кривая такой зависимости имеет форму колокола с максимумом на частоте 0.1 Гц.

Ясного и однозначного понимания механизмов регулирования ВСР и формирования колоколообразной зависимости ВСР от изменения частоты

дыхания в условиях контролируемого дыхания нет. В диссертации исследуется этот вопрос с помощью математической модели «Pneuma» (Cheng, et al. 2010).

III.1.1.1 Описание модели «Pneuma»

В работе использовалась комплексная имитационная математическая модель «Pneuma», которая позволяет имитировать работу и взаимодействие респираторной, сердечно-сосудистой и вегетативной систем организма человека в покое и во время сна. Модель «Pneuma» имеет модульную структуру и состоит из четырёх основных блоков: блок респираторной системы, блок сердечно-сосудистой системы, блок вегетативного контроля и блок контроля состояний «сон-бодрствование» (Рисунок III.1.1). Возможности последнего блока в данной работе не используются, поскольку предполагается, что рассматриваемые случаи моделируются в условиях состояния бодрствования. Для этого в данной работе индекс, описывающий состояния сна и бодрствования, всегда фиксирован в значении, которое отвечает состоянию бодрствования системы. Подробное описание функционирования блока контроля состояний «сон-бодрствование» можно посмотреть в оригинальных работах (Daan, et al. 1984; Borbely and Achermann 2000; Achermann and Borbely 2003).

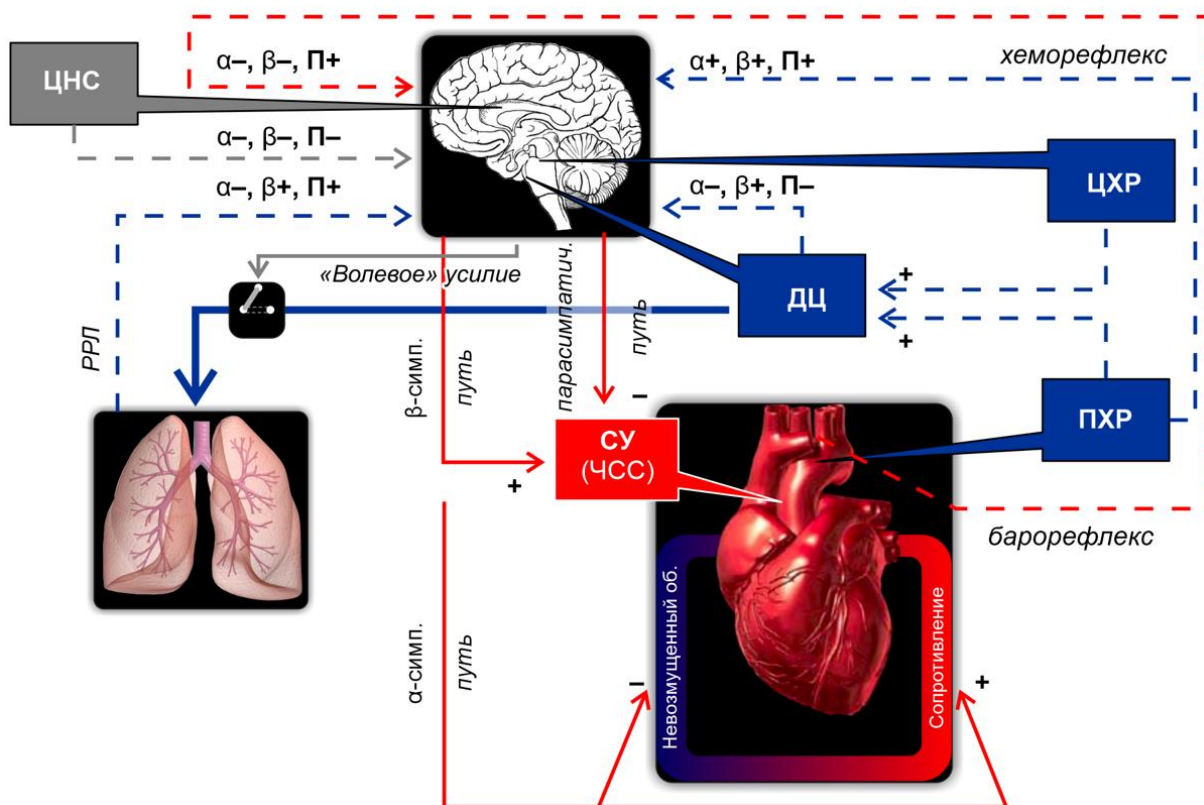


Рисунок III.1.1. Схема вегетативного контроля. Сплошные стрелки – эфферентные сигналы. Пунктирные стрелки – афферентные сигналы. ПХР, ЦХР – периферические и центральные хеморецепторы, соответственно. РРЛ – рецепторы растяжения лёгких. ЦНС – центральная нервная система. ДЦ – дыхательный центр. СУ – синусовый узел. К – коммутатор. α , β , П – альфа-, бета- и парасимпатическая регуляция, соответственно. «+»/«-» – увеличение/уменьшение значения параметра или активности компонента системы.

III.1.1.1 Респираторный блок

Респираторный блок описывает динамические и газообменные свойства дыхания. Динамика дыхания основана на модели Риддла и Йонеса (Riddle and Younes 1981), в которой моделируется нелинейная связь между напряжением лёгочной мускулатуры и изменением лёгочного объёма. Изменяющийся объём лёгких за счёт разницы внешнего (атмосферного) и внутреннего давлений воздуха приводит к формированию воздушного потока, пропорционального скорости этого изменения. Само давление, как плевральное, так и альвеолярное,

рассчитывается с учётом эластичных и вязкостных свойств грудной стенки и лёгочной ткани.

Газообмен между газовой смесью в лёгких и капиллярным кровотоком моделируется с учётом эффектов Бора–Холдена. Эти эффекты определяют кривые диссоциации O_2 от оксигемоглобина и сродство CO_2 с гемоглобином в зависимости от концентраций этих газов в крови и от величины pH. Здесь также учитываются структурные особенности лёгких, моделируемых шестью последовательно связанными компартментами. Пять из них представляют компартменты «мёртвого» дыхательного пространства, а последний – альвеолярный газообмен. Последующее перемешивание газов O_2 и CO_2 в крови и достижение соответствующих уровней парциальных давлений происходит в сердце и кровеносном русле. При этом время запаздывания, за которое новые концентрации газов достигают сердца и артерий (где находятся периферические хеморецепторы), обратно пропорционально скорости кровотока. Метаболизация газов в тканях моделируется единым тканевым компартментом, где скорость метаболизма, без учёта состояний «сон-бодрствование», постоянна и находится на заданном уровне.

Периодичность актов дыхания управляется системой автономного контроля и зависит от информации, приходящей в дыхательный центр от центральных хеморецепторов, отслеживающих уровень CO_2 в церебральном кровотоке, и от периферических хеморецепторов, отслеживающих уровни O_2 и CO_2 в артериальном кровотоке. Из суммарного сигнала от хеморецепторов в дальнейшем формируется управляющий сигнал для дыхательного центра. Далее, согласно модели Даффина и соавторов (Duffin, et al. 2000), из этого сигнала формируется респираторный ритм со ступенька-подобной частотой дыхания, остающейся постоянной во время одного акта «вдоха-выдоха».

В модели также описывается движение воздуха через верхний дыхательный путь, проводимость которого оценивается из соотношения между разностью внешнего и трансмурального давлений и порогового давления, величина последнего может меняться в зависимости от циркадных ритмов. В

представленных исследованиях эта зависимость не рассматривается, и проводимость верхнего дыхательного пути остаётся постоянной.

III.1.1.1.2 Сердечно-сосудистый блок

Сердечно-сосудистый блок описывает сократительную работу сердца с учётом левого и правого предсердий, левого и правого желудочков, а также гемодинамику через артериальное, венозное и периферические русла с учётом пульмонального и системного циклов кровообращения и учётом локального контроля периферического сопротивления (Ursino and Magosso 2000; Magosso and Ursino 2001). Синоатриальный (СА) узел моделируется как простой водитель ритма, работающий по принципу «накопил и выстрелил», и управляется сигналами через парасимпатическую и бета-симпатическую иннервацию. В результате активности СА узла формируется непрерывно меняющаяся ЧСС, которая затем преобразуется в дискретную ступенька-образную частоту, сохраняющую своё значение в пределах одного акта сердечного сокращения.

Сократительная активность желудочков в модели описывается с учётом нелинейной зависимости эластичности их мышечных стенок от времени. Это влияет на период систолы и сердечный выброс. Время диастолы вычисляется как разность между периодом сердечных сокращений и периодом систолы. Считается, что активация левого и правого желудочков происходит полностью синхронно. Формируемый при этом ударный объём зависит как от кровотока и объёма крови в возвратной вене, так и от периода сердечных сокращений и силы сердечного сжатия. С другой стороны, скорость кровотока через пульмональное и системное русла зависит от ударного объёма и от периферического тонуса сосудов.

Изменение периферического тонуса сосудов моделируется как периферическое обобщённое сопротивление, зависящее от альфа-симпатической иннервации. Обобщённое сопротивление включает периферическое сопротивление как таковое и свободный, не возмущённый объём крови в сосудах в висцеральной, невисцеральной и в мышечной периферической циркуляции.

Кроме того, скорость локального кровотока контролируется локальным сопротивлением мышечных, коронарных и церебральных сосудов, которое зависит от парциальных давлений кислорода и углекислого газа в крови этих компартментов. Отслеживание барорецепторами каротидного синуса величины артериального давления рассматривается в модели как активность барорефлекторной петли (Ursino 1998), преобразующей изменение давления крови в нервные импульсы, передающиеся затем в систему автономного контроля.

III.1.1.1.3 Блок вегетативного контроля (БВК)

Вегетативная нервная система в модели «Pneuma» описывается двумя отделами – парасимпатическим и симпатическим. Симпатический отдел разделяется на альфа-симпатический и бета-симпатический пути. Активность вегетативной системы может меняться за счёт хеморецепторов, барорецепторов, рецепторов растяжения лёгких и за счёт ответа центральной нервной системы (ЦНС) на содержание газов O_2 и CO_2 в артериальном и церебральном кровотоке (Ursino and Magosso 2003). Таким образом, блок вегетативного контроля имеет несколько входящих сигналов и несколько выходящих (Рисунок III.1.1). Входящие сигналы формируются обратными интерорецептивными связями, передающими информацию от хеморецепторов, барорецепторов, рецепторов растяжения лёгких и ЦНС в мозг. Выходящие сигналы представляют собой альфа-симпатический, бета-симпатический и парасимпатический пути и сигнал управления респираторной системой (имитация дыхательного центра). При этом реакция симпатического отдела всегда описывается экспоненциальными зависимостями, в то время как реакция парасимпатического отдела описывается в основном линейными зависимостями, за исключением барорефлекса, где зависимость экспоненциальная с модулируемой амплитудой. Кроме того, в БВК были внесены изменения в виде коммутатора, позволяющего изменять управление дыхательным ритмом между автономным контролем со стороны дыхательного центра и «сознательно-волевым» – со стороны коры головного

мозга. Все сигналы, входящие и выходящие из БВК, выражаются через частотные характеристики, которые определяются количеством импульсов или разрядов, генерируемых рецепторами или нейронами в единицу времени.

Как было уже сказано, хеморецепторы разделяются на центральные и периферические. Центральные хеморецепторы имитируют работу физиологических рецепторов, расположенных в стволе головного мозга, и отслеживают уровень CO_2 в церебральном кровотоке. Изменение парциального давления $P_{b\text{CO}_2}$ в кровотоке мозга происходит за счёт его производства как продукта метаболизма кислорода в тканях мозга, входа с током крови из артериального русла и вымывания в венозное русло. Математическое описание этого процесса основано на работах (Read and Leigh 1967; Khoo 1990) и представляет собой обыкновенное дифференциальное уравнение первого порядка для $P_{b\text{CO}_2}$.

Информация от центральных хеморецепторов вместе с информацией от периферических хеморецепторов, отслеживающих уровни O_2 и CO_2 в артериальном кровотоке, которые изменяются в результате процессов газообмена в альвеолярном компартменте лёгких и в тканевом компартменте, передаётся затем в дыхательный центр. Там она согласно модели Даффина и соавторов трансформируется в дыхательный ритм и в нейрональный сигнал, участвующий в формировании РСА. В модели эта часть РСА феномена выражается в уменьшении альфа-симпатической и парасимпатической активности и увеличении бета-симпатической активности. Кроме того, информация от периферических хеморецепторов напрямую увеличивает симпатическую и парасимпатическую активность благодаря формированию хеморефлекса согласно описанию в (Magosso and Ursino 2001).

Изменяющийся тидальный объём лёгких также участвует в модуляции вегетативной активности, что можно рассматривать как ещё одну часть феномена РСА. Для этого в модели имитируется работа рецепторов растяжения лёгких. Реагируя на изменение тидального объёма, рецепторы формируют

сигнал, который, попадая в вегетативную систему, уменьшает активность альфа-симпатического пути и, напротив, увеличивает активность бета-симпатического и парасимпатического путей.

Важным моментом в модели «Pneuma» является описание механизма обратной барорефлекторной петли. Для этого в модель введены каротидные барорецепторы, которые экспоненциальным образом отслеживают уровень артериального давления (АД) крови в системной артерии. Сигнал от барорецепторов поступает в блок вегетативного контроля и через экспоненциальные зависимости изменяет вегетативную активность. При этом симпатическая активность снижается, а парасимпатическая – возрастает.

Чувствительность нейрональных ядер вегетативной системы к внешним стимулам в модели выражается в терминах сдвигов. Каждый сдвиг представляет собой величину, описывающую реакцию ЦНС на изменение уровней O_2 и CO_2 в кровеносной системе. Сдвиги симпатического отдела изменяют его активность зависимым от уровней O_2 и CO_2 в крови образом, в то время как сдвиг парасимпатического отдела постоянен и не зависит от концентрации газов в крови. Чувствительность альфа-симпатического отдела зависит от уровней O_2 и CO_2 в артериальном и периферийном кровотоке, а чувствительность бета-симпатического отдела – от уровней газов в церебральном кровотоке. При этом увеличение сдвига приводит к снижению чувствительности, и наоборот, его уменьшение повышает чувствительность симпатического отдела к внешним стимулам.

В целом можно сказать, что блок вегетативной нервной системы способен моделировать феномен РСА, модуляцию кровяного давления и скорости течения крови по пульмональному руслу за счёт изменения плеврального давления, а также влияние активности хеморецепторов на периферическое сопротивление через альфа-симпатический путь. Изменения в сердечно-сосудистой системе, в свою очередь, могут влиять на контроль респираторной системы через динамику газообмена и через изменение временных задержек, зависящих от скорости кровотока. Ответ ЦНС на изменение парциальных давлений O_2 и CO_2 в

артериальном и церебральном кровотоке влияет на альфа- и бета-симпатическую активность через изменение чувствительности этих отделов к сигналам, приходящим по интерорецептивным связям.

III.1.1.2 Результаты численных расчетов с использованием модифицированной модели «Pneuma»

Для анализа взаимодействия сердечно-сосудистой и респираторной систем в условиях контролируемого дыхания использовалась модифицированная комплексная интегративная модель «Pneuma». В рамках этой модели исследовался отклик сердечно-сосудистой системы (ЧСС, ВСР и АД) на дыхание с фиксированными частотами (0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.16 и 0.25 Гц) и неконтролируемыми (свободными) динамическими параметрами цикла «вдох-выдох» (параметрами динамики вентиляции лёгких).

В рассматриваемой исходной модели «Pneuma» формирование дыхательного ритма в условиях спонтанного дыхания основано на механизме функционирования респираторного водителя ритма (РВР). РВР расположен в дыхательном центре, а его работа обусловлена информацией, поступающей от центральных и периферических хеморецепторов. При контролируемом дыхании респираторный ритм формируется в центральной нервной системе «сознательно-волевым усилием» независимо от сигналов, поступающих с центральных и периферических хеморецепторов. Для воспроизведения таких условий в исходной модели был отключен механизм формирования респираторного ритма водителем ритма, а частота дыхания задавалась принудительно. Однако все регуляторные связи, обеспечивающие взаимодействие респираторной и сердечно-сосудистой систем, были сохранены, то есть вся система альфа-, бета- и парасимпатической регуляции функционирования сердечно-сосудистой системы оставалась прежней. На рисунке III.1.1 переключение между «сознательно-волевым» и автономным управлением дыханием представлено в виде коммутатора. Следует подчеркнуть, что в условиях естественного произвольного дыхания его частота меняется в узком диапазоне с центральной

частотой около 0.3 Гц, а в условиях контролируемого дыхания эту частоту можно изменять, в частности, снижать до 0.03 Гц, а в отдельных случаях и ниже. Такой подход позволил моделировать параметры дыхания, контролируемого «сознательно-волевым усилием», в диапазоне частот от 0.03 до 0.25 Гц и исследовать отклик сердечно-сосудистой системы на дыхательную периодику с любой заданной частотой.

В качестве анализируемых физиологических параметров, таких как ЧСС и АД, использовали мгновенные значения соответствующих выходных параметров рассмотренной математической модели. Построение амплитудно-частотных спектров (АЧС) производилось с помощью метода адаптивного вейвлет-анализа (Tankanag and Chemeris 2008, 2009; Танканаг и Чемерис 2009; Tankanag 2013), который позволяет эффективно и с высокой точностью рассчитывать спектры коротких сигналов в низкочастотной области. Численные расчёты производились в модуле Simulink программного пакета Matlab (Mathworks, Inc.) с применением метода Рунге-Кутты 4-го порядка с изменяемым шагом интегрирования.

Заметим, что ВСР — это многокомпонентный колебательный процесс. При амплитудно-спектральном разложении можно увидеть вклады колебаний различной частоты, выраженные в амплитудных единицах. То есть общий размах колебаний ВСР (максимальное значение минус минимальное) определяется амплитудами составляющих колебаний, основной вклад из которых вносит респираторный ритм. Поэтому зависимость амплитуды ВСР от частоты дыхания строится по точкам из амплитудно-частотных спектров, которые соответствуют пикам максимальной «высоты».

Для выяснения вопроса, может ли модель «Pneuma» воспроизводить зависимость амплитуды ВСР от частоты дыхания, схожую с экспериментально наблюдаемой при фиксировании частот в диапазоне от 0.03 до 0.25 Гц и со значениями остальных параметров модели, соответствующими естественному дыханию, были проведены предварительные расчеты и было обнаружено, что амплитудно-частотные спектры ВСР на всех частотах дыхания имеют

характерный максимальный пик на частоте, совпадающей с частотой дыхания, что явным образом показывает наличие РСА в моделируемой ВСР (Рисунок III.1.2А). Однако при снижении частоты дыхания от 0.25 Гц до 0.03 Гц амплитуда ВСР увеличивалась в 40 раз и достигала максимального значения 280 мс на частоте дыхания $f_b = 0.03$ Гц (Рисунок III.1.2Б). Это не согласуется с экспериментальными данными, в которых зависимость ВСР от частоты дыхания имеет колоколообразный вид. Таким образом, модель «Pneuma» при значениях параметров нервной регуляции, соответствующих спонтанному (естественному) дыханию, не воспроизводит характерную колоколообразную зависимость ВСР от частоты дыхания. Для снятия этого ограничения было сделано предположение, что коэффициенты передачи сигналов по пара- альфа- и бета-симпатическим путям зависят от частоты дыхания. Исходя из этого, целью исследования была проверка выдвинутой гипотезы для пара- и бета-симпатической регуляции.

Помимо ЧСС и ВСР, еще одним критическим параметром состояния сердечно-сосудистой системы является АД, изменения которого не должны выходить за границы физиологической нормы при варьировании параметров модели. В связи с этим были проведены расчеты для выявления изменений величины АД при изменении частоты дыхания. Для этого использовались расчетные мгновенные значения системного артериального давления (САД), максимальные (систолическое давление) и минимальные (диастолическое давление) значения которых интерполировали огибающими. Затем вычисляли среднее арифметическое для каждой огибающей и интерпретировали их как среднее систолическое и среднее диастолическое давление. Оказалось, что эти величины в условиях контролируемой частоты дыхания и при сохранении остальных параметров модели неизменными, то есть соответствующими спонтанному дыханию, практически не изменяются с изменением частоты дыхания (Рисунок III.1.3). А их значения при этом находятся в пределах физиологической нормы.

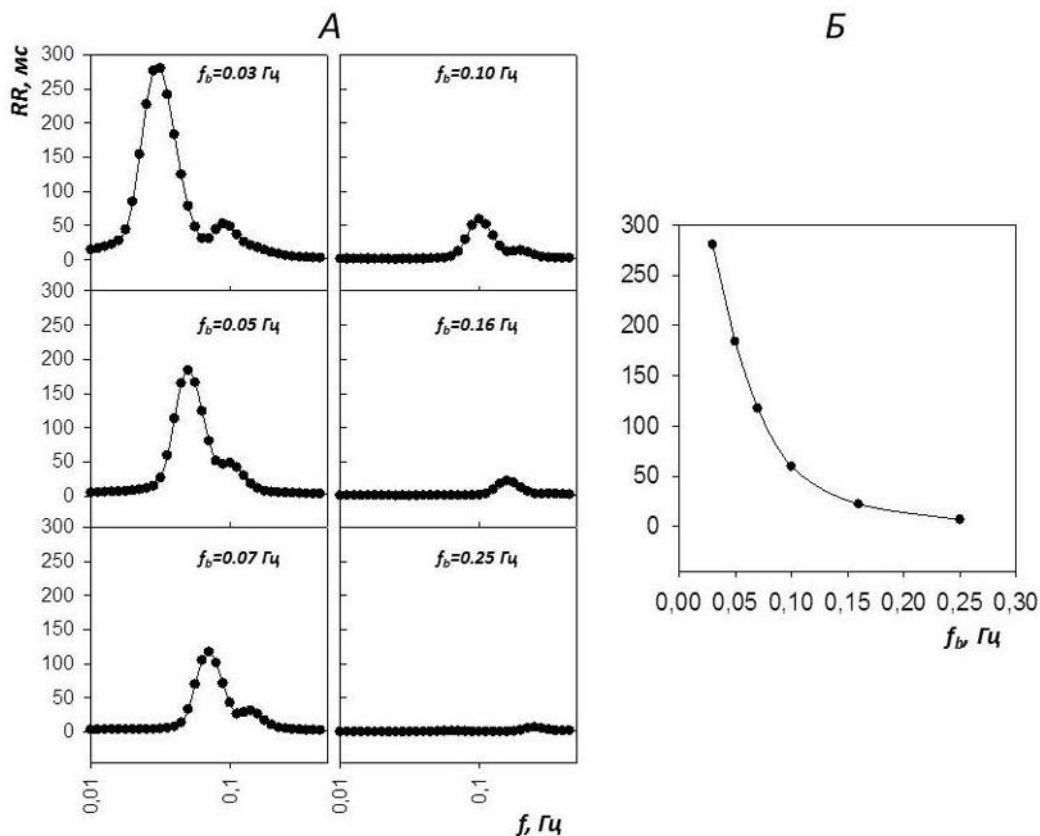


Рисунок 3.1.2. Амплитудно-частотные спектры ВСР при различных частотах (f_b) контролируемого дыхания (А), и их максимальные значения (Б), полученные для оригинальных (неизменённых) значений параметров модели.

Таким образом, при значениях параметров нервной регуляции, которые соответствуют спонтанному (естественному) дыханию, колоколообразная зависимость ВСР от частоты дыхания не наблюдается. При этом амплитуда ВСР с уменьшением частоты дыхания монотонно увеличивается, а значения САД остаются неизменными.

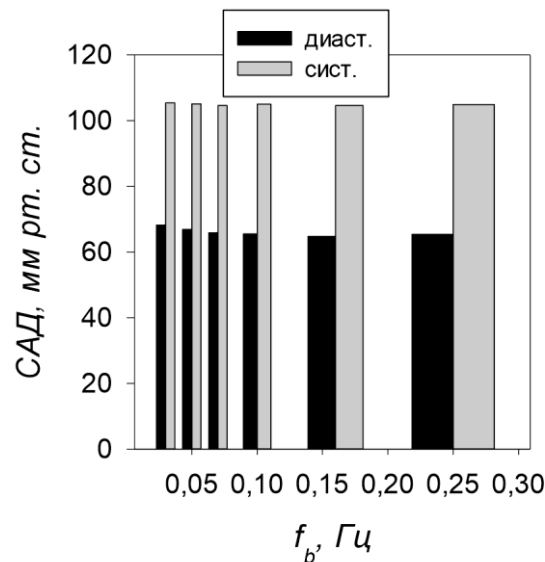


Рисунок Ш.1.3. САД для контролируемого дыхания. Данные получены в ходе численного эксперимента для оригинальных значений параметров модели.

Согласно сделанному ранее предположению, если при «сознательно-волевом» контроле частоты дыхания коэффициенты передачи сигналов по бета-симпатическому и парасимпатическому путям зависят от этой частоты, то при оптимальном подборе коэффициентов передачи можно ожидать формирования колоколообразной зависимости моделируемой ВСР от частоты дыхания. Для выявления зависимости коэффициентов передачи сигналов по симпатическому и парасимпатическому путям от частоты дыхания примем во внимание тот факт, что характерный пик зависимости ВСР от частоты дыхания приходится на частоту 0.1 Гц. Следовательно, учитывая монотонный характер кривой ВСР для случая исходных параметров модели (Рисунок Ш.1.2Б), можно предположить, что степень участия симпатического и парасимпатического путей зависит от этой частоты таким образом, что при снижении частоты до 0.1 Гц зависимость пренебрежимо мала, а при дальнейшем уменьшении частоты она резко возрастает. Чтобы выяснить, насколько сильной должна быть зависимость коэффициентов передачи от частоты дыхания при снижении её ниже 0.1 Гц, были найдены зависимости ЧСС от коэффициентов передачи симпатической

регуляции (S_β) при различном влиянии парасимпатической регуляции (S_p) для редкого дыхания ($f_b = 0.03$ Гц).

На рисунке III.1.4 можно видеть, что на вдохе максимальные значения ЧСС имеют приблизительно одинаковые значения при различных коэффициентах передачи парасимпатической активности для всего набора заданных коэффициентов передачи β -симпатической активности, тогда как на выдохе минимальные значения ЧСС имеют выраженную зависимость от этих коэффициентов. При этом при 100% коэффициенте передачи парасимпатической регуляции ($S_p = 100\%$) наблюдается наибольшая разность между максимальными и минимальными значениями ЧСС для всех S_β . Если же коэффициент передачи S_p снижать (увеличивать влияние на парасимпатическую регуляцию), то разность между максимальными и минимальными значениями ЧСС для заданного S_β снижается. Также эта разность снижается и при уменьшении коэффициента передачи S_β .

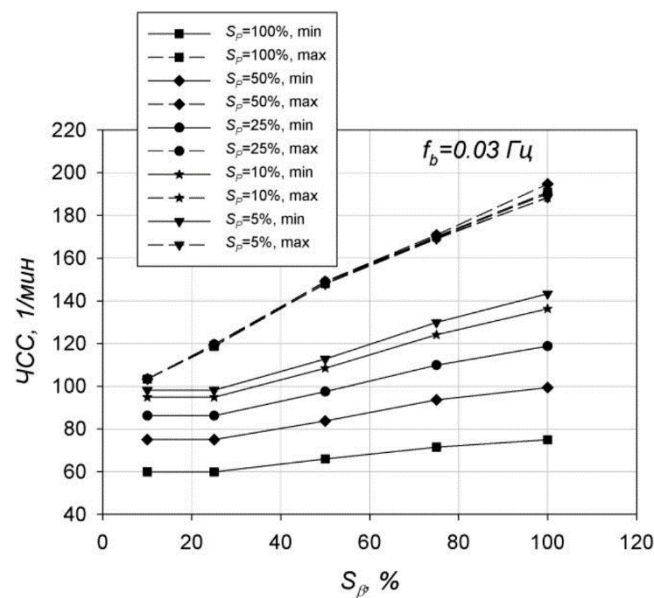


Рисунок III.1.4. Зависимости ЧСС от значений коэффициента передачи β -симпатической активности (S_β) при различных коэффициентах передачи парасимпатической (S_p) активности. Сплошными линиями показаны

минимальные значения ЧСС, пунктирными – максимальные. f_b – частота дыхания.

Исходя из вышесказанного понятно, что для формирования колоколообразной зависимости величины ВСР от частоты дыхания необходимо частотно-зависимым образом снижать коэффициент передачи по парасимпатическому и β -симпатическому путям регуляции ЧСС и ВСР при дыхании с частотой ниже 0.1 Гц, а при частотах дыхания выше 0.1 Гц эти коэффициенты передачи должны выходить на плато с величиной, близкой к единице. Следуя этому подходу, для формирования колоколообразной зависимости ВСР от частоты дыхания были подобраны коэффициенты передачи по пара- и бета-симпатическому путям регуляции, которые представлены на рисунке III.1.5.

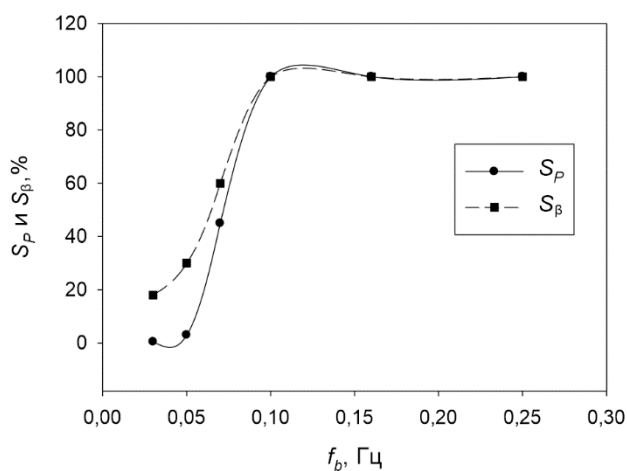


Рисунок III.1.5. Зависимость коэффициентов передачи парасимпатического (S_p) и бета-симпатического (S_β) путей регуляции ЧСС от частоты дыхания. Величины представляют собой процентное отношение изменённой амплитуды сигнала (интенсивности нервных импульсов), передающихся по бета-симпатическому и парасимпатическому путям, выраженных в единицах частоты (спайков в секунду) к неизменённой. 100% – оригинальный неизменённый сигнал.

АЧС ВСР для таких коэффициентов передачи представлены на рисунке III.1.6 слева. Справа, для сравнения, представлены экспериментальные данные. Можно видеть, что качественно формы кривых для модельных и экспериментальных данных хорошо согласуются между собой. В частности, расположение пиков и их количество в случае модели такое же, как и у экспериментальных кривых. Если посмотреть на пики АЧС для модели, то видно, что их значения приходятся на частоты, совпадающие с частотами дыхания для рассматриваемых кривых. Это говорит о том, что модель воспроизводит феномен РСА даже при частотно-зависимой парасимпатической и бета-симпатической активности.

Максимальные значения АЧС моделируемых данных, которые являются амплитудами ВСР для соответствующих частот дыхания, хорошо укладываются на колоколообразную кривую (Рисунок III.1.7), характерную для реальных физиологических экспериментов. Пик такой зависимости, как и в реальных экспериментальных данных, приходится на частоту дыхания $f_b = 0.1$ Гц.

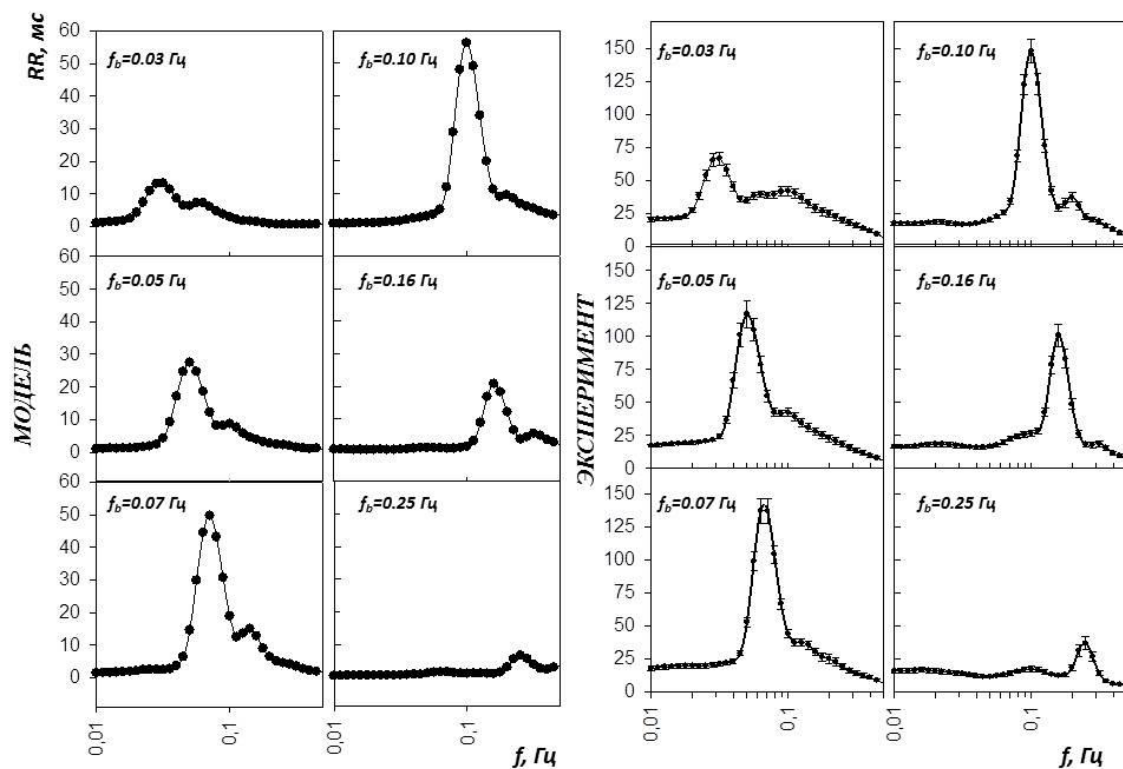


Рисунок III.1.6. Амплитудно-частотные спектры ВСР при различных частотах (f_b) контролируемого дыхания. Слева – данные модели, полученные для частотно-зависимой парасимпатической и бета-симпатической регуляции ЧСС. Справа – экспериментальные данные, взятые из (Krasnikov, et al. 2013).

Как ведёт себя САД при частотно-зависимой парасимпатической и бета-симпатической активности видно из рисунка III.1.8, где, как и в отсутствие зависимости от частоты коэффициентов передачи, представлены средние значения систолического и диастолического давлений. Если пренебречь слабым снижением среднего систолического давления в области редкого дыхания, то в целом значения САД практически не изменяются при изменении активности управляющих сигналов и остаются в пределах физиологической нормы.

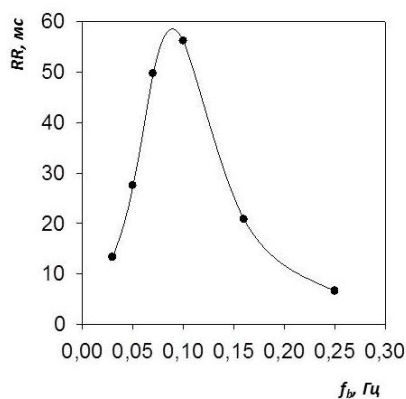


Рисунок III.1.7. Максимальные значения спектров ВСР для различных значений частоты f_b контролируемого дыхания. Данные получены для случая частотно-зависимой пара- и бета-симпатической регуляции ЧСС.

Результаты модельных экспериментов, представленные в исследовании, были получены для случая контролируемой частоты дыхания, при этом на объём лёгких и на форму кривой вентиляции лёгких никаких ограничений не накладывалось. Изменение объёма и вентиляции лёгких описывалось теми же уравнениями, что и при свободном естественном дыхании. Как было сказано выше, даже в случае контроля только частоты дыхания ВСР зависит от этой

частоты таким же образом, как это происходит и в случае более полного контроля, где помимо частоты дыхания контролируется и объём лёгких, и форма экскурсии грудной клетки.

Важно отметить, что, несмотря на хорошее качественное сходство данных, полученных при моделировании, с экспериментальными кривыми, количественное различие между ними, тем не менее, оказалось значительным (Рисунок III.1.6). Например, для максимального пика при частоте дыхания $f_b = 0.1$ Гц величина эффекта более чем в 2 раза ниже, чем в экспериментальных данных. Одним из объяснений такого различия может быть то, что в случае модели на амплитуду изменения объёма лёгких, определяемую как разность объёма лёгких (воздуха) на вдохе (максимальное значение) и объёма лёгких (воздуха) на выдохе (минимальное значение), не накладывалось каких-либо ограничений, в то время как экспериментальные данные, с которыми проводится сравнение, были получены для фиксированного объёма, значение которого задавалось как 40% от жизненной ёмкости лёгких испытуемых (Krasnikov, et al. 2013). Как известно, именно объём лёгких является ещё одним фактором, определяющим степень РСА или величину ВСР. Это происходит как за счёт рефлексии сигналов с рецепторов растяжения лёгких, так и за счёт присасывающей функции лёгких, изменяющей давление в нижней поллой вене.

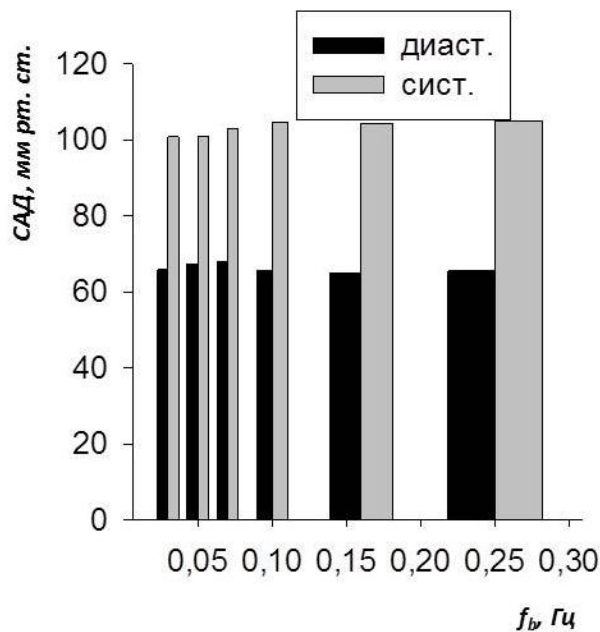


Рисунок Ш.1.8. Моделируемое САД для контролируемого дыхания. Данные модели получены для случая частотно-зависимой пара- и бета-симпатической регуляции ЧСС.

Проведённые численные исследования показали, что колоколообразная зависимость ВСР от контролируемой частоты дыхания может быть получена при частотно-зависимом изменении коэффициентов передачи сигналов, управляющих работой ССС со стороны системы вегетативного контроля. При этом в данной работе был рассмотрен только один случай – частотно-зависимая парасимпатическая и бета-симпатическая регуляция ЧСС. Замечательным оказалось то, что при такой регуляции не только удалось воспроизвести колоколообразный вид феномена РСА при фиксированных частотах дыхания, но и удержать гемодинамические характеристики модели, по крайней мере, САД, в рамках диапазона физиологической нормы.

Гипотетически частотная зависимость коэффициентов передачи при «сознательно-волевым» управлении респираторным ритмом может быть обусловлена частотной зависимостью сигнала, формируемого дыхательным центром на основе информации от хеморецепторов. В автономном режиме этот сигнал определяет частоту дыхания в зависимости от газового состава крови,

играя роль РВР. Оказывается, что амплитуда РВР существенным образом зависит от частоты контролируемого дыхания (Рисунок III.1.9А). Если построить зависимости коэффициентов передачи сигналов бета-симпатического и парасимпатического путей регуляции ЧСС от амплитуды РВР, то они будут выглядеть так, как показано на рисунке III.1.9Б. Эти зависимости аппроксимировались методом наименьших квадратов. В результате была получена следующая закономерность:

$$S_i(A_{RD}) = S_{\min,i} + \frac{S_{\max,i}}{1 + (A_{RD}/a_i)^{\gamma_i}}, \quad (\text{III.1.1})$$

где A_{RD} – респираторный водитель ритма, $i = p, \beta$. Значения параметров $S_{\min,i}$, $S_{\max,i}$, a_i и γ_i приведены в таблице III.1.1.

Таблица III.1.1. Значения параметров аппроксимации зависимостей коэффициентов передачи сигналов по парасимпатическому (S_p) и бета-симпатическому (S_β) путям регуляции ЧСС от амплитуды РВР

i	$S_{\min,i}$	$S_{\max,i}$	a_i , л/с	γ_i
p	1.27	99.05	0.011	2.69
β	18.94	82.86	0.012	1.45

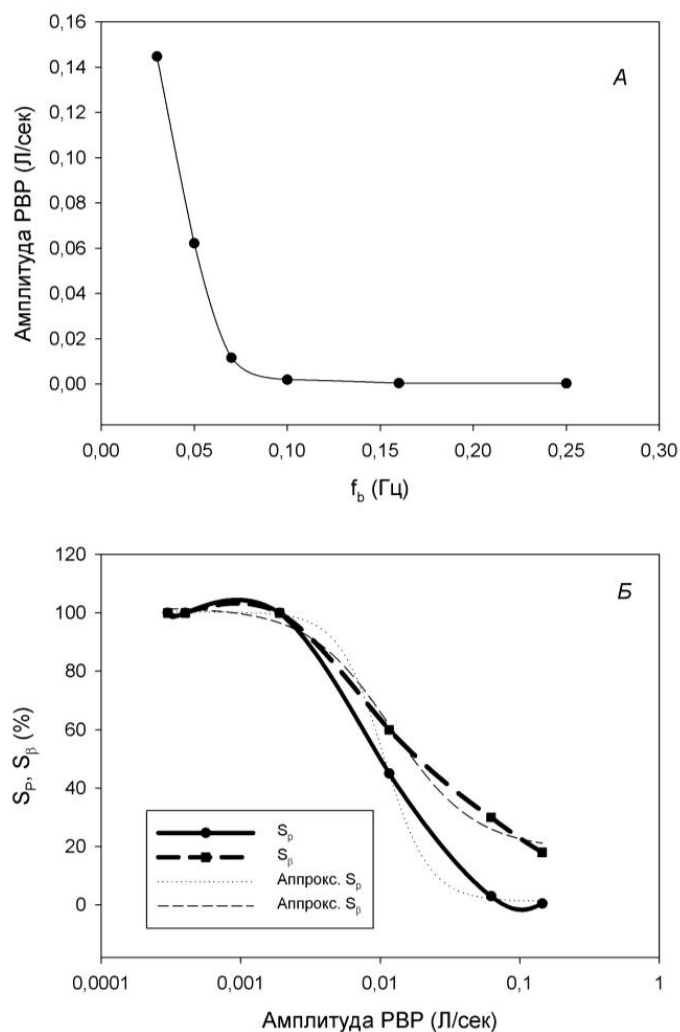


Рисунок III.1.9. Зависимость амплитуды респираторного водителя ритма (РВР) от частоты дыхания (А). Зависимость коэффициентов передачи сигналов по пара- (S_p) и бета- (S_b) симпатическому путям от РВР (Б). На рис. Б ось абсцисс взята в логарифмическом масштабе.

Таким образом, в условиях напряжённых нестационарных режимов дыхания изменение активности вегетативного контроля может приводить к колоколообразной зависимости ВСР от изменения контролируемой частоты дыхания с пиком на частоте, равной 0.1 Гц. Само изменение активности вегетативного контроля динамическим образом связано с частотой дыхания через амплитуду респираторного водителя ритма, что говорит о динамической регуляции ВСР при изменении частоты дыхания. Взаимосвязь параметров

вегетативного контроля с амплитудой респираторного водителя ритма носит обратный степенной закон.

III.1.2 Моделирование низкочастотных колебаний кровотока в микроциркуляторном русле (МЦР) при стохастических воздействиях

Колебания с частотами, лежащими ниже частоты дыхания (0.25 Гц), принято считать низкочастотными. Проблема формирования таких колебаний как в ССС человека в целом, так и в МЦР в частности, до сих пор остается нерешенной. Существующие представления о локальных механизмах регуляции кровотока в МЦР (Stefanovska et al., 1999) не дают ясного ответа на вопрос о роли самого сосудистого русла как гидродинамической системы, в формировании низкочастотных колебаний. Полученные экспериментальные данные о наличии высокой фазовой когерентности между низкочастотными колебаниями (эндотелиальными, нейрогенными, миогенными) кожной перфузии на контралатеральных участках кожи (Tankanag et al., 2014; Танканаг и др., 2017) предполагают существование центрального механизма регуляции кожной перфузии в области низких частот. С помощью математической модели было показано, что в качестве такого механизма может выступать само сосудистое русло, как замкнутая гидродинамическая система, которая осуществляет динамическую связь между сердечным выбросом и микроциркуляторным кровотоком не только в диапазоне частот кардио- ритма, но и в области более низких частот.

III.1.2.1 Модель сердечно-сосудистого русла человека с учетом периферической микроциркуляции

Математическая модель была разработана на основе гидродинамического аналога течения ньютоновской жидкости через замкнутый контур связанных эластичных резервуаров. Модель описывает 4-х камерное сердце, системный (большой) и легочный (малый) круги кровообращения (Рисунок III.1.10). Четыре

камеры сердца соответствуют левому и правому предсердиям, а также левому и правому желудочкам. Остальные сосудистые резервуары представляют собой: легочную и системную артерии; легочную и системную периферические артерии; легочную и системную периферические вены; системный обобщенный сосудистый резервуар (ОСР), включающий в себя все сосуды, которые не описываются явным образом; МЦР.

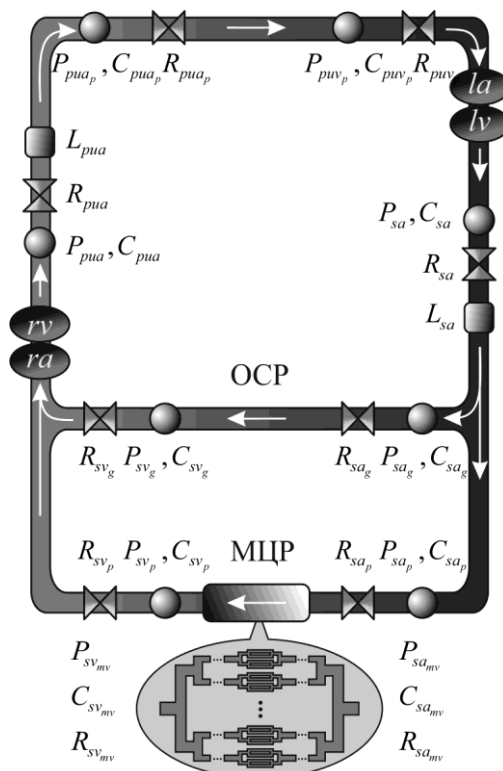


Рисунок Ш.1.10. Схема моделируемого сердечно-сосудистого русла человека. ra, rv, la, lv – правое предсердие и желудочек, а также левое предсердие и желудочек соответственно. P_n, C_n, R_n – давление, эластичность и сопротивление -го сосудистого резервуара. Обозначения резервуаров: ria – пульмональная обобщенная артерия, ria_p – артериальная часть пульмональной обобщенной периферии, rvp_p – венозная часть пульмональной обобщенной периферии, sa – системная обобщенная артерия, sa_g – артериальная часть системного ОСР, sa_p – артериальная часть системной обобщенной периферии, sa_{mv} – артериальная часть системного МЦР, sv_{mv} – венозная часть системного МЦР, sv_p – венозная

часть системной обобщенной периферии, sv_g – венозная часть системного ОСР. Стрелками показано направление движения крови.

III.1.2.1.1 Сердце.

Левое и правое предсердия являются пассивными, а левый и правый желудочки – активными элементами, выполняющими насосную функцию. Зависимость мгновенного давления крови в желудочках от времени описывается формулой:

$$P_{iv}(t) = P_{max,iv}(t) \left(1 - k_{R,iv} Q_{o,iv}(t) \right), \quad i = l, r, \quad (\text{III.1.2})$$

где символ i в индексах обозначает левый ($i = l$) и правый ($i = r$) отделы сердца, составной индекс iv обозначает -й желудочек, $k_{R,iv}$ – константа, определяющая известный эффект (Shroff, et al. 1985) снижения мгновенного давления за счет выходящего из i -го желудочка потока крови $Q_{o,iv}$. Изометрическое давление i -го желудочка $P_{max,iv}$ связано с изменением объема V_i этого желудочка соотношением:

$$P_{max,iv}(t) = \varphi(t) E_{max,iv} (V_{iv}(t) - V_{u,iv}) + (1 - \varphi(t)) P_{0,iv} (e^{k_{E,iv}(V_{iv}(t) - V_{u,iv})} - 1), \quad (\text{III.1.3})$$

где

$$\varphi(t) = \begin{cases} \sin^2 \left[\frac{\pi T}{T_{sys}} u(t) \right], & 0 \leq u \leq \frac{T_{sys}}{T}, \\ 0, & \frac{T_{sys}}{T} < u \leq 1, \end{cases}$$

$$u(t) = \text{frac} \left[\int_{t_0}^t \frac{d\tau}{T} + u(t_0) \right].$$

Здесь $E_{max,iv}$ – жесткость стенок i -го желудочка, $V_{u,i}$ $V_{u,i}$ – невозмущенный объем i -го желудочка, $P_{0,iv}$, $k_{E,iv}$ – константы, определяющие диастолическое расслабление i -го желудочка, T , T_{sys} – период сердечного цикла и период систолы соответственно. Предполагается, что в модели T , T_{sys} – константы, что позволяет исследовать роль только гидродинамических характеристик

сосудистого русла в формировании низкочастотных компонент колебаний кровотока.

Входящие $Q_{in,iv}$ и выходящие $Q_{o,iv}$ потоки крови для желудочков описываются формулами:

$$Q_{in,iv} = \begin{cases} 0, & P_{ia} \leq P_{iv} \\ \frac{P_{ia} - P_{iv}}{R_{ia}}, & P_{ia} > P_{iv} \end{cases}, \quad \alpha = s, pu, \quad (III.1.4)$$

$$Q_{o,iv} = \begin{cases} 0, & P_{max,iv} \leq P_{\alpha\alpha} \\ \frac{P_{max,iv} - P_{\alpha\alpha}}{R_{iv}}, & P_{max,iv} > P_{\alpha\alpha} \end{cases}$$

где символ α в индексах обозначает системный ($\alpha = s$) и легочный ($\alpha = pu$) круги кровообращения, составной индекс ia обозначает i -е предсердие, P_{ia} – давление крови в i -ом предсердии, $P_{\alpha\alpha}$ – давление крови в обобщенной артерии α -го круга кровообращения, R_{ia} – эффективное гидродинамическое сопротивление (ЭГС) i -го предсердия, $R_{iv} = k_{R,iv} P_{max,iv}$ – гидродинамическое сопротивление i -го желудочка, которое пропорционально изометрическому давлению желудочка. Здесь и далее предполагается, что ЭГС не зависят от гематокрита и являются константами для всех резервуаров сосудистого русла за исключением желудочков. Входящие и выходящие потоки крови определяют изменение объема крови $V_{iv}(t)$ в желудочках согласно уравнению:

$$\frac{dV_{iv}(t)}{dt} = Q_{in,iv} - Q_{o,iv}. \quad (III.1.5)$$

Далее, из желудочков кровь выбрасывается в артерии соответствующих кругов кровообращения.

III.1.2.1.2 Системный круг кровообращения.

Для системной артерии поток $Q_{sa}(t)$, объем $V_{sa}(t)$ и давление $P_{sa}(t)$ крови описываются уравнениями:

$$\frac{dQ_{sa}(t)}{dt} = \frac{1}{L_{sa}} \left(P_{sa}(t) - P_{sap}(t) - R_{sa} Q_{sa}(t) \right), \quad (III.1.6)$$

$$\frac{dV_{sa}(t)}{dt} = Q_{o,lv}(t) - Q_{sa}(t), \quad P_{sa}(t) = \frac{1}{C_{sa}} (V_{sa}(t) - V_{u,sa}).$$

Здесь L_{sa} – инерционность потока в системной артерии, R_{sa} , C_{sa} , $V_{u,sa}$ – ЭГС, эластичность и невозмущенный объем системной артерии соответственно, P_{sap} – давление крови в системной периферической артерии.

Системная периферическая артерия разделяется на сосуды МЦР, моделирующие сосудистое русло небольшого (несколько квадратных миллиметров) участка кожи, и на ОСР. Уравнения, описывающие изменение объема ответвления системной периферической артерии на МЦР $V_{sap}(t)$, объема артериальной части ОСР $V_{sa_g}(t)$ и давления $P_{sp}(t)$ крови в системной периферической артерии имеют вид:

$$\begin{aligned} \frac{dV_{sap,g}(t)}{dt} &= Q_{sa}(t) - \frac{P_{sap}(t) - P_{sv_g}(t)}{R_{sa_g}} - \frac{P_{sap}(t) - P_{samv}^1(t)}{R_{sap}}, \\ V_{sap,g}(t) &= V_{sap}(t) + V_{sa_g}(t), \\ V_{sap}(t) &= C_{sap} P_{sap}(t) + V_{u,sap}, \\ V_{sa_g}(t) &= C_{sa_g} P_{sap}(t) + V_{u,sa_g}, \\ P_{sap}(t) &= \frac{1}{C_{sap} + C_{sa_g}} (V_{sap,g}(t) - V_{u,sap} - V_{u,sa_g}). \end{aligned} \quad (III.1.7)$$

Здесь R_{sap} , C_{sap} , $V_{u,sap}$, R_{sa_g} , C_{sa_g} , V_{u,sa_g} – ЭГС, эластичность и невозмущенный объем ответвления системной периферической артерии на МЦР, ЭГС, эластичность и невозмущенный объем артериальной части ОСР а P_{sv_g} , P_{samv}^1 – давление крови в венозной части ОСР и в МЦР на первом уровне ветвления соответственно.

Модель МЦР представляет собой древовидную структуру с 10-ю уровнями ветвления в артериальной и 10-ю уровнями ветвления в венозной части русла. Ветвление сосудов на каждом уровне является бифуркационным – один в два в артериальной и два в один в венозной части. Предполагая, что сосуды одного уровня одинаковы по своим гидродинамическим характеристикам, более того, что в каждой части МЦР (артериальной и венозной) эластичности сосудов одинаковы, МЦР можно описать следующей системой уравнений:

$$\begin{aligned}
\frac{dV_{sa_{mv}}^k(t)}{dt} &= Q_{sa_{mv}}^{k-1}(t) - 2Q_{sa_{mv}}^k(t), & P_{sa_{mv}}^k(t) &= \frac{1}{C_{sa_{mv}}}(V_{sa_{mv}}^k(t) - V_{u,sa_{mv}}^k), \\
&\dots \\
\frac{dV_{sa_{mv}}^n(t)}{dt} &= Q_{sa_{mv}}^{n-1}(t) - 2Q_{sa_{mv},sv_{mv}}^n(t), & P_{sa_{mv}}^n(t) &= \frac{1}{C_{sa_{mv}}}(V_{sa_{mv}}^n(t) - V_{u,sa_{mv}}^n), \\
\frac{dV_{sv_{mv}}^n(t)}{dt} &= Q_{sa_{mv},sv_{mv}}^n(t) - Q_{sv_{mv}}^n(t), & P_{sv_{mv}}^n(t) &= \frac{1}{C_{sv_{mv}}}(V_{sv_{mv}}^n(t) - V_{u,sv_{mv}}^n), \quad (\text{III.1.8}) \\
&\dots \\
\frac{dV_{sv_{mv}}^k(t)}{dt} &= 2Q_{sv_{mv}}^{k+1}(t) - Q_{sv_{mv}}^k(t), & P_{sv_{mv}}^k(t) &= \frac{1}{C_{sv_{mv}}}(V_{sv_{mv}}^k(t) - V_{u,sv_{mv}}^k), \\
Q_{sa_{mv}}^k &= \frac{P_{sa_{mv}}^k - P_{sa_{mv}}^{k+1}}{R_{sa_{mv}}^k}, & Q_{sa_{mv},sv_{mv}}^n &= \frac{P_{sa_{mv}}^n - P_{sv_{mv}}^n}{R_{sa_{mv}}^n}, & Q_{sv_{mv}}^k &= \frac{P_{sv_{mv}}^k - P_{sv_{mv}}^{k-1}}{R_{sv_{mv}}^k}.
\end{aligned}$$

Здесь верхний индекс обозначает номер уровня ветвления сосудов, который изменяется от 1 до n , где $n = 10$. $C_{sa_{mv}}$, $C_{sv_{mv}}$ – эластичность сосудов артериальной и венозной частей МЦР соответственно. Предполагается, что ЭГС сосудов МЦР зависят от номера ветвления сосудов линейным образом:

$$\begin{aligned}
R_{sa_{mv}}^k &= \eta \frac{l_{sa_{mv}}^1 + (l_{sa_{mv}}^n - l_{sa_{mv}}^1) \frac{k-1}{n-1}}{(r_{sa_{mv}}^1 + (r_{sa_{mv}}^n - r_{sa_{mv}}^1) \frac{k-1}{n-1})^4}, \\
R_{sv_{mv}}^k &= \eta \frac{l_{sv_{mv}}^1 + (l_{sv_{mv}}^n - l_{sv_{mv}}^1) \frac{k-1}{n-1}}{(r_{sv_{mv}}^1 + (r_{sv_{mv}}^n - r_{sv_{mv}}^1) \frac{k-1}{n-1})^4}.
\end{aligned} \quad (\text{III.1.9})$$

Здесь $l_{sa_{mv}}^1, l_{sa_{mv}}^n, r_{sa_{mv}}^1, r_{sa_{mv}}^n, l_{sv_{mv}}^1, l_{sv_{mv}}^n, r_{sv_{mv}}^1, r_{sv_{mv}}^n$ – длины и радиусы на первом и n -ом уровнях ветвления сосудов артериальной (a_{mv}) и венозной (v_{mv}) части МЦР, η – параметр, связанный с эффективной вязкостью крови. Невозмущенные объемы сосудов МЦР вычисляются через геометрические свойства сосудов следующим образом:

$$\begin{aligned}
V_{u,sa_{mv}}^k &= \pi \left(r_{sa_{mv}}^1 + (r_{sa_{mv}}^n - r_{sa_{mv}}^1) \frac{k-1}{n-1} \right)^2 \times \\
&\times \left(l_{sa_{mv}}^1 + (l_{sa_{mv}}^n - l_{sa_{mv}}^1) \frac{k-1}{n-1} \right), \\
V_{u,sv_{mv}}^k &= \pi \left(r_{sv_{mv}}^1 + (r_{sv_{mv}}^n - r_{sv_{mv}}^1) \frac{k-1}{n-1} \right)^2 \times \\
&\times \left(l_{sv_{mv}}^1 + (l_{sv_{mv}}^n - l_{sv_{mv}}^1) \frac{k-1}{n-1} \right).
\end{aligned} \quad (\text{III.1.10})$$

Изменение объема V_{sv_p} и давления P_{sv_p} венозной части ответвления системной периферической вены на МЦР описывается уравнениями:

$$\begin{aligned}\frac{dV_{svp}(t)}{dt} &= 2 \frac{P_{svmv}^1(t) - P_{svp}(t)}{R_{svmv}^1} - \frac{P_{svp}(t) - P_{ra}(t)}{R_{svp}}, \\ P_{svp}(t) &= \frac{1}{C_{svp}} (V_{svp}(t) - V_{u,svp}).\end{aligned}\quad (\text{III.1.11})$$

Здесь R_{svp} , C_{svp} , $V_{u,svp}$ – ЭГС, эластичность и невозмущенный объем ответвления системной периферической вены на МЦР.

Изменение объема $V_{svg}(t)$ и давления $P_{svg}(t)$ крови в венозной части ОСР запишем, используя закон сохранения количества крови во всем сердечно-сосудистом русле:

$$\begin{aligned}V_{svg}(t) &= V_{tot} - \sum_j V_j(t) - \sum_{k=1}^{10} 2^k [V_{samv}^k(t) + V_{svmv}^k(t)], \\ j &= pua, pua_p, piv_p, sa, sa_p, sa_g, sv_p, la, lv, ra, rv, \\ P_{svg}(t) &= \frac{1}{C_{svg}} (V_{svg}(t) - V_{u,svg}),\end{aligned}\quad (\text{III.1.12})$$

где V_{tot} – объем всей крови, C_{svg} , $V_{u,svg}$ – эластичность и невозмущенный объем венозной части ОСР соответственно.

Далее кровь из венозной части ОСР и ответвления периферической вены на МЦР системного круга кровообращения попадает в правое предсердие. Объем $V_{ra}(t)$ и давление $P_{ra}(t)$ крови в правом предсердии описываются уравнениями:

$$\begin{aligned}\frac{dV_{ra}(t)}{dt} &= \frac{P_{svg}(t) - P_{ra}(t)}{R_{svg}} + \frac{P_{svp}(t) - P_{ra}(t)}{R_{svp}} - Q_{in,rv}(t), \\ P_{ra}(t) &= \frac{1}{C_{ra}} (V_{ra}(t) - V_{u,ra}).\end{aligned}\quad (\text{III.1.13})$$

Здесь R_{svg} – ЭГС венозной части ОСР системного круга кровообращения, C_{ra} , $V_{u,ra}$ – эластичность и невозмущенный объем правого предсердия.

III.1.2.1.3 Легочный круг кровообращения.

Для легочной артерии поток $Q_{pua}(t)$, объем $V_{pua}(t)$ и давление $P_{pua}(t)$ крови описываются уравнениями:

$$\begin{aligned}\frac{dQ_{pua}(t)}{dt} &= \frac{1}{L_{pua}} (P_{pua}(t) - P_{pua_p}(t) - R_{pua} Q_{pua}(t)), \\ \frac{dV_{pua}(t)}{dt} &= Q_{o,rv}(t) - Q_{pua}(t), P_{pua}(t) = \frac{1}{C_{pua}} (V_{pua}(t) - V_{u,pua}).\end{aligned}\quad (\text{III.1.14})$$

Здесь L_{pua} – инерционность потока в легочной артерии, R_{pua} , C_{pua} , $V_{u,pua}$ – ЭГС, эластичность и невозмущенный объем легочной артерии соответственно, P_{pua_p} – давление крови в легочной периферической артерии.

Уравнения, описывающие изменение объема легочной периферической артерии $V_{pua_p}(t)$ и давления $P_{pua_p}(t)$ крови в легочной периферической артерии, имеют вид:

$$\begin{aligned} \frac{dV_{pua_p}(t)}{dt} &= Q_{pua}(t) - \frac{P_{pua_p}(t) - P_{puv_p}(t)}{R_{pua_p}}, \\ P_{pua_p}(t) &= \frac{1}{C_{pua_p}} \left(V_{pua_p}(t) - V_{u,pua_p} \right). \end{aligned} \quad (\text{III.1.15})$$

Здесь R_{pua_p} , C_{pua_p} , V_{u,pua_p} – ЭГС, эластичность и невозмущенный объем легочной периферической артерии соответственно, P_{puv_p} – давление крови в легочной периферической вене.

Уравнения, описывающие изменение объема $V_{puv_p}(t)$ и давления $P_{puv_p}(t)$ крови в легочной периферической вене, имеют вид:

$$\begin{aligned} \frac{dV_{puv_p}(t)}{dt} &= \frac{P_{pua_p}(t) - P_{puv_p}(t)}{R_{pua_p}} - \frac{P_{puv_p}(t) - P_{la}(t)}{R_{puv_p}}, \\ P_{puv_p}(t) &= \frac{1}{C_{puv_p}} \left(V_{puv_p}(t) - V_{u,puv_p} \right). \end{aligned} \quad (\text{III.1.16})$$

Здесь R_{puv_p} , C_{puv_p} , V_{u,puv_p} – ЭГС, эластичность и невозмущенный объем легочной периферической вены.

Далее кровь из легочной периферической вены попадает в левое предсердие. При этом объем $V_{la}(t)$ и давление $P_{la}(t)$ крови в левом предсердии описываются уравнениями:

$$\begin{aligned} \frac{dV_{la}(t)}{dt} &= \frac{P_{puv_p}(t) - P_{la}(t)}{R_{puv_p}} - Q_{in,lv}(t), \\ P_{la}(t) &= \frac{1}{C_{la}} \left(V_{la}(t) - V_{u,la} \right). \end{aligned} \quad (\text{III.1.17})$$

Здесь C_{la} , $V_{u,la}$ – эластичность и невозмущенный объем левого предсердия.

III.1.2.2 Методы

Параметризация модели была проведена таким образом, чтобы величины давления в сердце и в сосудистых резервуарах соответствовали физиологической норме в покое (Таблица III.1.2, III.1.3, Рисунок III.1.11) при частоте сердцебиения 1.2 Гц или примерно 72 уд/мин. При этом учитывалось соответствие модельных значений общего объема крови и ударного объема физиологической норме (Таблица III.1.4). В результате моделирования получали записи объемной скорости и давления кровотока для всех сосудистых резервуаров. Длительность записей составляла 600 с. Для дальнейшего анализа брали объемные скорости кровотока в системной артерии и в МЦР.

Таблица III.1.2. Средние значения давлений крови в сосудах.

Сосуд	Давление (мм рт. ст.)	
	Физ. норма	Модель
Аорта	100-120	92
Магистральные артерии	100-120	
Ветвящиеся артерии	80-90	87
Терминальные артерии	80-90	
Артериолы	40-60	19
Капилляры	15-25	
Венулы	12-18	
Терминальные вены	10-12	13
Ветвящиеся вены	5-8	
Венозные коллекторы	3-5	4.4
Полые вены	1-3	

Примечание: экспериментальные физиологические данные взяты из (<http://meduniver.com/Medical/Physiology/357.html>, дата обращения: 30.10.2018).

Таблица III.1.3. Давления крови в полостях сердца.

Полость сердца	Давление (мм рт. ст.)	
	Физ. Норма	Модель
Правое предсердие:		
систола	5-8	4.55
диастола	0	4.20
Правый желудочек:		
систола	25-30	25
диастола	0	4
Левое предсердие:		
систола	5-8	9.9
диастола	0	9.57
Левый желудочек:		
систола	115-125	120
диастола	0	2

Примечание: экспериментальные физиологические данные взяты из (<http://www.amedgrup.ru/davlen.html>, дата обращения: 30.10.2018).

Таблица III.1.4. Общий объем крови и ударный объем сердца.

	Объем (мл)	
	Физ. норма	Модель
Общий объем	4500-5400	4500
Ударный объем	40-70	52

Примечание: экспериментальные физиологические данные взяты из (<http://www.km.ru/zdorove/encyclopedia/pokazateli-deyatelnosti-serdtsa>, дата обращения: 30.10.2018; <http://medbiol.ru/medbiol/anatomia/000007e7.htm>, дата обращения: 30.10.2018).

Исследование колебательных режимов системного и микроциркуляторного кровотока проводилось при следующих возмущающих

воздействиях на сердечно-сосудистое русло: 1) влияние случайных шумовых флуктуаций на жесткость стенок желудочков; 2) влияние случайных шумовых флуктуаций на эластичность сосудов МЦР. Шумовые возмущения представляли собой физический белый шум с ограниченной полосой частот (БШО) с нулевым средним, единичной дисперсией и временем корреляции 0.1 с.

Моделирование шумового воздействия на жесткость стенок желудочков осуществлялось добавкой независимых случайных членов к изометрическому давлению:

$$P_{max,iv}^{noise}(t) = P_{max,iv}(t) + \delta \left(\frac{\zeta_i(t)}{\sqrt{t_s}} + \kappa \right), i = l, r, \quad (\text{Ш.1.18})$$

где $\delta = 7.071 \times 10^{-1}(\text{ммрт.ст.})с$ и $\kappa = 1.414 с^{-1}$ – масштабные параметры, а $t_s = 1.0 \times 10^{-1} с$ – время корреляции. $\zeta_i(t)$ – белый Гауссов шум, воздействующий на жесткость стенок i -го желудочка. Далее в уравнении (Ш.1.2) вместо детерминированного изометрического давления $P_{max,iv}(t)$ использовалось давление с шумовой добавкой $P_{max,iv}^{noise}(t)$.

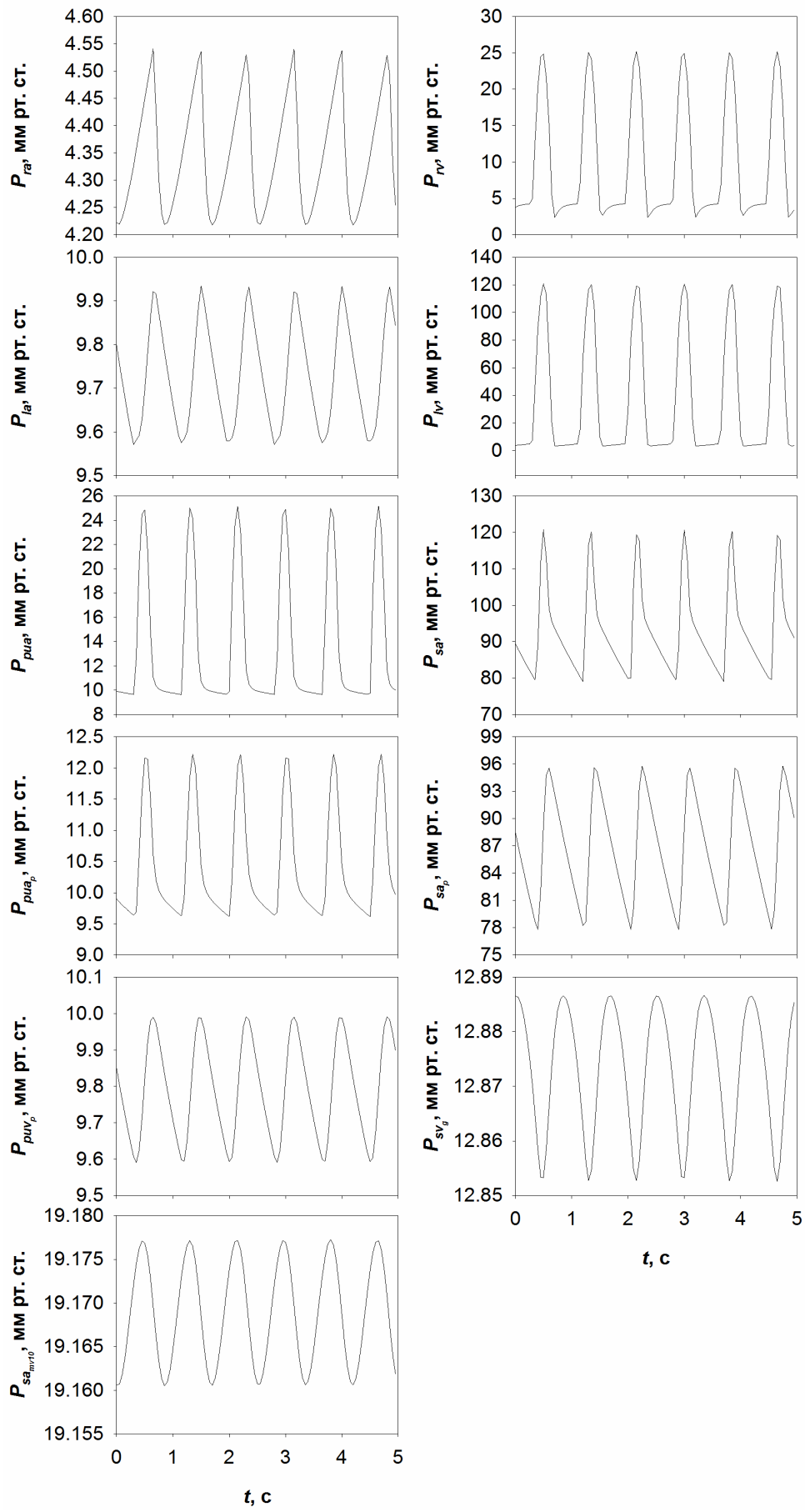


Рисунок III.1.11. Модельные записи колебаний давления кровотока в левом и правом предсердиях (P_{la}, P_{ra}), в левом и правом желудочках (P_{lv}, P_{rv}), в системной артерии P_{sa} , в пульмональной артерии P_{pua} , в периферической системной P_{sa_p} и пульмональной P_{pua_p} артерии, в МЦР на 10-ом уровне ветвления P_{samv10} , в венозной части ОСР P_{sv_g} и в пульмональной периферической вене P_{pvp_p} .

Влияние шума на эластичность сосудов МЦР системного круга кровообращения моделировалось аддитивной добавкой БШО к параметрам эластичности МЦР:

$$\begin{aligned} C_{samv}^{noise}(t) &= C_{samv} + \delta_{mv} \frac{\zeta_{mv}(t)}{\sqrt{t_{s,mv}}}, \\ C_{svmv}^{noise}(t) &= C_{svmv} + \delta_{mv} \frac{\zeta_{mv}(t)}{\sqrt{t_{s,mv}}}, \end{aligned} \quad (III.1.19)$$

где $\delta = 7.071 \times 10^{-4} \text{мл(ммрт.см.)}^{-1}\text{с}$ – масштабный параметр, а $t_{s,mv} = 1.0 \times 10^{-1}\text{с}$ – время корреляции. $\zeta_{mv}(t)$ – белый Гауссов шум. Далее в систему уравнений (III.1.8) вместо постоянных значений эластичности МЦР C_{samv} и C_{svmv} подставлялись эластичности с шумовой добавкой $C_{samv}^{noise}(t)$ и $C_{svmv}^{noise}(t)$.

Записи объемных скоростей в системной артерии и в МЦР разлагались на спектральные составляющие при помощи метода адаптивного вейвлет-преобразования (Tankanag and Chemeris, 2008). При этом для МЦР делалось предварительное усреднение по 4-м уровням (amv9, amv10, vmv10, vmv9), на которые приходится более 75% всех микрососудов моделируемого МЦР. Таким образом, полученные записи объемных скоростей в МЦР являлись модельными аналогами измеряемой экспериментально методом лазерной доплеровской флоуметрии кожной перфузии, которая характеризует колебания объемной скорости кровотока в микрососудах кожи, расположенных приблизительно в 1 мм³ зондируемого объема ткани.

Численное решение системы уравнений (III.1.2 – III.1.17) проводилось в модуле Simulink пакета Matlab (The MathWorks, Inc.) с использованием

численной схемы интегрирования Dormand-Prince с переменным шагом интегрирования. Параметры модели, используемые при решении уравнений (III.1.2 – III.1.17) приведены в таблице III.1.5.

Таблица III.1.5. Параметры модели.

Параметр	Значение	Единицы измерения
Сердце		
$k_{R,lv}$	7.0×10^{-4}	$с\ мл^{-1}$
$k_{R,rv}$	1.4×10^{-3}	$с\ мл^{-1}$
$E_{max,lv}$	6.5×10^{-1}	$(мм\ рт.\ ст.)мл^{-1}$
$E_{max,rv}$	4.0×10^{-1}	$(мм\ рт.\ ст.)мл^{-1}$
$k_{E,lv}$	7.0×10^{-3}	$мл^{-1}$
$k_{E,rv}$	1.1×10^{-2}	$мл^{-1}$
$P_{0,lv}$	8.0×10^{-1}	$мм\ рт.\ ст.$
$P_{0,rv}$	1.3	$мм\ рт.\ ст.$
$V_{u,lv}$	7.0×10^1	$мл$
$V_{u,rv}$	4.08×10^1	$мл$
R_{la}	5.0×10^{-2}	$(мм\ рт.\ ст.)с\ мл^{-1}$
R_{ra}	5.0×10^{-3}	$(мм\ рт.\ ст.)с\ мл^{-1}$
C_{la}	8.0×10^1	$(мм\ рт.\ ст.)^{-1}мл$
C_{ra}	1.0×10^2	$(мм\ рт.\ ст.)^{-1}мл$
$V_{u,la}$	2.5×10^1	$мл$
$V_{u,ra}$	4.0×10^1	$мл$
Пульмональная артерия		
C_{pua}	4.0×10^{-1}	$(мм\ рт.\ ст.)^{-1}мл$
R_{pua}	5.0×10^{-2}	$(мм\ рт.\ ст.)с\ мл^{-1}$
L_{pua}	1.8×10^{-4}	$(мм\ рт.\ ст.)мл\ с^{-2}$

$V_{u,pu}$	0.0	мл
Пульмональная периферическая артерия		
C_{rup}	4.0	$(\text{мм рт. ст.})^{-1}\text{мл}$
R_{rup}	1.0×10^{-2}	$(\text{мм рт. ст.})\text{с мл}^{-1}$
$V_{u,rup}$	1.23×10^2	мл
Пульмональная периферическая вена		
C_{pivp}	5.0×10^1	$(\text{мм рт. ст.})^{-1}\text{мл}$
R_{pivp}	1.0×10^{-3}	$(\text{мм рт. ст.})\text{с мл}^{-1}$
$V_{u,pivp}$	1.20×10^2	мл
Системная артерия		
C_{sa}	3.0×10^{-1}	$(\text{мм рт. ст.})^{-1}\text{мл}$
R_{sa}	1.0×10^{-1}	$(\text{мм рт. ст.})\text{с мл}^{-1}$
L_{sa}	2.2×10^{-4}	$(\text{мм рт. ст.})\text{мл с}^{-2}$
$V_{u,sa}$	3.5×10^1	мл
Ответвление системной периферической артерии на МЦР		
C_{sap}	9.0×10^{-1}	$(\text{мм рт. ст.})^{-1}\text{мл}$
R_{sap}	1.3	$(\text{мм рт. ст.})\text{с мл}^{-1}$
$V_{u,sap}$	3.0×10^1	мл
Ответвление системной периферической артерии на ОСР		
C_{sag}	9.0×10^{-1}	$(\text{мм рт. ст.})^{-1}\text{мл}$
R_{sag}	1.3	$(\text{мм рт. ст.})\text{с мл}^{-1}$
$V_{u,sag}$	5.0×10^1	мл
МЦР		
C_{samv}	1.8×10^{-3}	$(\text{мм рт. ст.})^{-1}\text{мл}$
l_{samv}^1	4.0×10^{-1}	см
l_{samv}^{10}	1.0×10^{-1}	см

$r_{sa_{mv}}^1$	1.5×10^{-3}	см
$r_{sa_{mv}}^{10}$	3.0×10^{-4}	см
$l_{sv_{mv}}^1$	4.0×10^{-1}	см
$l_{sv_{mv}}^{10}$	1.0×10^{-1}	см
$r_{sv_{mv}}^1$	5.0×10^{-3}	см
$r_{sv_{mv}}^{10}$	4.0×10^{-4}	см
η	8.59×10^{-17}	(мм рт. ст.)с
Ответвление системной периферической вены на МЦР		
C_{sv_p}	5.5×10^1	(мм рт. ст.) ⁻¹ мл
R_{sv_p}	1.3	(мм рт. ст.)с мл ⁻¹
V_{u,sv_p}	1.0×10^1	мл
Ответвление системной периферической вены на ОСР		
C_{sv_g}	5.0×10^1	(мм рт. ст.) ⁻¹ мл
R_{sv_g}	1.5×10^{-1}	(мм рт. ст.)с мл ⁻¹
V_{u,sv_g}	2.0×10^1	мл

III.1.2.3 Результаты численного моделирования

На рисунке III.1.11 представлены фрагменты записей колебаний давления кровотока в сердце и в сосудистых резервуарах. Записи получены без внешнего воздействия в покое при частоте сердцебиения $F_h = 1.2$ Гц. Они демонстрируют кинетику и количественные величины давления кровотока (Таблица III.1.2, III.1.3), которые соответствуют физиологической норме.

На рисунке III.1.12 представлены амплитудно-частотные спектры колебаний объемных скоростей кровотока невозмущенной системы. Видно, что как на системном (Рисунок III.1.12а), так и на микроциркуляторном (Рисунок III.1.12б) уровнях в спектрах присутствует только компонент на частоте сердечных сокращений ($F_h = 1.2$ Гц) и гармоника этого компонента (пик меньшей амплитуды справа).

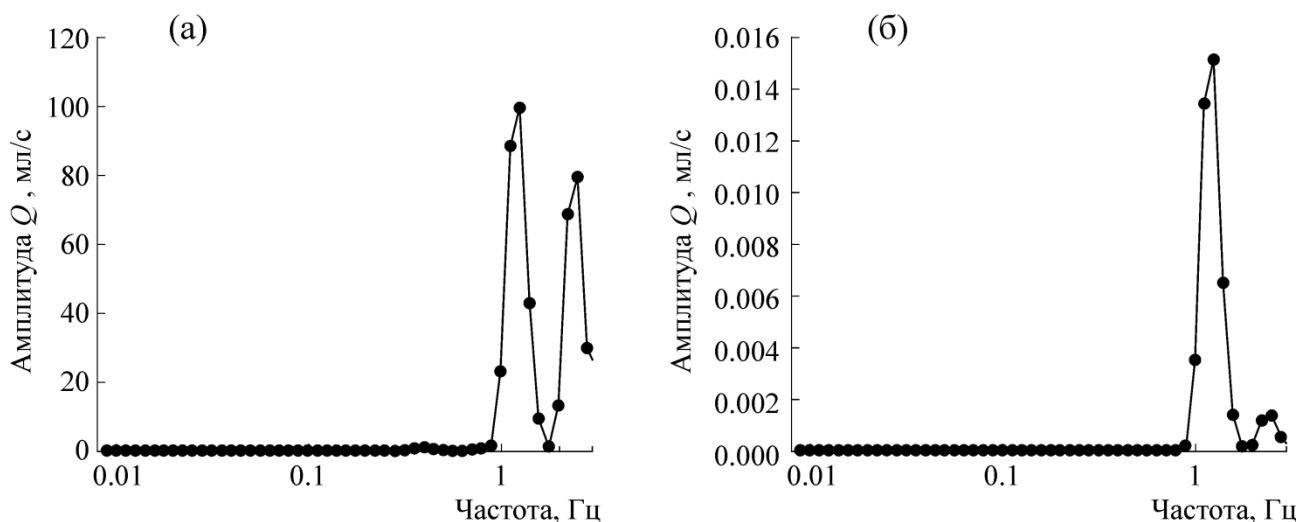


Рисунок III.1.12. Спектры колебаний модельной объемной скорости кровотока в системной обобщенной артерии (а) и МЦР (б) невозмущенной системы.

На рисунках III.1.13а и III.1.13б показаны спектры колебаний объемных скоростей кровотока в моделируемой ССС при возмущающем воздействии на жесткость стенок желудочков низкоинтенсивным шумом, спектральная мощность которого не превышала 0.5% от спектральной мощности колебаний давления крови в левом желудочке. Моделирование шумового воздействия на жесткость стенок желудочков осуществляли добавкой независимых случайных членов к изометрическому давлению по формуле (III.1.18). Модельные кривые представляют собой усредненные данные по десяти независимым реализациям шумового сигнала. Также на рисунке III.1.13в приведена экспериментальная кривая спектра кожной перфузии по данным лазерной доплеровской флоуметрии у 29 молодых (18–26 лет) испытуемых на подушечке указательного пальца в покое (Krasnikov et. al. 2013). Из рисунка видно, что на системном уровне (Рисунок III.1.13а) низкочастотный отклик практически не формируется, в то время как на микроциркуляторном уровне (Рисунок III.1.13б) низкочастотной отклик достигает значительной величины и качественно схож с экспериментальными данными (Рисунок III.1.13в).

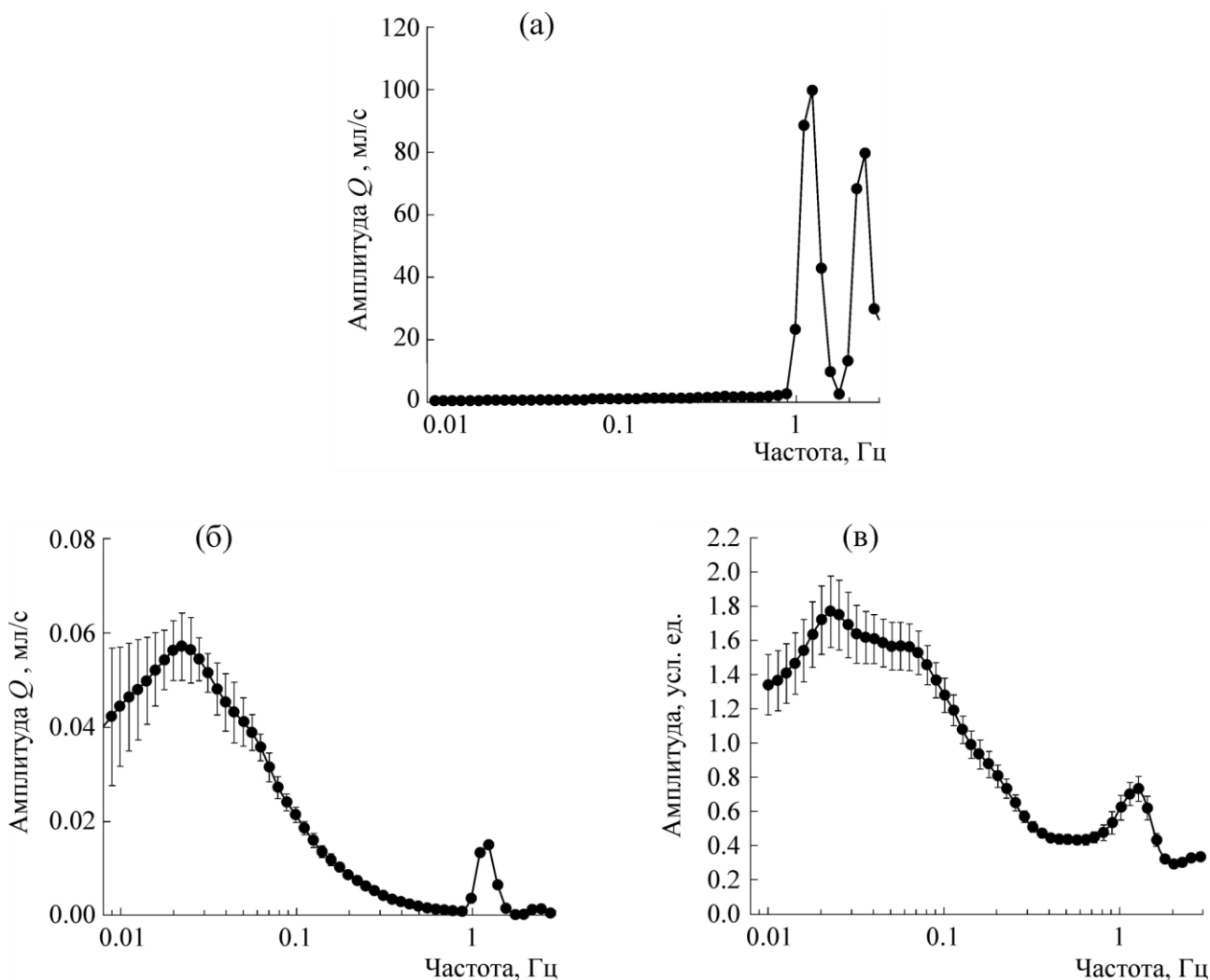


Рисунок III.1.13. Спектры колебаний модельной объемной скорости кровотока в системной обобщенной артерии (а) и в МЦР (б) в условиях случайного воздействия на жесткость стенок желудочков сердца низкоинтенсивным шумом. Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение по десяти реализациям случайного сигнала. (в) – Экспериментальная кривая спектра кожной перфузии условно здоровых добровольцев (Krasnikov et. al. 2013). Данные представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Аналогичные результаты были получены на упрощенных моделях сердечно-сосудистого русла, в которых описывалась одна камера сердца (левый желудочек) и только системный круг кровообращения. Было показано, что при случайных или периодических воздействиях на сердце в МЦР также

формируются низкочастотные колебания, а максимум их амплитуды приходился на частоту 0.1 Гц.

Влияние шума на эластичность сосудов МЦР моделировалось аддитивной добавкой БШО к параметрам эластичности по формуле (III.1.19). Интенсивность шумового воздействия не превышала 0.4% от эластичности системной обобщенной периферической артерии. На рисунке III.1.14 показан результат влияния БШО на эластичность сосудов МЦР. Видно, что в данном случае низкочастотные колебания кровотока не формируются в отличие от шумового воздействия на жесткость стенок желудочков сердца (Рисунок III.1.13).

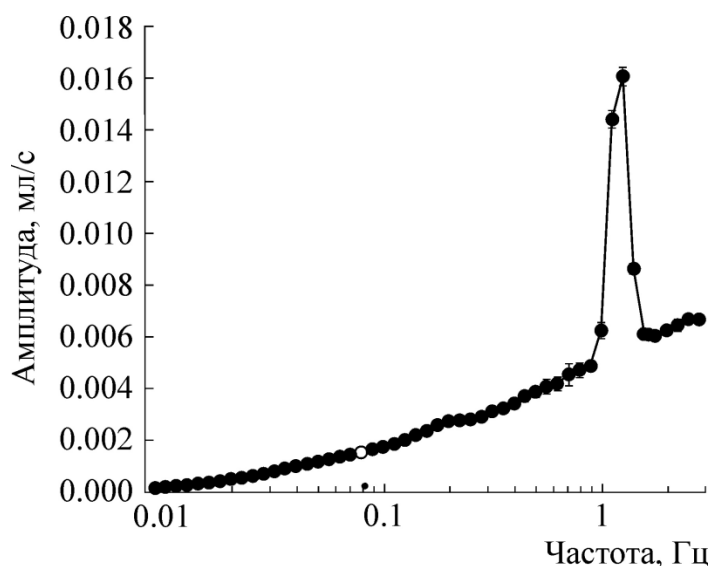


Рисунок III.1.14. Спектр колебаний модельной объемной скорости кровотока в МЦР при воздействии на эластичность сосудов МЦР низкоинтенсивным шумом.

Проблема формирования низкочастотных ритмов как в ССС человека в целом, так и в МЦР в частности, до сих пор остается не решенной. существующие представления о локальных механизмах регуляции кровотока в МЦР (Stefanovska, et al. 1999; Mück-Weymann, et al. 1996; Bertuglia, et al. 1994; Landsverk, et al. 2006; Kvandal, et al. 2006; Bernjak, et al. 2008; Stewart, et al. 2007) не дают ясного ответа на вопрос о роли самого сосудистого русла как гидродинамической системы в формировании низкочастотных ритмов.

Для описания ССС человека использовалась гидродинамическая модель с четырехкамерным сердцем, системным и легочным кругами кровообращения и периферическим микроциркуляторным руслом, включающим многоуровневое ветвление сосудов. В модель не заложена автономная регуляция со стороны вегетативной нервной системы. Такой подход позволяет исследовать роль сосудистого русла в формировании колебательной динамики кровотока как на системном, так и на микроциркуляторном уровнях.

Подбор параметров модели является важным моментом математического моделирования биологических процессов. Параметры представленной модели подобраны таким образом, чтобы при частоте сердечных сокращений, равной 1.2 Гц, значения давлений крови в основных сосудистых резервуарах и в камерах сердца соответствовали физиологической норме (Таблица III.1.2, III.1.3, Рисунок III.1.11). Кроме того, значения общего объема крови и ударного объема также соответствовали физиологической норме (Таблица III.1.4).

Численное решение уравнений (III.1.2) – (III.1.17) для невозмущенной системы дает ожидаемые результаты по спектральному составу (Рисунок III.1.12). Они заключаются в том, что в колебаниях как системного, так и микроциркуляторного кровотока отсутствуют выраженные спектральные компоненты в низкочастотной области.

Картина меняется при воздействии на эластичность желудочков сердца низкоинтенсивным шумом. При этом на системном уровне видимых изменений не происходит (Рисунок III.1.13а), в то время как на микроциркуляторном уровне в низкочастотной области формируются колебания, которые приблизительно в три раза превосходят по амплитуде колебания на частоте кардиоритма (Рисунок III.1.13б). сходные спектры наблюдаются в экспериментальных исследованиях кожной перфузии фаланги указательного пальца руки (Рисунок III.1.13в, (Krasnikov, et al. 2013)).

В рамках представленной модели также исследовалось влияние шума на эластичность сосудов МЦР и отклика микроциркуляторного кровотока на это воздействие. Оказалось, что добавление шума не приводит к формированию

низкочастотных ритмов в микроциркуляторном кровотоке (Рисунок III.1.14). По-видимому, в этом случае недостаточен учет только гидродинамических свойств сосудистого русла и в модель необходимо включать более высокие контуры регуляции, например, автономный контроль со стороны вегетативной нервной системы.

Таким образом, можно предположить, что динамическая связь между активностью сердца и низкочастотными колебаниями кожного кровотока в МЦР может базироваться только на гидродинамических свойствах сосудистого русла даже в отсутствие вегетативного контроля. Сами же колебания могут формироваться пассивно без активного участия процессов регуляции эндотелиальной, нейрогенной и миогенной природы, как это принято в современных представлениях о регуляции кожной перфузии (Stefanovska, et al. 1999; Mück-Weymann, et al. 1996; Bertuglia, et al. 1994; Landsverk, et al. 2006; Kvandal, et al. 2006; Bernjak, et al. 2008; Stewart, et al. 2007).

Наличие динамической связи между активностью сердца и низкочастотными колебаниями кожной перфузии подтверждается экспериментально. Например, авторами работы (Ticcinelli, et al. 2017) показано, что между кардиоритмом и низкочастотными колебаниями кожной перфузии в миогенном диапазоне (0.056–0.145 Гц) существует фазовая когерентность, а форма связи между фазами носит динамический синусоидальный характер.

С помощью математического моделирования показано, что даже в отсутствие вегетативного контроля существует динамическая связь между активностью сердца и низкочастотными колебаниями кожного кровотока в МЦР, которая базируется на гидродинамических свойствах сосудистого русла. Эта связь свидетельствует о принципиальной возможности влияния центральных механизмов на локальную регуляцию микрогемодинамики.

Важно понимать, что нормальное функционирование ССС определяется согласованной работой механизмов, регулирующих колебания кровотока, и что эта согласованная работа может нарушаться при патологических состояниях. Такие состояния могут быть связаны с ангиопатиями и

нейропатиями при метаболических заболеваниях, приводящие к расстройству как центральной, так и локальной регуляции кровотока в ССС (Czacowski and Roustit, 2020). Во многом это связано с неправильной работой клеток врожденного иммунитета, реализующими свою защитную функцию на уровне всего организма за счет ССС. Многочисленными представителями клеток врожденного иммунитета человека являются полиморфноядерные нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы). Они составляют более 60% всех лейкоцитов. В развитии метаболических нарушений и осложнений нейтрофилы играют важнейшую роль, поддерживая окислительный стресс за счет нарушения функциональной активности NADPH-оксидазы. Существует много исследований, показывающих ключевое участие нейтрофилов в формировании воспаления и хронического окислительного стресса в таких социально значимых заболеваниях, как: рак, аллергия и диабет (El-Benna, et al. 2016). Поэтому исследование динамических особенностей активации NADPH-оксидазы и их влияния на защитную функцию иммунной системы в норме и при системных патологических нарушениях является важной задачей для понимания регуляторных изменений в периферической микрогемодинамике, определяющих нарушения колебаний микроциркуляторного кровотока конечностей.

III.2 Моделирование фагоцитарного ответа гранулоцитов на микробные частицы

Окислительный стресс как дисбаланс между производством и утилизацией активных форм кислорода (АФК) играет важную роль в возникновении и прогрессировании острого или хронического воспаления при разных патологиях, в частности, при диабете. Массовое высвобождение АФК (респираторный взрыв), катализируемое NADPH-оксидазой в фагоцитах крови, при диабете недостаточно изучено. Изучение кинетики ответа на микробные частицы в крови для уточнения нарушения механизмов динамической регуляции генерации АФК

у пациентов с сахарным диабетом 2 типа важно и актуально. Для этого использовались взаимодополняющие экспериментальный и теоретический подходы.

III.2.1 Описание модели фагоцитарного ответа гранулоцитов на микробные частицы

Математическая модель описывает фагоцитарный ответ и кинетику респираторного взрыва нейтрофилов в крови. В модели рассмотрены четыре состояния нейтрофилов в популяции клеток (Рисунок III.2.1): (I) – покой, (II) – взаимодействие с патогеном и захват его, в результате инициируется сборка комплексов NADPH – оксидазы, что ведет к тому, что нейтрофилы могут переходить в I или III состояние; (III) - активированные клетки, интенсивно продуцирующие супероксид при катализе NADPH-оксидазы, нейтрофилы могут переходить во II или IV состояние (апоптоз/некроз или нетоз).

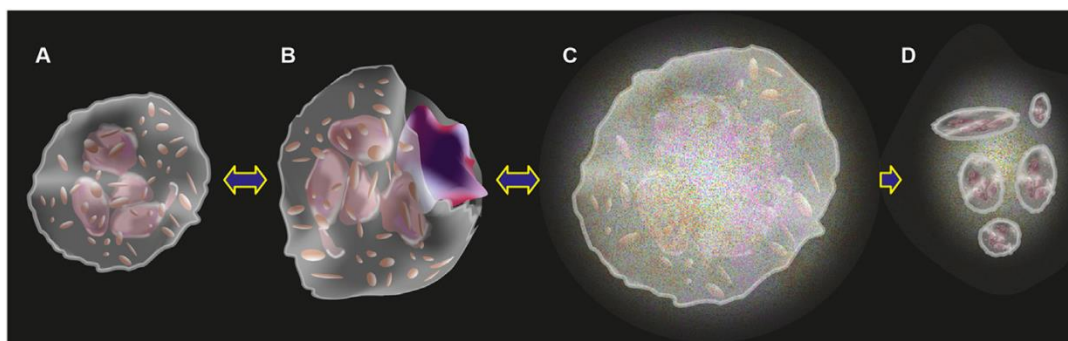


Рисунок III.1. Схема состояний нейтрофилов, описанная в математической модели. (A) Покоящийся нейтрофил, I состояние. (B) Нейтрофил, взаимодействующий с патогеном, II состояние. (C) Активированный нейтрофил, III состояние. (D) Инактивированный/мертвый нейтрофил, IV состояние. Стрелки указывают на переходы между состояниями нейтрофилов.

Для описания состояний нейтрофилов с I по III использовалась система обыкновенных дифференциальных уравнений. Нейтрофилы в IV состоянии не рассматривались из-за гибели клеток.

Пусть в начальный момент количество покоящихся нейтрофилов в крови составляло $N_{0,in}$. После появления микробных частиц покоящиеся нейтрофилы взаимодействовали с ними и переходили во II состояние. Изменение числа покоящихся нейтрофилов $N_0(t)$ описывалось уравнением:

$$\frac{dN_0(t)}{dt} = k_{01} \left(\tilde{k}_{10} N_1(t) - C'_a(t) N_0(t) \right), \quad (\text{III.2.1})$$

$$\tilde{k}_{10} = k_{10}/k_{01},$$

где k_{01} – константа скорости перехода из I во II состояние, характеризующая способность нейтрофилов к связыванию с патогеном; k_{10} – константа скорости обратного перехода, характеризующая прочность этой связи. Оба параметра отражают способностью нейтрофилов к фагоцитозу. Параметр C'_a – концентрация микробных частиц, $N_1(t)$ – число клеток во II состоянии.

$N_1(t)$ – описывалось следующим уравнением:

$$\frac{dN_1(t)}{dt} = k_{1A} \left(\tilde{k}_{A1} N_A(t) + \tilde{k}_{01} C'_a(t) N_0(t) - \tilde{k}_{01} \tilde{k}_{10} N_1(t) - S_{th}(r) N_1(t) \right), \quad (\text{III.2.2})$$

$$\tilde{k}_{A1} = k_{A1}/k_{1A}, \quad \tilde{k}_{01} = k_{01}/k_{1A},$$

где k_{1A} – константа скорости перехода из II в III (активированное) состояние, характеризующая способность нейтрофилов продуцировать супероксид при катализе NADPH-оксидазы; k_{A1} – константа скорости обратного перехода, характеризующая распад комплекса NADPH-оксидазы; $N_A(t)$ – число активированных нейтрофилов, $S_{th}(r)$ – пороговая функция, характеризующая число комплексов NADPH-оксидазы, преодолевающих порог активации.

При переходе нейтрофилов во II состояние инициируется сборка комплекса NADPH-оксидазы. Степень готовности NADPH-оксидазы к активации $r(t)$ описывалась уравнением:

$$\frac{dr(t)}{dt} = \gamma_r \left(-r(t) + \frac{1}{2} \left(\frac{1}{1 + e^{-\alpha_r C'_a(t)}} - \frac{1}{2} \right) \right), \quad (\text{III.2.3})$$

где γ_r – константа скорости сборки NADPH-оксидазы, α_r – коэффициент чувствительности, характеризующий сборку NADPH-оксидазы при низкой концентрации патогенных частиц.

Пороговая функция зависела от r следующим образом:

$$S_{th}(r) = \frac{k_s r(t)}{1 + e^{-\alpha_s(r_{th} - r(t))}}, \quad (\text{III.2.4})$$

где r_{th} – это порог степени готовности NADPH-оксидазы к выработке супероксида, преодоление которого приводит к переходу из II в III состояние, k_s – коэффициент, характеризующий величину пороговой функции, α_s – степень синхронизации сборки NADPH-оксидазы.

Количество супероксидных радикалов, обуславливающих появление реакционноспособных частиц, определяется количеством активированных нейтрофилов N_A . Уравнение, описывающее $N_A(t)$, было:

$$\frac{dN_A(t)}{dt} = k_{AD} \left(\tilde{k}_{1A} S_{th}(r) N_1(t) - N_A(t) - \tilde{k}_{1A} \tilde{k}_{A1} N_A(t) \right), \quad (\text{III.2.5})$$

$$\tilde{k}_{1A} = k_{1A} / k_{AD},$$

где k_{AD} – константа скорости перехода нейтрофилов из активированного в инактивированное состояние.

Поскольку количество реакционноспособных частиц определяет кинетику кривой люминолзависимой (CL) интенсивности, то для описания модельной интенсивности CL $I_{CL}(t)$ использовалась формула:

$$I_{CL}(t) = k_{CL} N_A(t), \quad (\text{III.2.6})$$

где $k_{CL} = 1$ – коэффициент пропорциональности.

Для учета времени добавления стимула t_s и экспериментального значения концентрации патогена C_a модельный параметр C'_a был масштабирован по формуле:

$$C'_a(t) = \begin{cases} 0, & t \leq t_s, \\ c'_l + (C_a - c_l) \frac{c'_h - c'_l}{c_h - c_l}, & t > t_s, \end{cases} \quad (\text{III.2.7})$$

где $c'_h = 13$, $c'_l = 0.75$, $c_h = 31.25$ мг/л, а $c_l = 3.9$ мг/л – параметры масштабирования, $t_s = 250$ с.

Численный расчет уравнений модели (III.2.1)–(III.2.5) проводился в среде Matlab с использованием численной схемы интегрирования Дорманда-Принса с переменным шагом интегрирования. Значения параметров модели подбирались на основе наборов экспериментальных данных (CL-кривых), соответствующих “контрольным кривым” и “кривым диабета 2 типа” при 5.5 и 22 ммоль/л *D*-глюкозы (Таблица III.2.1). Начальные условия численного решения уравнений модели (III.2.1)–(III.2.3), (III.2.5) были: $N_{0,in} = 20$, $N_{1,in} = 0$, $r_{in} = 0$, $N_{A,in} = 0$, соответственно.

Таблица III.2.1. Значения параметров уравнений модели (III.2.1)–(III.2.5).

Параметр	Значение				Ед. измер.
	5.5 ммоль/л <i>D</i> -глюкозы		22 ммоль/л <i>D</i> -глюкозы		
	Контроль	Диабет 2 типа	Контроль	Диабет 2 типа	
k_{01}	1.125×10^{-4}	$1.250 \times 10^{-4} \uparrow$	$1.250 \times 10^{-4} \uparrow$	$1.575 \times 10^{-4} \uparrow\uparrow$	c^{-1}
k_{10}	1.125×10^{-5}	$1.250 \times 10^{-5} \uparrow$	$1.250 \times 10^{-5} \uparrow$	$1.575 \times 10^{-5} \uparrow\uparrow$	c^{-1}
$\tilde{k}_{10} = \frac{k_{10}}{k_{01}}$	1.0×10^{-1}	1.0×10^{-1}	1.0×10^{-1}	1.0×10^{-1}	
k_{1A}	1.2×10^{-2}	1.2×10^{-2}	$5.0 \times 10^{-3} \downarrow$	$1.0 \times 10^{-2} \uparrow\downarrow$	c^{-1}
k_{A1}	7.2×10^{-3}	$7.2 \times 10^{-5} \downarrow$	$1.5 \times 10^{-3} \downarrow$	$6.0 \times 10^{-5} \downarrow\downarrow$	c^{-1}
$\tilde{k}_{A1} = \frac{k_{A1}}{k_{1A}}$	6.0×10^{-1}	$6.0 \times 10^{-3} \downarrow$	$3.0 \times 10^{-1} \downarrow$	$6.0 \times 10^{-3} \downarrow$	

γ_r	1.71×10^{-3}	$1.54 \times 10^{-3} \downarrow$	$2.057 \times 10^{-3} \uparrow$	$1.54 \times 10^{-3} \downarrow$	c^{-1}
α_r	1.0	1.0	1.0	1.0	
k_S	4.0	4.0	4.0	4.0	
α_S	5.0×10^1	$3.0 \downarrow$	$3.0 \times 10^1 \Downarrow$	$3.0 \downarrow$	
r_{th}	7.0×10^{-2}	7.0×10^{-2}	7.0×10^{-2}	7.0×10^{-2}	
k_{AD}	2.220×10^{-3}	$1.221 \times 10^{-3} \downarrow$	2.220×10^{-3}	$1.0952 \times 10^{-3} \Downarrow\Downarrow$	c^{-1}

Тонкие стрелки указывают на различия между группами при одинаковой концентрации глюкозы; широкие стрелки указывают на различия между значениями параметров при различных концентрациях глюкозы в одной группе. Стрелки вверх и вниз указывают на увеличение или уменьшение параметра соответственно.

III.2.2 Результаты моделирования фагоцитарного ответа нейтрофилов

Для уточнения специфических регуляторных механизмов активации NADPH-оксидазы была использована разработанная новая математическая модель, описывающая зависимость от фагоцитоза продукцию супероксида нейтрофилами в периферической крови человека. Экспериментальные и модельные CL-кривые сравнивались при двух концентрациях глюкозы (Рисунок III.2.2). Как показал коэффициент детерминации $R^2 = 1$ модель хорошо описывала экспериментальные кривые (Рисунок III.1.11).

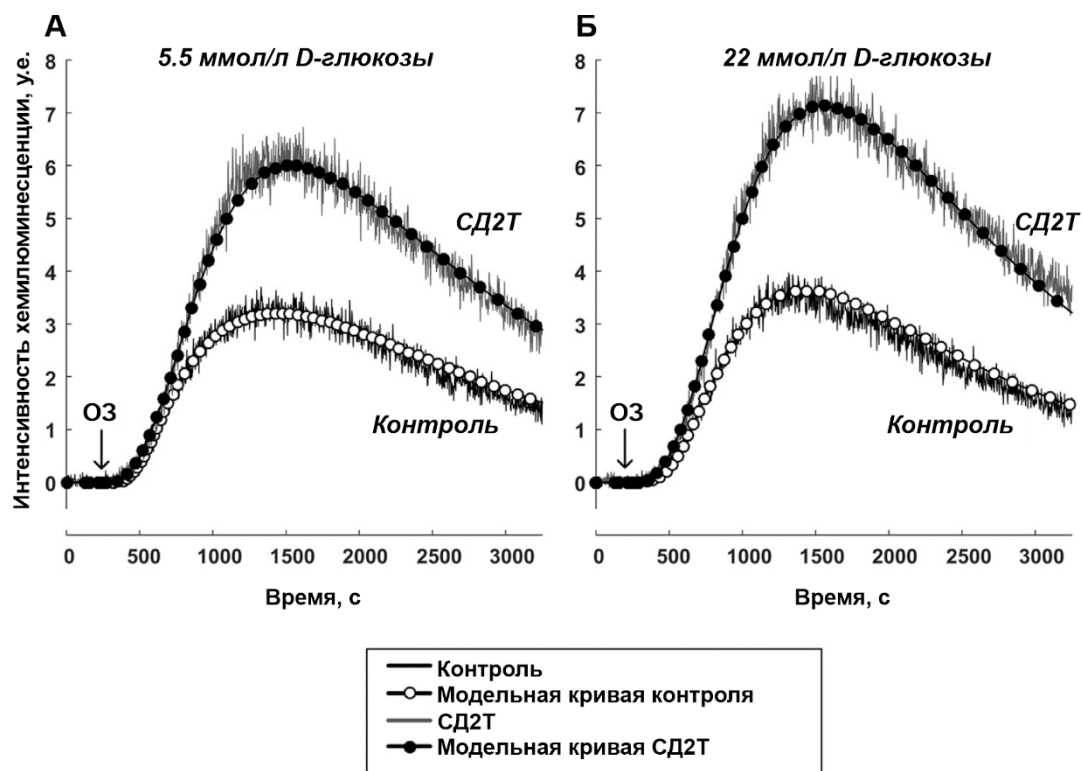


Рисунок III.2. Экспериментальные и модельные кинетические кривые реакций на опсонизированный зимозан (O3) в образцах крови. (А) 5.5 ммоль/л D-глюкозы. (Б) 22 ммоль/л D-глюкозы. Для регистрации экспериментальных кривых использовались образцы крови пациента (СД2Т) и здорового человека (контроль) (Tikhonova, et al. 2020). Стрелки указывают на добавление 15.6 мг/л O3.

Параметры k_{01} и k_{10} были выше у пациентов по сравнению с контролем, а их отношение $\tilde{k}_{10} = k_{10}/k_{01}$ было одинаковым в обеих группах для концентраций D-глюкозы 5.5 и 22 ммоль/л (Таблица III.2.1). Это указывает на высокую способность нейтрофилов к фагоцитозу у пациентов. Эти измененные параметры вместе с более низкими k_{AD} у пациентов приводили к более высокой амплитуде ответов. При высоком уровне глюкозы k_{01} и k_{10} увеличивались, их соотношение не менялось в обеих группах, а k_{AD} был неизменным в контроле и снижался у пациентов. Это согласуется с экспериментами: в обеих группах амплитуда была несколько выше при 22, чем 5.5 ммоль/л D-глюкозы (Таблица III.2.1).

Повышенная способность к фагоцитозу и снижение скорости инактивации клеток объясняют, почему амплитуда оказалась наиболее значимым предиктором при обеих концентрациях глюкозы (Tikhonova, et al. 2020).

Параметр k_{1A} , характеризующий способность клеток продуцировать супероксид, был одинаковым в контроле и у пациентов при 5.5 ммоль/л *D*-глюкозы (Таблица III.2.1), k_{A1} был ниже у пациентов, указывая на более высокую стабильность NADPH-оксидазы. Это привело к более высокой продукции супероксида у пациентов по сравнению с контролем. Отношение $\tilde{k}_{A1} = k_{A1}/k_{1A}$, обратно связанное с количеством супероксида, было ниже для 22, чем для 5.5 ммоль/л *D*-глюкозы в контроле. У пациентов это отношение было ниже, чем в контроле, и одинаковым при обеих концентрациях глюкозы (Таблица III.2.1). Возможно, хроническая гипергликемия значительно изменила регуляцию NADPH-оксидазы, поэтому острая гипергликемия не имела эффекта. Процессы, определяющие способность нейтрофилов продуцировать супероксид и стабильность NADPH-оксидазы, влияют в основном на скорость реакции, а не на амплитуду.

Скорость сборки NADPH-оксидазы γ_r была ниже у пациентов по сравнению с контролем при 5.5 ммоль/л *D*-глюкозы (Таблица III.2.1). Таким образом, в модели лаг-период увеличился у пациентов, что согласуется с экспериментом (Tikhonova, et al. 2020). Параметр α_s , определяющий синхронизацию сборки NADPH-оксидазы, был низким у пациентов при 5.5 ммоль/л *D*-глюкозы. Это могло влиять на скорость ответов. При высоком уровне глюкозы γ_r увеличивалась в контроле и оставалась неизменной у пациентов, что указывало на уменьшение лаг-периода в контроле. Параметр α_s уменьшался в контроле и не изменялся у пациентов. Таким образом, снижение синхронизации в сочетании с повышенной способностью к фагоцитозу в контроле объясняет, почему в дополнение к амплитуде, скорость ответа также является наиболее значимым предиктором при высоком уровне глюкозы (Tikhonova, et al. 2020).

Построенная математическая модель фагоцитоззависимой продукции супероксида в крови объясняет специфические механизмы динамической регуляции активации NADPH-оксидазы при сахарном диабете 2 типа. Ранние модели не рассматривали такие параметры, как скорость, пороговая функция и синхронизация, описывающие сборку NADPH-оксидазы (Chaudhury, et al. 2016; McDaniel, et al. 2019; Smith, et al. 2011; Pereira, et al. 2016). Можно предположить, что NADPH-оксидазные комплексы начинают собираться в разное время и с разной скоростью, что может быть связано с наклоном сигмоидной функции (α_s), описывающей пороговую функцию активации NADPH-оксидазы. Когда степень готовности фермента к активации была близка к пороговому значению, параметр α_s определял, будет ли переход из II в III состояние (Рисунок III.2.1) происходить внезапно или постепенно, что соответствует высокому или низкому значению α_s , или синхронной или асинхронной сборке/активации NADPH-оксидазы.

Описание экспериментальных CL-кривых с помощью модели прояснила связь кинетических параметров со стадиями фагоцитоза в крови и причинами изменения кинетики кривых при сахарном диабете (Рисунок III.2.1). Увеличение амплитуды ОЗ-ответа у пациентов было связано с повышением параметров, определяющих способность к фагоцитозу, снижением смертности фагоцитов и/или нарушением антиоксидантных систем (Таблица III.2.1). Кроме того, увеличение амплитуды сопровождалось увеличением скорости ответов. Таким образом, повышение фагоцитарной способности приводило еще и к увеличению скорости ответных реакций при диабете. Острая гипергликемия изменяла синхронизацию и выработку супероксида в контроле таким же образом, как и хроническая при диабете (Таблица III.2.1). Это объясняло почему скорость ответов является значимым предиктором (Tikhonova, et al. 2020), который, как и амплитуда ответов, является наиболее чувствительным и специфичным параметром кинетики респираторного взрыва нейтрофилов, позволяющим отличать пациентов от здоровых испытуемых. Баланс между снижением

синхронизации и увеличением выработки супероксида смещался в сторону снижения синхронизации в контроле при высоком уровне глюкозы, в то время как при диабете он сразу был смещен в сторону увеличения выработки супероксида. Скорость сборки NADPH-оксидазы также была важна для кинетики CL-кривой – ее снижение приводило к увеличению лаг-периода. С помощью модели была показана более низкая скорость сборки NADPH-оксидазы у пациентов по сравнению с контролем при обеих концентрациях *D*-глюкозы. Это согласуется с увеличением лаг-периода у пациентов, показанного экспериментально (Tikhonova, et al. 2020).

Таким образом, математическая модель фагоцитарного ответа нейтрофилов на микробную провокацию позволила выявить скрытые механизмы динамической регуляции фагоцитоза и связать изменение кинетических параметров респираторного взрыва нейтрофилов с нарушениями молекулярного механизма выработки супероксида у больных СД2Т.

Еще одним из многочисленных классов мембранных белков, имеющих меньшую структурно-функциональную сложность, но не меньшую важность и большую распространенность, являются ионные каналы. Они широко представлены и присутствуют во всех типах клеток различных организмов, включая человека. Понимание динамических свойств управления ионным током через клеточную мембрану позволит расширить представление о регуляторных механизмах на более высоких уровнях сложности строения живой материи от клеток и клеточных систем до органов и систем органов. В следующем разделе будет рассмотрена функциональная особенность ионного канала, связанная с немарковской кинетикой ионного тока через канал, и механизм ее формирования, связанный с динамикой воротных частиц.

III.3 Моделирование одиночного ионного канала в биологических мембранах клетки

Биологические мембраны клетки содержат различные белковые макромолекулы (мембранные белки), необходимые для нормального функционирования и жизнедеятельности живых клеток и клеточных органелл. Среди мембранных белков, ионные каналы играют особую роль. Они обеспечивают пассивный избирательный транспорт ионов через биологическую мембрану, что необходимо для внутриклеточной и межклеточной сигнализации и электрогенеза в возбудимых тканях. Моделирование одиночных ионных каналов важно в аспекте связи их функций и структурно-динамических свойств. Проводимость ионных каналов обуславливает формирование ионного тока, кинетика которого имеет сложную форму. Ионный ток через одиночный ионный канал состоит из импульсов одинаковой амплитуды, но различной длительности. Время, когда ток течет через канал, соответствует открытому состоянию канала. Время, когда ток не течет через канал, соответствует закрытому состоянию канала. Переключение между состояниями проводимости – открытым и закрытым – определяет время жизни канала в соответствующих состояниях. Само переключение обусловлено связыванием лиганда, значением электрического трансмембранного потенциала и спонтанными флуктуациями.

Известно, что времена жизни канала в последовательностях закрытых $\{\tau_c\}$ и открытых $\{\tau_o\}$ состояниях связаны между собой. Эта связь характеризуется показателем Херста. Показано, что показатель Херста зависит от электрического трансмембранного потенциала. Механизм этого явления остается не ясным. В диссертации представлена модель, позволяющая описать и выявить возможный механизм, лежащий в основе этого явления.

III.3.1 Базовая модель и ее модификации

III.3.1.1 Базовая модель

Модель построена на базе простой схемы одиночного ионного канала (Рисунок III.3.1). Схема основана на рентгеноструктурных данных бактериального K^+ -канала (KcsA-канала). В схеме подвижные части трансмембранных сегментов TM2 – воротные частицы – моделировались жесткими стержнями.

Динамика этих стержней описывалась конформационной переменной $\varphi(t)$, соответствующей углу отклонения воротных частиц во время открывания/закрывания канала. Зависимость угла φ от времени моделировалась уравнением Ланжевена, которое в безразмерном случае имеет вид:

$$\frac{d^2\varphi(\tau)}{d\tau^2} = -\frac{d\varphi(\tau)}{d\tau} - \frac{E_g}{\tilde{\gamma}^2 I_g} \frac{d}{d\varphi} \tilde{U}(\varphi(\tau), W(\tau), \psi(\tau), V_m) + \sqrt{\frac{3kT}{2\tilde{\gamma}^3 I_g}} \zeta(\tau). \quad (\text{III.3.1})$$

Здесь $\tau = \tilde{\gamma}t$ – безразмерное время, $\tilde{\gamma} = \frac{\gamma}{3I_g}$ – приведенный коэффициент трения, γ – коэффициент трения, $I_g = ML^2/3$, M , L – момент инерции, масса и длина воротной частицы, соответственно, V_m – электрический трансмембранный потенциал, k – постоянная Больцмана, T – абсолютная температура, $\zeta(t)$ – функция, описывающая случайный процесс с нулевым средним и единичной дисперсией, $\tilde{U} = \frac{U}{E_g}$ – безразмерная потенциальная функция, U – размерная потенциальная функция, E_g – максимальная величина энергетического барьера между открытым и закрытым положением воротных частиц, соответствующих открытому и закрытому состояниям канала.

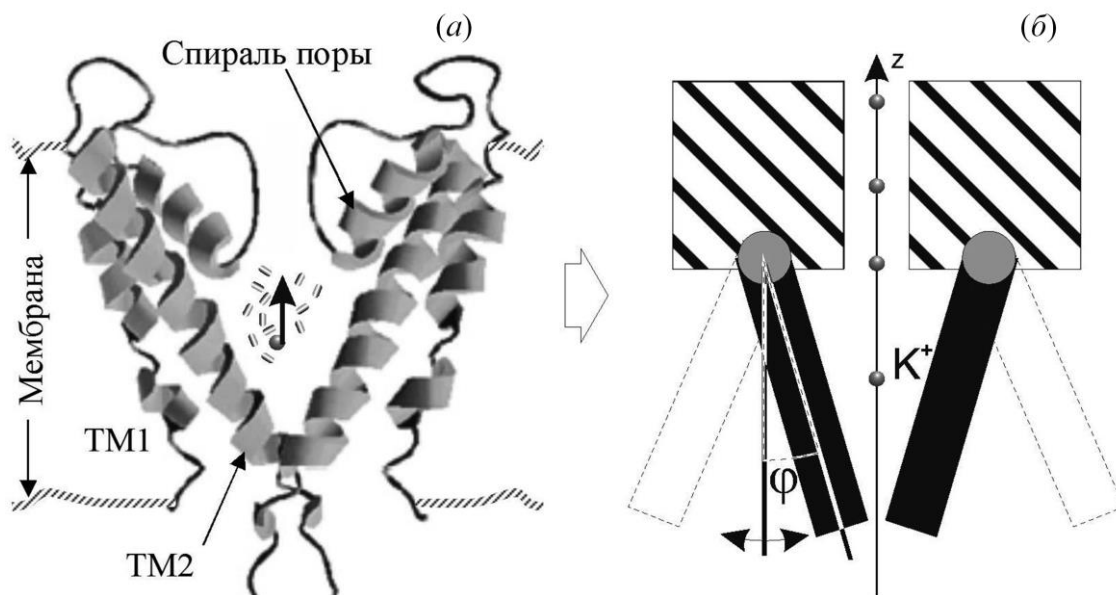


Рисунок III.3.1. (а) – KcsA-канал (вид сбоку). Маленькие серые шарики – ионы K^+ , маленькие черно-белые цилиндры внутри поры – молекулы воды, черная стрелка показывает направление движения ионов. (б) – схема модельного ионного канала, построенного на основе структуры KcsA-канала. φ – угол отклонения подвижных частей трансмембранных сегментов TM2 канального белка при его открывании и закрывании.

Безразмерная потенциальная функция \tilde{U} имеет вид:

$$\tilde{U}(\varphi, W, \psi, V_m) = A(W, \psi, V_m) \left(\frac{(\tilde{L} \sin(\varphi))^4}{4} - B(W, \psi, V_m) \frac{(\tilde{L} \sin(\varphi))^3}{3} - \frac{(\tilde{L} \sin(\varphi))^2}{2} + B(W, \psi, V_m) \tilde{L} \sin(\varphi) \right). \quad (\text{III.3.2})$$

Здесь $\tilde{L} = \frac{L}{D_{\max}/4}$, D_{\max} – максимальный диаметр поры канала в открытом состоянии. Функции $A(W, \psi, V_m)$ и $B(W, \psi, V_m)$ выражаются через глубины потенциальных ям закрытого $E_c(W, \psi, V_m)$ и открытого $E_o(\psi, V_m)$ состояний канала (Рисунок III.3.2) следующим образом:

$$A(W, \psi, V_m) = \frac{E_c(W, \psi, V_m)}{(4+B(W, \psi, V_m))^3(12-B(W, \psi, V_m))}$$

$$B(W, \psi, V_m) = \begin{cases} -4 \frac{E_c(W, \psi, V_m) - E_o(\psi, V_m)}{|E_c(W, \psi, V_m) - E_o(\psi, V_m)|} (\alpha(W, \psi, V_m) - \beta(W, \psi, V_m)), & \text{при } E_c \neq E_o, \\ 0 & \text{при } E_c = E_o, \end{cases}$$

$$\alpha(W, \psi, V_m) = \sqrt{1 + \left(4 \frac{E_c(W, \psi, V_m) E_o(\psi, V_m)}{(E_c(W, \psi, V_m) - E_o(\psi, V_m))^2}\right)^{\frac{1}{3}}},$$

$$\beta(W, \psi, V_m) = \sqrt{2 + \frac{2(E_c(W, \psi, V_m) + E_o(\psi, V_m))}{\alpha(W, \psi, V_m) |E_c(W, \psi, V_m) - E_o(\psi, V_m)|} - \left(4 \frac{E_c(W, \psi, V_m) E_o(\psi, V_m)}{(E_c(W, \psi, V_m) - E_o(\psi, V_m))^2}\right)^{\frac{1}{3}}}.$$

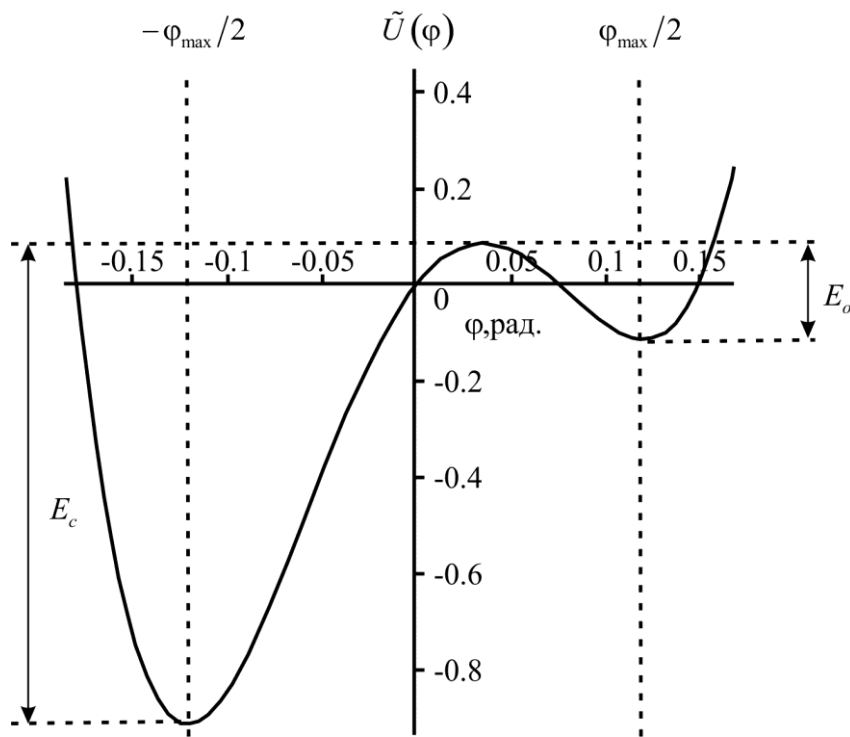


Рисунок III.3.2. Профиль безразмерного потенциала, определяющего конформационные переходы канала во время воротного процесса. Здесь φ_{max} – угол отклонения подвижной части сегмента ТМ2 от оси симметрии одной субъединицы при максимально открытой поре, E_c и E_o – величины глубин потенциальных ям закрытого и открытого состояний канала соответственно.

Глубины потенциальных ям $E_c(W, \psi, V_m)$ и $E_o(\psi, V_m)$ являются безразмерными величинами и изменяются от 0 до 1. Они определяют форму

профиля конформационной энергии в области ворот, который, в свою очередь, определяет динамику воротных частиц и их переходы между положениями, соответствующими закрытому и открытому состояниям канала. Выражения для $E_c(W, \psi, V_m)$ и $E_o(\psi, V_m)$ имеют вид:

$$\begin{aligned} E_c(W, \psi, V_m) &= \frac{1}{1+e^{a_c(V_m-V_c)}} \frac{1}{2} (1 + \varepsilon_W W(\tau) + \varepsilon_\psi \psi(\tau)) \\ E_o(\psi, V_m) &= \frac{1}{1+e^{-a_o(V_m-V_o)}} \frac{1}{2} (1 - \varepsilon_\psi \psi(\tau)) \end{aligned} \quad (\text{III.3.3})$$

Здесь учитывается зависимость от электрического трансмембранного потенциала V_m , которая носит сигмоидный характер с параметрами a_c, V_c, a_o, V_o . Кроме того, учитывается влияние гидрофобного W фактора, определяемого взаимодействием гидрофобной выстилки поры канала с молекулами воды, и инерционного ψ фактора, описывающего медленные, по сравнению с переходами канала между состояниями проводимости, и низкоамплитудные, по сравнению с конформационной динамикой воротных частиц, конформационные изменения канала во время воротного процесса.

Изменение во времени гидрофобного фактора определяется уравнением:

$$\frac{d}{d\tau} W(\tau) = \frac{\alpha_W}{\tilde{\gamma}} (g_W(\varphi) + \beta_W(1 - g_W(\varphi))) (-W(\tau) - 2g_W(\varphi) + 1), \quad (\text{III.3.4})$$

где проводимость поры канала для молекул воды имеет вид: $g_W(\varphi) = \frac{1}{1+e^{-\tilde{\mu}_W \tilde{L}(\sin(\varphi) - \sin(\varphi_W))}}$. Здесь $\tilde{\mu}_W$ – параметр, определяющий наклон сигмоиды к оси абсцисс, φ_W – пороговое значение угла, при превышении которого через воротную часть канала могут проходить молекулы воды. При этом подразумевается, что коэффициенты α_W и β_W являются константами. Уравнение описывает изменение энергии гидрофобных взаимодействий, которая изменяет конформационный энергетический профиль канала в закрытом состоянии, когда происходит вытеснение молекул воды из гидрофобной поры канала и последующее гидрофобное «слипание» воротных частиц.

Изменение во времени инерционного фактора определяется уравнением:

$$\frac{d}{d\tau} \psi(\tau) = -\frac{\alpha_\psi}{\tilde{\gamma}} (\psi(\tau) + \tilde{L} \sin(\varphi)), \quad (\text{III.3.5})$$

где α_ψ константа.

III.3.1.2 Модель, учитывающая зависимость фактора инерционности от V_m .

Ранее было показано, что корреляционные соотношения в последовательностях закрытых и открытых времен жизни канала во многом определяются скоростью изменения инерционного фактора α_ψ [Гриневич и др., 2007]. Таким образом, можно предположить, что модификация базовой модели, учитывающая зависимость α_ψ от V_m , позволит описать зависимость корреляционных соотношений от V_m . Для этого, на основе базовой модели, подбирались реперные значения параметра α_ψ для различных значений V_m так, чтобы значения показателя Херста H_2 приблизительно соответствовали экспериментальным значениям H_2 для K_v канала, взятым из работы [Казаченко и др., 2004]. Затем проводился регрессионный анализ полученных реперных значений с помощью следующей зависимости:

$$\alpha_\psi(V_m) = \alpha_{\psi,1}e^{-b_{\psi,1}V_m} + \alpha_{\psi,2}e^{b_{\psi,2}V_m}. \quad (\text{III.3.6})$$

Параметры $\alpha_{\psi,1}$, $b_{\psi,1}$, $\alpha_{\psi,2}$, $b_{\psi,2}$, полученные при помощи регрессионного анализа представлены в таблице III.3.1. Коэффициент детерминации регрессии $R^2 = 0.98$.

Таблица III.3.1. Коэффициенты формулы (III.3.6).

$\alpha_{\psi,1}, \text{c}^{-1}$	$b_{\psi,1}, \text{мВ}^{-1}$	$\alpha_{\psi,2}, \text{c}^{-1}$	$b_{\psi,2}, \text{мВ}^{-1}$
2.6056	0.1833	0.1989	0.3873

III.3.1.3 Модель, учитывающая зависимость гидрофобного фактора от V_m .

Кроме вышеописанной модификации, зависимость корреляционных соотношений от V_m можно учесть, введя в базовую модель зависимость относительной скорости вытеснения молекул воды β_w из гидрофобной поры канала в закрытом состоянии от V_m . Основанием для этого является то, что

кинетика ионного тока через модельный канал существенно зависит от параметра β_W , в частности, он обуславливает формирование пачечной активности. Для выбора зависимости β_W от V_m был использован подход аналогичный вышеописанному случаю, только в качестве функции регрессии выбиралась 4-х параметрическая сигмоида:

$$\beta_W(V_m) = \beta_{W,\min} + \frac{\beta_{W,\max}}{1 + e^{-(V_m - V_{0,W})/b_W}}. \quad (\text{III.3.7})$$

Параметры $\beta_{W,\min}$, $\beta_{W,\max}$, $V_{0,W}$, b_W , полученные при помощи регрессионного анализа представлены в таблице III.3.2. Коэффициент детерминации регрессии $R^2 = 0.995$.

Таблица III.3.2. Коэффициенты формулы (III.3.7).

$\beta_{W,\min}$	$\beta_{W,\max}$	$V_{0,W}$, мВ	b_W , мВ
0.089	0.9178	7.8861	6.8907

III.3.2 Анализ модели и методы численного решения уравнений

Анализ модели проводился аналогично анализу экспериментальных данных, где основной исследуемой характеристикой является ионный ток через канал. Ток через модельный канал описывали уравнением, учитывающим наличие фильтра низких частот и шум измерительной установки:

$$\frac{d}{d\tau} I(\tau) = \frac{f}{\tilde{\gamma}} (-I(\tau) + g_i(\varphi(\tau))(V - V_0) + \delta\zeta(\tau)), \quad (\text{III.3.8})$$

где f – частота среза фильтра, $g_i(\varphi) = \frac{g_{\max}}{1 + e^{\tilde{\mu}_i \tilde{L}(\sin(\varphi) - \sin(\varphi_i))}}$ – ионная проводимость поры канала, g_{\max} – максимальная ионная проводимость канала, $\tilde{\mu}_i$ – параметр, определяющий наклон сигмоиды к оси абсцисс, φ_i – пороговое значение угла, превышение которого переводит канал из непроводящего состояния в проводящее, $\delta\zeta(\tau)$ – аддитивный шум установки, V_0 – внутриклеточный потенциал.

Численно решая уравнения, моделирующие динамику воротного механизма одиночного ионного канала с учетом уравнения (III.3.8), получали записи модельного тока, из которых методом полуамплитудного уровня получали кинетические параметры $\{\tau_c\}$ и $\{\tau_o\}$ (Рисунок III.3.3).

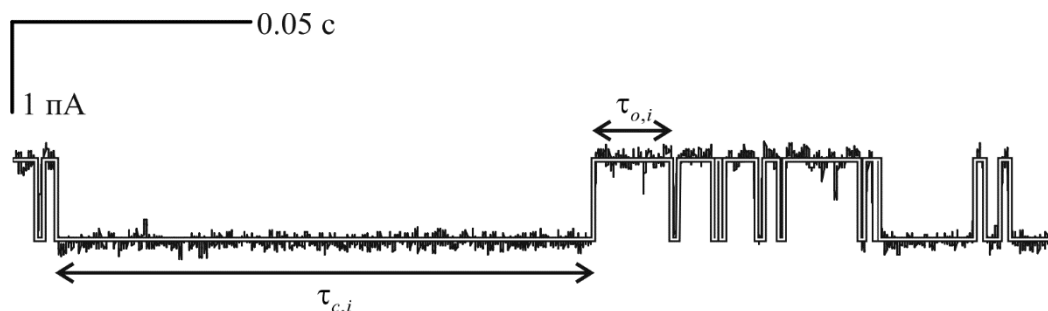


Рисунок III.3.3. Фрагмент записи ионного тока через модельный канал (черная линия) и аппроксимация последовательности импульсов тока методом полуамплитудного уровня (белая линия). $\tau_{c,i}\tau_{o,i}$ – времена жизни канала i -го участка последовательности в закрытом и открытом состоянии, соответственно.

Для анализа кинетических параметров ионного тока через модельный и реальный каналы использовался БФА метод (Peng et al 1994). В результате получали зависимости усредненной вариации от длины отрезков разбиения исследуемых последовательностей времен жизни канала, которые аппроксимировали одной или несколькими прямыми (Рисунок III.3.4). Наклоны прямых определяют искомые показатели Херста.

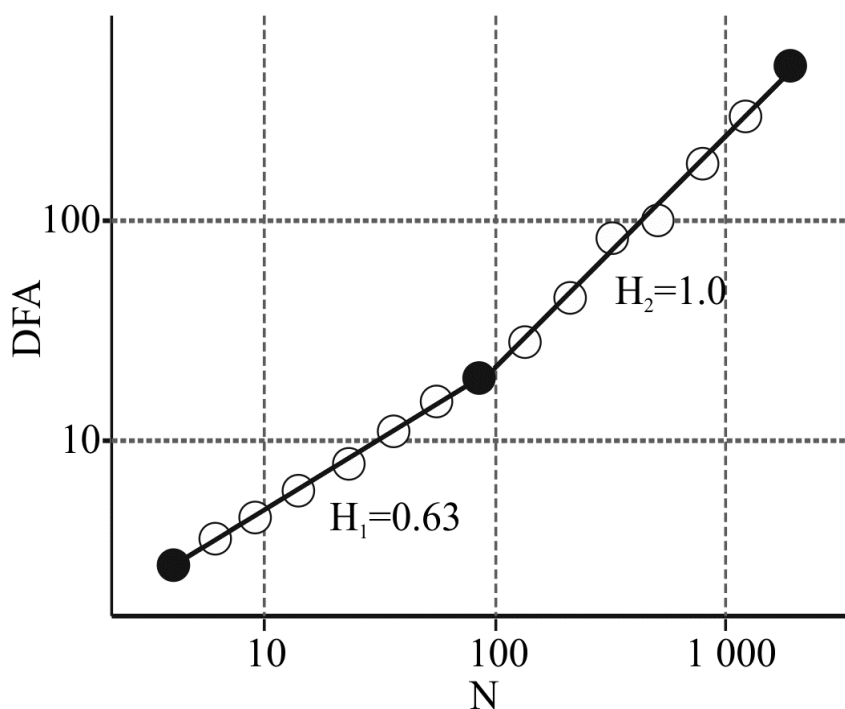


Рисунок Ш.3.4. Показатели Херста, полученные методом БФА. Кружки – результат БФА-анализа кинетических параметров ионного тока через модельный канал, прямые линии – линейная аппроксимация методом наименьших квадратов.

Численные расчеты проводились в среде Matlab с использованием пакета Simulink и численной схемы Рунге-Кутты 4-го порядка с фиксированным шагом интегрирования. Используемые параметры базовой модели приведены в таблице Ш.3.3. Для модифицированной модели, учитывающей зависимость инерционного фактора от V_m , используются такие же параметры, как в таблице Ш.3.3 кроме ε_W и β_W , значения которых приведены в таблице Ш.3.4. Для модифицированной модели, учитывающей зависимость гидрофобного фактора от V_m , используются такие же параметры, как в таблице Ш.3.3 кроме ε_W , ε_ψ , α_W и α_ψ , значения которых приведены в таблице Ш.3.5. Параметры уравнения (Ш.3.8) для тока приведены в таблице Ш.3.6.

Таблица Ш.3.3. Параметры базовой модели.

Параметр	Значение параметра
----------	--------------------

$\tilde{\gamma} = \tilde{\gamma}_{\text{calc}}$	$1 \times 10^6 c^{-1} (1 \times 10^9 c^{-1})$
E_g	$9.28 \times 10^{-28} \text{Дж} (1 \times 10^{-19} \text{Дж})$
M	$3.5 \times 10^{-24} \text{кг}$
L	$2.5 \times 10^{-9} \text{м}$
k	$1.38 \times 10^{-23} \text{Дж} \text{К}^{-1}$
$T = T_{\text{calc}}$	$1 \times 10^{-3} \text{К} (300 \text{К})$
D_{max}	$1.2 \times 10^{-9} \text{м}$
a_c	$1.9 \times 10^{-5} B^{-1}$
V_c	$-1.1 \times 10^{-1} B$
a_o	$1.3 \times 10^{-5} B^{-1}$
V_o	$1.7 \times 10^{-1} B$
ε_W	4×10^{-1}
ε_ψ	5×10^{-2}
α_W	$5 \times 10^2 c^{-1}$
β_W	5.45×10^{-1}
α_ψ	$2c^{-1}$
$\tilde{\mu}_W$	1.36×10^1
φ_W	0

Примечание. В скобках даны не перенормированные значения параметров (см. далее по тексту).

Таблица III.3.4. Параметры модифицированной модели, учитывающей зависимость инерционного фактора от V_m .

Параметр	Значение параметра
ε_W	3×10^{-1}
β_W	5×10^{-1}

Таблица III.3.5. Параметры модифицированной модели, учитывающей зависимость гидрофобного фактора от V_m .

Параметр	Значение параметра
ε_W	3.5×10^{-1}
ε_Ψ	7.5×10^{-2}
α_W	$1 \times 10^3 c^{-1}$
α_Ψ	$8 c^{-1}$

Таблица III.3.6. Параметры уравнения (III.3.8) для тока.

Параметр	Значение параметра
f	$2.5 \times 10^3 Гц$
δ	2
g_{max}	1
$\tilde{\mu}_i$	1.36×10^1
φ_i	0
V	$4 \times 10^{-3} B$
V_0	$-6 \times 10^{-2} B$

Для уменьшения времени счета, проводилась перенормировка значений некоторых основных параметров уравнения (III.3.1), а именно: $\tilde{\gamma}$ и T , согласно следующему алгоритму. Известно, что характерное время релаксации участков полипептидной цепи $t \sim 10^{-9} c$, следовательно $\tilde{\gamma} = \frac{1}{t} \sim 10^9 c^{-1}$. Обычный температурный диапазон, при котором были получены экспериментальные данные, соответствовал: $T = 290 \div 295^\circ K$. Время перехода канала из одного состояния в другое составляет $\sim 10^{-5} c$. В расчетах же $\tilde{\gamma}$ и T были заменены на расчетные параметры, которые были равны соответственно $\tilde{\gamma}_{calc} = 10^6 c^{-1}$ и $T_{calc} = 0.001^\circ K$ так, чтобы время перехода канала из одного состояния в другое не изменилось бы, то есть составляло $\sim 10^{-5} c$. Параметр E_g так же подбирался

таким образом, чтобы выполнялось вышеописанное условие, и чтобы среднее значение закрытых времен $\langle \tau_c \rangle$ и среднее значение открытых времен $\langle \tau_o \rangle$ были $\sim 10^{-3}c$ при вероятности открытого состояния $P_o \approx 0.5$. Таким образом, ускорение расчетов заключается в том, что для расчета 1 с размерного времени в случае не перенормированных параметров необходимо провести вычисления в интервале от 0 до 10^9 у.е. в безразмерном времени, а в случае перенормированных параметров это время сокращается до 10^6 у.е.

Для оценки энергетического барьера были сделаны тестовые расчеты с использованием неперенормированных значений параметров $\tilde{\gamma} = 10^9 c^{-1}$, $T = 300^{\circ}K$. При этом, для корректности расчетов использовалась безразмерная случайная сила $\tilde{\zeta}(\tau) = \zeta(\tau)/\sqrt{\tilde{\gamma}}$. В результате тестовых расчетов, подобранное значение максимального энергетического барьера было $E_g = 10^{-19} Дж$. Если учесть, что расчеты проводились для случая, когда вероятность открытого состояния модельного канала приблизительно была равна 0.5, что в модели соответствует $V_m = 4 мВ$, а $E_c = E_o = 0.1$, то фактическое значение энергетического барьера соответствовало $10^{-20} Дж$. При этом надо отметить, что для тестовых расчетов изменялись только $\tilde{\gamma}, T$ и E_g , все остальные параметры оставались такими же, как в случае с перенормированными $\tilde{\gamma}, T, E_g$.

III.3.3 Результаты и обсуждение численных расчетов и анализа моделируемых характеристик

Результаты расчетов на основе базовой модели и ее модификаций представлены на рисунке III.3.5а,б,в. Экспериментальные данные (Казаченко и др., 2004; Гриневич и Асташев, 2010) по зависимости показателей Херста (H_1, H_2) от величины трансмембранного потенциала V_m показаны на рисунке III.3.5г. Из рисунка III.3.5а,б,в видно, что для модельных данных зависимость показателя Херста H_1 от V_m для всех случаев принимает значения близкие к 0.6, что соответствует экспериментальным значениям (Рисунок III.3.5г) и

говорит о почти случайном характере вортного процесса на малых временах (несколько секунд). Вместе с тем зависимости показателей Херста H_2 от V_m имеют значимые различия для трех моделируемых случаев. При этом наиболее близкое поведение к экспериментальным данным соответствует модифицированной модели, учитывающей зависимость гидрофобного фактора от V_m (Рисунок III.3.5в).

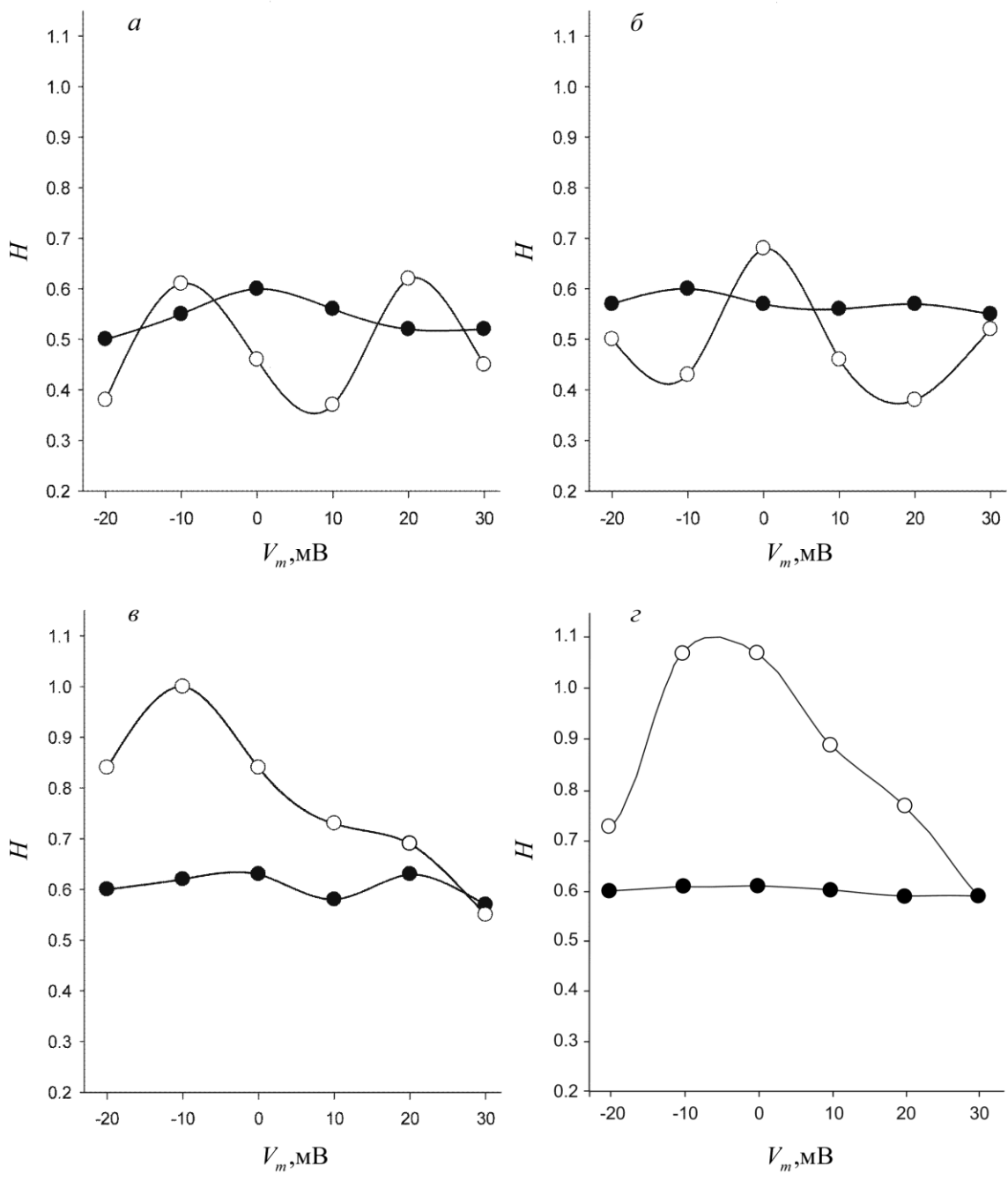


Рисунок III.3.5. Сравнение модельных (а, б, в) и экспериментальных (г) зависимостей показателей Херста от трансмембранного потенциала V_m . Модельные расчеты выполнены на основе (а) – базовой модели с постоянными параметрами, (б) – модели, учитывающей зависимость фактора инерционности от V_m , (в) – модели, учитывающей зависимость гидрофобного фактора от V_m . (г) – экспериментальные данные (Казаченко и др., 2004). Белые кружки – H_2 , черные кружки – H_1 . На всех графиках кружки соответствуют значениям V_m для экспериментальных кривых.

Важную роль гидрофобного фактора в воротном процессе отмечают и другие исследователи. В работе (Jensen et al., 2010) авторы при помощи метода молекулярной динамики исследовали воротный процесс и движение ионов K^+ через селективный фильтр Kv1.2 канала. Они утверждают, что обнаружили новый фундаментальный механизм «гидрофобных ворот», который позволяет коллапсировать открытой поре канала в закрытое состояние при обезвоживании ее внутренней гидрофобной полости.

Известно, что гидрофобные взаимодействия являются следствием изменения свободной энергии системы за счет изменения энтропийной составляющей, поэтому можно предположить, что влияние электрического трансмембранного потенциала на скоррелированность событий открывания или закрывания канала во время воротного процесса осуществляется именно через гидрофобный фактор. Действительно, если посмотреть на модель (ур. III.3.4), то видно, что гидрофобный фактор зависит от скорости (коэффициент β_w) вытеснения молекул воды из закрытой поры канала за счет гидрофобных взаимодействий воды с гидрофобной выстилкой поры. Включение электрического поля приводит к поляризации молекул воды и их ориентации по силовым линиям поля за счет наведенного дипольного момента, что, в свою очередь, снижает энтропию системы и увеличивает ее свободную энергию. Это может приводить к увеличению скорости вытеснения молекул воды из поры

канала в закрытом состоянии, так как системе не выгодно находиться в состоянии с повышенной свободной энергией, и она стремится перейти в состояние с более низкой свободной энергией.

На рисунке III.3.6 показана зависимость β_W от V_m , описываемая ур. (III.3.7). Видно, что эта зависимость носит сигмоидальный характер. Изменение V_m от отрицательных значений к положительным ведет к увеличению скорости выхода молекул воды из гидрофобной полости канала, что согласуется с данными работы (Jensen et al., 2010). В ней авторы, при помощи метода молекулярной динамики, показали, что при отрицательных значениях трансмембранного электрического потенциала обезвоживание поры Kv1.2-канала происходит за несколько микросекунд, в то время как при значениях $V_m = 0$ мВ и выше, это время сокращается до десятков наносекунд.

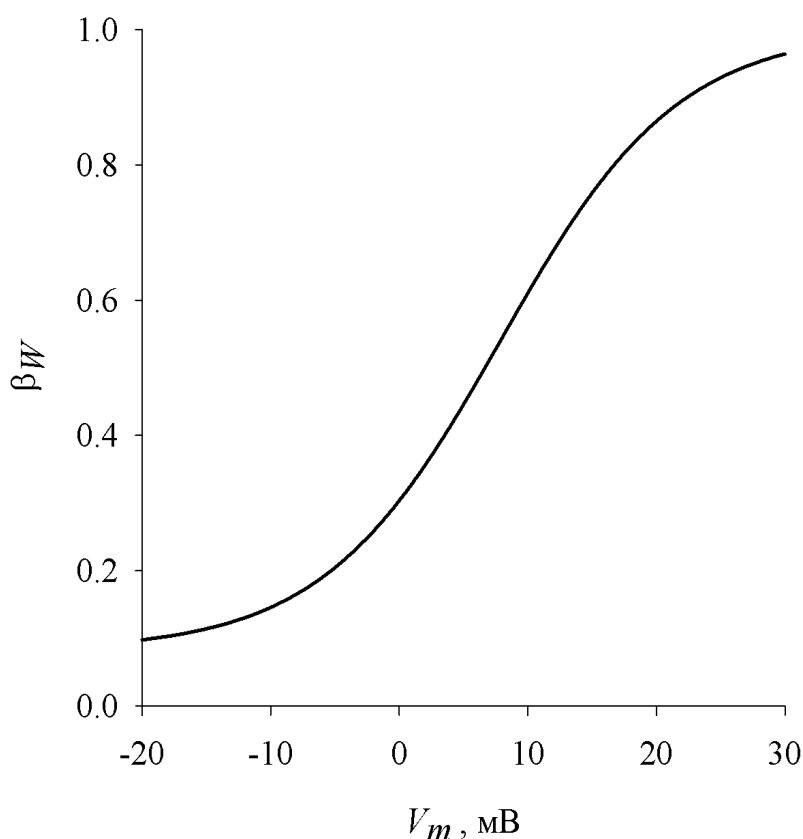


Рисунок III.3.6. Зависимость относительной скорости β_W (ур. III.3.4, III.3.7) вытеснения молекул воды из гидрофобной поры канала в закрытом состоянии от трансмембранного электрического потенциала V_m .

В рамках представленной модифицированной модели, учитывающей зависимость гидрофобного фактора от V_m , удалось показать связь между интегральной характеристикой кинетики ионного тока через одиночный ионный канал – показателем Херста и внутримолекулярным свойством канала – гидрофобностью ионной поры. Ранее, с помощью базовой модели, была показана связь между гидрофобностью ионной поры и полиэкспоненциальностью распределений последовательностей $\{\tau_o\}$ и $\{\tau_c\}$ (Гриневич и др., 2007). С помощью модифицированной модели удалось показать, что зависимость гидрофобного фактора от V_m может определять зависимость корреляционных соотношений в активности ионного канала от V_m .

Заметим, однако, что представленные результаты были получены при целом ряде ограничений. Во-первых, ионный канал представляет собой сложный глико-протеиновый комплекс, который имеет модульную структуру. Эта структура включает в себя селективный фильтр, сенсоры электрического потенциала, воротный механизм и цитоплазматическую часть. Однако при моделировании использовалась упрощенная структура канала и рассматривался только воротный механизм, так как он напрямую участвует в динамической регуляции ионного тока через пору канала.

Работа воротного механизма моделировалась на основе рентгеноструктурных данных KcsA-канала, состоящего из 4-х субъединиц. При этом подвижные части (воротные частицы) трансмембранных сегментов каждой субъединицы рассматривались как жесткие стержни, то есть их внутренние деформации не учитывались. Для упрощения расчетов предполагалось, что воротные частицы движутся синхронно и симметрично в радиальных направлениях от центральной оси поры канала. В результате, это позволило рассматривать динамику только одной воротной частицы. Более того, при описании динамики воротной частицы учитывалась только одна степень свободы.

Известно, что переход канала в открытое состояние, когда проникающие ионы свободно двигаются через пору канала, определяется пороговым значением угла отклонения воротных частиц от центральной оси поры. В модели это значение выбиралось как половина максимального угла отклонения воротных частиц от центральной оси поры канала (приблизительно 6.8 градусов).

Следует отметить, что все приведенные выше ограничения не являются принципиальными и снятие этих ограничений существенно не изменит полученные результаты.

Таким образом, с помощью физической мезоскопической модели воротного механизма одиночного ионного канала показано, что корреляционные соотношения в последовательностях событий открывания ионного канала зависят от электрического трансмембранного потенциала и эта зависимость определяется гидрофобным фактором, что говорит о важности гидрофобных взаимодействий в воротном процессе и в динамической регуляции ионной проводимости биологических мембран.

Ионная проводимость биологических мембран играет одну из ключевых ролей в функциональных ответах живых клеток на различные стимулы и в процессах межклеточной коммуникации. Вместе с тем, базовые механизмы регуляции функционирования живых организмов определяются молекулой ДНК, представляющей еще более простой уровень структурно-функциональной организации живой материи. Действительно, экспрессия генов мембранных белков, как и всех белков в клетке, регулируется функциональной активностью этой молекулы. В связи с чем важно понимать связь между динамикой азотистых оснований в ДНК, определяющих конформационную подвижность открытых состояний вдоль молекулы, и функциональной значимостью последовательности оснований (промоторы, терминаторы, кодирующие области).

III.4 Моделирование конформационной динамики ДНК

Моделирование внутренней динамики структурных элементов ДНК (оснований, сахаров, фосфатов и фрагментов полинуклеотидных цепочек) является важным в понимании того, какую роль динамические свойства молекулы играют в реализации ее базовых функций. Понимание этой роли невозможно без учета неоднородной структуры молекулы. В данном разделе будет представлена неоднородная модель и ее применение для выявления связи между динамическими и функциональными свойствами ДНК.

III.4.1 Уравнение Синус-Гордона для неоднородной ДНК, состоящей из двух неодинаковых однородных последовательностей, разделенных границей

Угловые отклонения оснований от положения равновесия являются энергетически наименее затратными в молекуле ДНК (Yakushevich, 2006; Giudice et al., 2003). Будем описывать только их, пренебрегая остальными степенями свободы. Будем рассматривать плоскую молекулу ДНК без учета спирализации. Используем приближение, в котором одна из двух цепочек ДНК рассматривается как среднее поле. Тогда динамику угловых отклонений оснований в молекуле ДНК можно описывать независимо для каждой из цепочек. В этом случае, в качестве физического аналога удобно использовать цепочку связанных маятников или осцилляторов (Рисунок III.4.1), покоящихся или колеблющихся в гравитационном поле Земли. Тогда упругая нить подвеса, с которой жестко связаны маятники, будет соответствовать сахаро-фосфатному остову рассматриваемой цепочки в ДНК, сами маятники будут соответствовать основаниям, а гравитационное поле Земли будет соответствовать среднему потенциальному полю комплементарной цепочки в ДНК. В результате, динамика угловых отклонений маятников от положения равновесия будет соответствовать динамике угловых отклонений оснований в молекуле ДНК.

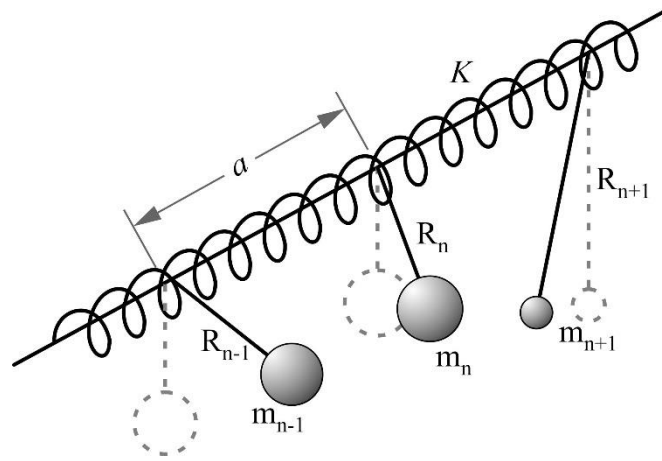


Рисунок Ш.4.1. Цепочка связанных маятников. a – расстояние между соседними маятниками, K – коэффициент упругости линии подвеса, R_n и m_n – радиус и масса маятника n , соответственно.

Ш.4.1.1 Уравнение модели в однородном случае

В однородном случае, где молекула ДНК состоит из оснований одного типа, уравнение модели будем строить на примере модели Ингландера (Englander et. al., 1980). Уравнение, описывающее угловые отклонения $\phi(z, t)$ оснований в модели Ингландера, представляет собой, в континуальном приближении, дифференциальное уравнение в частных производных параболического типа:

$$I \frac{\partial^2 \phi(z, t)}{\partial t^2} - K'a^2 \frac{\partial^2 \phi(z, t)}{\partial z^2} + V \sin(\phi(z, t)) = 0. \quad (\text{Ш.4.1})$$

Здесь z – координата, определяющая положение основания в последовательности, I – момент инерции основания, V – эффективный потенциал взаимодействия с комплементарной цепочкой, $K' = KR^2$ – крутильная жесткость сахаро-фосфатного остова (K – жесткость сахаро-фосфатного остова), R – расстояние от сахаро-фосфатного остова до центра масс основания (радиус основания), a – расстояние между соседними основаниями.

Уравнение Ш.4.1) представляет собой уравнение Синус-Гордона (СГ). Известно, что в приближении бегущей волны, двигающейся со скоростью v , это

уравнение имеет односолитонное решение в виде кинка (+) или антикинка (-) (Буллаф, Кодри, 1983):

$$\phi(z, t) = 4 \operatorname{arctg} \left\{ \exp \left[\pm \frac{\gamma}{d} (z - vt - z_0) \right] \right\}, \quad (\text{III.4.2})$$

где $\gamma = 1/\sqrt{1 - v^2/c_0^2}$, c_0 – скорость звука для ДНК, d – полуширина кинка/антикинка, z_0 – сдвиг относительно начала координат, который полагался равным нулю ($z_0 = 0$) для упрощения описания. Кинк принято рассматривать как математический образ открытого состояния в молекуле ДНК (Рисунок III.4.2) (Yakushevich, 2006).

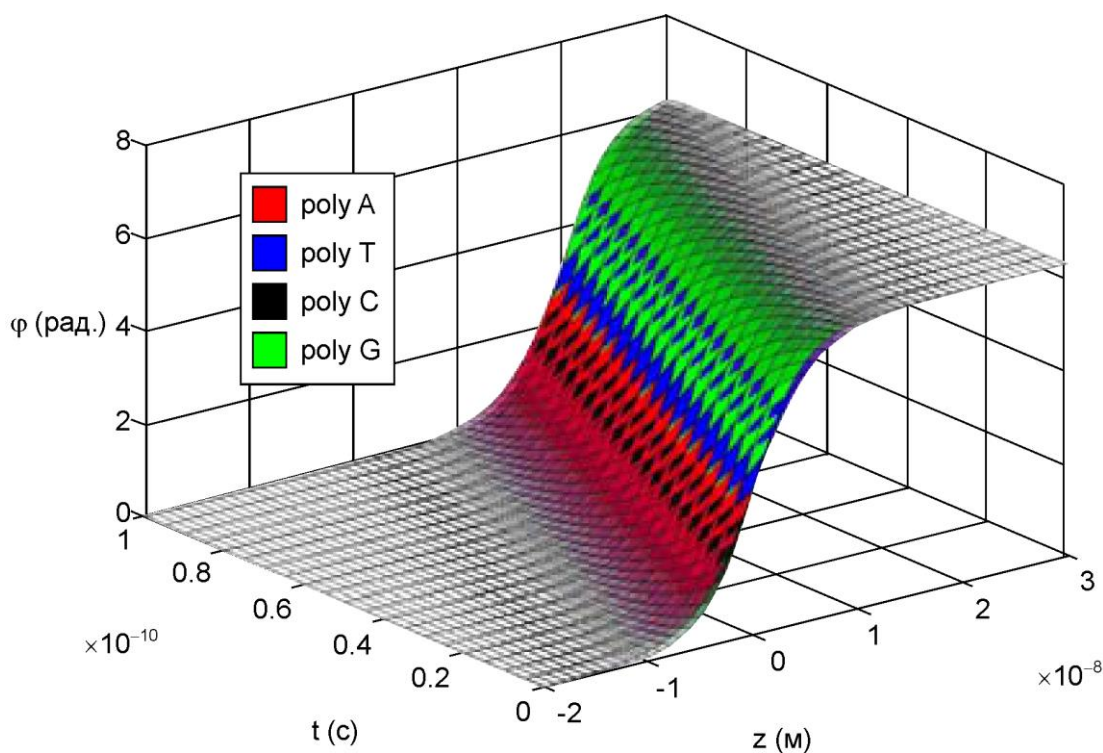


Рисунок III.4.2. График функции (2) $\phi(z, t)$, отображающий движение кинков вдоль четырех однородных последовательностей: *poly(A)*, *poly(T)*, *poly(C)*, *poly(G)*.

Модели, которые используют такой подход, хорошо описывают вращательную динамику оснований в однородных молекулах ДНК. Это означает, что в модели Ингландера коэффициенты уравнения (III.4.1) I, K', V

являются константами. Однако, для понимания связи динамики и функции ДНК этого недостаточно. Важно учитывать неоднородность последовательностей ДНК. Для этого была проведена проверка модели Ингландера на искусственных неоднородных молекулах ДНК.

III.4.1.2 Адаптация модели к неоднородному случаю и построение численной схемы интегрирования

Для неоднородного случая структура модельной молекулы ДНК с неоднородной последовательностью нуклеотидов выбиралась в следующем виде. Предполагалось, что основная цепочка состоит из двух однородных участков, следующих друг за другом (Рисунок III.4.3), и разделённых между собой границей. Каждый из участков состоит из одного своего типа нуклеотидов. Вторая цепочка строилась по комплементарному принципу.

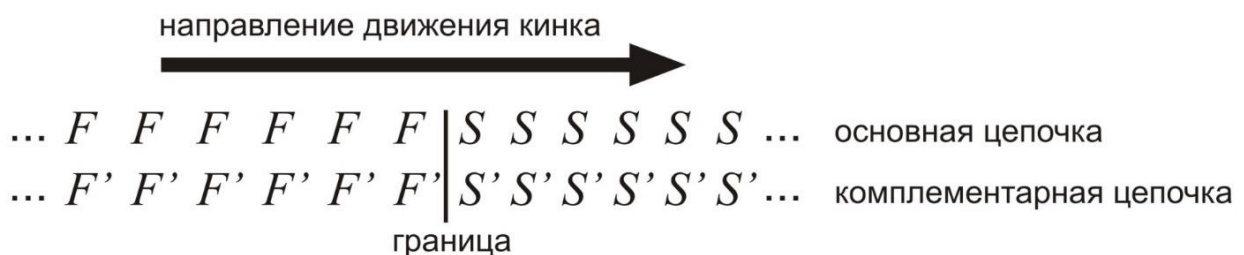


Рисунок III.4.3. Модельная молекула ДНК. Основная цепочка состоит из двух однородных последовательностей, следующих друг за другом. Буквами F и S – обозначены нуклеотиды в первой и второй однородных последовательностях. F' и S' – нуклеотиды в комплементарных последовательностях. Стрелкой вверху указано направление движения кинка – слева на право.

Исследование динамических свойств модельной молекулы ДНК проводилось при помощи изучения движения кинка вдоль основной цепочки. Предполагалось, что сначала кинк двигался из бесконечности по первой однородной нуклеотидной последовательности в сторону границы слева на право. Цель численного эксперимента – выявить, как будет вести себя кинк на

границе: отразится от границы или продолжит движение. Как при этом изменится его скорость?

В уравнении (III.4.1) каждому виду нуклеотидов, составляющих однородные последовательности по обе стороны от границы, соответствует собственный набор коэффициентов: I , K' и V . При рассмотрении динамики нуклеотидов на границе коэффициенты уравнения (III.4.1) менялись скачкообразно.

Начальные условия выбирались в виде кинка, и, исходя из решения (III.4.2) уравнения СГ (III.4.1), имели вид:

$$\phi(z \in [z_L, z_R], 0) = 4 \operatorname{arctg} \left\{ \exp \left[\frac{\gamma_F}{d_F} z \right] \right\}, \quad (\text{III.4.3})$$

$$\phi_t(z \in [z_L, z_R], 0) = \frac{-2v\gamma_F}{d_F \cosh(\gamma_F z / d_F)}. \quad (\text{III.4.4})$$

Аналогичным образом выбирались и граничные (краевые) условия.

$$\begin{aligned} \phi(z_L, t) &= 4 \operatorname{arctg} \left\{ \exp \left[\frac{\gamma_F}{d_F} (z_L - vt) \right] \right\}, \\ \phi(z_R, t) &= 4 \operatorname{arctg} \left\{ \exp \left[\frac{\gamma_F}{d_F} (z_R - vt) \right] \right\}. \end{aligned} \quad (\text{III.4.5})$$

Здесь $z \in [z_L, z_b] \cup (z_b, z_R]$, где z_b – координата границы, разделяющей две однородные последовательности нуклеотидов. Индекс у коэффициентов γ и d относится к первой (F) последовательности нуклеотидов (см. Рисунок III.4.3), а индексы L и R обозначают левый и правый края рассматриваемой цепочки.

Для решения уравнения (III.4.1) с начальными и граничными условиями (III.4.3-III.4.5) использовался численный метод конечно-разностных схем. При этом предварительно, уравнение (III.4.1) и условия (III.4.3-III.4.5) приводились к безразмерному виду с использованием замены переменных: $z \rightarrow \tilde{z} = \left(\sqrt{V / (K'a^2)} \right) z$, $t \rightarrow \tilde{t} = \left(\sqrt{V / I} \right) t$. Затем для безразмерных переменных \tilde{z} и \tilde{t} строилась прямоугольная сетка:

$$\begin{aligned}\omega_h &= \{\tilde{z}_j = jh, j = 0, 1, \dots, b, \dots, N_z\}, \quad \omega_\tau = \{\tilde{t}_i = i\tau, i = 0, 1, \dots, N_t\}, \\ \omega_{h\tau} &= \omega_h \times \omega_\tau, \quad h = 1/N_z, \quad \tau = 1/N_t,\end{aligned}\tag{III.4.6}$$

где b – индекс, соответствующий границе между последовательностями z_b . Вводилось обозначение u_j^i для значений сеточной функции ϕ в узлах $(\tilde{z}_j, \tilde{t}_i)$, определенной на сетке (III.4.6). Проводилась замена производных по времени и координате на разностные выражения. При этом использовался метод Кранка-Николсона, содержащий в себе явную и неявную разностные схемы с различными весовыми коэффициентами. В результате уравнение (III.4.1) было переписано в безразмерном разностном виде:

$$\begin{aligned}u_j^{i+1} - 2u_j^i + u_j^{i-1} &= \left(\frac{\tau}{h}\right)^2 [\theta(u_{j+1}^{i+1} - 2u_j^{i+1} + u_{j-1}^{i+1}) + \\ &+ (1 - \theta)(u_{j+1}^i - 2u_j^i + u_{j-1}^i)] - \tau^2 \sin(u_j^i), \\ &1 \leq i \leq N_t - 1, \quad 1 \leq j \leq b, \\ u_j^{i+1} - 2u_j^i + u_j^{i-1} &= \left(\alpha \frac{\tau}{h}\right)^2 [\theta(u_{j+1}^{i+1} - 2u_j^{i+1} + u_{j-1}^{i+1}) + \\ &+ (1 - \theta)(u_{j+1}^i - 2u_j^i + u_{j-1}^i)] - (\beta\tau)^2 \sin(u_j^i), \\ &1 \leq i \leq N_t - 1, \quad b < j \leq N_z - 1,\end{aligned}\tag{III.4.7}$$

где θ – параметр, определяющий вклад явной и неявной схем, $\alpha = \sqrt{I_F K'_S / I_S K'_F}$ и $\beta = \sqrt{I_F V_S / I_S V_F}$ – масштабные коэффициенты. Индекс F соответствует первой последовательности нуклеотидов (слева), а индекс S соответствует второй последовательности (справа, см. Рисунок III.4.3).

При переходе к разностной схеме граничные и начальные условия аппроксимировались точно. Учитывая безразмерный случай, $d = 1$, получали:

$$\begin{aligned}u_0^i (0, i \in [0, N_t]) &= 4 \operatorname{arctg} \left\{ \exp \left[\gamma_F (\tilde{z}_0 - \nu \tilde{t}_i) \right] \right\} \equiv \phi_0(\tilde{t}_i), \\ u_{N_z}^i (N_z, i \in [0, N_t]) &= 4 \operatorname{arctg} \left\{ \exp \left[\gamma_F (\tilde{z}_{N_z} - \nu \tilde{t}_i) \right] \right\} \equiv \phi_{N_z}(\tilde{t}_i).\end{aligned}\tag{III.4.8}$$

$$u_j^0 (j \in [0, N_z], 0) = 4 \operatorname{arctg} \left\{ \exp \left[\gamma_F \tilde{z}_j \right] \right\} \equiv U,\tag{III.4.9}$$

Второе начальное условие аппроксимировалось с использованием разложения в ряд Тейлора, чтобы обеспечить первый порядок точности по \tilde{t} :

$$u_j^1(j \in [0, N_z], 0) = U + \frac{-2\upsilon\gamma_F}{\cosh(\gamma_F \tilde{z}_j)} \tau. \quad (\text{III.4.10})$$

Затем из (III.4.7) получали систему алгебраических уравнений на u^{i+1} :

$$\begin{aligned} a_j^k u_{j-1}^{i+1} + b_j^k u_j^{i+1} + c_j^k u_{j+1}^{i+1} &= (1-\theta)r^k \left(\frac{\tau}{h}\right)^2 [u_{j+1}^i - 2u_j^i + u_{j-1}^i] + \\ &+ 2u_j^i - u_j^{i-1} - \tau^2 g^k \sin(u_j^i), \quad 1 \leq i \leq N_t - 1, \quad 1 \leq j \leq N_z - 1. \end{aligned} \quad (\text{III.4.11})$$

Здесь индекс k определяет текущую последовательность, т.е. $k = F$ при $1 \leq j \leq b$ и $k = S$ при $b < j \leq N_z - 1$. Соответственно коэффициенты r^k и g^k принимают следующие значения: $r^F = 1$, $r^S = \alpha^2$, $g^F = 1$, $g^S = \beta^2$. Для коэффициентов a , b и c имеем:

$$\begin{aligned} a_j^F &= -\theta \left(\frac{\tau}{h}\right)^2, & a_j^S &= -\theta \left(\alpha \frac{\tau}{h}\right)^2, \\ b_j^F &= 1 + 2\theta \left(\frac{\tau}{h}\right)^2, \quad 1 \leq j \leq b, & b_j^S &= 1 + 2\theta \left(\alpha \frac{\tau}{h}\right)^2, \quad b < j \leq N_z - 1, \\ c_j^F &= -\theta \left(\frac{\tau}{h}\right)^2, & c_j^S &= -\theta \left(\alpha \frac{\tau}{h}\right)^2. \end{aligned} \quad (\text{III.4.12})$$

С учётом граничных условий (III.4.8) из (III.4.11) получали окончательную систему уравнений:

$$\begin{aligned} b_1^F u_1^{i+1} + c_1^F u_2^{i+1} &= (1-\theta) \left(\frac{\tau}{h}\right)^2 [u_2^i - 2u_1^i] + 2u_1^i - u_1^{i-1} - \\ &- \tau^2 \sin(u_1^i) + \left(\frac{\tau}{h}\right)^2 \phi_0(\tilde{t}_i) \quad \equiv D_1, & j &= 1, \\ a_j^k u_{j-1}^{i+1} + b_j^k u_j^{i+1} + c_j^k u_{j+1}^{i+1} &= (1-\theta)r^k \left(\frac{\tau}{h}\right)^2 [u_{j+1}^i - 2u_j^i + u_{j-1}^i] + 2u_j^i - u_j^{i-1} - \\ &- \tau^2 g^k \sin(u_j^i) \quad \equiv D_j, & 2 \leq j &\leq N_z - 2, \\ a_{N_z-1}^S u_{N_z-2}^{i+1} + b_{N_z-1}^S u_{N_z-1}^{i+1} &= (1-\theta) \left(\alpha \frac{\tau}{h}\right)^2 [-2u_{N_z-1}^i + u_{N_z-2}^i] + 2u_{N_z-1}^i - u_{N_z-1}^{i-1} - \\ &- (\beta\tau)^2 \sin(u_{N_z-1}^i) + \left(\alpha \frac{\tau}{h}\right)^2 \phi_{N_z}(\tilde{t}_i) \quad \equiv D_{N_z-1}, & j &= N_z - 1. \end{aligned} \quad (\text{III.4.13})$$

Для нахождения u_j^{i+1} из системы (III.4.13) использовался метод прогонки, где решения системы линейных алгебраических уравнений, описываемой трёхдиагональной матрицей, ищутся в виде рекуррентного соотношения для текущего значения i :

$$u_j^{i+1} = \psi_{j+1} u_{j+1}^{i+1} + \eta_{j+1}, \quad 1 \leq j \leq N_z - 2, \quad (\text{III.4.14})$$

с коэффициентами ζ и η имеющими следующий вид:

$$\begin{aligned} \psi_2 &= \frac{-c_1^k}{b_1^k}, & \eta_2 &= \frac{D_1}{b_1^k}, & j &= 1, \\ \psi_{j+1} &= \frac{-c_j^k}{a_j^k \zeta_j + b_j^k}, & \eta_{j+1} &= \frac{D_j - a_j^k \eta_j}{a_j^k \zeta_j + b_j^k}, & 2 \leq j &\leq N_z - 2. \end{aligned} \quad (\text{III.4.15})$$

при этом $u_{N_z-1}^{i+1} = (D_{N_z-1} - a_{N_z-1}^S \eta_{N_z-1}) / (a_{N_z-1}^S \psi_{N_z-1} + b_{N_z-1}^S)$.

Кроме того, из полученных значений u_j^i вычислялась численная производная по времени:

$$\frac{u_j^{i+1} - u_j^i}{\tau}, \quad 0 \leq j \leq N_z, 0 \leq i \leq N_t - 1, \quad (\text{III.4.16})$$

которая соответствует угловой скорости $\partial\phi(z,t)/\partial t$.

Все вычисления проводились на персональном компьютере с использованием программного пакета «Matlab». Значения коэффициентов и параметров, использованных в вычислениях, приведены в таблицах III.4.1, III.4.2.

Таблица III.4.1. Физические параметры ДНК.

	I (кгм ²) $\times 10^{-43}$	K' (Джс) $\times 10^{-17}$	V (Джс) $\times 10^{-19}$	R (м) $\times 10^{-10}$	a (м) $\times 10^{-10}$
A	0.76	0.227	0.209	5.8	3.4
T	0.48	0.155	0.143	4.8	3.4
G	0.82	0.220	0.312	5.7	3.4
C	0.41	0.149	0.212	4.7	3.4

Таблица III.4.2. Параметры численной схемы.

τ	h	θ
2.5×10^{-3}	5×10^{-3}	0.1

III.4.1.3 Результаты численного моделирования и их обсуждение

Как показал численный анализ, нелинейное возмущение в виде кинка, распространяющееся вдоль модельной молекулы ДНК (см. Рисунок III.4.3), может вести себя тремя разными способами. При достижении границы между двумя однородными последовательностями, состоящими из разных типов нуклеотидов, кинк может: а) отразиться, б) пройти границу с ускорением (увеличить скорость), в) пройти границу с замедлением (уменьшить скорость). Эти сценарии движения кинка можно видеть на рисунках III.4.4, III.4.5. На рисунке III.4.4 слева изображены поверхности $\phi(z,t)$, а справа проекции на плоскость (z,t) .

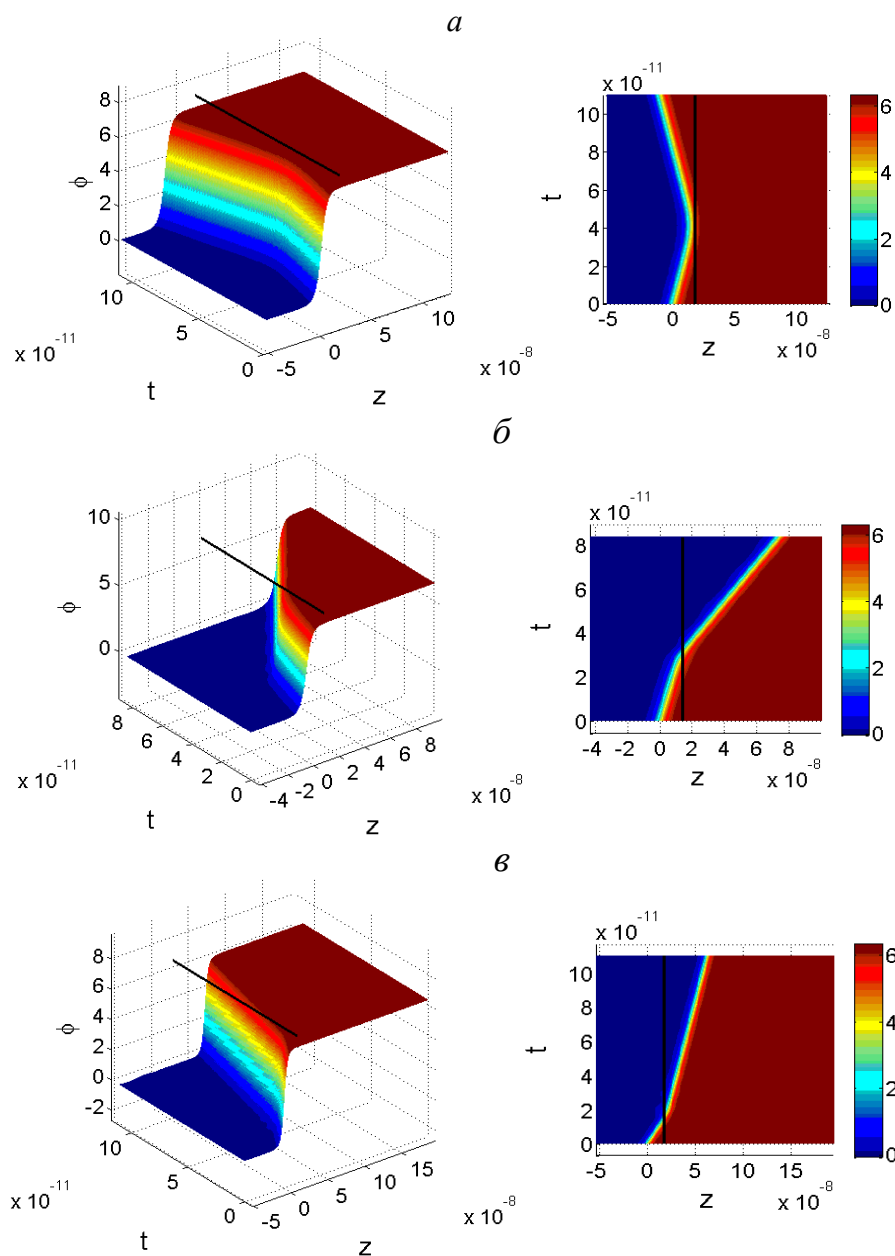


Рисунок Ш.4.1. Поверхности $\phi(z, t)$ (слева – произвольный вид, справа – проекция на плоскость (z, t)), иллюстрирующие три различных случая поведения кинка. (а) – отражение кинка от границы между областями T и G (начальная скорость $v = 400$ м/с). (б) – прохождение границы между областями C и A с увеличением скорости движения (начальная скорость $v = 400$ м/с). (в) – прохождение границы между областями T и C с уменьшением скорости движения (начальная скорость $v = 1200$ м/с). Чёрная прямая линия – граница. Единицы измерения: ϕ в рад, t в с, z в м.

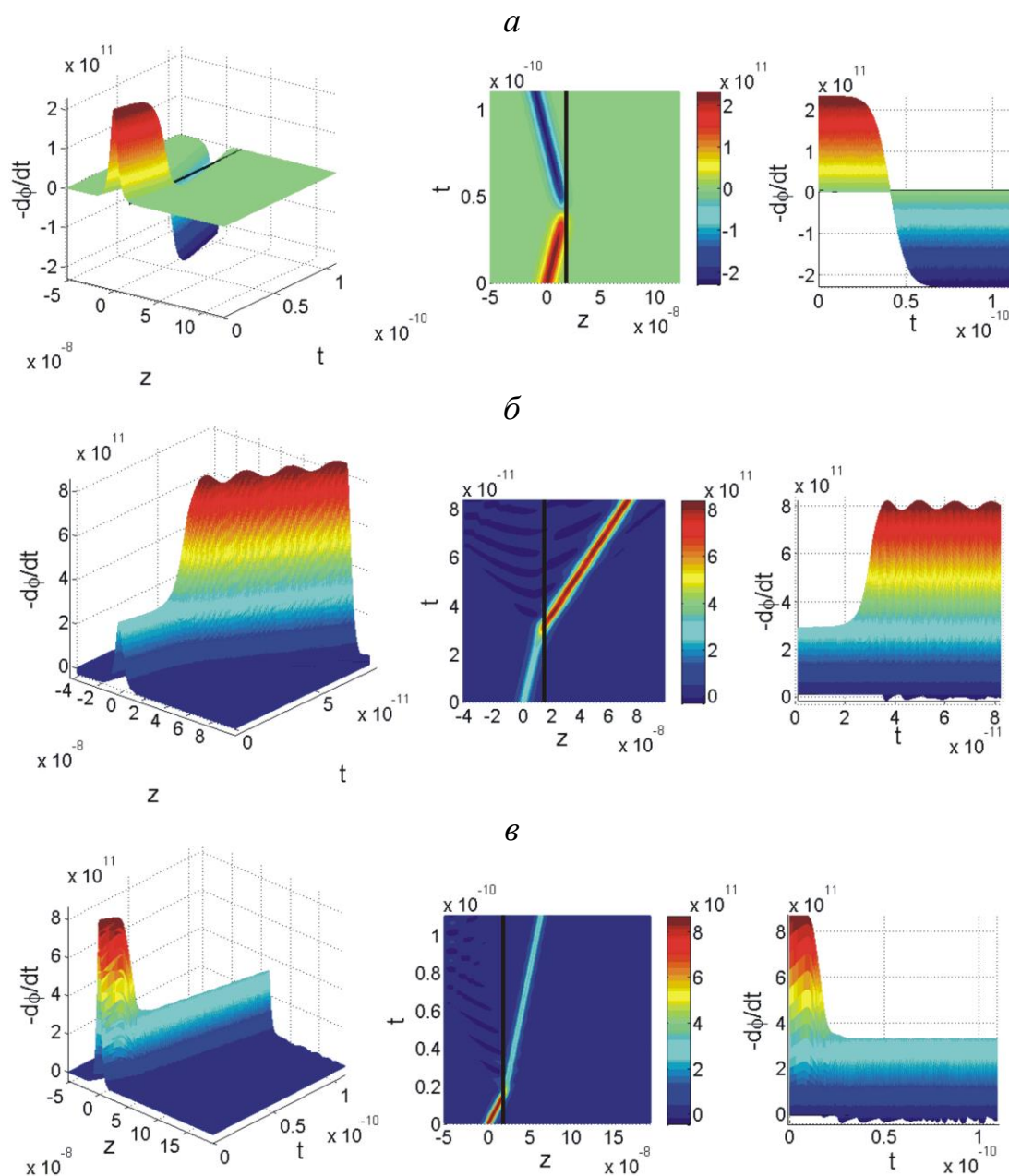


Рисунок Ш.4.2. Поверхности $-\partial\phi/\partial t$ (слева – произвольный вид, в середине – проекция на плоскость (z,t) , справа – проекция на плоскость $(t,-\partial\phi/\partial t)$), иллюстрирующие три различных случая поведения кинка. (а) – отражение кинка от границы между областями T и G (начальная скорость $v = 400$ м/с). (б) – прохождение границы между областями C и A с увеличением скорости движения (начальная скорость $v = 400$ м/с). (в) – прохождение границы между областями T и C с уменьшением скорости движения (начальная скорость $v = 1200$ м/с). Чёрная прямая линия – граница. Единицы измерения: ϕ в рад, t в с, z в м.

На рисунке III.4.5 изображены поверхности скоростей $-\partial\phi(z,t)/\partial t$. Здесь слева показан произвольный вид, в середине – проекции на плоскость (z,t) (вид сверху), а справа – проекции на плоскость $(t, -\partial\phi(z,t)/\partial t)$ (вид сбоку).

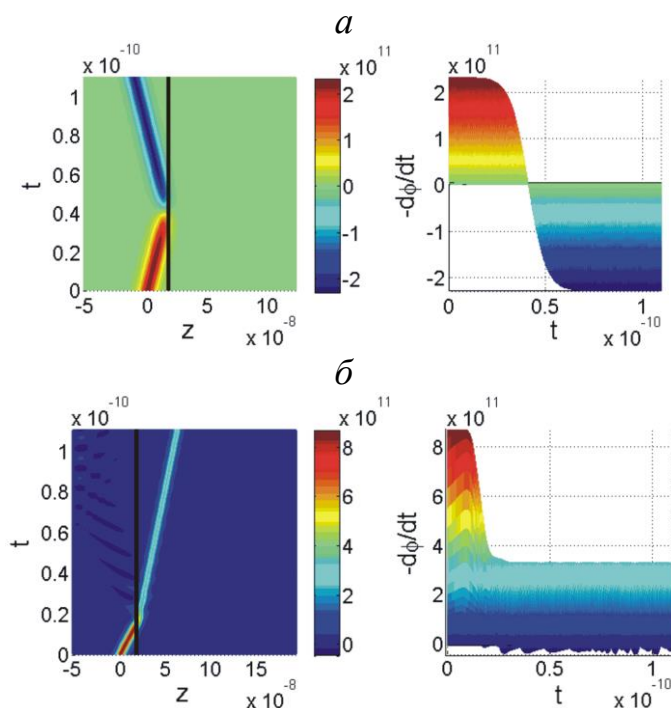





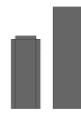








Рисунок III.4.3. Поверхности $-\partial\phi/\partial t$ (слева – проекция на плоскость (z,t) , справа – проекция на плоскость $(t, -\partial\phi/\partial t)$), иллюстрирующие динамику кинка при достижении границы между двумя однородными последовательностями оснований T и C для двух разных начальных скоростей движения. (а) – отражение, начальная скорость $v = 400$ м/с. (б) – прохождение границы с уменьшением скорости движения, начальная скорость $v = 1200$ м/с. Чёрная прямая линия – граница. Единицы измерения: ϕ в рад, t в с, z в м.

Существенным фактором, влияющим на поведение кинка при его прохождении через границу раздела двух однородных последовательностей, является скорость распространения кинка v вдоль первой последовательности до границы. На рисунке III.4.6 видно, что при скорости движения $v = 400$ м/с кинк отражается от границы (а), разделяющей T и C однородные

последовательности нуклеотидов. Если скорость кинка увеличить, например, выбрав $v = 1200$ м/с, то кинк преодолевает границу раздела (δ) и продолжает своё движение по второй нуклеотидной последовательности с уменьшенной по отношению к первой последовательности скоростью движения.

В таблице III.1.3 приведены все результаты расчётов для всех типов оснований. При просмотре таблицы нужно руководствоваться следующим правилом. Сначала необходимо выбрать тип азотистого основания из левой крайней колонки, а затем из верхней крайней строки. В ячейке на пересечении выбранных оснований находится результат численного моделирования. Каждая такая ячейка включает в себя тип поведения кинка при переходе им границы между выбранными нуклеотидными последовательностями, где состав левой последовательности определяется выбором основания из левого столбца, а состав правой последовательности выбором основания из верхней строки. Типы поведения кинка имеют соответствующие обозначения: R – отражение, P_{\uparrow} – прохождение с увеличением скорости, P_{\downarrow} – прохождение с уменьшением скорости, P_0 – прохождение без изменения скорости. Кроме того, каждая ячейка (за исключением диагональных) содержит диаграмму плотностей энергии, состоящую из двух столбиков, левый из которых отображает максимальное значение плотности энергии кинка,двигающегося по левой последовательности с заданной скоростью, а правый столбик - максимальное значение плотности энергии активации кинка на правой последовательности без учёта скорости движения. Для удобства под диаграммой показано числовое значение разности соответствующих уровней плотностей энергии по формуле «левый»–«правый». Результаты, представленные в таблице III.1.3, получены для одного и того же начального значения скорости кинка $v = 400$ м/с.

Таблица III.4.1. Результаты вычислений, демонстрирующие характерное поведение кинка при достижении им границы между двумя однородными последовательностями нуклеотидов и начальной скорости движения $v = 400$ м/с. Единицы измерения: ρ в Дж.

	A	T	G	C
A	P_0	P_{\uparrow}  $\Delta\rho = 3.05 \times 10^{-20}$	R  $\Delta\rho = -3.71 \times 10^{-20}$	R  $\Delta\rho = 0.29 \times 10^{-20}$
T	P_{\downarrow}  $\Delta\rho = -2.38 \times 10^{-20}$	P_0	R  $\Delta\rho = -6.50 \times 10^{-20}$	R  $\Delta\rho = -2.50 \times 10^{-20}$
G	P_{\uparrow}  $\Delta\rho = 4.80 \times 10^{-20}$	P_{\uparrow}  $\Delta\rho = 7.44 \times 10^{-20}$	P_0	P_{\uparrow}  $\Delta\rho = 4.68 \times 10^{-20}$
C	P_{\uparrow}  $\Delta\rho = 0.46 \times 10^{-20}$	P_{\uparrow}  $\Delta\rho = 3.10 \times 10^{-20}$	P_{\downarrow}  $\Delta\rho = -3.66 \times 10^{-20}$	P_0

Продемонстрированный подход для описания динамики неоднородной молекулы ДНК обладает рядом допущений. Среди них можно выделить отсутствие явного учёта локальной специфики взаимодействия между комплементарными цепочками, которое заменено на усредненное влияние одной полинуклеотидной цепочки на динамику нуклеотидов в другой цепочке, отсутствие учёта спирализации цепей, а также пренебрежение вязкостью среды (отсутствие диссипативного члена) и тепловыми флуктуациями. Несмотря на это, модели такого рода широко применяются в исследованиях локальной

динамики полинуклеотидных цепей. В частности, в работе (Bashford, 2006) аналогичный подход применяется для теоретического исследования нелинейных возбуждений в виде бризера, и их возможного влияния на скольжение РНК полимеразы вдоль ДНК при поиске промоторной последовательности в геноме бактериофага T7. Авторы в этой работе учитывают только слабое влияние различных типов нуклеотидов на взаимодействие между комплементарными парами оснований. Даже в этом случае, как оказывается, такой подход даёт результаты, которые хорошо коррелируют с экспериментальными данными. Похожие приёмы используются и в других работах (Yakushevich, 1987; Salerno, 1992; Salerno, Kivshar, 1994; Salerno, 1995; Dominguez-Adame, et al. 1995; Cuenda, Sanchez, 2004^a; Cuenda, Sanchez, 2004^b).

Численное решение уравнения синус-Гордона проводилось при явном учёте различий масс оснований, расстояний до сахаро-фосфатного остова от центров масс оснований и взаимодействий между комплементарными парами оснований для различных типов нуклеотидов в рассматриваемой последовательности. Для простоты использовалась полинуклеотидная цепочка, состоящая из двух однородных последовательностей, отличающихся между собой типами составляющих их нуклеотидов, так как это было сделано, например, в работе (Якушевич и др., 2009). Проведенные численные расчеты, в отличие от работы (Yakushevich, Krasnobaeva, 2008), позволили явным образом проследить за динамикой кинка, распространяющегося вдоль цепи молекулы ДНК с неоднородным составом. Было выявлено характерное поведение кинка на границе раздела двух однородных последовательностей нуклеотидов составляющих модельную молекулу ДНК, включающее три основных типа: а) отражение; б) прохождение с уменьшением скорости; в) прохождение с увеличением скорости.

В первом случае кинк не переходил через границу раздела, а отражался от неё и, оставаясь в первой последовательности, продолжал двигаться в обратную первоначальному направлению сторону. При этом скорость кинка по абсолютной величине не менялась, т.е. для рассматриваемой модельной

ситуации происходило упругое отражение кинка от границы. Более того, в этом случае изначально сформировавшийся кинк, отражаясь, переходил в антикинк, что хорошо видно на рисунке III.4.7, где изображена фазовая поверхность, демонстрирующая зависимость $-\partial\phi/\partial t$ от ϕ во времени. Для сравнения на рисунке III.4.8 показаны фазовые кривые кинка (а) и антикинка (б), полученные из аналитического решения уравнения СГ (III.4.2) для произвольного момента времени и однородной последовательности нуклеотидов. Видно, что с точностью до знака кривые на рисунке III.4.8 совпадают с кривыми, получаемыми из фазовой поверхности сечением плоскостью, параллельной плоскости $(\phi, -\partial\phi/\partial t)$.

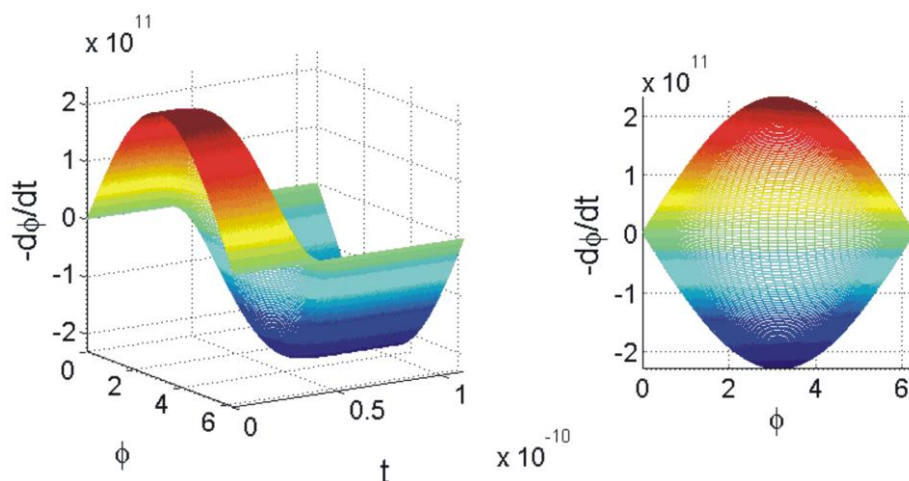


Рисунок III.4.4. Фазовая поверхность, иллюстрирующая переход кинка в антикинк при отражении кинка от границы между двумя однородными последовательностями оснований T и C для начальной скорости движения $v = 400$ м/с. Слева – произвольный вид, справа – проекция на плоскость $(\phi, -\partial\phi/\partial t)$. Единицы измерения: ϕ в рад, t в с.

Второй и третий типы поведения кинка на границе раздела соответствуют случаям, когда кинк переходит из первой однородной последовательности нуклеотидов во вторую последовательность с увеличением или с уменьшением скорости. Такое поведение можно было бы интерпретировать следующим образом. При прохождении границы раздела кинк либо терял часть энергии,

преодолевая барьер, либо приобретал дополнительную энергию, переходя на более низкий уровень энергии. Так как в отсутствие диссипации полная энергия системы должна сохраняться, то в первом случае происходит увеличение кинетической составляющей энергии кинка и, следовательно, скорость кинка увеличивалась, а во втором случае – уменьшалась. Однако такое объяснение годится не всегда. Если посмотреть на таблицу III.4.2, то можно видеть, что для последовательностей *A* и *C*, не смотря на наличие энергетического спада при движении кинка из области *A* в *C* он отражается от границы. Если кинк движется из *C* в *G* или из *T* в *A*, то, не смотря на наличие энергетического барьера на границе раздела, он переходит через неё и продолжает двигаться по второй цепочке с уменьшением скорости, хотя начальной скорости $v = 400$ м/с, как показывают диаграммы, для этого недостаточно. Такое странное поведение кинка объясняется тем, что рассмотренная модель ограничена описанием только однородных последовательностей и не позволяет получить правильное динамическое поведение кинка в неоднородной ДНК.

Все результаты были получены для начальных скоростей движения кинка намного превышающих скорость распространения конформационных возмущений, наблюдаемую в процессах функционирования молекулы ДНК, например, скорость репликации, составляющей ~ 1000 н.о./с $\sim 10^{-7}$ м/с (Kelman, O'Donnell, 1995). Авторы работы (Cadoni, et al., 2011) на дискретных неоднородных моделях ДНК показали, что кинки могут распространяться и при скоростях $\sim 10^{-5}$ м/с. Как будет показано далее, учёт в модели диссипативного фактора, а также внешних вынуждающих воздействий может позволить провести расчёты для скоростей значительно ниже рассмотренных.

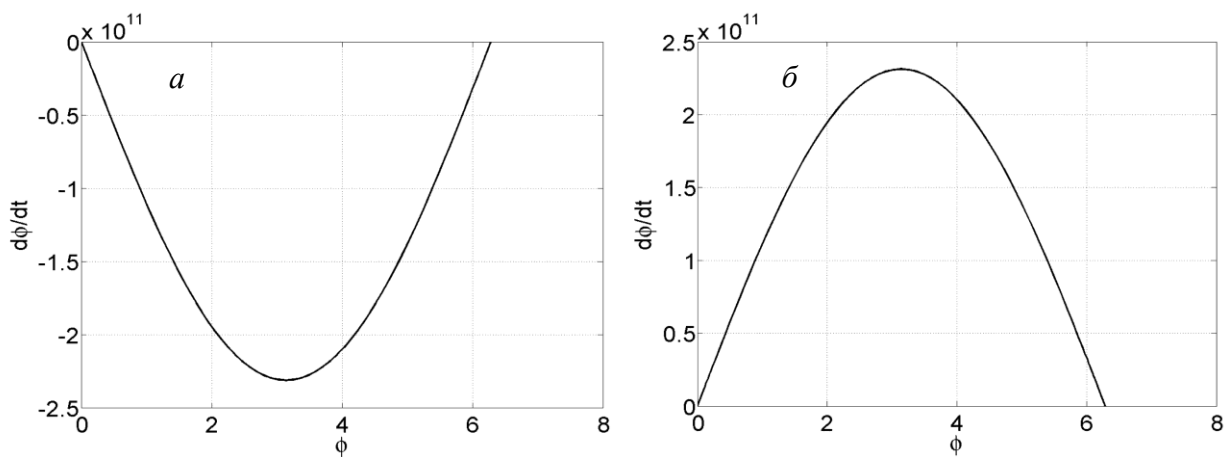


Рисунок III.4.5. Фазовые траектории кинка (*a*) и антикинка (*b*) полученные из аналитического решения уравнения СГ ($\phi(z, t) = 4 \arctg \left\{ \exp \left[\pm \frac{\gamma}{d} (z - vt - z_0) \right] \right\}$, (III.4.2) для однородной последовательности тиминов при скорости

Таким образом, модель Инглендера ограничена описанием однородных искусственных последовательностей. Для снятия этого ограничения необходимо разработать модель, учитывающую неоднородную структуру ДНК. Ниже будет представлена такая модель.

III.4.2 Моделирование движения кинка в однородных и неоднородных последовательностях ДНК с учетом диссипации

Известно, что все реальные механические системы без внешнего притока энергии являются диссипативными. Исследование молекулярных систем при помощи механических аналогов важно проводить с учетом диссипативных сил. Для молекулярных систем диссипативные силы в основном определяются как взаимодействием исследуемых молекул с растворителем, так и излучением.

III.4.2.1 Эффекты диссипации в однородных цепочках ДНК

В рамках модели синус-Гордона угловая скорость азотистых оснований определяется формулой

$$\phi_t(z, t) = \frac{-2v(\gamma/d)}{\cosh\left(\frac{\gamma}{d}(z-vt-z_0)\right)}. \quad (\text{Ш.4.17})$$

Она, однако, не учитывает эффекты диссипации, которые могут формироваться как за счёт внутримолекулярного трения, так и благодаря взаимодействию вращающихся оснований с окружающей средой (раствором). Их удалось учесть позднее в работе (Yakushevich, 1987). Для этого было использовано модифицированное уравнение синус-Гордона

$$I \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} - Ka^2 \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} + V \sin \phi = -\lambda \frac{\partial \phi}{\partial t}, \quad (\text{Ш.4.18})$$

исследованное затем методом теории возмущений. Введение в уравнение (Ш.4.18) диссипативного члена, пропорционального угловой скорости оснований $\partial \phi / \partial t$ с коэффициентом пропорциональности (коэффициентом диссипации) λ приводит к уменьшению скорости кинков (и антикинков). Формула, определяющая это уменьшение, была получена, однако, значительно позднее в работе (Якушевич, Краснобаева, 2007) методом МакЛафлина-Скотта (McLaughlin and Scott, 1978)

$$v(t) = \frac{\gamma_0 v_0 \exp[-(\lambda/I)t]}{\sqrt{1 + (\gamma_0 v_0 / c)^2 \exp[-2(\lambda/I)t]}}. \quad (\text{Ш.4.19})$$

Учет эффектов диссипации путем введения диссипативного слагаемого, пропорционального угловой скорости оснований, широко использовался в задачах, связанных с исследованием влияния внешнего воздействия или неоднородного состава полинуклеотидных последовательностей на динамику кинка (Nakamura et al., 1977; Nakanishi and Tsuboi, 1978; Quintero and Salerno, 2002; Reviznikov and Formalev, 2004). Тем не менее, отдельно и более углубленно эффекты диссипации в них не анализировались.

В данном разделе представлены результаты исследования влияния эффектов диссипации на динамику кинков в однородных и неоднородных искусственных последовательностях ДНК. Представлена аналитическая формула, определяющая координату кинка (Z), показаны траектории движения кинка на фазовой плоскости $\{v, z\}$, получены графики временной зависимости энергии кинка (E), его массы (M) и размера (D).

В однородном случае все коэффициенты модельного уравнения (III.4.18) являются константами, и решение может быть найдено аналитическим методом МакЛафлина-Скотта (McLaughlin and Scott, 1978).

III.4.2.1.1 Решение задачи методом МакЛафлина-Скотта

В основе метода лежит предположение о том, что включение в модель эффектов диссипации не приводит к изменению профиля конформационной волны (кинка), и только скорость движения кинка v становится функцией времени. Это дает возможность вывести уравнение для скорости кинка

$$\frac{dv}{dt} = -\frac{\lambda}{I}v \left(1 - \frac{v^2}{c^2}\right), \quad (\text{III.4.20})$$

решение которого, получаемое прямым интегрированием, как раз и приводит к формуле (III.4.19).

Если определить теперь координату кинка Z соотношением

$$\frac{dZ}{dt} = v, \quad (\text{III.4.21})$$

то легко найти формулу, определяющую изменение координаты кинка со временем

$$Z(t) = \int_0^t v(\tau) d\tau = -\frac{cI}{\lambda} \left[\operatorname{arcsinh} \left(\frac{v_0 \gamma_0}{c} \exp \left(-\frac{\lambda t}{I} \right) \right) - \operatorname{arcsinh} \left(\frac{v_0 \gamma_0}{c} \right) \right], \quad (\text{III.4.22})$$

а также формулу, определяющую путь, который пройдет кинк прежде, чем остановится вследствие действия эффектов диссипации,

$$s = \int_0^{+\infty} v(\tau) d\tau = \frac{cI}{\lambda} \operatorname{arcsinh} \left(\frac{v_0 \gamma_0}{c} \right), \quad (\text{III.4.23})$$

В таблице III.4.4 представлены коэффициенты диссипации λ для последовательностей $poly(A)$, $poly(T)$, $poly(G)$ и $poly(C)$ (Awrejcewicz et al., 2011).

Графики скоростей и координат кинка, рассчитанные согласно формулам (III.4.19) и (III.4.22), а также траектория движения кинка в плоскости $\{v, z\}$ представлены на рисунке III.4.9 (А, В, Д).

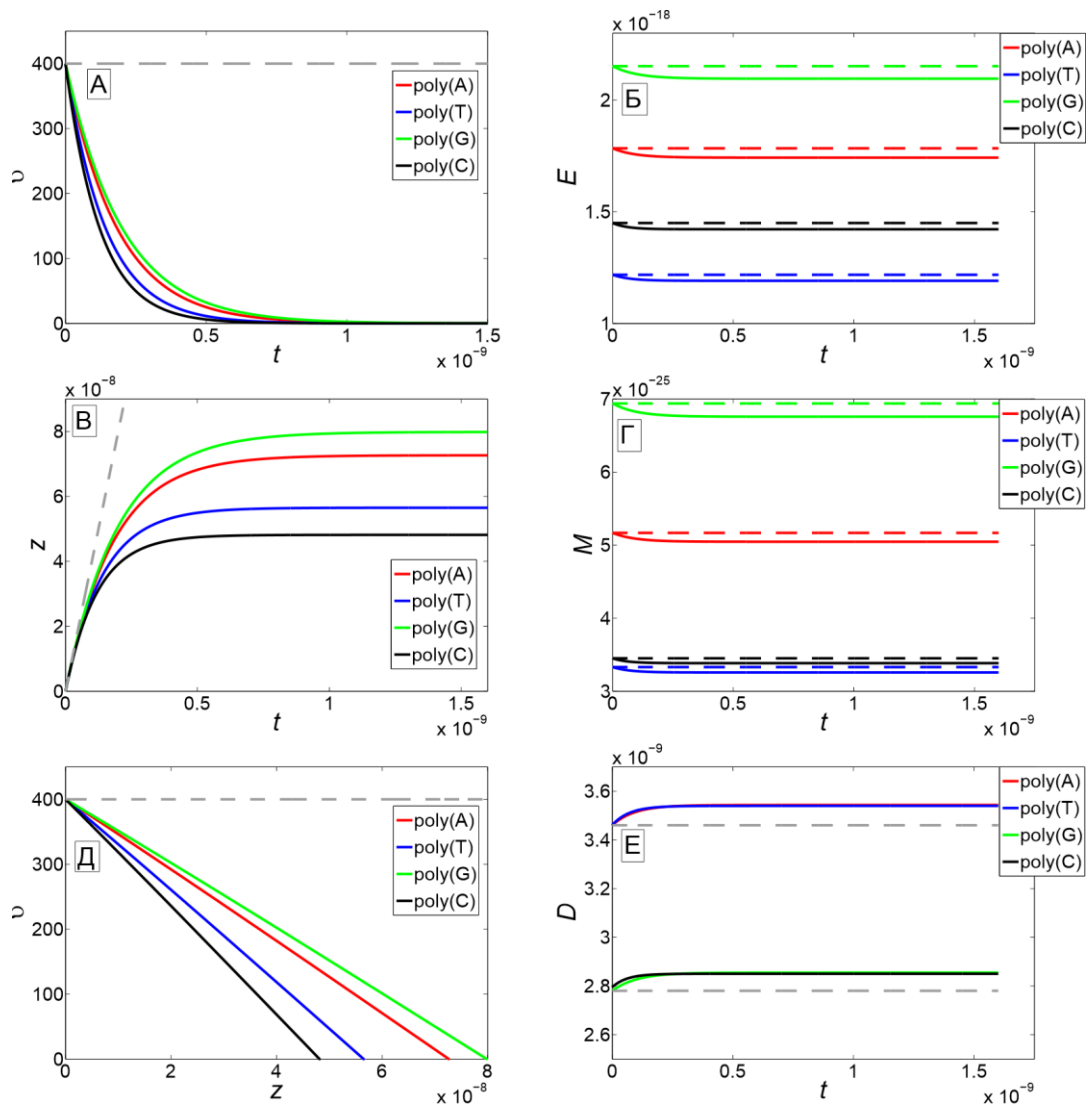


Рисунок III.4.9. Скорости (А), координаты (В), фазовые траектории (Д), энергии (Б), массы (Г) и размеры (Д) кинка, вычисленные с учетом диссипации (сплошные линии) для 4-х различных однородных последовательностей: $poly(A)$ – красный, $poly(T)$ – синий, $poly(G)$ – зеленый, $poly(C)$ – черный. Пунктирные линии – результаты вычислений без диссипации. Единицы измерения следующие: v – м/с, z – м, t – с, E – Дж, M – кг, D – м. Начальная скорость кинка $v_0 = 400$ м/с.

Таблица III.4.4. Значения коэффициентов диссипации оснований.

	A	T	G	C
λ (Дж с) $\times 10^{-34}$	4.25	3.52	4.18	3.45

Результаты расчета длины пробега кинка (s), а также полупериоды затухания (τ) приведены в таблице III.4.5.

Таблица III.4.5. Длины пробега и полупериоды жизни кинка.

	s (м) $\times 10^{-9}$	τ (с) $\times 10^{-10}$
A	72.67 (214 п.о.)	1.27
T	56.52 (166 п.о.)	0.99
G	79.86 (235 п.о.)	1.40
C	48.15 (142 п.о.)	0.84

Из рисунка III.4.9, а также данных таблицы III.4.5 видно, что наибольшее расстояние кинк проходит в $poly(G)$ цепочке, и при этом имеет наибольший полупериод затухания, в то время как в $poly(C)$ цепочке кинк проходит наименьшее расстояние и имеет наименьший полупериод затухания.

Другие динамические характеристики (энергия кинка E , его масса M и размер D) (Рясик, Якушевич, 2012):

$$\begin{aligned}
 E &= \gamma E_0, \quad E_0 = 8\sqrt{VK}, \\
 M &= \frac{E}{c^2} = \frac{8l\gamma}{a^2} \sqrt{V/K}, \\
 D &= \frac{d}{\gamma} = \frac{\sqrt{Ka^2/V}}{\gamma},
 \end{aligned}
 \tag{III.4.24}$$

параметрически зависят от времени из-за присутствия релятивистского множителя γ . Здесь E_0 – энергия активации (покоя) кинка, соответствует энергии кинка для нулевой скорости $v = 0$, что соответствует $\gamma = 1$. Используя эти формулы и формулу (III.4.19) были построены графики зависимости динамических характеристик кинка от времени (Рисунок III.4.9Б,Г,Е).

Из рисунка III.4.9Б,Г,Е видно, что вследствие эффектов диссипации масса и энергия кинка уменьшаются, а размер, напротив, увеличивается. Также из графиков следует, что наибольшей энергией и массой обладает кинк, активированный в $poly(G)$ цепочке, а наименьшей – в $poly(T)$ цепочке. Из рисунка III.4.9Е видно, что размеры кинков, активированных в $poly(A)$ и $poly(T)$,

практически совпадают, аналогично совпадают размеры кинков в $poly(G)$ и $poly(C)$.

III.4.2.1.2 Решение задачи численными методами

Известно, что метод МакЛафлина-Скотта (McLaughlin and Scott, 1978) является приближенным, и более того, применение его для решения модифицированного уравнения синус-Гордона может привести к неконтролируемым ошибкам. Для проверки результатов, полученных методом МакЛафлина-Скотта, задача (III.4.18) была решена численно, используя метод конечно-разностных схем, а именно используя схему Кранка-Николсона.

Сначала были рассчитаны координаты кинка $z(t)$ (Рисунок III.4.10 А) и проведено их сравнение с результатами, полученными с помощью формулы (III.4.22) (Рисунок III.4.10Б), затем угловая скорость азотистых оснований ϕ_t (Рисунок III.4.10В) и проведено ее сравнение с результатами аналитических расчетов по формуле (III.4.19) (Рисунок III.4.10Г). После этого, была рассчитана функция ϕ_z (Рисунок III.4.10Д) и также проведено ее сравнение с результатами аналитических расчетов (Рисунок III.4.10Е).

Из рисунка III.4.10 видно, что результаты численных и аналитических расчетов хорошо согласуются между собой, что говорит об адекватном выборе численной схемы, с одной стороны, и правильности предположений, входящих в основу метода МакЛафлина-Скотта, с другой. Отметим, что графики функции ϕ_z , построенные численно (Рисунок III.4.10Д), имеют осцилляции в профиле линии, что можно объяснить погрешностью, полученной в ходе численного дифференцирования. Однако при этом видно, что характер поведения кривых в обоих случаях схож, и что они совпадают при наложении их друг на друга.

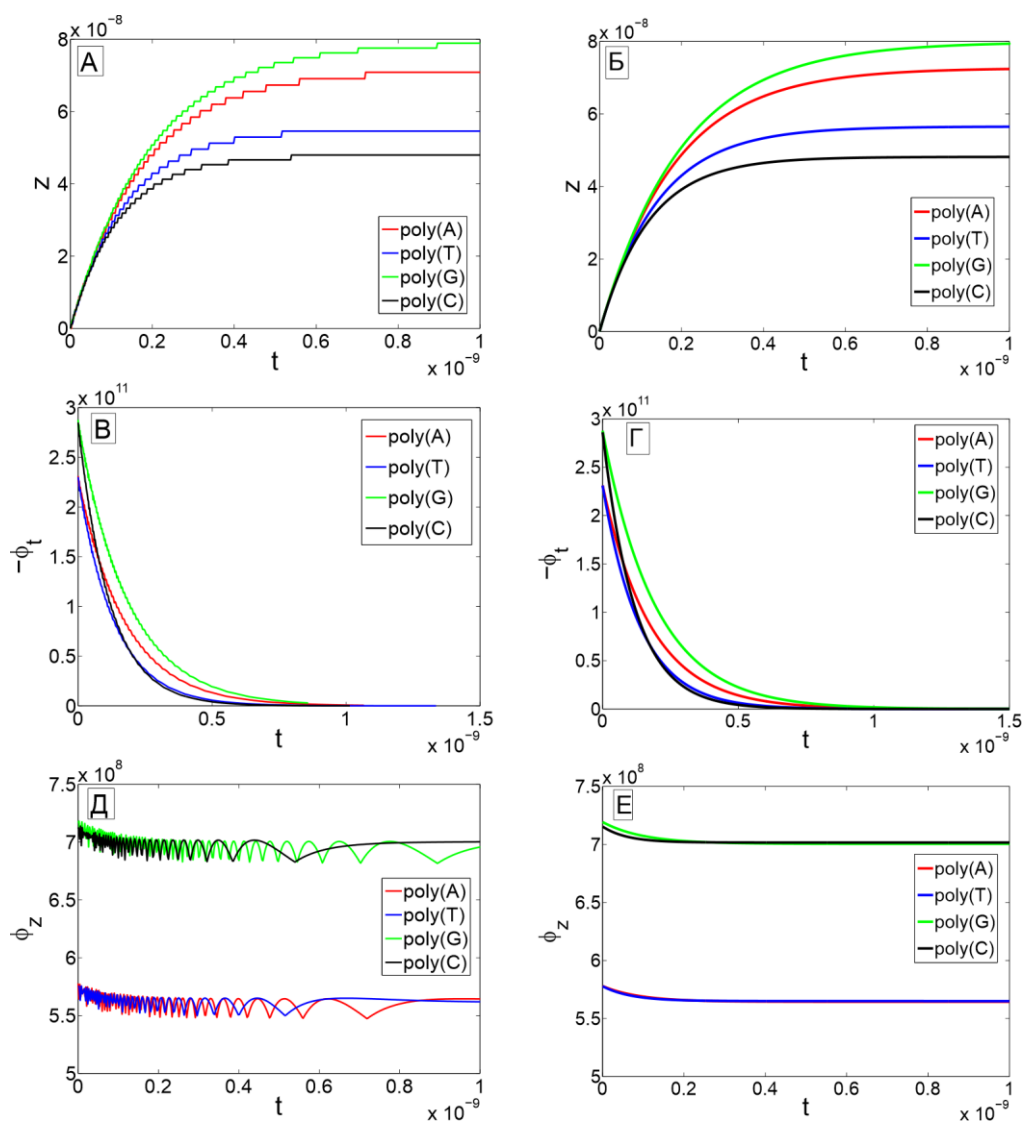


Рисунок Ш.4.10. Результаты численных (А, В, Д) и аналитических (Б, Г, Е) вычислений функций: $z(t)$ (А, Б), $-\phi_t(t)$ (В, Г) и $\phi_z(t)$ (Д, Е), для 4-х различных однородных последовательностей: $poly(A)$ – красный, $poly(T)$ – синий, $poly(G)$ – зеленый, $poly(C)$ – черный. Единицы измерения: z – м, t – с, $-\phi_t(t)$ – рад/с, $\phi_z(t)$ – рад/м. Начальная скорость кинка $v_0 = 400$ м/с.

Ш.4.2.2 Эффекты диссипации в неоднородных цепочках ДНК

Рассмотрим неоднородную последовательность, состоящую из двух однородных участков F и S , разделенных границей (Рисунок Ш.4.3). Угловые колебания азотистых оснований моделируются в такой последовательности тем же уравнением (Ш.4.18), но с коэффициентами, зависящими от координаты z

следующим образом: если $z \leq z_b$, коэффициенты I , K , V и α имеют значения, отвечающие последовательности F , если $z > z_b$ – другие, отвечающие последовательности S (z_b – координата границы).

Задачу (III.4.18) будем решать численно. Граничные и начальные условия зададим таким образом, чтобы кинк начинал свое движение на левом конце молекулы ДНК (последовательность F) и двигался в сторону правого конца (последовательность S) (Рисунок III.4.3).

Для решения уравнения (III.4.18) воспользуемся методом конечно-разностных схем, а именно схемой Кранка-Николсона. Чтобы построить траекторию движения кинка вблизи границы, вычислим функцию ϕ_t для различных вариантов однородных областей слева и справа от границы и построим проекции этой функции на плоскость $\{z, t\}$. Результаты вычислений представлены на рисунке III.4.11 (Б, Г, Е). Для сравнения там же приведены аналогичные проекции, рассчитанные без учета диссипации (Рисунок III.4.11А,В,Д).

Из рисунка III.4.11 видно, что в обоих случаях (с учетом и без учета диссипации) характер движения кинка вблизи границы схожий: кинк может отразиться от границы (Рисунок III.4.11А,Б), может пройти через границу с увеличением (Рисунок III.4.11В,Г) или с уменьшением скорости (Рисунок III.4.11Д,Е). Однако, из-за диссипации угловая скорость азотистых оснований ϕ_t будет уменьшаться, что видно по изменению цвета проекции на плоскость $\{z, t\}$, а сама траектория приобретает небольшой изгиб, что свидетельствует о замедлении движения кинка.

Таким образом, проведено исследование влияния эффектов диссипации на динамику нелинейного конформационного возмущения ДНК – кинка. Были рассмотрены две задачи: движение кинка в однородной последовательности нуклеотидов, и движение кинка в неоднородной последовательности, состоящей из двух однородных участков, разделенных границей. Показано, что эффекты

диссипации приводят к уменьшению энергии кинка, его скорости и массы, а также к увеличению размера кинка.

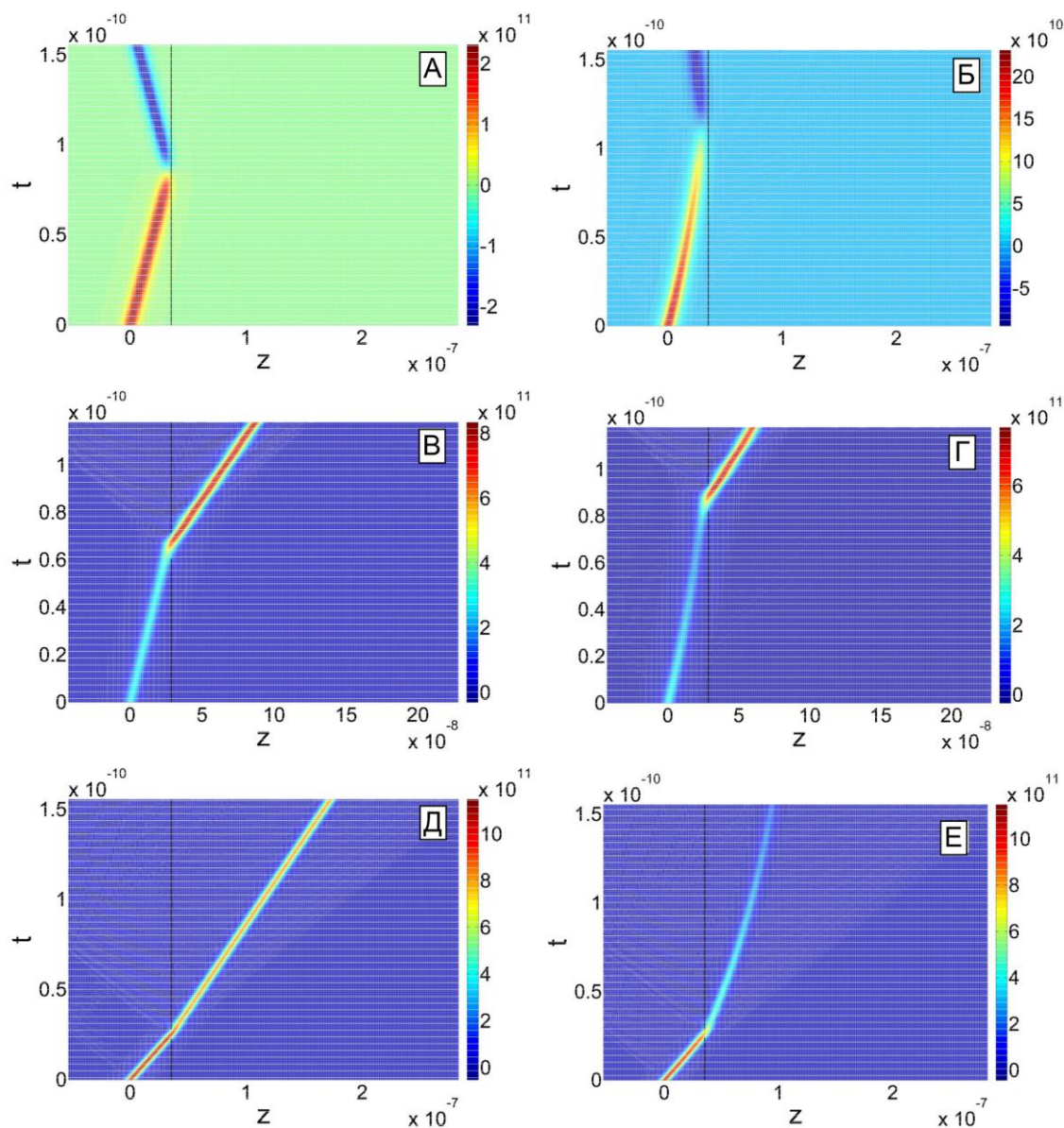


Рисунок Ш.4.11. Отражение кинка от границы (А, Б), прохождение границы с увеличением скорости (В, Г), прохождение границы с уменьшением скорости (Д, Е). Вычисления были сделаны с учетом диссипации (Б, Г, Е) и без учета диссипации (А, В, Д). Цветовая шкала показывает значения угловой скорости в рад/с. Единицы измерения: z – м, t – с.

Численные эксперименты показали, что поведение кинка вблизи границы, разделяющей две однородные последовательности, как с учетом диссипации, так

и при ее отсутствии, имеет следующие характерные особенности: кинк может отразиться от границы или пройти через нее. При прохождении границы скорость кинка может увеличиться или уменьшиться. Такое поведение обусловлено неоднородным составом рассматриваемых последовательностей, как это было показано в разделе «Уравнение Синус-Гордона для двух неодинаковых однородных последовательностей, разделенных границей». Также, диссипация приводит к уменьшению угловой скорости азотистых оснований ϕ_t и к изгибу траектории движения кинка в плоскости $\{z, t\}$.

Важным моментом в рассмотренных задачах было то, что уравнение (III.4.18) отличается от уравнения (III.4.1) только наличием диссипативного члена. Как было показано в разделе III.4.1, уравнение (III.4.1) имеет ограничение. Оно адекватно описывает динамику кинка только в однородных последовательностях ДНК. В неоднородном случае наблюдается нефизическое поведение кинка, когда он отражается от энергетического барьера, для преодоления которого он имеет достаточное количество кинетической энергии. Наличие диссипативного члена в уравнении (III.4.18) не снимает это ограничение. Поэтому необходим поиск нового уравнения, которое бы адекватно описывало динамику открытых состояний в неоднородной последовательности нуклеотидов с учетом угловых колебаний азотистых оснований в ДНК.

III.4.3 Новая неоднородная модель ДНК

III.4.3.1 Вывод уравнения модели

Для вывода нового модельного уравнения начнем с уравнения для угловых колебаний одного (изолированного) маятника:

$$I \frac{d^2 \phi(t)}{dt^2} + V \sin(\phi(t)) = 0, \quad (\text{III.4.25})$$

где $\phi(t)$ – угловое отклонение маятника от положения равновесия, $I = mR^2$, $V = mgR$, m и R – момент инерции, потенциал взаимодействия с

гравитационным полем Земли, масса и длина маятника, g – ускорение свободного падения. Перепишем уравнение (III.4.25) в следующем виде:

$$mR \frac{d^2(R\phi)}{dt^2} + mgR\sin(\phi) = 0. \quad (\text{III.4.26})$$

Разделим обе части уравнения (III.4.26) на R :

$$m \frac{d^2(R\phi)}{dt^2} + mg\sin(\phi) = 0. \quad (\text{III.4.27})$$

Получим уравнение для n -го маятника в цепочке связанных маятников (Рисунок III.4.1). Для этого добавим два члена, описывающих взаимодействие n -го маятника с соседними маятниками:

$$m_n \frac{d^2(R_n\phi_n)}{dt^2} + m_n g \sin(\phi_n) + f_{left} - f_{right} = 0. \quad (\text{III.4.28})$$

Здесь $f_{left} = K(R_n\phi_n - R_{n-1}\phi_{n-1})$ – сила, действующая на n -й маятник со стороны маятника, расположенного слева, а $f_{right} = K(R_{n+1}\phi_{n+1} - R_n\phi_n)$ – сила, действующая на n -й маятник со стороны маятника, расположенного справа.

K – коэффициент жесткости нити подвеса. Предполагается, что нить подвеса однородная, поэтому коэффициенты жесткости во всех ее частях одинаковы. Это предположение согласуется с тем фактом, что в ДНК роль нити подвеса играет сахаро-фосфатный остов, который является строго регулярной структурой. Таким образом, уравнение (III.4.28) может быть записано в виде:

$$m_n \frac{d^2(R_n\phi_n)}{dt^2} + m_n g \sin(\phi_n) + K(R_n\phi_n - R_{n-1}\phi_{n-1}) - K(R_{n+1}\phi_{n+1} - R_n\phi_n) = 0. \quad (\text{III.4.29})$$

После умножения обеих частей уравнения (III.4.29) на R_n получим:

$$m_n R_n^2 \frac{d^2\phi_n}{dt^2} + m_n g R_n \sin(\phi_n) + K R_n (R_n\phi_n - R_{n-1}\phi_{n-1}) - K R_n (R_{n+1}\phi_{n+1} - R_n\phi_n) = 0. \quad (\text{III.4.30})$$

Комбинируя два последних члена, получим уравнение, описывающее динамику угловых отклонений n -го маятника в цепочке связанных маятников, как механическом аналоге молекулы ДНК:

$$I_n \frac{d^2\phi_n}{dt^2} + V_n \sin(\phi_n) - K R_n (R_{n+1}\phi_{n+1} - 2R_n\phi_n + R_{n-1}\phi_{n-1}) = 0. \quad (\text{III.4.31})$$

Применяя уравнение (Ш.4.31) к описанию конформационной динамики молекулы ДНК предполагается, что ϕ_n – это угловое отклонение n -го основания от положения равновесия, I_n , V_n и R_n – это момент инерции, потенциал взаимодействия с комплиментарной цепочкой и расстояние от сахаро-фосфатного остова до центра масс n -го основания, соответственно, а K – коэффициент жесткости сахаро-фосфатного остова.

Для описания всей молекулы ДНК необходимо уравнение (Ш.4.31) применить к каждому основанию, то есть, необходимо рассматривать систему дифференциальных уравнений. Чтобы описывать конформационную динамику ДНК одним уравнением, необходимо перейти к континуальному пределу. Для этого предположим, что a – расстояние между соседними основаниями в рассматриваемой цепочке, а z_n – координата n -го основания. Тогда в континуальном приближении получим:

$$\begin{aligned}
 a &\rightarrow 0, \\
 z_n &\rightarrow z, \\
 \phi_n(t) \equiv \phi(z_n, t) &\rightarrow \phi(z, t), \\
 I_n \equiv I(z_n) &\rightarrow I(z), \\
 V_n \equiv V(z_n) &\rightarrow V(z), \\
 R_n \equiv R(z_n) &\rightarrow R(z),
 \end{aligned} \tag{Ш.4.32}$$

а уравнение (Ш.4.31) переписется следующим образом:

$$I(z) \frac{\partial^2 \phi(z, t)}{\partial t^2} + V(z) \sin(\phi(z, t)) - a^2 \frac{K'(z)}{R(z)} \frac{\partial^2 (R(z) \phi(z, t))}{\partial z^2} = 0. \tag{Ш.4.33}$$

Здесь $K'(z) = KR^2(z)$ – крутильная жесткость сахаро-фосфатного остова.

Уравнение (Ш.4.33) можно переписать в эквивалентной форме:

$$\begin{aligned}
 I(z) \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} - K'(z) a^2 \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} + V(z) \sin(\phi) - \\
 - \frac{K'(z) a^2}{R(z)} \left(2 \frac{\partial \phi}{\partial z} \frac{\partial R(z)}{\partial z} + \phi \frac{\partial^2 R(z)}{\partial z^2} \right) = 0.
 \end{aligned} \tag{Ш.4.34}$$

Можно видеть, что первые три члена уравнения (Ш.4.34) представляют левую часть уравнения СГ (Ш.4.1), рассмотренного ранее с коэффициентами, зависящими от координаты z . Остальная часть уравнения (Ш.4.34) – это новые

члены, которые естественным образом появились при учете неоднородной структуры ДНК. Очевидно, что если рассмотреть однородную последовательность нуклеотидов, когда динамические коэффициенты оснований I , V , R константы, то уравнение (III.4.34) сведется к однородному уравнению СГ.

Важным моментом в уравнении (III.4.34) является определение функциональной зависимости динамических коэффициентов оснований от координаты z . Потребуем, чтобы изменение коэффициентов между различными типами оснований происходило гладко с некоторым параметром, характеризующим гладкость этого изменения и таким, чтобы в пределе такое изменение переходило в скачкообразное, описываемое функцией Хэвисайда (θ -функцией). Очевидно, что такое изменение должно иметь сигмоидальный характер:

$$\begin{aligned}
 I(z) &= I_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{I_{\zeta} - I_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(z_{b_{\zeta-1}} - z\right)/\sigma\right)}, \\
 V(z) &= V_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{V_{\zeta} - V_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(z_{b_{\zeta-1}} - z\right)/\sigma\right)}, \\
 K'(z) &= K'_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{K'_{\zeta} - K'_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(z_{b_{\zeta-1}} - z\right)/\sigma\right)}, \\
 R(z) &= R_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{R_{\zeta} - R_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(z_{b_{\zeta-1}} - z\right)/\sigma\right)}.
 \end{aligned}
 \tag{III.4.35}$$

Здесь I_i — момент инерции i -го основания, V_i — эффективный потенциал взаимодействия с комплементарной цепочкой для i -го основания, K'_i — крутильная жесткость сахара-фосфатного остова для i -го основания, R_i — радиус i -го основания, n — число оснований в последовательности, z_{b_i} — координата i -го основания, σ — параметр, определяющий гладкость изменения значений коэффициентов для соседних оснований различного типа.

Учитывая диссипацию, окончательно получим:

$$I(z) \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} - K'(z) a^2 \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} + V(z) \sin(\phi) + \lambda(z) \frac{\partial \phi}{\partial t} - \frac{K'(z) a^2}{R(z)} \left(2 \frac{\partial \phi}{\partial z} \frac{\partial R(z)}{\partial z} + \phi \frac{\partial^2 R(z)}{\partial z^2} \right) = 0. \quad (\text{III.4.36})$$

$$I(z) = I_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{I_{\zeta} - I_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(z_{b_{\zeta-1}} - z\right)/\sigma\right)},$$

$$V(z) = V_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{V_{\zeta} - V_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(z_{b_{\zeta-1}} - z\right)/\sigma\right)},$$

$$K'(z) = K'_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{K'_{\zeta} - K'_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(z_{b_{\zeta-1}} - z\right)/\sigma\right)}, \quad (\text{III.4.37})$$

$$R(z) = R_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{R_{\zeta} - R_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(z_{b_{\zeta-1}} - z\right)/\sigma\right)},$$

$$\lambda(z) = \lambda_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{\lambda_{\zeta} - \lambda_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(z_{b_{\zeta-1}} - z\right)/\sigma\right)},$$

где $\lambda(z)$ – коэффициент трения, зависящий от координаты z , а λ_i – коэффициент трения i -го основания. Заметим, что в однородном случае, когда коэффициенты I, V, K', R и λ – константы, четвертый член уравнения (III.4.36) становится равным нулю, в результате новое уравнение сводится к классическому уравнению СГ (III.4.1) при $\lambda = 0$, или к уравнению СГ с диссипацией (III.4.18) при $\lambda \neq 0$.

Таким образом, уравнение (III.4.36) и формулы (III.4.37) представляют новую модель, которая описывает динамику открытого состояния в молекуле ДНК с учетом ее неоднородной структуры и влияния окружающей среды.

III.4.3.2 Проверка модели на искусственной последовательности

Проверка адекватности модели проводилась на искусственной последовательности, состоящей из трех однородных участков $poly(A)$, $poly(T)$ и $poly(G)$ (Рисунок III.4.12). Использование последовательностей, состоящих из

набора однородных участков, является удобным и эффективным подходом для изучения динамических свойств неоднородной молекулы ДНК, так как любую неоднородную последовательность можно разбить на смежные однородные участки разной длины. Это позволяет сократить количество членов в суммах в формулах для динамических коэффициентов оснований (III.4.37). В результате, индексы ζ при динамических коэффициентах будут нумеровать последовательно идущие друг за другом однородные участки, n будет соответствовать полному числу однородных участков в последовательности, а z_{b_ζ} будут соответствовать границам между смежными однородными участками. Таким образом, рассматриваемая последовательность очевидным образом разбивается на три однородных участка по построению, при этом $\zeta = 1, 2, 3$, а $n = 3$.

AAAAAAAAA...A
TTTTTTTTTTT...T
GGGGGG...G

Рисунок III.4.12. Искусственная последовательность, состоящая из трех однородных участков $poly(A)$, $poly(T)$ и $poly(G)$.

Для полной постановки задачи необходимо задать начальные и граничные условия. Предположим, что в начальный момент времени $t = 0$ решение уравнения (III.4.36) имеет форму кинка, соответствующего решению однородного уравнения СГ, который помещен в точку z_0 на первом однородном участке и имеет скорость v_0 . Таким образом, начальные условия могут быть записаны в виде:

$$\begin{aligned}
 \phi(z, 0) &= 4 \arctan \left(\exp \left(\frac{\gamma_1}{d_1} (z - z_0) \right) \right), \\
 \phi_t(z, 0) &= -2v_0 \frac{\gamma_1/d_1}{\cosh \left(\frac{\gamma_1}{d_1} (z - z_0) \right)},
 \end{aligned}
 \tag{III.4.38}$$

где $\gamma_1 = \sqrt{1 - (v_0/c_{0,1})^2}$, $c_{0,1} = \sqrt{K'_1 a^2 / I_1}$ – скорость звука в ДНК на первом участке последовательности, $d_1 = \sqrt{K'_1 a^2 / V_1}$ – размер кинка на первом участке последовательности.

Предполагая, что z_0 находится далеко от левого и правого концов рассматриваемой последовательности, тогда граничные условия могут быть аппроксимированы и записаны в виде:

$$\phi(Z_L, t) = 0, \quad \phi(Z_R, t) = 2\pi, \quad (\text{III.4.39})$$

где Z_L и Z_R – координаты левого и правого концов последовательности, соответственно.

Для увеличения стабильности процедуры численного интегрирования уравнения (III.4.36) приведем его к безразмерному виду. Для этого перейдем к безразмерным переменным (z', t') следующим образом:

$$\begin{aligned} t \rightarrow t' = \mu t, \quad z \rightarrow z' = \nu z, \\ \mu = \sqrt{V_1 / I_1}, \quad \nu = \sqrt{V_1 / (K'_1 a^2)}, \end{aligned} \quad (\text{III.4.40})$$

где I_1 , V_1 и K'_1 – момент инерции оснований, потенциал взаимодействия оснований с комплементарной цепочкой и крутильная жесткость сахарофосфатного остова последовательности на первом участке, соответственно. В результате уравнение (III.4.36) и формулы (III.4.37) примут вид:

$$\begin{aligned} \tilde{I}(z') \frac{\partial^2 \phi}{\partial t'^2} - \tilde{K}'(z') \frac{\partial^2 \phi}{\partial z'^2} + \tilde{V}(z') \sin(\phi) + \tilde{\lambda}(z') \frac{\partial \phi}{\partial t'} - \\ - \frac{\tilde{K}'(z')}{\tilde{R}(z')} \left(2 \frac{\partial \phi}{\partial z'} \frac{\partial \tilde{R}(z')}{\partial z'} + \phi \frac{\partial^2 \tilde{R}(z')}{\partial z'^2} \right) = 0. \end{aligned} \quad (\text{III.4.41})$$

$$\begin{aligned} \tilde{I}(z') &= 1 + \frac{1}{I_1} \sum_{\zeta=2}^n \frac{I_\zeta - I_{\zeta-1}}{1 + \exp((z' b_{\zeta-1} - z') / \sigma')}, \\ \tilde{V}(z') &= 1 + \frac{1}{V_1} \sum_{\zeta=2}^n \frac{V_\zeta - V_{\zeta-1}}{1 + \exp((z' b_{\zeta-1} - z') / \sigma')}, \\ \tilde{K}'(z') &= 1 + \frac{1}{K'_1} \sum_{\zeta=2}^n \frac{K'_\zeta - K'_{\zeta-1}}{1 + \exp((z' b_{\zeta-1} - z') / \sigma')}, \end{aligned} \quad (\text{III.4.42})$$

$$\begin{aligned}\tilde{R}(z') &= 1 + \frac{1}{R_1} \sum_{\zeta=2}^n \frac{R_{\zeta} - R_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\frac{(z'_{b_{\zeta-1}} - z')}{\sigma'}\right)}, \\ \tilde{\lambda}(z') &= \frac{\lambda_1}{\sqrt{V_1 I_1}} + \frac{1}{\sqrt{V_1 I_1}} \sum_{\zeta=2}^n \frac{\lambda_{\zeta} - \lambda_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\frac{(z'_{b_{\zeta-1}} - z')}{\sigma'}\right)},\end{aligned}$$

Где $z'_{b_{\zeta-1}}$ – безразмерная координата $\zeta - 1$ границы между однородными участками, $\sigma' = \nu\sigma$ – безразмерный параметр сигмоиды. При вычислениях он был равен $\sigma' = 0.7$.

Для удобства перепишем уравнение (III.4.41) в следующем виде:

$$\frac{\partial^2 \phi}{\partial t'^2} + \tilde{\gamma}(z') \frac{\partial \phi}{\partial t'} - \tilde{\beta}(z') \frac{\partial^2 \phi}{\partial z'^2} - \tilde{\varepsilon}(z') \frac{\partial \phi}{\partial z'} + \tilde{\alpha}(z') \sin(\phi) - \tilde{\delta}(z') \phi = 0, \quad (\text{III.4.43})$$

где

$$\begin{aligned}\tilde{\alpha}(z') &= \frac{\tilde{V}(z')}{\tilde{I}(z')}, \quad \tilde{\beta}(z') = \frac{\tilde{K}'(z')}{\tilde{I}(z')}, \quad \tilde{\gamma}(z') = \frac{\tilde{\lambda}(z')}{\tilde{I}(z')}, \\ \tilde{\varepsilon}(z') &= 2 \frac{\tilde{K}'(z')}{\tilde{I}(z') \tilde{R}(z')} \frac{\partial \tilde{R}}{\partial z'}, \quad \tilde{\delta}(z') = \frac{\tilde{K}'(z')}{\tilde{I}(z') \tilde{R}(z')} \frac{\partial^2 \tilde{R}}{\partial z'^2}.\end{aligned} \quad (\text{III.4.44})$$

Для численного решения уравнения (III.4.43) будем использовать равномерную сетку интегрирования с постоянными безразмерными шагами по координате h и по времени τ :

$$\begin{aligned}t' &= \tau i = 0, \dots, T', \quad i = 0, \dots, N_t, \\ z' &= Z'_L + hj = Z'_L, \dots, Z'_R, \quad j = 0, \dots, N_z.\end{aligned} \quad (\text{III.4.45})$$

Здесь T' – полное безразмерное время, в пределах которого моделируется динамика ДНК, а Z'_L и Z'_R – безразмерные координаты левого и правого концов последовательности, соответственно. Взаимосвязь между безразмерными и размерными параметрами, следующая:

$$\begin{aligned}\tau &= \mu \Delta t, \quad T' = \mu T, \\ h &= \nu \Delta z, \quad Z'_L = \nu Z_L, \quad Z'_R = \nu Z_R.\end{aligned} \quad (\text{III.4.46})$$

Приближенные значения искомой функции $\phi(z_j, t_i)$ в узлах сетки интегрирования определяются значениями сеточной функции $\tilde{\phi}_j^i$, которая, в свою очередь, является решением следующих разностных уравнений:

$$\begin{aligned}
b_1 \tilde{\phi}_1^{i+1} + c_1 \tilde{\phi}_2^{i+1} &= (1-\theta) \left(\frac{\tau}{h} \right)^2 (\tilde{\beta}_1 + \tilde{\varepsilon}_1 h) \tilde{\phi}_2^i - \tilde{\phi}_1^{i-1} + \\
&+ \left(2 + \tilde{\gamma}_1 \tau - (1-\theta) \left(\frac{\tau}{h} \right)^2 (2\tilde{\beta}_1 + \tilde{\varepsilon}_1 h) \right) \tilde{\phi}_1^i - \\
&- \tau^2 (\tilde{\alpha}_1 \sin(\tilde{\phi}_1^i) - \tilde{\delta}_1 \tilde{\phi}_1^i) + \tilde{\beta}_1 \left(\frac{\tau}{h} \right)^2 \times \\
&\times (\tilde{\Phi}_0(t'_i) + \theta(\tilde{\Phi}_0(t'_{i+1}) - \tilde{\Phi}_0(t'_i))) \equiv p_1^i, \\
&i = 1, \dots, N_t - 1, \quad j = 1,
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
a_j \tilde{\phi}_{j-1}^{i+1} + b_j \tilde{\phi}_j^{i+1} + c_j \tilde{\phi}_{j+1}^{i+1} &= (1-\theta) \left(\frac{\tau}{h} \right)^2 (\tilde{\beta}_j (\tilde{\phi}_{j+1}^i + \tilde{\phi}_{j-1}^i) + \tilde{\varepsilon}_j h \tilde{\phi}_{j+1}^i) - \\
&- \tilde{\phi}_j^{i-1} + \left(2 + \tilde{\gamma}_j \tau - (1-\theta) \left(\frac{\tau}{h} \right)^2 (2\tilde{\beta}_j + \tilde{\varepsilon}_j h) \right) \tilde{\phi}_j^i - \quad (\text{III.4.47}) \\
&- \tau^2 (\tilde{\alpha}_j \sin(\tilde{\phi}_j^i) - \tilde{\delta}_j \tilde{\phi}_j^i) \equiv p_j^i, \\
&i = 1, \dots, N_t - 1, \quad j = 2, \dots, N_z - 2,
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
a_{N_z-1} \tilde{\phi}_{N_z-2}^{i+1} + b_{N_z-1} \tilde{\phi}_{N_z-1}^{i+1} &= (1-\theta) \left(\frac{\tau}{h} \right)^2 \tilde{\beta}_{N_z-1} \tilde{\phi}_{N_z-2}^i - \tilde{\phi}_{N_z-1}^{i-1} + \\
&+ \left(2 + \tilde{\gamma}_{N_z-1} \tau - (1-\theta) \left(\frac{\tau}{h} \right)^2 (2\tilde{\beta}_{N_z-1} + \tilde{\varepsilon}_{N_z-1} h) \right) \tilde{\phi}_{N_z-1}^i - \\
&- \tau^2 (\tilde{\alpha}_{N_z-1} \sin(\tilde{\phi}_{N_z-1}^i) - \tilde{\delta}_{N_z-1} \tilde{\phi}_{N_z-1}^i) + (\tilde{\beta}_{N_z-1} + \tilde{\varepsilon}_{N_z-1} h) \left(\frac{\tau}{h} \right)^2 \times \\
&\times (\tilde{\Phi}_{N_z}(t'_i) + \theta(\tilde{\Phi}_{N_z}(t'_{i+1}) - \tilde{\Phi}_{N_z}(t'_i))) \equiv p_{N_z-1}^i, \\
&i = 1, \dots, N_t - 1, \quad j = N_z - 1,
\end{aligned}$$

где θ – параметр численной схемы интегрирования, а коэффициенты a_j , b_j , c_j , $\tilde{\alpha}_j$, $\tilde{\beta}_j$, $\tilde{\gamma}_j$, $\tilde{\varepsilon}_j$ и $\tilde{\delta}_j$ определяются следующими формулами:

$$a_j = \begin{cases} 0, & j = 1, \\ -\theta \left(\frac{\tau}{h} \right)^2 \tilde{\beta}_j, & j > 1, \end{cases}$$

$$b_j = 1 + \tilde{\gamma}_j \tau + \theta \left(\frac{\tau}{h} \right)^2 (2\tilde{\beta}_j + \tilde{\varepsilon}_j h), \quad j = 1, \dots, N_z - 1, \quad (\text{III.4.48})$$

$$c_j = \begin{cases} -\theta \left(\frac{\tau}{h} \right)^2 (\tilde{\beta}_j + \tilde{\varepsilon}_j h), & j < N_z - 1, \\ 0, & j = N_z - 1, \end{cases}$$

$$\begin{aligned} \tilde{\alpha}_j &= \tilde{\alpha}(z'_j), \quad \tilde{\beta}_j = \tilde{\beta}(z'_j), \quad \tilde{\gamma}_j = \tilde{\gamma}(z'_j), \\ \tilde{\varepsilon}_j &= \tilde{\varepsilon}(z'_j), \quad \tilde{\delta}_j = \tilde{\delta}(z'_j), \quad j = 0 \dots N_z. \end{aligned}$$

Для начальных и граничных условий имеем:

$$\begin{aligned} \tilde{\phi}_j^0 &= 4 \arctan(\exp(\gamma_1 z'_j)), \\ \tilde{\phi}_j^1 &= \tilde{\phi}_j^0 - 2\nu_0 \frac{\gamma_1/d_1}{\cosh(\gamma_1 z'_j)} \frac{\tau}{\mu}, \\ \tilde{\Phi}_0(t'_i) &= 0, \quad \tilde{\Phi}_{N_z}(t'_i) = 2\pi, \quad i = 0, \dots, N_t. \end{aligned} \tag{III.4.49}$$

Уравнения (III.4.47) представляют собой линейные алгебраические уравнения с трех-диагональной матрицей коэффициентов. Для их решения можно использовать метод прогонки:

$$\begin{aligned} \tilde{\phi}_{N_z-1}^{i+1} &= \frac{p_{N_z-1}^i - a_{N_z-1} \omega_{N_z-1}^i}{a_{N_z-1} \xi_{N_z-1} + b_{N_z-1}}, \quad j = N_z - 1, \\ \tilde{\phi}_j^{i+1} &= \xi_{j+1} \tilde{\phi}_{j+1}^{i+1} + \omega_{j+1}^i, \quad j = N_z - 2, \dots, 1, \end{aligned} \tag{III.4.50}$$

где прогоночные коэффициенты имеют вид:

$$\begin{aligned} \xi_2 &= -\frac{c_1}{b_1}, \quad \omega_2^i = \frac{p_1^i}{b_1}, \quad j = 1, \\ \xi_{j+1} &= -\frac{c_j}{a_j \xi_j + b_j}, \quad \omega_{j+1}^i = \frac{p_j^i - a_j \omega_j^i}{a_j \xi_j + b_j}, \quad j = 2, \dots, N_z - 2. \end{aligned} \tag{III.4.51}$$

Сначала был рассмотрен случай без диссипации. Результат численного решения уравнения (III.4.36) при условии, что $\lambda(z) = 0$, показан на рисунке III.4.13a. Кинк, при заданной начальной энергии, двигаясь вдоль участка $poly(A)$, достигал границы с участком $poly(T)$, преодолевал ее и с увеличенной скоростью продолжал движение вдоль участка $poly(T)$. Достигнув границы с участком $poly(G)$, кинк отражался и начинал двигаться в обратном направлении. Достигнув границы с участком $poly(A)$, кинк снижал скорость движения и продолжал движение вдоль участка $poly(A)$ в направлении обратном первоначальному.

Для более наглядного представления динамики кинка в ДНК использовали проекцию $\partial\phi/\partial z$ на плоскость (z, t) . Этот метод назвали методом траекторий. Он позволяет отслеживать направление движения кинка вдоль ДНК и изменение его скорости. На рисунке III.4.13б показана траектория кинка,двигающегося вдоль исследуемой последовательности в случае отсутствия диссипации. Видно, что если двигаться по траектории в сторону увеличения времени, то траектория будет показывать направление движение кинка, а изменение ее угла наклона к прямой, параллельной оси времени, изменение скорости кинка. Учет диссипативного влияния среды на динамику кинка приводит к постепенному снижению скорости его движения со временем, что при помощи метода траекторий можно видеть, как плавный изгиб траектории (Рисунок III.4.13в).

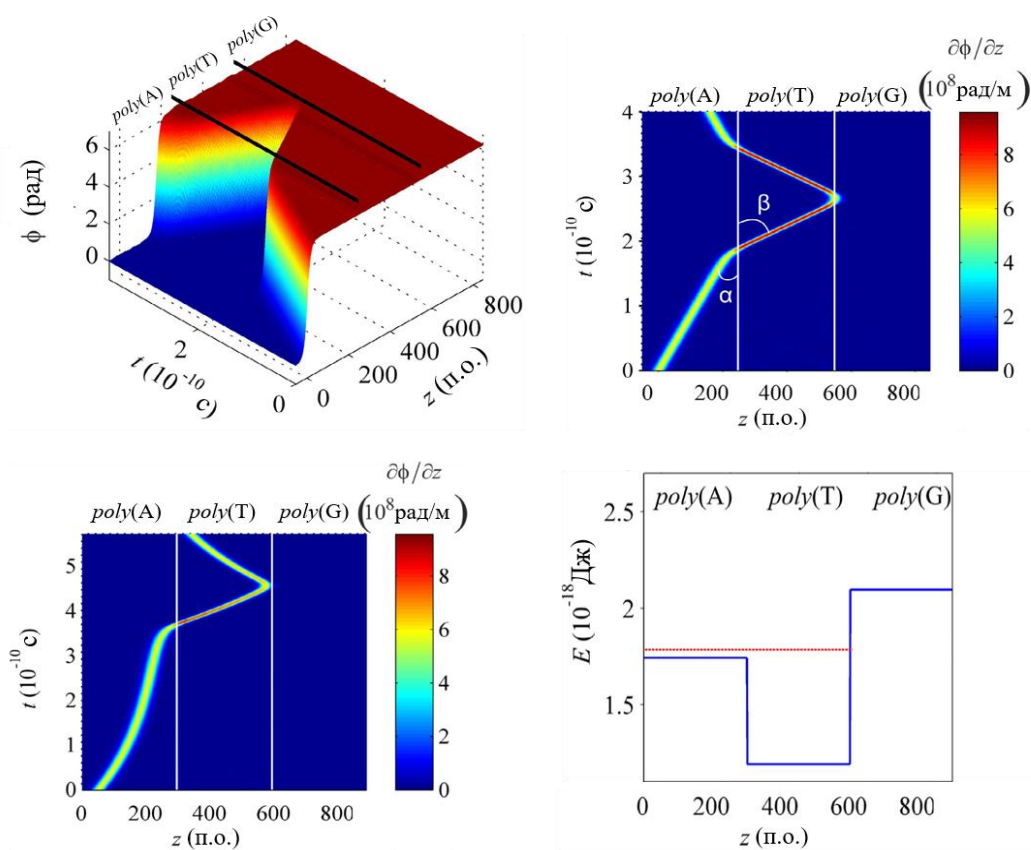


Рисунок III.4.13. Движение кинка в искусственной последовательности, состоящей из трех однородных участков $poly(A)$, $poly(T)$ и $poly(G)$. (a) – трехмерное изображение движения кинка без учета диссипации. Жирные черные

прямые линии обозначают границы между однородными участками. (б) – траектория кинка без учета диссипации как проекция $\partial\phi/\partial z$ на плоскость (z, t) . (в) – траектория кинка с учетом диссипации как проекция $\partial\phi/\partial z$ на плоскость (z, t) . Белые вертикальные линии обозначают границы между однородными участками. (г) – энергетический профиль последовательности (синяя линия) и начальная энергия кинка (красная линия).

Полученные траектории согласуются с энергетическим профилем исследуемой последовательности (Рисунок III.4.13г), который представляет собой чередование ям и барьеров. Для получения энергетического профиля использовалась следующая формула:

$$E_0(z) = 8\sqrt{V(z)K'(z)}. \quad (\text{III.4.52})$$

Эта формула описывает энергию активации кинка в последовательности в положении, характеризуемом координатой z .

Согласно полученным траекториям, движение кинка вдоль участка $poly(T)$ происходило с увеличенной скоростью, так как этот участок соответствует энергетической яме. Затем кинк отражался от следующей границы, так как, даже без учета диссипации, его полной энергии, определяемой начальной энергией, было недостаточно для преодоления энергетического барьера, формируемого участком $poly(G)$.

Полученная модель снимает ограничения, связанные с нефизическим поведением кинка в искусственных последовательностях в рамках старой модели, основанной на использовании классического уравнения СГ (III.4.1). В рамках старой модели было показано (Таблица III.1.3), что в последовательности $poly(A)-poly(C)$ кинк, двигаясь из участка $poly(A)$, отражался от границы с участком $poly(C)$, хотя его начальной скорости ($v = 400 \text{ м/с}$) и, соответственно, энергии было достаточно чтобы преодолеть границу и двигаться по участку

$poly(C)$ с большей скоростью, чем по участку $poly(A)$, так, как это происходит при движении кинка из $poly(A)$ в $poly(T)$.

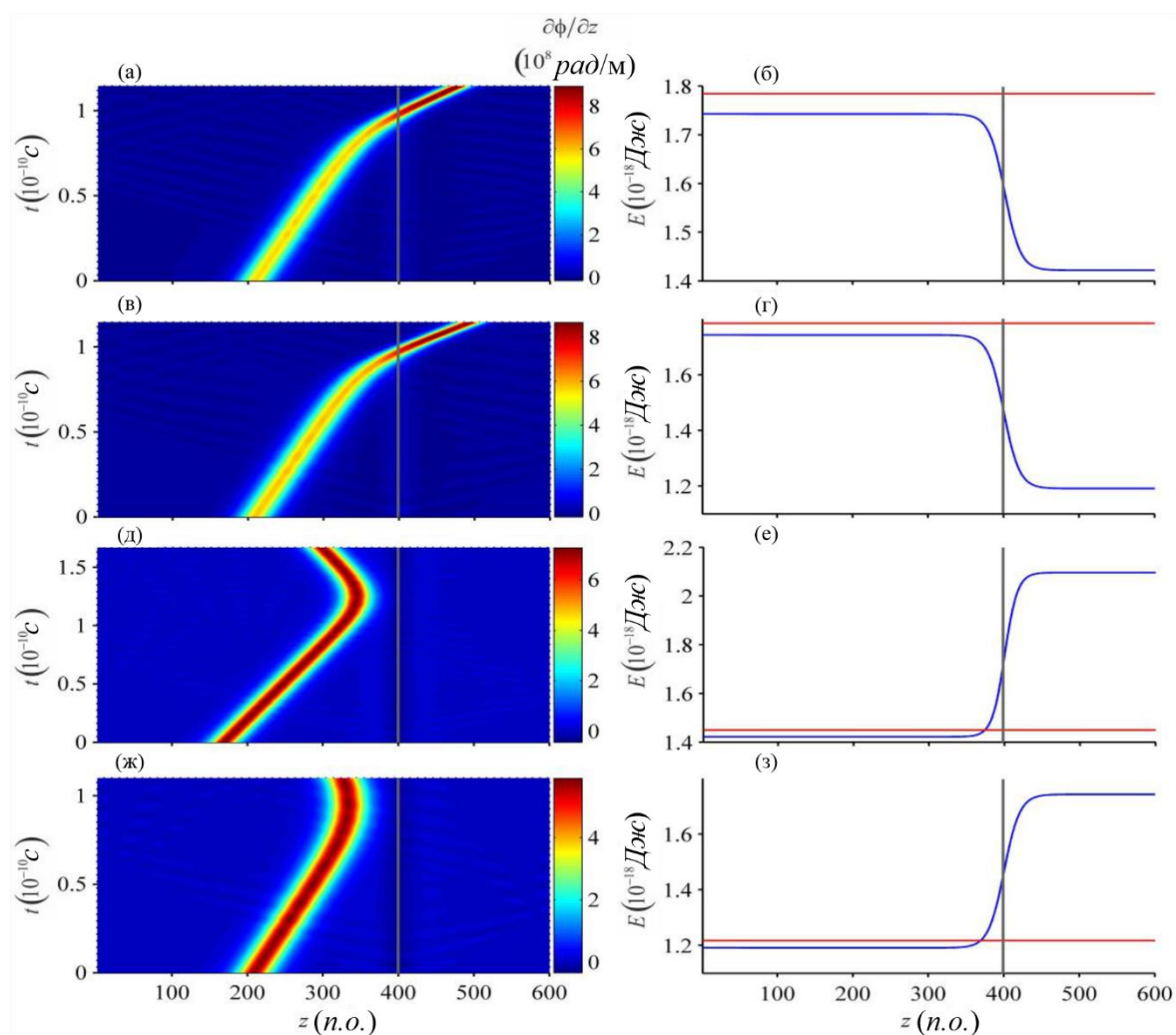


Рисунок Ш.4.14. Слева – траектории кинков, распространяющихся в искусственных последовательностях: (а) $poly(A) - poly(C)$, (в) $poly(A) - poly(T)$, (д) $poly(C) - poly(G)$, (ж) $poly(T) - poly(A)$. Справа – потенциальные энергии профилей последовательностей (синие кривые) и полные (красные кривые) энергии кинков: (б), (г), (е), (з). Начальная скорость кинков $v = 400$ м/с. Вертикальные серые линии – границы между однородными участками.

В новой модели кинк демонстрирует правильную динамику (Рисунок Ш.4.14а,в), которая соответствует полной энергии кинка и энергетическим профилям рассматриваемых последовательностей (Рисунок Ш.4.14б,г).

Обратная ситуация возникала, когда кинк двигался из *poly(T)* в *poly(A)* или из *poly(C)* в *poly(G)*. В этом случае в старой модели кинк преодолевал границу, продолжая двигаться по второму участку с меньшей скоростью чем по первому (Таблица III.1.3). Такое поведение имело нефизический характер, так как кинк должен был отразиться от границы. В новой модели кинк отражается от границы (Рисунок III.4.14д,ж) в соответствии со своей полной энергией и энергетическими профилями рассматриваемых последовательностей (Рисунок III.4.14е,з).

Таким образом, показано, что новая модель адекватно описывает динамику кинка, которая зависит от начальной энергии (скорости) кинка, от расположения однородных участков в последовательности, и от действия диссипативных сил. Кроме того, новая модель снимает принципиальные ограничения описания нелинейной конформационной динамики в молекуле ДНК на основе классического уравнения СГ.

III.4.4 *Эффекты на границе*

III.4.4.1 *Зигзагообразное возмущение на границе*

При исследовании искусственных последовательностей ДНК с использованием предложенной новой математической модели был обнаружен интересный динамический эффект, обусловленный неоднородностью структуры молекулы. Было выявлено стационарное зигзагообразное возмущение на границе, разделяющей однородные участки на примере последовательности, состоящей из двух однородных участков *poly(A)* и *poly(C)* (Рисунок III.4.15а).

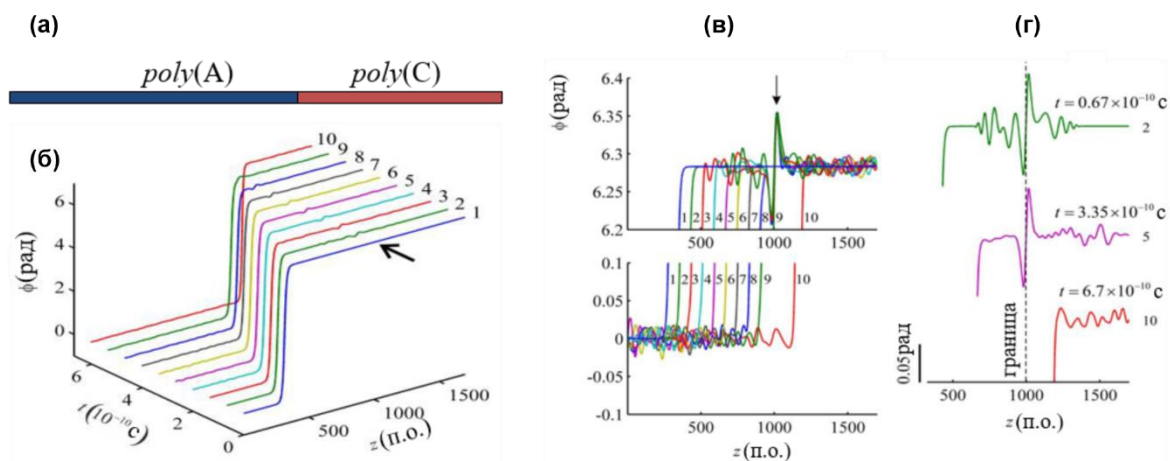


Рисунок III.4.15. Динамика кинка в последовательности *poly(A)-poly(C)*. (а) – последовательность *poly(A)-poly(C)*. (б) – трехмерный график движения кинка вдоль последовательности, представленный в виде временных срезов (кривые 1, ..., 10). (в) – верхние и нижние части временных срезов движущегося кинка. (г) – верхние части трех временных срезов, показывающие прохождение кинка через границу. Черные стрелки указывают на зигзагообразное возмущение на границе.

Для наблюдения за возмущением были сделаны временные срезы профиля кинка в ДНК с интервалом $\Delta t \approx 0.67 \times 10^{-10}$ с. Возмущение имело малую (Рисунок III.4.15б), но хорошо выраженную (Рисунок III.4.15в) амплитуду углового отклонения оснований на границе между однородными участками. Оно формировалось только для тех оснований, которые расположены за кинком по ходу его движения и были повернуты на угол 2π по отношению к основаниям перед кинком. Это видно на рисунке III.4.15в,г, где в верхней части профиля кинка, основания которой повернуты на угол 2π , наблюдаются зигзагообразные возмущения на временных срезах в окрестности границы между однородными участками, а в нижней части, где угол оснований соответствует нулевому значению, таких возмущений нет даже в окрестности границы. Об этом свидетельствует 10-й временной срез, где возмущение в нижней части профиля кинка в окрестности границы отсутствует (Рисунок III.4.15б,г), там основания имеют нулевой угол. Заметим, что на 1-м временном срезе возмущение

отсутствует из-за начальных условий (Рисунок III.4.15б). В качестве начального условия задавался кинк (III.4.49), в котором не было возмущения. Для наглядности на рисунке III.4.16 представлены движущийся вдоль цепочки связанных маятников кинк и стационарное зигзагообразное возмущение на границе раздела участков, соответствующих разным типам маятников, которые моделируют разные типы оснований молекулы ДНК. Кроме зигзагообразного возмущения на верхней и нижней частях профиля кинка наблюдались небольшие флуктуации, которые, предположительно, обусловлены недостатками численного интегрирования, связанные с выбором шагов интегрирования. Увеличение расстояния между 9-м и 10-м временными срезами профиля кинка соответствует увеличению скорости движения кинка на 2-м однородном участке ДНК.

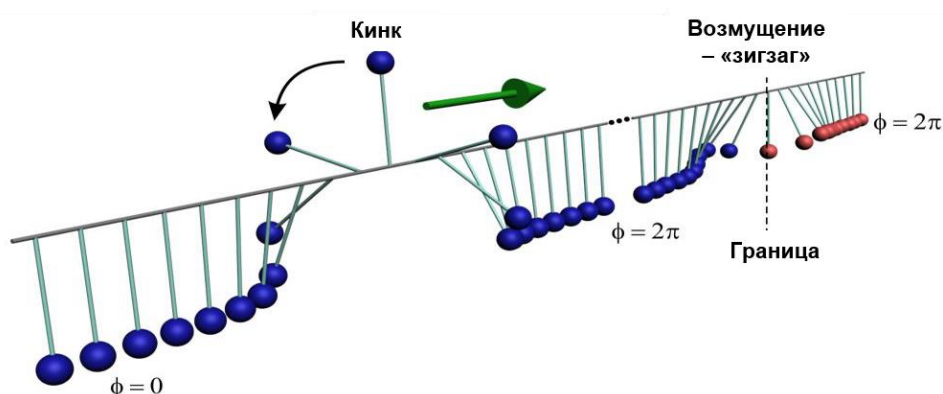


Рисунок III.4.16. Маятниковая модель движения кинка вдоль неоднородной молекулы ДНК, состоящей из двух однородных участков. Цвет шариков обозначает разный тип оснований. Зеленая стрелка указывает направление движения кинка вдоль ДНК, а черная – направление вращения оснований.

Изменение параметра σ , определяющего степень сглаженности перехода между значениями динамических параметров оснований разного типа, показало увеличение амплитуды зигзагообразного возмущения при уменьшении σ и наоборот, уменьшение амплитуды возмущения при увеличении этого параметра (Рисунок III.4.17).

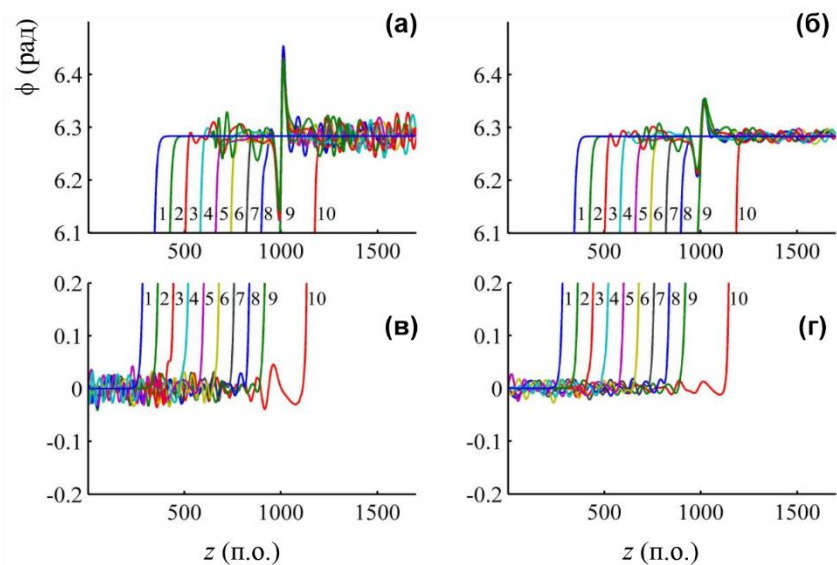


Рисунок III.4.17. Проекция на плоскость (z, ϕ) верхних (а), (б) и нижних (в), (г) частей профилей кинка вычисленные для двух значений параметра σ : $\sigma = 0.5$ (а), (в) и $\sigma = 1$ (б), (г). Начальная скорость кинка $v = 400$ м/с.

Также следует отметить, что зигзагообразное возмущение не симметрично относительно границы. Было показано, что при смене направления движения кинка – из $poly(A)$ в $poly(C)$ на противоположное – из $poly(C)$ в $poly(A)$, возмущение менялось зеркально (Рисунок III.4.18).

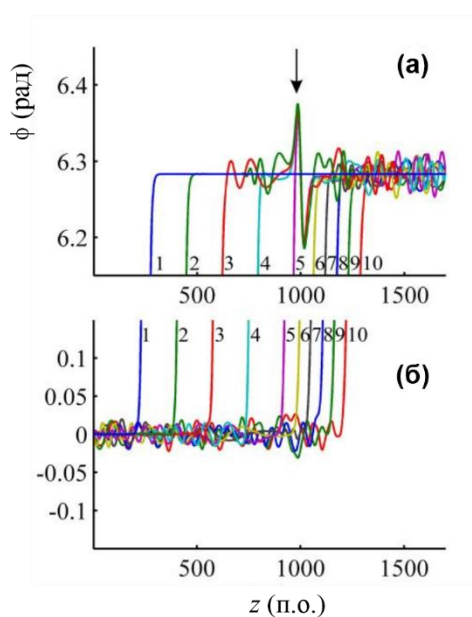


Рисунок Ш.4.18. Проекция на плоскость (z, ϕ) верхних (а) и нижних (б) частей профилей кинка распространяющегося в искусственной последовательности ДНК $poly(C) - poly(A)$. Начальная скорость кинка $v = 1200$ м/с, $\sigma = 1$. Черная стрелка указывает на зигзагообразное возмущение на границе.

Ш.4.4.2 Изменение плотности энергии кинка в окрестности границы

Представленные выше результаты позволяют предположить, что плотность энергии кинка в ДНК меняется на границе, разделяющей однородные области с разными типами оснований. Для проверки этой гипотезы были построены Лагранжиан и Гамильтониан для уравнения новой модели (Ш.4.36). Для демонстрации того, что Лагранжианы и Гамильтонианы могут иметь различную, но эквивалентную, с точки зрения уравнения движения, форму, использовалось два подхода для вывода их математических выражений.

Ш.4.4.2.1 Вывод из теории твердого тела

Запишем сначала Лагранжиан и Гамильтониан для дискретного уравнения (Ш.4.31):

$$\begin{aligned} L &= \sum_n \left[\frac{I_n \left(\frac{d\phi_n}{dt} \right)^2}{2} - V_n (1 - \cos(\phi_n)) + \frac{K(R_n \phi_n - R_{n-1} \phi_{n-1})^2}{2} \right], \\ H &= \sum_n \left[\frac{I_n \left(\frac{d\phi_n}{dt} \right)^2}{2} + V_n (1 - \cos(\phi_n)) + \frac{K(R_n \phi_n - R_{n-1} \phi_{n-1})^2}{2} \right]. \end{aligned} \quad (\text{Ш.4.53})$$

Переходя к континуальному приближению, получаем:

$$\begin{aligned} L &= \int \left[\frac{I(z)}{2} \left(\frac{\partial \phi}{\partial t} \right)^2 - V(z) (1 - \cos \phi) - \frac{K a^2}{2} \left(\frac{\partial (R(z) \phi)}{\partial z} \right)^2 \right] \frac{dz}{a}, \\ H &= \int \left[\frac{I(z)}{2} \left(\frac{\partial \phi}{\partial t} \right)^2 + V(z) (1 - \cos \phi) + \frac{K a^2}{2} \left(\frac{\partial (R(z) \phi)}{\partial z} \right)^2 \right] \frac{dz}{a}. \end{aligned} \quad (\text{Ш.4.54})$$

Плотность Лагранжиана и плотность Гамильтониана (плотность энергии) можно записать в виде:

$$\rho_L = \frac{I(z)}{2} \left(\frac{\partial \phi}{\partial t} \right)^2 - V(z)(1 - \cos \phi) - \frac{KR^2(z)a^2}{2} \left(\frac{\partial \phi}{\partial z} \right)^2 - , \quad (\text{III.4.55})$$

$$- \frac{Ka^2}{2} \left(\phi^2 \left(\frac{\partial R}{\partial z} \right)^2 + \phi \frac{\partial \phi}{\partial z} \frac{d^2(R^2)}{dz^2} \right),$$

$$\rho_H = \frac{I(z)}{2} \left(\frac{\partial \phi}{\partial t} \right)^2 + V(z)(1 - \cos \phi) + \frac{KR^2(z)a^2}{2} \left(\frac{\partial \phi}{\partial z} \right)^2 + , \quad (\text{III.4.56})$$

$$+ \frac{Ka^2}{2} \left(\phi^2 \left(\frac{\partial R}{\partial z} \right)^2 + \phi \frac{\partial \phi}{\partial z} \frac{d^2(R^2)}{dz^2} \right).$$

Формулы (III.4.55) и (III.4.56) состоят из двух частей. Первая часть содержит первые три слагаемых и соответствует уравнению старой модели (III.4.1). Вторая часть (четвертое слагаемое) соответствует четвертому слагаемому в уравнении новой модели (III.4.36). Эта часть обусловлена корректным учетом гетерогенной природы последовательности нуклеотидов в ДНК.

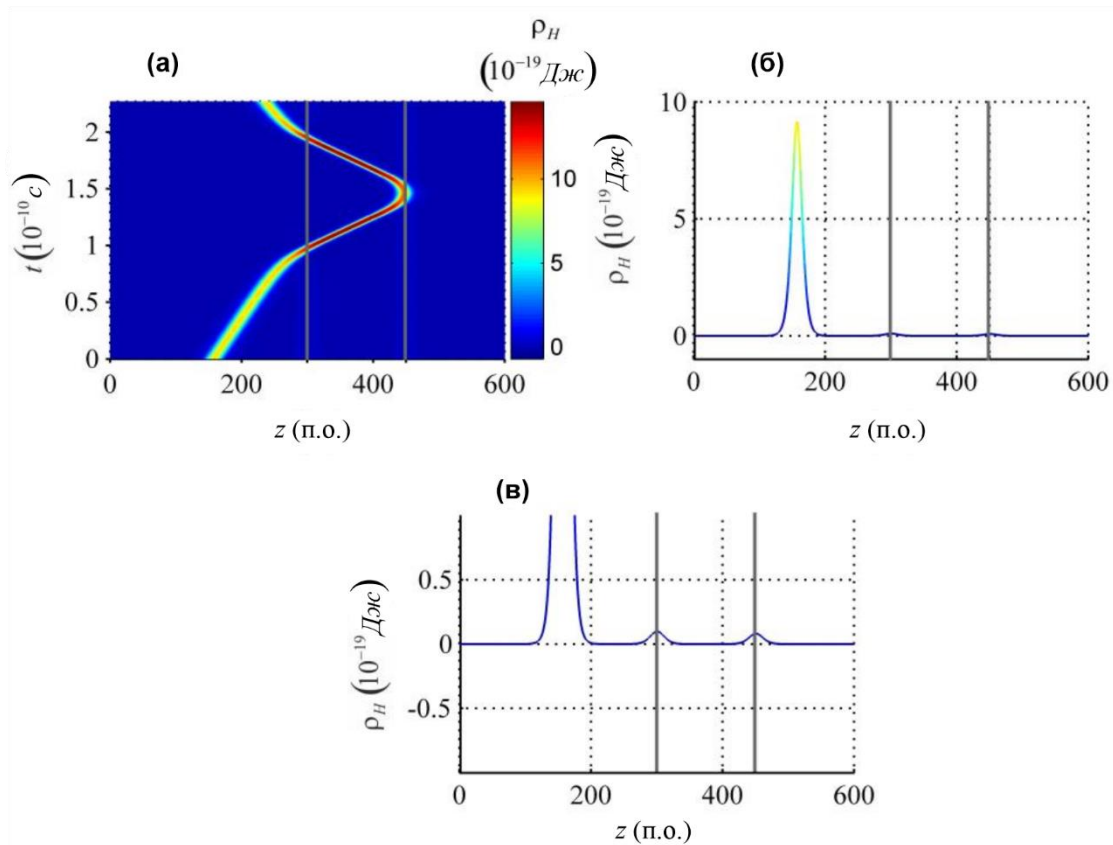


Рисунок III.4.19. Проекция плотности энергии кинка $\rho_H(z, t)$ на плоскость (z, t) (а) и на плоскость (z, ρ_H) (б) в узком временном интервале $t = [0, 2.27]$ (10^{-15} с) вблизи точки старта движения кинка. Аналогичная проекция на плоскость $(z,$

ρ_H), но в увеличенном масштабе (в). Начальная скорость кинка $v = 400$ м/с. Вертикальные серые сплошные линии обозначают границы между однородными областями.

На рисунке III.4.19 показаны результаты вычисления плотности энергии для последовательности, состоящей из трех однородных участков: $poly(A)$, $poly(C)$ и $poly(G)$. Длина первого участка – 300 п.о., второго и третьего по 150 п.о. Проекция плотности энергии кинка на плоскости (z, t) и (z, ρ_H) представлены на рисунке III.4.19а,б. Видно, что малые колоколообразные возмущения плотности энергии кинка формируются на границах между однородными участками. В увеличенном масштабе эти возмущения видны более четко (Рисунок III.4.19в).

III.4.4.2.2 Вывод из теории поля

В формализме теории поля уравнения движения получают из Лагранжиана следующим образом:

$$\partial_\mu \left(\frac{\partial L}{\partial (\partial_\mu \phi)} \right) - \frac{\partial L}{\partial \phi} = 0, \quad (\text{III.4.57})$$

где $\partial_\mu = (\partial_t, \partial_z)$, (z, t) – 2-мерное (в рассматриваемом случае) пространство-время, а суммирование идет по повторяющимся индексам. Приведем подобные в (III.4.36) по производным от ϕ :

$$I \partial_{tt} \phi - a^2 K' \partial_{zz} \phi - 2a^2 \frac{K'}{R} \partial_z R \partial_z \phi + V \sin \phi - a^2 \frac{K'}{R} \partial_{zz} (R) \phi = 0. \quad (\text{III.4.58})$$

Внесем коэффициенты, которые зависят от z , под знак первой производной в выражении $I(z) \partial_{tt} \phi - a^2 K'(z) \partial_{zz} \phi$. В первом слагаемом получим:

$$I(z) \partial_{tt} \phi = \partial_t (I(z) \partial_t \phi). \quad (\text{III.4.59})$$

Для второго слагаемого учтем, что $K'(z) = K(R(z))^2$, где K – константа. Тогда:

$$\begin{aligned} -a^2 K' \partial_{zz} \phi &= -a^2 K R^2 \partial_{zz} \phi = -a^2 K [\partial_z (R^2 \partial_z \phi) - \partial_z (R^2) \partial_z \phi] = \\ &= -a^2 K [\partial_z (R^2 \partial_z \phi) - 2R \partial_z R \partial_z \phi]. \end{aligned} \quad (\text{III.4.60})$$

Подставляя (III.4.59) и (III.4.60) в (III.4.36) получим:

$$\begin{aligned} \partial_t(I\partial_t\phi) - a^2K[\partial_z(R^2\partial_z\phi) - 2R\partial_zR\partial_z\phi] - 2a^2KR\partial_zR\partial_z\phi + \\ + V \sin \phi - a^2 \frac{K'}{R} \partial_{zz}(R)\phi = 0. \end{aligned}$$

Или:

$$\partial_t(I\partial_t\phi) - \partial_z(a^2KR^2\partial_z\phi) + V \sin \phi - a^2 \frac{K'}{R} \partial_{zz}(R)\phi = 0. \quad (\text{III.4.61})$$

Таким образом, имеем:

$$\begin{aligned} \partial_t \left(\frac{\partial L}{\partial(\partial_t\phi)} \right) + \partial_z \left(\frac{\partial L}{\partial(\partial_z\phi)} \right) &= \partial_t(I\partial_t\phi) - \partial_z(a^2KR^2\partial_z\phi), \\ - \frac{\partial L}{\partial\phi} &= V \sin \phi - a^2 \frac{K'}{R} \partial_{zz}(R)\phi. \end{aligned} \quad (\text{III.4.62})$$

Интегрируя соответствующие слагаемые в левых и правых частях (III.4.62), получаем члены плотности Лагранжиана:

$$\begin{aligned} L_t = I(z) \frac{(\partial_t\phi)^2}{2}, \quad L_z = -a^2K'(z) \frac{(\partial_z\phi)^2}{2}, \\ U = U_0 + V(z) \cos \phi + a^2 \frac{K'(z)}{R(z)} \partial_{zz}(R) \frac{\phi^2}{2}. \end{aligned} \quad (\text{III.4.63})$$

Из условия, что при $\phi = 0$ следует $U = 0$ получим: $U_0 = -V(z)$. Учитывая, что Лагранжиан связан с плотностью Лагранжиана следующим выражением: $L = \int (L_t + L_z + U) \frac{dz}{a}$, получим:

$$\begin{aligned} L = \int \left[I(z) \frac{(\partial_t\phi)^2}{2} - a^2K'(z) \frac{(\partial_z\phi)^2}{2} - V(z)(1 - \cos \phi) + \right. \\ \left. + a^2 \frac{K'(z)}{R(z)} \partial_{zz}(R) \frac{\phi^2}{2} \right] \frac{dz}{a}, \end{aligned} \quad (\text{III.4.64})$$

а плотность энергии кинка, таким образом, будет иметь вид:

$$\begin{aligned} \rho_H = \frac{I(z)}{2} \left(\frac{\partial\phi}{\partial t} \right)^2 + \frac{KR^2(z)a^2}{2} \left(\frac{\partial\phi}{\partial z} \right)^2 + V(z)(1 - \cos \phi) - \\ - a^2 \frac{K'(z)}{R(z)} \frac{\partial^2 R}{\partial z^2} \frac{\phi^2}{2}. \end{aligned} \quad (\text{III.4.65})$$

Можно показать, что формула для плотности энергии кинка (III.4.65) совпадает с формулой плотности энергии кинка (III.4.56) с точностью до полной производной. Рассмотрим третий член в (III.4.54):

$$\begin{aligned} \frac{Ka^2}{2} \left(\frac{\partial(R(z)\phi)}{\partial z} \right)^2 = \\ = \frac{Ka^2}{2} R^2(z) \left(\frac{\partial\phi}{\partial z} \right)^2 + \frac{Ka^2}{2} \left[\frac{\partial(\phi^2)}{\partial z} R(z) \frac{dR(z)}{dz} + \phi^2 \left(\frac{dR(z)}{dz} \right)^2 \right]. \end{aligned} \quad (\text{III.4.66})$$

В более простой форме:

$$\begin{aligned} & \frac{Ka^2}{2} ((R\phi)_z)^2 = \\ & = \frac{Ka^2}{2} R^2 (\phi_z)^2 + \frac{Ka^2}{2} [(\phi^2)_z RR_z + \phi^2 (R_z)^2]. \end{aligned} \quad (\text{III.4.67})$$

Или:

$$\begin{aligned} & \frac{Ka^2}{2} ((R\phi)_z)^2 = \\ & = \frac{Ka^2}{2} R^2 (\phi_z)^2 + \frac{Ka^2}{2} \left[\frac{\partial}{\partial z} (\phi^2 RR_z) - \phi^2 RR_{zz} \right]. \end{aligned} \quad (\text{III.4.68})$$

Окончательно, подставляя (III.4.68) в (III.4.56), получим формулу (III.4.65) с точностью до полной производной $\frac{\partial}{\partial z} \left(\frac{Ka^2}{2} \phi^2 RR_z \right)$.

Низкоамплитудное зигзагообразное возмущение ранее не наблюдалось в других моделях ДНК и является характерной особенностью системы неоднородных связанных осцилляторов. Можно предположить, что такая динамическая особенность может служить инициирующим механизмом спирализации молекулы ДНК.

Для понимания закономерностей, определяющих связь динамических и функциональных свойств ДНК, рассмотрение искусственных последовательностей, состоящих из однородных участков, недостаточно. Необходимо изучить более сложные функционально значимые последовательности. Одними из таких последовательностей являются последовательности Касмана.

III.4.5 Эффект Касмана

Американский исследователь математик Алекс Касман, занимаясь проблемой биаса (избыточности числа кодонов по отношению к числу аминокислот), предложил компьютерный эксперимент, в котором он рассмотрел динамику кинка в двух искусственных последовательностях (Рисунок III.4.20) (Kasman and LeMesurier, 2007). Левая часть первой из последовательностей содержала повторяющиеся триплеты ГТА, кодирующие лейцины, а правая часть содержала повторяющиеся триплеты СGC, кодирующие аргинины. Во второй последовательности триплеты СТG, кодирующие лейцины и триплеты АGА,

кодирующие аргинины. Особенность выбранных последовательностей заключается в том, что они функционально одинаковы, но структурно отличаются. Хотелось бы выяснить, будут ли отличаться динамические свойства последовательностей? Если да, то интересно ответить на вопрос: может ли различие динамических свойств кинков в последовательности (I) и (II) объяснить почему некоторые кодоны имеют преимущество по сравнению с другими?

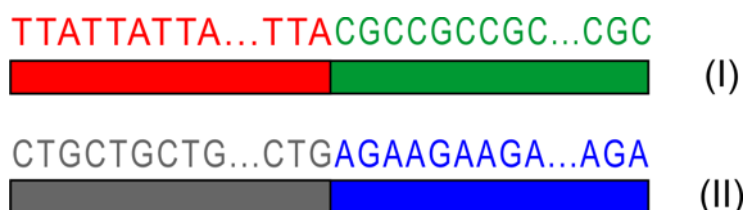


Рисунок III.4.20. Последовательности Касмана. Левые части последовательностей кодируют лейцины, правые – аргинины.

Для ответа на эти вопросы Касман провел серию оригинальных компьютерных экспериментов с кинками уравнения СГ,двигающимися вдоль последовательностей (I) и (II). Используя модель Салерно, Касман показал, что в одной последовательности кинк отражался от границы, а в другой проходил без остановок. Это предполагает, что динамика распространения открытых состояний в функционально одинаковых последовательностях различна. Этот эффект был назван эффектом Касмана. Далее, для проверки описанных результатов была использована неоднородная модель ДНК.

Расчет траекторий и оценка энергетических профилей последовательностей проводилась с использованием квази-однородного приближения:

$$\bar{I}(z) \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} - \bar{K}'(z) a^2 \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} + \bar{V}(z) \sin(\phi) - \frac{\bar{K}'(z) a^2}{\bar{R}(z)} \left(2 \frac{\partial \phi}{\partial z} \frac{\partial \bar{R}}{\partial z} + \phi \frac{\partial^2 \bar{R}}{\partial z^2} \right) = 0,$$

$$\bar{I}(z) = \bar{I}_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{I}_\zeta - \bar{I}_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\frac{z_{b_{\zeta-1}} - z}{\sigma}\right)}, \quad \bar{V}(z) = \bar{V}_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{V}_\zeta - \bar{V}_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\frac{z_{b_{\zeta-1}} - z}{\sigma}\right)}, \quad (\text{Ш.4.69})$$

$$\bar{K}'(z) = \bar{K}'_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{K}'_\zeta - \bar{K}'_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\frac{z_{b_{\zeta-1}} - z}{\sigma}\right)}, \quad \bar{R}(z) = \bar{R}_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{R}_\zeta - \bar{R}_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\frac{z_{b_{\zeta-1}} - z}{\sigma}\right)}.$$

$$\bar{E}_0(z) = 8\sqrt{\bar{V}(z)\bar{K}'(z)}, \quad \bar{E}(z) = \gamma\bar{E}_0(z), \quad (\text{Ш.4.70})$$

где $n=2$ – число функциональных участков, \bar{I}_i , \bar{V}_i , \bar{K}'_i и \bar{R}_i – усредненные значения коэффициентов на i -ом участке, z_{b_i} – координата границы между i -ым и $i+1$ -ым участками.

Рассмотрим в дополнение к последовательностям Касмана четыре последовательности (Рисунок Ш.4.21), состоящих из периодически повторяющихся триплетов нуклеотидов (кодонов). Две из них состоят из триплетов, кодирующих аргинины (III, IV), а другие две состоят из триплетов, кодирующих лейцины (V, VI).

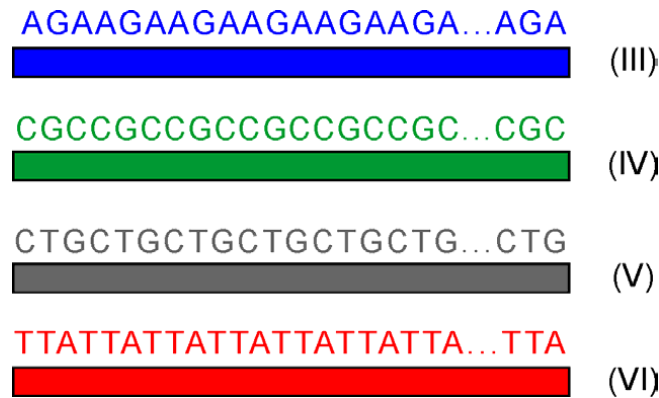


Рисунок Ш.4.21. Четыре искусственные последовательности, состоящие из периодически повторяющихся триплетов.

Усредненные коэффициенты \bar{I} , \bar{K}' , и \bar{V} для последовательностей (III)–(VI), и используемые в численных расчет даны в таблице Ш.4.6.

Таблица III.4.6. Усредненные коэффициенты для последовательностей (III)–(VI).

Послед.	\bar{I} (кг м ²) × 10 ⁻⁴³	\bar{K}' (Дж) × 10 ⁻¹⁷	\bar{V} (Дж) × 10 ⁻¹⁹
(III)	0.781	0.232	0.243
(IV)	0.548	0.179	0.245
(V)	0.573	0.181	0.222
(VI)	0.578	0.186	0.165

Предположим, что в начальный момент времени кинк покоится – его скорость равна нулю. В отсутствие внешних сил, скорость кинка будет оставаться равной нулю, а его энергия равной энергии покоя \bar{E}_0 , определяемой формулой (III.4.70). В квази-однородном приближении значение энергии покоя не будет зависеть от координаты z , если область усреднения будет равна длине рассматриваемых последовательностей (III)–(VI). Следовательно графики энергии покоя кинка будут прямыми горизонтальными линиями. На рисунке III.4.22 представлены графики энергии покоя кинка в последовательностях (III)–(VI).

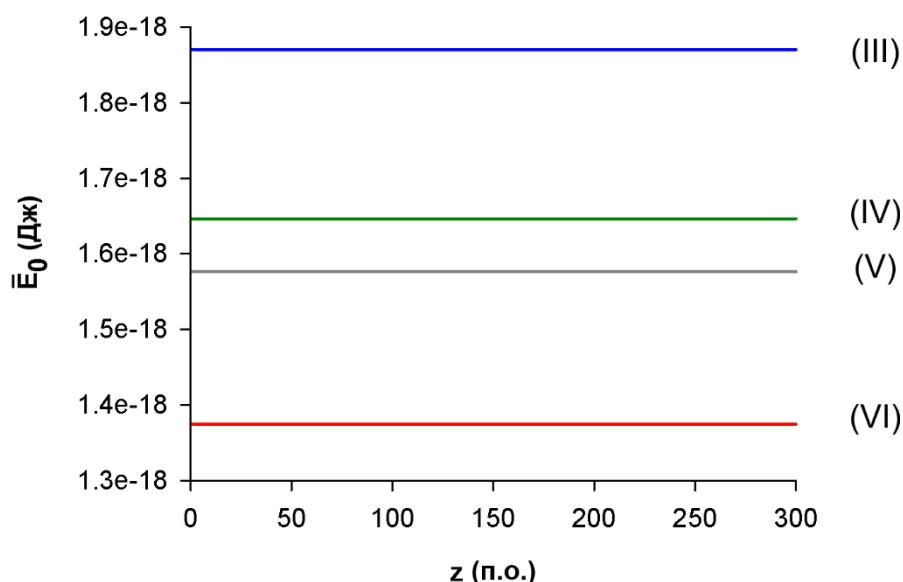


Рисунок III.4.22. Уровни энергии покоя.

Видно, что для синтезирования лейцинов наиболее предпочтительно (энергетически) использовать последовательность VI, состоящую из триплетов

ТТА, а не последовательность V, состоящую из триплетов СТG. Аналогично, для синтеза аргининов более предпочтительно использовать последовательность триплетов CGC (IV), чем последовательность триплетов AGA (III).

Если провести вычисления для последовательностей Касмана, то их энергетические профили в квази-однородном приближении будут выглядеть так, как показано на рисунке III.4.23a,б (сплошные линии). Видно, что оба профиля имеют барьер. Это предполагает, что для того, чтобы кинк прошел всю последовательность, начиная с левой части, кодирующей лейцины, и заканчивая в правой части, кодирующей аргинины, необходимо чтобы его полная энергия была не меньше высоты барьера. Это условие может быть записано в виде:

$$\frac{\bar{E}_0^{left}}{\sqrt{1 - \left(\frac{v^{left}}{\bar{C}_0^{left}}\right)^2}} \geq \bar{E}_0^{right}. \quad (\text{III.4.71})$$

Подставляя значения динамических коэффициентов из таблицы III.4.6 и параметра a из таблицы III.4.1 в формулу (III.4.71), можно получить минимальную энергию преодоления барьера в последовательности (I), которая равна:

$$\bar{E}_{0,I}^{right} = 1.647 \times 10^{-18} \text{ Дж}. \quad (\text{III.4.72})$$

Аналогично, минимальная энергия для преодоления барьера в последовательности (II) равна:

$$\bar{E}_{0,II}^{right} = 1.871 \times 10^{-18} \text{ Дж}. \quad (\text{III.4.73})$$

Таким образом, было показано, что эффект, наблюдаемый Касманом, имеет место быть только если начальная энергия кинка при его движении из левой части последовательности, состоящей из периодически повторяющихся триплетов, кодирующих лейцины, в правую часть, состоящей из повторяющихся триплетов, кодирующих аргинины, удовлетворяет условиям:

$$1.647 \times 10^{-18} < \bar{E}_0 < 1.871 \times 10^{-18} \text{ Дж}. \quad (\text{III.4.74})$$

Еще один эффект, который наблюдал Касман в своих экспериментах, это отражение кинка от границы, разделяющей участки с триплетами, кодирующие лейцины и аргинины. С помощью модели неоднородной ДНК и метода траекторий этот эффект можно наблюдать более наглядно.

Траектории кинков в последовательностях Касмана представлены на рисунке III.4.23*в,г*. Они были получены при разных значениях начальных энергий кинка без учета сил трения. Траектория с номером 1 демонстрирует, что кинк с начальной энергией $\bar{E}_{0,1} = 2.0 \times 10^{-18}$ Дж преодолевает энергетический барьер на границе и доходит до конца обеих последовательностей (I) и (II). Траектория с номером 3 демонстрирует, что кинк с начальной энергией $\bar{E}_{0,3} = 1.6 \times 10^{-18}$ Дж отражается от границ в обеих последовательностях. Траектория номер 2 демонстрирует эффект Касмана, а именно, что кинк с начальной энергией $\bar{E}_{0,2} = 1.8 \times 10^{-18}$ Дж преодолевает границу в последовательности (I) и отражается от границы в последовательности (II).

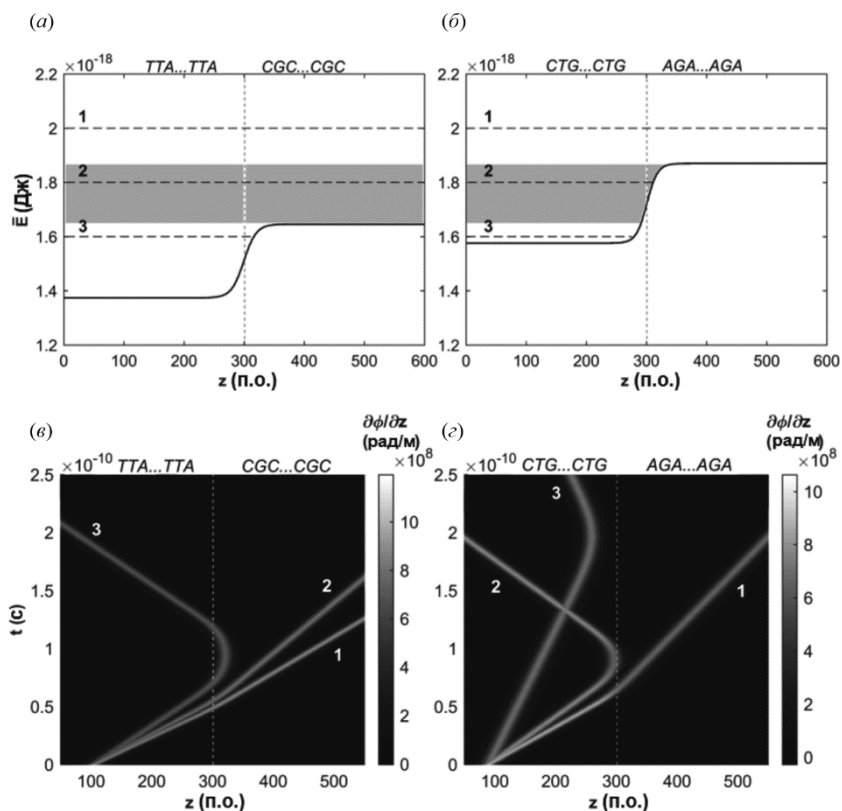


Рисунок III.4.23. Начальные энергии кинков (пунктирные горизонтальные прямые) и энергетические профили (сплошные кривые) (а) и (б) последовательностей Касмана (I) и (II) соответственно. Траектории кинка (в) и (г) в последовательностях Касмана (I) и (II) соответственно. Вертикальные пунктирные прямые обозначают границы между участками, кодирующими лейцины и аргинины. Цифры 1, 2, 3 показывают соответствие между траекториями и начальными энергиями кинков. Серая полоса – интервал начальных энергий кинков, для которых наблюдается эффект Касмана.

Таким образом, было показано, что эффект Касмана действительно имеет место быть, но в ограниченном диапазоне начальных энергий кинка. Для того чтобы кинк преодолел энергетический барьер на границе участков, кодирующих лейцины и аргинины в последовательности (I) и отразился от аналогичной границы в последовательности (II), необходимо чтобы его начальная энергия удовлетворяла условиям (III.4.74). Кроме того, наличие этого эффекта зависит и от направления движения кинка в последовательностях. Также было показано, что, не смотря на одинаковые функциональные свойства последовательностей Касмана, их динамические особенности различаются.

Сравнивая кодоны в последовательностях Касмана, было обнаружено, что некоторые имеют преимущество (энергетическое) перед другими. Так из рисунка III.4.22 следует, что для синтеза последовательности лейцинов наиболее предпочтительно (энергетически) использовать последовательность (VI), состоящую из TTA кодонов, чем последовательность (V), состоящую из GTG кодонов. Аналогичным образом можно сказать про синтез последовательности аргининов, для которой наиболее предпочтительно использовать последовательность (IV), состоящей из CGC кодонов, чем последовательность (III), состоящей из AGA кодонов.

Можно предположить, что такая закономерность имеет более общее значение. Для подтверждения этого были рассмотрены все триплеты, кодирующие лейцины и аргинины (Рисунок III.4.24). Значения энергии покоя

кинков в последовательностях, состоящих из этих кодонов, указаны во втором и пятом столбцах таблицы III.4.7. Видно, что последовательности, состоящие из СТТ кодонов, являются наиболее предпочтительными (энергетически) для синтеза лейцинов, а последовательности, состоящие из СGT кодонов, являются наиболее предпочтительными для синтеза аргининов.

Ранее считалось, что предпочтение в выборе кодона определяется просто количеством водородных связей между основаниями, составляющими кодон и основаниями, комплементарными к ним. Однако, с точки зрения формирования открытых состояний в рамках неоднородной модели ДНК это не всегда так. Было обнаружено, что кодоны с меньшим количеством водородных связей между комплементарными основаниями отличаются от кодонов с низким значением энергии покоя кинков (см. третью и шестую колонки в таблице III.4.7).

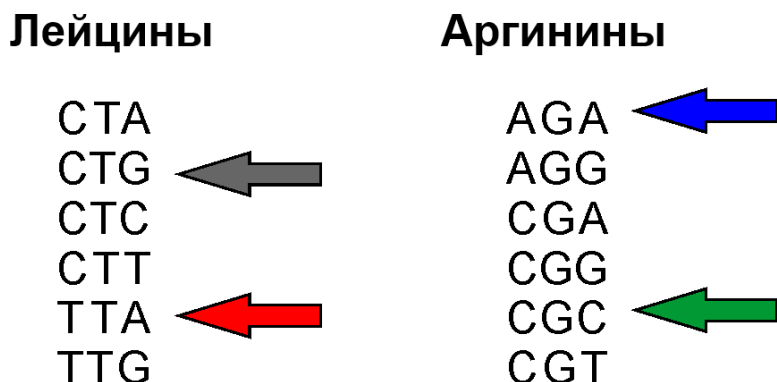


Рисунок III.4.24. ДНК триплеты, кодирующие лейцин (слева) и аргинин (справа). Стрелки указывают на триплеты, использованные Касманом в численных экспериментах.

Например, на основе подсчета водородных связей, последовательность, состоящая из ТТА кодонов (в случае лейцинов) и последовательность, состоящая из АGA кодонов (в случае аргининов) являются более предпочтительными. В тоже время полученные значения энергии покоя указывают на другие предпочтительные последовательности. В случае лейцина это последовательность, состоящая из СТТ кодонов. В случае аргинина –

последовательность, состоящая из CGT кодонов. Вопрос, какой метод оценки предпочтительности кодонов является лучшим, остается пока открытым.

В отношении последовательностей Касмана (последовательности (I) и (II)), с точки зрения числа водородных связей, приходящихся на один кодон, можно наблюдать следующую картину:

1. В случае последовательности (I), состоящей из TTA кодонов слева и CGC кодонов справа от границы получается, согласно таблице III.4.7, число 6 слева и число 9 справа. Из этого следует, что кинк,двигающийся справа на лево (как в экспериментах Касмана) попадет в потенциальную яму и, таким образом, пройдет всю последовательность.

2. В случае последовательности (II), состоящей из CTG кодонов слева и AGA кодонов справа от границы получается 8 водородных связей слева и 7 справа. В результате, кинк,двигающийся справа на лево (как в экспериментах Касмана) будет наталкиваться на барьер и останавливать свое движение. Такая точка зрения позволяет объяснить эффекты, наблюдаемые Касманом в своих экспериментах.

Таблица III.4.7. Число водородных связей в ДНК триплетах, кодирующих лейцин и аргинин, и энергии покоя кинков, активируемых в последовательностях, состоящих из этих кодонов.

Триплеты, кодирующие лейцин	Энергия покоя \bar{E}_0 (Дж) $\times 10^{-17}$	Число водородных связей	Триплеты, кодирующие аргинины	Энергия покоя \bar{E}_0 (Дж) $\times 10^{-17}$	Число водородных связей
TTA	0.140	6	AGA	0.190	7
CTG	0.160	8	CGC	0.167	9
СТА	0.149	7	AGG	0.179	8
СТС	0.138	8	CGA	0.179	8
СТТ	0.130	7	CGC	0.167	9
ТТG	0.153	7	CGT	0.160	8

Вычисление энергетического профиля последовательностей в рамках неоднородной модели показало, однако, что чтобы воспроизвести эффект Касмана, необходимо «запускать» кинк в другом направлении: слева на право. Тогда кинк будет проходить границу в последовательности (I) и отражаться от нее в последовательности (II), но только в определенном интервале начальных энергий.

Результаты исследования динамики открытых состояний в последовательностях Касмана позволили сделать предположение о наличии прямой связи между динамическими и функциональными свойствами ДНК. Для подтверждения этого предположения далее будут рассмотрены более интересные случаи, связанные с исследованием динамики кинка не в искусственных, а в реальных последовательностях.

III.4.6 Моделирование природных молекул ДНК

Исследование динамики открытых состояний в ДНК является одной из важнейших задач в понимании связи между динамическими свойствами молекулы и ее функциями, так как эти состояния обязательно формируются в процессах транскрипции и репликации. Открытые состояния в молекуле ДНК — это локально расплетенные участки с разорванными водородными связями. Выявление связи между динамикой открытых состояний и функциями ДНК позволит оценить вклад механической составляющей конформационной динамики молекулы в процессы транскрипции и репликации и, возможно, выявить новые механизмы их регуляции.

III.4.6.1 Плазмида pPF1

Векторная плазмида pPF1 (Рисунок III.4.25) была получена из плазмиды pET-28b (<https://www.snapgene.com...>) и дополнена двумя генами, кодирующими зеленый и красный флуоресцентные белки Egfp и mCherry, соответственно (Masulis 2015). Данный вектор, как репортерная конструкция, позволяет

одновременно регистрировать транскрипцию в двух направлениях, инициированную на участках последовательности между генами флуоресцентных белков.

Используя аппарат нелинейной математики и разработанную новую модель, был произведен расчет энергетического профиля плазмиды pPF1 и различных ее модификаций, полученных путем интегрирования в область, расположенную между двумя генами белков Egfp и mCherry, однородных последовательностей и небольших фрагментов *Escherichia coli*, взятых из так называемых промоторных островов – областей высоко насыщенных промоторо-подобными участками (Shavkunov, et al. 2009). Цель расчетов – предсказать поведение кинка, что в свою очередь позволит сделать выводы о том, в какой области плазмиды с наибольшей вероятностью произойдет нуклеация транскрипционного пузыря и в каком направлении (в сторону гена Egfp или mCherry) пойдет процесс транскрипции.

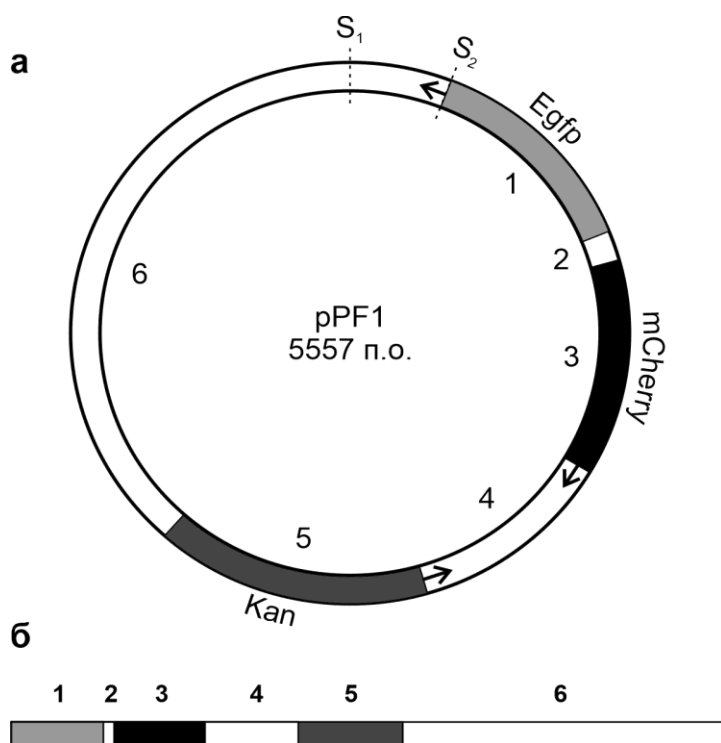


Рисунок III.4.25. Кольцевая (а) и линейная (б) схемы плазмиды pPF1. Ген зеленого белка Egfp (участок 1) и ген устойчивости к канамицину Kan (участок 5) транскрибируются по комплементарной нити. Ген красного белка mCherry

(участок 3) транскрибируется по основной нити. S1 – точка, указывающая начало последовательности. S2 – точка, указывающая начало первого участка.

Основное внимание при генетических манипуляциях уделяется 2-му участку, так как он расположен между генами белков Egfp и mCherry и имеет удобный для манипуляций нуклеотидный состав. На рисунке III.4.26 показана структура этого участка. В центре последовательности находится сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции BglIII AGATCT длиной 6 п.о. Слева и справа от него находятся короткие последовательности длиной 39 п.о. каждая, причем короткая последовательность справа от рестриктазного сайта является обратно комплементарной к короткой последовательности слева от рестриктазного сайта.

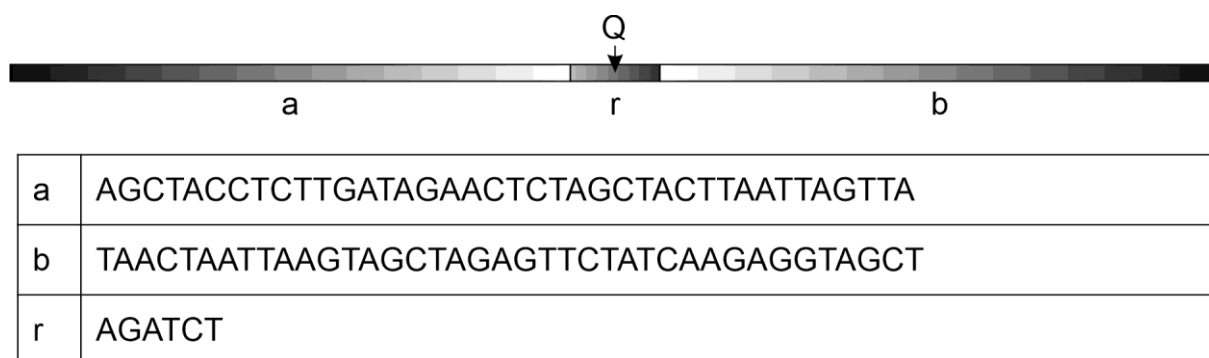


Рисунок III.4.26. Схематическое изображение последовательности 2-го участка. Q – точка, указывающая место, куда будут встроены небольшие модельные последовательности в компьютерных экспериментах.

Как и в экспериментах по искусственным генетическим манипуляциям *in vitro*, в компьютерных экспериментах проводилось встраивание во 2-й участок небольших модельных последовательностей. Сначала для отработки метода в качестве модельных были использованы однородные последовательности: polyA, polyT, polyG, polyC, а затем - небольшие фрагменты последовательности *Escherichia coli*.

III.4.6.1.1 Математическое описание конформационной подвижности молекулы ДНК

Для математического описания конформационной подвижности некоторого фрагмента молекулы ДНК, которое включало бы возможность образования открытых состояний, воспользуемся системой из $2N$ связанных нелинейных дифференциальных уравнений, имитирующих угловые отклонения азотистых оснований в обеих полинуклеотидных цепочках (Krasnobaeva and Yakushevich, 2015):

$$\begin{aligned} I_{n,1} \frac{d^2 \varphi_{n,1}(t)}{dt^2} - K'_{n,1} [\varphi_{n+1,1}(t) - 2\varphi_{n,1}(t) + \varphi_{n-1,1}(t)] + \\ + k_{n,1-2} R_{n,1} (R_{n,1} + R_{n,2}) \sin \varphi_{n,1} - \\ - k_{n,1-2} R_{n,1} R_{n,2} \sin(\varphi_{n,1} - \varphi_{n,2}) = \\ = -\beta_{n,1} \frac{d\varphi_{n,1}(t)}{dt} + M_0, \end{aligned} \quad (\text{III.4.75})$$

$$\begin{aligned} I_{n,2} \frac{d^2 \varphi_{n,2}(t)}{dt^2} - K'_{n,2} [\varphi_{n+1,2}(t) - 2\varphi_{n,2}(t) + \varphi_{n-1,2}(t)] + \\ + k_{n,1-2} R_{n,2} (R_{n,1} + R_{n,2}) \sin \varphi_{n,2} - \\ - k_{n,1-2} R_{n,1} R_{n,2} \sin(\varphi_{n,2} - \varphi_{n,1}) = \\ = -\beta_{n,2} \frac{d\varphi_{n,2}(t)}{dt} + M_0. \end{aligned} \quad (\text{III.4.76})$$

Здесь $\varphi_{n,i}(t)$ – угловое отклонение n -го азотистого основания i -й цепочки; $I_{n,i}$ – момент инерции n -го азотистого основания i -й цепочки; $R_{n,i}$ – расстояние от центра масс n -го азотистого основания i -й цепочки до сахаро-фосфатного остова; $K'_{n,i} = KR_{n,i}^2$; K – константа, характеризующая жесткость (на растяжение) сахаро-фосфатного остова; $\beta_{n,i} = \alpha R_{n,i}^2$; α – коэффициент диссипации; $k_{n,i}$ – константа, характеризующая взаимодействие между основаниями внутри пар; M_0 – постоянный внешний момент; $i = 1, 2$; $n = 1, 2, \dots, N$, N – число пар оснований в рассматриваемом фрагменте.

Уравнения (III.4.75) – (III.4.76) упрощаются, если усреднить коэффициенты $I_{n,i}$, $R_{n,i}$, $K'_{n,i}$, $k_{n,1-2}$ и $\beta_{n,i}$ методом концентраций (Yakushevich and Krasnobaeva, 2008):

$$\begin{aligned}
I_{n,i} &\rightarrow \bar{I}_i = I_A C_{A,i} + I_T C_{T,i} + I_G C_{G,i} + I_C C_{C,i}, \\
R_{n,i} &\rightarrow \bar{R}_i = R_A C_{A,i} + R_T C_{T,i} + R_G C_{G,i} + R_C C_{C,i}, \\
K'_{n,i} &\rightarrow \bar{K}'_i = K'_A C_{A,i} + K'_T C_{T,i} + K'_G C_{G,i} + K'_C C_{C,i}, \\
k_{n,1-2} &\rightarrow \bar{k}_{1-2} = k_{A-T}(C_{A,1} + C_{T,2}) + k_{G-C}(C_{G,1} + C_{C,2}), \\
\beta_{n,i} &\rightarrow \bar{\beta}_i = \beta_A C_{A,i} + \beta_T C_{T,i} + \beta_G C_{G,i} + \beta_C C_{C,i},
\end{aligned} \tag{III.4.77}$$

где $C_{j,i} = N_{j,i}/N$ – концентрация оснований j -го типа ($j = A, T, G, C$) в i -й цепи ($i = 1, 2$); $N_{j,i}$ – количество азотистых оснований j -го типа в i -й последовательности.

После проведения процедуры усреднения (III.4.77) уравнения (III.4.75) – (III.4.76) преобразуются к виду:

$$\begin{aligned}
\bar{I}_1 \frac{d^2 \varphi_{n,1}(t)}{dt^2} - \bar{K}'_1 [\varphi_{n+1,1}(t) - 2\varphi_{n,1}(t) + \varphi_{n-1,1}(t)] + \\
+ \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 (\bar{R}_1 + \bar{R}_2) \sin \varphi_{n,1} - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_{n,1} - \varphi_{n,2}) = \\
= -\bar{\beta}_1 \frac{d\varphi_{n,1}(t)}{dt} + M_0,
\end{aligned} \tag{III.4.78}$$

$$\begin{aligned}
\bar{I}_2 \frac{d^2 \varphi_{n,2}(t)}{dt^2} - \bar{K}'_2 [\varphi_{n+1,2}(t) - 2\varphi_{n,2}(t) + \varphi_{n-1,2}(t)] + \\
+ \bar{k}_{1-2} \bar{R}_2 (\bar{R}_1 + \bar{R}_2) \sin \varphi_{n,2} - \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_{n,2} - \varphi_{n,1}) = \\
= -\bar{\beta}_2 \frac{d\varphi_{n,2}(t)}{dt} + M_0.
\end{aligned} \tag{III.4.79}$$

В континуальном приближении эти уравнения приобретают вид:

$$\begin{aligned}
\bar{I}_1 \varphi_{1tt} - \bar{K}'_1 a^2 \varphi_{1zz} + \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 (\bar{R}_1 + \bar{R}_2) \sin \varphi_1 - \\
- \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_1 - \varphi_2) = \\
= -\bar{\beta}_1 \varphi_{1t} + M_0,
\end{aligned} \tag{III.4.80}$$

$$\begin{aligned}
\bar{I}_2 \varphi_{2tt} - \bar{K}'_2 a^2 \varphi_{2zz} + \bar{k}_{1-2} \bar{R}_2 (\bar{R}_1 + \bar{R}_2) \sin \varphi_2 - \\
- \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1 \bar{R}_2 \sin(\varphi_2 - \varphi_1) = \\
= -\bar{\beta}_2 \varphi_{2t} + M_0.
\end{aligned} \tag{III.4.81}$$

С помощью приближения среднего поля (Yakushevich, 2017) два связанных уравнения (III.4.80)–(III.4.81) трансформируются в два независимых уравнения:

$$\bar{I}_1 \varphi_{1tt} - \bar{K}'_1 a^2 \varphi_{1zz} + \bar{k}_{1-2} \bar{R}_1^2 \sin \varphi_1 = -\bar{\beta}_1 \varphi_{1t} + M_0, \tag{III.4.82}$$

$$\bar{I}_2 \varphi_{2tt} - \bar{K}'_2 a^2 \varphi_{2zz} + \bar{k}_{1-2} \bar{R}_2^2 \sin \varphi_2 = -\bar{\beta}_2 \varphi_{2t} + M_0. \tag{III.4.83}$$

Односолитонные решения этих уравнений – кинки:

$$\begin{aligned}\varphi_{k,1}(z, t) &= 4 \operatorname{arctg}\{\exp[(\gamma_{k,1}/d_{k,1})(z - v_{k,1}t - z_{0,1})]\}, \\ \varphi_{k,2}(z, t) &= 4 \operatorname{arctg}\{\exp[(\gamma_{k,2}/d_{k,2})(z - v_{k,2}t - z_{0,2})]\},\end{aligned}\quad (\text{Ш.4.84})$$

используют для имитации открытых состояний (Englander, et al. 1980; Якушевич и др. 2005). Здесь $v_{k,i}$ – скорость движения кинка в i -й цепочке ($i = 1, 2$); $\gamma_{k,i} = (1 - v_{k,i}^2/\bar{c}_i^2)^{-1/2}$ – фактор Лоренца, $\bar{c}_i = (\bar{K}_i' a^2/\bar{I}_i)^{1/2}$ – скорость звука в i -й цепочке, $d_{k,i} = (\bar{K}_i' a^2/\bar{V}_i)^{1/2}$ – размер кинка в i -й цепочке, $\bar{V}_i = \bar{k}_{1-2}\bar{R}_i^2$.

Полная энергия кинка в i -й цепочке E_i определяется формулой (Якушевич и Рясик, 2012):

$$E_i = \frac{E_{0,i}}{\sqrt{1 - \frac{v_{k,i}^2}{\bar{c}_i^2}}}, \quad (\text{Ш.4.85})$$

где $E_{0,i}$ – минимальное значение энергии, необходимое для образования кинка:

$$E_{0,i} = 8\sqrt{\bar{K}_i'\bar{V}_i}, \quad (i = 1, 2). \quad (\text{Ш.4.86})$$

В случае малых скоростей ($v_{k,i} \ll E_i$) формула (Ш.4.85) приобретает вид:

$$E_i = \frac{E_{0,i}}{\sqrt{1 - \frac{v_{k,i}^2}{\bar{c}_i^2}}} = E_{0,i} + \frac{m_{k,i}v_{k,i}^2}{2}, \quad (\text{Ш.4.87})$$

где $m_{k,i} = \frac{E_{0,i}}{2\bar{c}_i^2}$ – масса кинка в i -й цепочке. Формула (Ш.4.87) свидетельствует о том, что кинк можно моделировать как квазичастицу, обладающую массой $m_{k,i}$, скоростью $v_{k,i}$ и обладающую потенциальной энергией $E_{0,i}$.

Ш.4.6.1.2 Энергетический профиль плазмиды pPF1

При построении энергетического профиля плазмиды pPF1 использовались значения коэффициентов уравнений (Ш.4.82) – (Ш.4.83) из таблицы Ш.4.1 и формула (Ш.4.86) для расчета минимальных значений энергии $E_{0,i}$, необходимых для образования кинка в каждом из шести участков i -й цепочки ДНК ($i = 1, 2$): в трех участках, отвечающих генам (Egfp, mCherry, Kan) и трех участках, отвечающих промежуточным областям (2-й, 4-й, 6-й участки). Результаты расчета приведены в таблице Ш.4.8. Построенные энергетические профили для

основной и комплементарной последовательностей плазмиды pPF1 приведены на рисунке III.4.27. Видно, что самая глубокая потенциальная яма наблюдается во 2-м участке и основной (черная кривая), и комплементарной (серая кривая) последовательностей. Это говорит о том, что вероятность образования кинка во 2-м участке выше, чем в других. Видно также, что во 2-м участке черная и серая кривые совпадают. Это означает, что энергии активации кинка в основной и в комплементарной последовательностях одинаковые. Таким образом, с энергетической точки зрения кинку все равно, в какой из двух этих последовательностей активироваться. Какого-либо предпочтения нет.

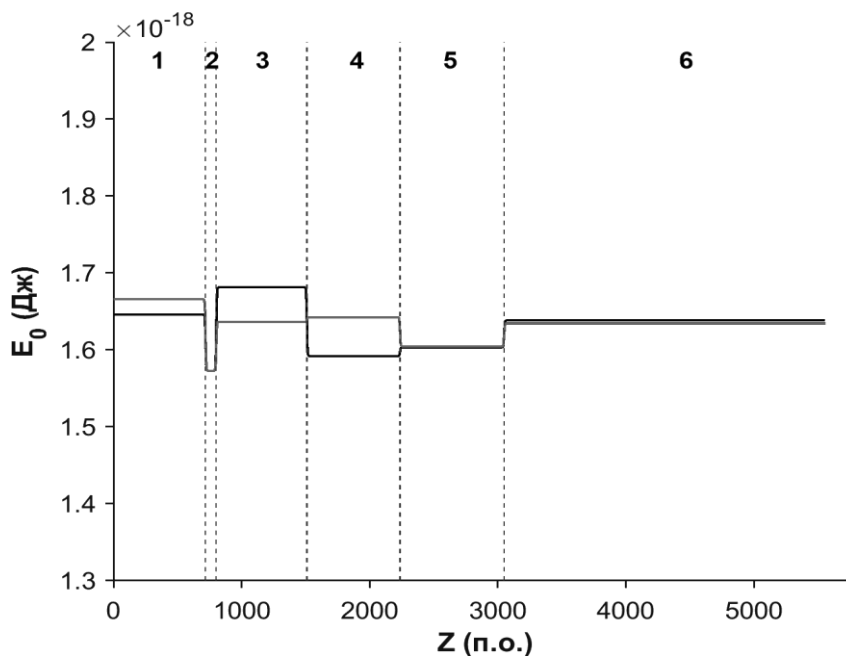


Рисунок III.4.27. Энергетический профиль основной (черная кривая) и комплементарной (серая кривая) последовательностей плазмиды pPF1. Цифрами 1–6 обозначены участки последовательностей. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы между смежными участками.

Таблица III.4.8. Минимальные значения энергии кинка $E_{0,i}$, рассчитанные для шести участков основной и комплементарной последовательностей плазмиды pPF1.

Номер	Координаты	$E_{0,1}$	$E_{0,2}$
-------	------------	-----------	-----------

участка	участка (п.о.)	(10 ⁻¹⁷ дж)	(10 ⁻¹⁷ дж)
1 (Egfp)	333- 1049	0.1639	0.1658
2	1050-1133	0.1566	0.1566
3 (mCherry)	1134-1841	0.1673	0.1673
4	1842-2568	0.1585	0.1585
5 (Kan)	2569-3381	0.1596	0.1596
6	(3382-5557) + (1-332)	0.1631	0.1631

III.4.6.1.3 Модификация плазмиды pPF1 однородными последовательностями

В первом компьютерном эксперименте плазмида pPF1 модифицировалась вставкой во 2-й участок однородной модельной последовательности polyA длиной 183 п.о. Схематическое изображение последовательности 2-го участка со вставкой представлено на рисунке III.4.28.

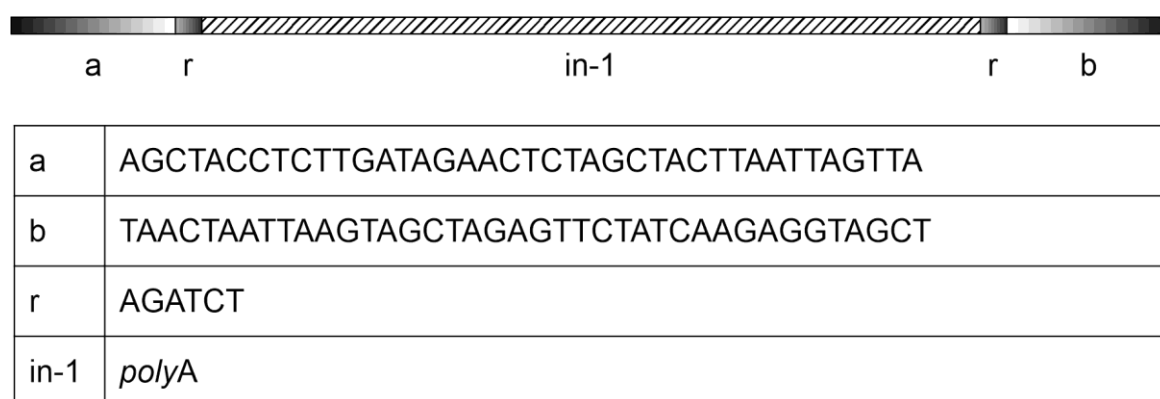


Рисунок III.4.28. Схематическое изображение последовательности 2-го участка с интегрированной в него последовательностью *polyA*.

Результаты расчета энергетических профилей основной и комплементарной последовательностей модифицированной плазмиды представлены на рисунке III.4.29. Видно, что во 2-м участке комплементарной последовательности *polyT* (серая кривая) наблюдается самая глубокая

потенциальная яма, а в том же участке основной последовательности *polyA* (черная кривая), напротив, наблюдается барьер. Это говорит о том, что с вероятностью активации кинка во 2-м участке комплементарной последовательности выше, чем в том же участке основной последовательности.

Во втором компьютерном эксперименте плазида рPF1 модифицировалась вставкой во 2-й участок другой однородной последовательности (*polyG*) той же длины (Рисунок III.4.30).

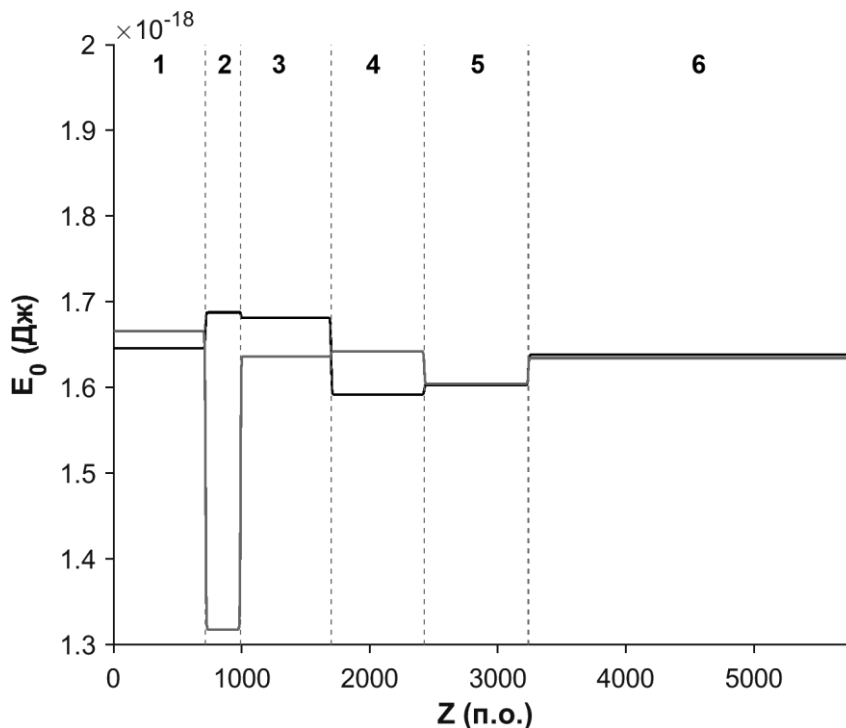


Рисунок III.4.29. Энергетический профиль основной (черная кривая) и комплементарной (серая кривая) последовательностей модифицированной плазмиды рPF1 с однородной последовательностью *polyA*, интегрированной во 2-й участок. Цифрами 1–6 обозначены участки. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы между смежными участками.

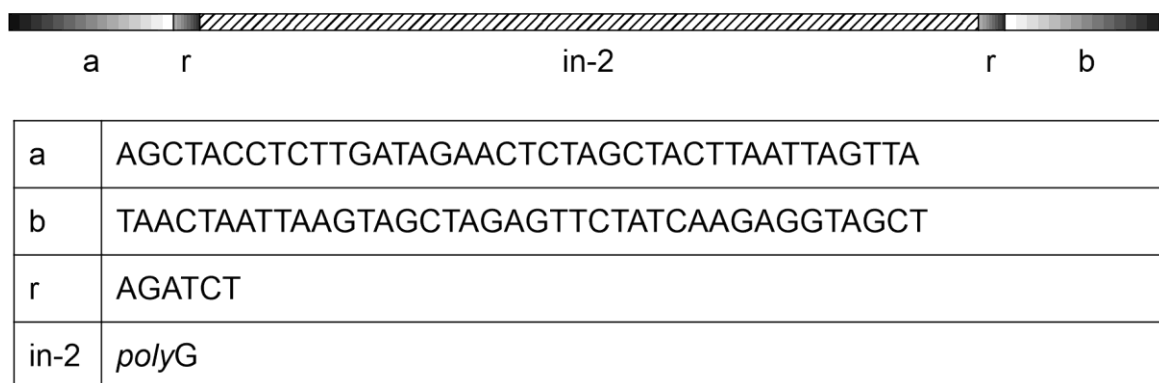


Рисунок III.4.30. Схематическое изображение последовательности 2-го участка плазмиды pPF1 с интегрированной в него модельной однородной последовательностью *polyG*.

Результат расчета энергетических профилей основной и комплементарной последовательностей модифицированной плазмиды pPF1 с интегрированной в нее последовательностью *polyG* представлены на рисунке III.4.31.

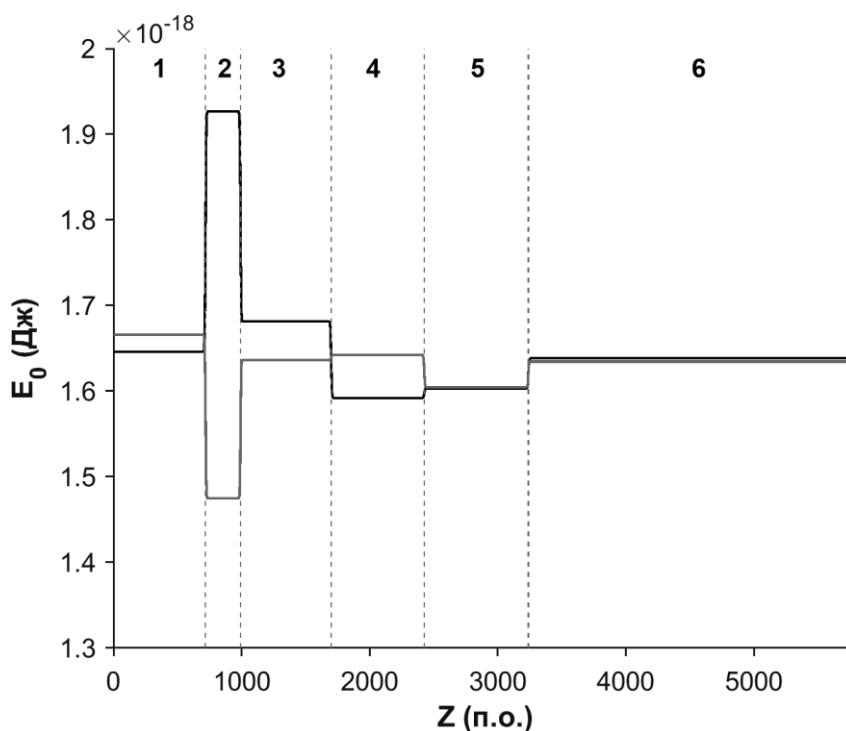


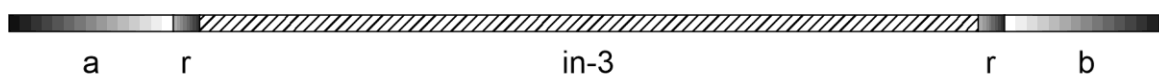
Рисунок III.4.31. Энергетический профиль основной (черная кривая) и комплементарной (серая кривая) последовательностей модифицированной плазмиды pPF1, с однородной последовательностью *polyG*, интегрированной во

2-й участок. Цифрами 1–6 обозначены участки. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы между смежными участками.

Из рисунка III.4.31 видно, что самая глубокая потенциальная яма наблюдается во 2-м участке комплементарной последовательности *polyC* (серая кривая). В этом же участке основной последовательности *polyG* (черная кривая), напротив, наблюдается барьер. Таким образом, наибольшая вероятность локального расплетания двухнитевой ДНК будет наблюдаться в комплементарной последовательности 2-го участка.

III.4.6.1.4 Модификация плазмиды *pPF1* неоднородными последовательностями

В следующем компьютерном эксперименте плазида *pPF1* модифицировалась вставкой во 2-й участок небольшого фрагмента реальной последовательности *Escherichia coli*, взятого из так называемых промоторных островков – областей, высоко насыщенных промотор-подобными участками (Shavkunov, et al. 2009). На рисунке III.4.32 представлена схема 2-го участка после модификации.



a	AGCTACCTCTTGATAGAACTCTAGCTACTTAATTAGTTA
b	ТААСТААТТААГТАГСТАГАГТТСТАТСААГАГГТАГСТ
r	AGATCT
in-3	TAATCAGGATGATGTGCATTTATATTTTTATACACAAAATTATAGTTTGCA AATTTTAATAAATTTCAATTAAGATTAATTAATATATGATGTTGTTTTTA TTCTAACTTATTTCAAAGTTACATTTTTCAACGCTTACTATGCTTTTTATT AACATAAACTCACTACAACGCACCTGAA

Рисунок III.4.32. Схематическое изображение последовательности 2-го участка плазмиды pPF1 с интегрированным в него первым фрагментом реальной последовательности *Escherichia coli* (in-3).

Результаты расчета энергетического профиля основной и комплементарной последовательностей модифицированной вышеуказанным способом плазмиды pPF1 представлены на рисунке III.4.33. Видно, что самая глубокая потенциальная яма приходится на 2-й участок основной последовательности (черная кривая). Это говорит о том, что наибольшая вероятность активации кинка, будет наблюдаться во 2-м участке основной последовательности, соответствующей матричной нити ДНК. В данном случае это можно трактовать следующим образом: именно 2-й участок ответственен за разрушение водородных связей и нуклеацию транскрипционного пузыря. Более того, то, что нуклеация происходит на основной последовательности, указывает на направление движения пузыря: от 5' к 3' концу, т.е. в направлении гена зеленого белка. Можно ожидать, что в данном случае преимущественно будет синтезироваться белок Egfp.

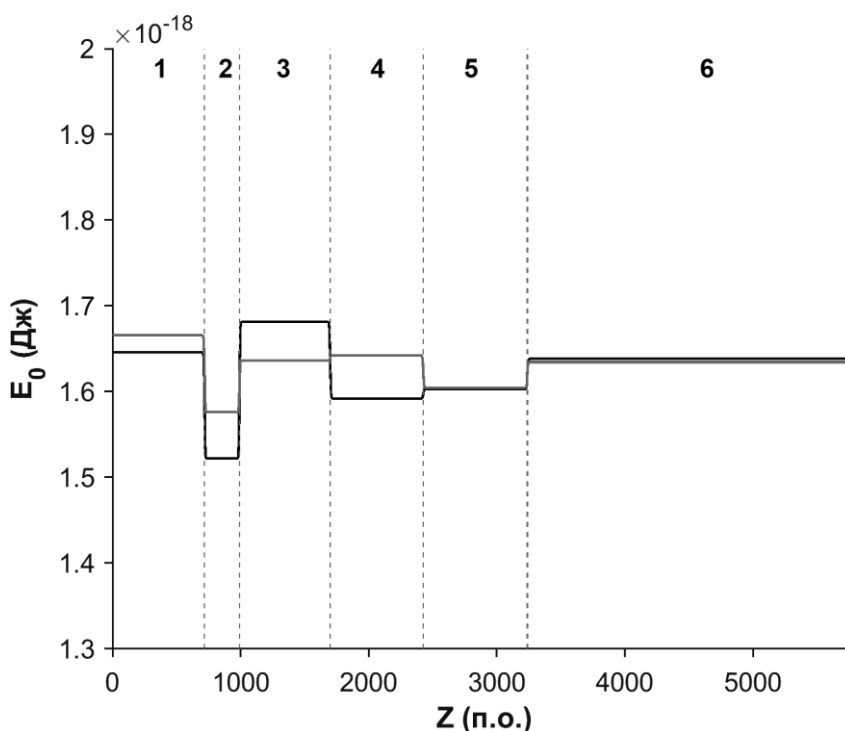
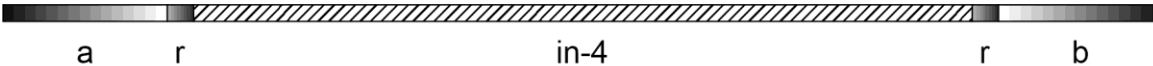


Рисунок III.4.33. Энергетический профиль основной (черная кривая) и комплементарной (серая кривая) последовательностей модифицированной плазмиды pPF1, где во 2-й участок интегрирован небольшой фрагмент последовательности *Escherichia coli* (in-3). Цифрами 1–6 обозначены участки последовательностей. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы между смежными участками.

В следующем компьютерном эксперименте во 2-й участок плазмиды pPF1 был встроен фрагмент последовательности обратно комплементарной к последовательности фрагмента, который встраивался во 2-й участок в предыдущем эксперименте. Последовательность 2-го участка, полученная в результате такой модификации, показана на рисунке III.4.34, а на рисунке III.4.35 представлены результаты построения энергетического профиля модифицированной плазмиды.



a	AGCTACCTCTTGATAGAACTCTAGCTACTTAATTAGTTA
b	ТААСТААТТААГТАГСТАГАГТТСТАТСААГАГГТАГСТ
r	AGATCT
in-4	TTCAGGTGCGTTGTAGTGAGTTTATGTTAATAAAAAGCATAGTAAGCGT TGAAAAATGTAACSTTTGAAATAAGTTAGAATAAAAAACAACATACATATA ATAATTTAATCTTAAATGAAATTTATTTAAAATTTGCAAACSTATAATTTTGTG TATAAAAATATAAATGCACATCATCCTGATTA

Рисунок III.4.34. 2-й участок плазмиды с интегрированной в него вторым фрагментом реальной последовательности *Escherichia coli* (in-4).

Из рисунка III.4.35 видно, что в отличие от предыдущего случая самая глубокая потенциальная яма приходится на 2-й участок комплементарной последовательности (серая кривая). Таким образом, с более высокой

вероятностью кинк будет активироваться не в основной, а в комплементарной последовательности 2-го участка, которая в данном случае будет матричной. С учетом того, что движение пузыря всегда происходит от 5' к 3' концу, можно ожидать, что с большей вероятностью пузырь будет двигаться в направлении гена красного белка, для которого в данной конструкции нематричной нитью является комплементарная последовательность. Таким образом, вероятность синтеза белка mCherry будет выше по отношению к Egfp.

С помощью методов нелинейной математики были рассчитаны энергетические профили потенциальных полей плазмиды pPF1 и ее модификаций. Модификации плазмиды получали вставкой во 2-й участок, расположенный между генами зеленого и красного белков, небольших фрагментов однородных (синтетических) и неоднородных (природных) последовательностей.

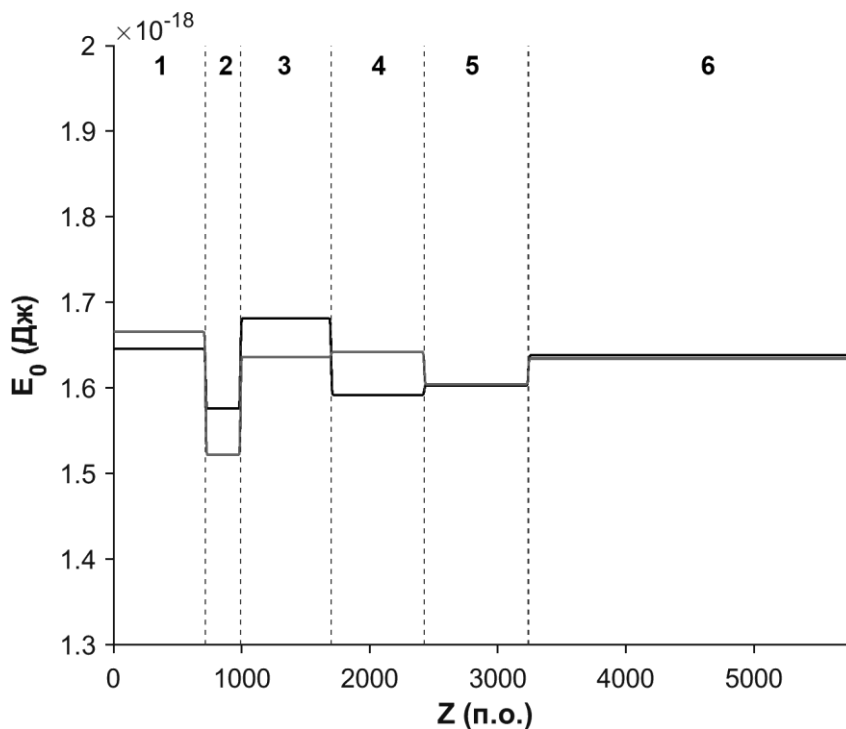


Рисунок III.4.35. Энергетический профиль основной (черная кривая) и комплементарной (серая кривая) последовательностей модифицированной плазмиды pPF1, где во 2-й участок интегрирован небольшой фрагмент последовательности *Escherichia coli* (in-4). Цифрами 1–6 обозначены участки

последовательностей. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы между смежными участками.

Показано, что во всех случаях самая глубокая потенциальная яма наблюдается на 2-м участке. Это говорит о том, что этот участок наиболее предпочтителен для образования кинка (или нуклеации транскрипционного пузыря). В случае немодифицированной плазмиды кинк с равной вероятностью активируется в обоих (в основной и в комплементарной) последовательностях. В случае с интегрированной в плазмиду последовательностью *polyA* кинк с большей вероятностью активируется в комплементарной последовательности *polyT*. А в случае с интегрированной в плазмиду последовательностью *polyG* кинк с большей вероятностью активируется в комплементарной последовательности *polyC*. Это свидетельствует о важной роли такого физического параметра как масса основания, которая, вместе с водородными взаимодействиями между комплементарными основаниями внутри пар, играет ключевую роль в процессе образования локально расплетенного участка. Чем легче основание, тем легче происходит нуклеация.

Были рассчитаны энергетические профили модифицированных плазмид с интегрированными во 2-й участок двумя небольшими фрагментами реальной последовательности *Escherichia coli*, содержащими промоторные участки. Исходя из вида полученных профилей удалось предсказать в какой области плазмиды с наибольшей вероятностью произойдет нуклеация транскрипционного пузыря и в каком направлении (в сторону гена *Egfr* или *mCherry*) пойдет процесс транскрипции. Это говорит о том, что в модельном эксперименте приоритетное направление транскрипции, а, следовательно, и роль нитей ДНК в качестве матричной или нематричной обусловлены энергетическими характеристиками вставляемой последовательности, независимо от ее ориентации по отношению к генам репортерных белков. Эта определяющая роль нуклеотидов нематричной нити имеет экспериментальное

(Chen, et al. 2020; Zhang, et al. 2012; Heyduk, et al. 2006; Karpen and deHaseth, 2015) и теоретическое (Roy, et al. 2018) подтверждение.

При моделировании энергетического профиля однородных и природной последовательностей, использованных в данной работе, комплементарные нити ДНК проявляли асимметрию по своей потенциальной способности к активации кинка. Асинхронный характер дестабилизации двойной спирали и преимущественная лабильность пиримидинов при взаимодействии с бактериальными хеликазами были подтверждены экспериментальными методами (Colizzi, et al. 2019).

Результаты моделирования показали, что эффективность транскрипции в заданном направлении синтеза РНК зависит от энергии активации кинка в матричной нити. Можно сказать, что динамические свойства азотистых оснований регулируют экспрессию генов. Кроме того, как будет показано ниже, динамика открытых состояний в ДНК, играющих ключевую роль в экспрессии генов, регулируется внешними воздействиями, например, торсионным моментом. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности применения расчетного метода на основе аппарата нелинейной динамики для прогнозирования биологических характеристик природных последовательностей ДНК.

III.4.6.2 Плазмида pTTQ18

Плазмида pTTQ18 (<http://www.lifesci.dundee.ac.uk>; Stark 1987) представляет собой небольшую кольцевую молекулу ДНК длиной 4563 пар оснований (Рисунок III.4.36a). Она содержит четыре функционально значимых участка: промоутер (Pr), первая и вторая кодирующие области (CDS-1 и CDS-2), терминатор (Term). Участки, расположенные между функционально значимыми участками, назовем некодирующими.

Для моделирования открытых состояний будем использовать уравнения (III.4.41) и (III.4.42), записанные в безразмерном виде, которые позволяют описывать открытые состояния, формируемые угловыми вращениями

оснований. В рамках квази-однородного приближения имеем 8 участков, разделенных 8-ю границами (Рисунок III.4.36а,б). Уравнения (III.4.41) и (III.4.42) в квази-однородном приближении переписутся в виде:

$$\begin{aligned} \tilde{I}(z') \frac{\partial^2 \phi}{\partial t'^2} - \tilde{K}'(z') \frac{\partial^2 \phi}{\partial z'^2} + \tilde{V}(z') \sin(\phi) + \tilde{\lambda}(z') \frac{\partial \phi}{\partial t'} - \frac{\tilde{K}'(z')}{\tilde{R}(z')} \left(2 \frac{\partial \phi}{\partial z'} \frac{\partial \tilde{R}}{\partial z'} + \phi \frac{\partial^2 \tilde{R}}{\partial z'^2} \right) &= 0, \\ \tilde{I}(z') &= 1 + \frac{1}{\bar{I}_1} \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{I}_\zeta - \bar{I}_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(\frac{z'_{b_{\zeta-1}} - z'}{\sigma'}\right)\right)}, & \tilde{V}(z') &= 1 + \frac{1}{\bar{V}_1} \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{V}_\zeta - \bar{V}_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(\frac{z'_{b_{\zeta-1}} - z'}{\sigma'}\right)\right)}, \\ \tilde{K}'(z') &= 1 + \frac{1}{\bar{K}'_1} \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{K}'_\zeta - \bar{K}'_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(\frac{z'_{b_{\zeta-1}} - z'}{\sigma'}\right)\right)}, & \tilde{R}(z') &= 1 + \frac{1}{\bar{R}_1} \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{R}_\zeta - \bar{R}_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(\frac{z'_{b_{\zeta-1}} - z'}{\sigma'}\right)\right)}, \\ \tilde{\lambda}(z') &= \frac{\bar{\lambda}_1}{\sqrt{V_1 I_1}} + \frac{1}{\sqrt{V_1 I_1}} \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{\lambda}_\zeta - \bar{\lambda}_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\left(\frac{z'_{b_{\zeta-1}} - z'}{\sigma'}\right)\right)}, \end{aligned} \quad (\text{III.4.88})$$

где $n = 8$ – число квази-однородных участков.

Формула для энергии покоя \bar{E}_0 кинка в квази-однородном приближении будет иметь вид:

$$\bar{E}_0(z') = 8 \sqrt{\bar{V}_1 \bar{K}'_1 \tilde{V}(z') \tilde{K}'(z')}, \quad (\text{III.4.89})$$

Усредненные значения коэффициентов определяются выражениями:

$$\begin{aligned} \bar{I}_\zeta &= I_A C_{\zeta A} + I_T C_{\zeta T} + I_G C_{\zeta G} + I_C C_{\zeta C}, \\ \bar{V}_\zeta &= V_A C_{\zeta A} + V_T C_{\zeta T} + V_G C_{\zeta G} + V_C C_{\zeta C}, \\ \bar{K}'_\zeta &= K'_A C_{\zeta A} + K'_T C_{\zeta T} + K'_G C_{\zeta G} + K'_C C_{\zeta C}, \\ \bar{R}_\zeta &= R_A C_{\zeta A} + R_T C_{\zeta T} + R_G C_{\zeta G} + R_C C_{\zeta C}, \\ \bar{\lambda}_\zeta &= \lambda_A C_{\zeta A} + \lambda_T C_{\zeta T} + \lambda_G C_{\zeta G} + \lambda_C C_{\zeta C}, \end{aligned} \quad (\text{III.4.90})$$

Здесь $C_{\zeta\alpha} = N_{\zeta\alpha} / N_\zeta$ – концентрация азотистых оснований α -го типа на ζ -м участке, $N_{\zeta\alpha}$ – число оснований α -го типа на ζ -м участке и N_ζ – общее число оснований на ζ -м участке ($\zeta = 1, 2, \dots, 8$, $\alpha = A, T, G, C$). Физические параметры оснований, используемые в вычислениях, даны в таблице III.4.9.

Таблица III.4.9. Физические параметры оснований.

	I ($\kappa\text{гм}^2$) $\times 10^{-43}$	K' (Дж) $\times 10^{-17}$	V (Дж) $\times 10^{-19}$	R (м) $\times 10^{-10}$	λ (Дж с) $\times 10^{-34}$	a (м) $\times 10^{-10}$

A	0.76	0.227	0.209	5.8	4.25	3.4
T	0.48	0.155	0.143	4.8	3.52	3.4
G	0.82	0.220	0.312	5.7	4.18	3.4
C	0.41	0.149	0.212	4.7	3.45	3.4

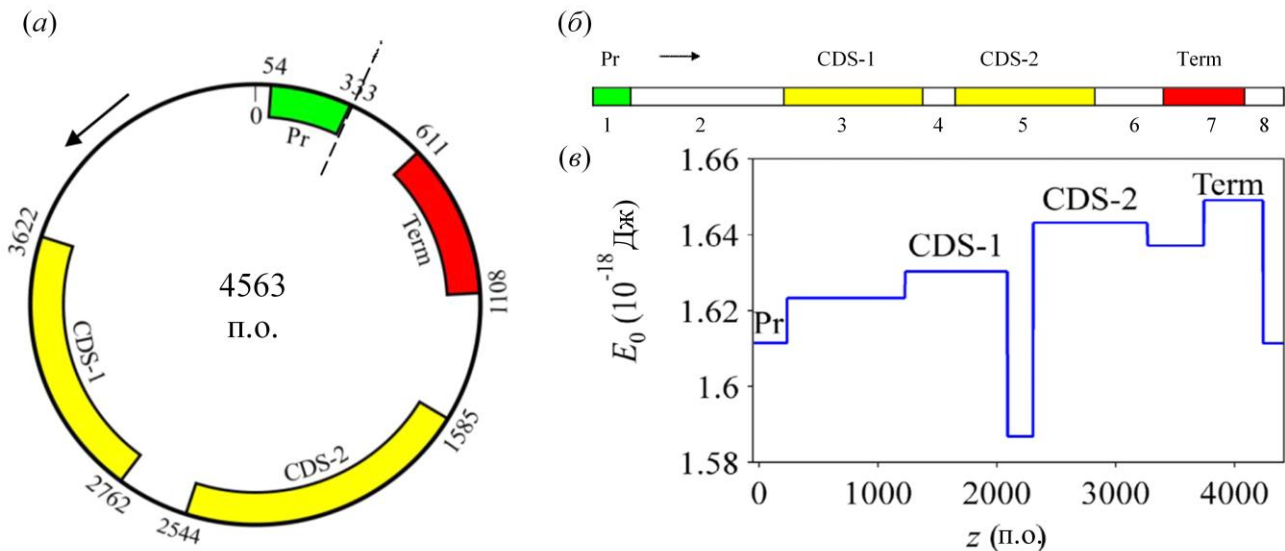


Рисунок Ш.4.36. Плазмида рТТQ18 в кольцевом (а) и в линейном (б) представлении. (в) – энергетический профиль плазмиды. Pr – промотор, CDS-1 и CDS-2 – первая и вторая кодирующие области, Term – терминатор. Стрелки показывают направление движения кинка. Пунктирная линия – линия разреза кольцевой плазмиды.

Перед исследованием динамики кинка в плазмиде был совершен переход от ее кольцевой формы к линейной. Для этого плазмиду разрезали так, как показано на рисунке Ш.4.36а пунктирной линией. Затем была рассмотрена динамика кинка в линейной плазмиде (Рисунок Ш.4.36б) для разных значений его начальных скоростей/энергий.

Сначала рассмотрели статическую задачу, в которой оценили энергетический профиль линейной плазмиды, показанный на рисунке Ш.4.36в. Он был получен с использованием формулы (Ш.4.89) и представляет собой энергию покоя кинка на соответствующих участках последовательности. Можно видеть, что среди функциональных участков промотор обладает наименьшей энергией покоя кинка, а терминатор – наибольшей. Энергии покоя кинка на

кодирующих участках имеют средние значения между промотором и терминатором. Причем, первый кодирующий участок (CDS-1) имеет меньшую энергию, чем второй (CDS-2).

Эти результаты хорошо коррелируют со свойствами функционально значимых участков рассмотренной плазмиды. Показано, что промотор имеет наименьшую, а терминатор наибольшую энергию активации кинка или, другими словами, энергию формирования открытого состояния. Это согласуется с тем, что на промоторном участке происходит инициация, а на терминаторном – завершение транскрипции.

Следующим шагом было решение динамической задачи. Для этого необходимо выбрать начальные и граничные условия. Было предположено, что в начальный момент времени $t_0 = 0$ решение уравнения (III.4.88) представляет собой решение уравнения СГ в виде кинка, расположенного в координате z_0 на первом участке последовательности и имеющего начальную скорость v_0 . Тогда начальные условия могут быть записаны в виде:

$$\begin{aligned} \phi(z, 0) &= 4 \operatorname{arctg} \left\{ \exp \left[\frac{\gamma_1}{d_1} (z - z_0) \right] \right\}, \\ \phi_t(z, 0) &= -2v_0 \frac{\gamma_1/d_1}{\cosh \left(\frac{\gamma_1}{d_1} (z - z_0) \right)}, \end{aligned} \quad (\text{III.4.91})$$

где $\gamma_1 = \sqrt{1 - (v_0/c_{01})^2}$, $c_{01} = \sqrt{\bar{K}'_1 a^2 / \bar{I}_1}$ и $d_1 = \sqrt{\bar{K}'_1 a^2 / \bar{V}_1}$ – скорость звука и размер кинка на первом участке последовательности плазмиды. Более того, предполагалось, что координата z_0 находится достаточно далеко от левого и правого концов последовательности. Тогда граничные условия на концах могут быть записаны в виде:

$$\phi(Z_L, t) = 0, \quad \phi(Z_R, t) = 2\pi, \quad (\text{III.4.92})$$

где Z_L и Z_R – координаты левого и правого концов последовательности, соответственно.

Запуская кинк, моделирующий динамическое поведение открытого состояния в плазмиде рТТQ18, из точки z_0 , находящейся на первом участке последовательности слева в сторону последнего (8-го) участка справа, как показано стрелкой на рисунке III.4.36, изучалось его динамическое поведение.

III.4.6.2.1 Результаты, полученные без учета эффекта диссипации

Без учета диссипации решение уравнения (III.4.88) $\phi(z,t)$ и его производная $\partial\phi(z,t)/\partial z$ показаны на рисунке III.4.37. Как уже отмечалось ранее, проекция производной $\partial\phi(z,t)/\partial z$ на плоскость (z,t) рассматривается как динамическая траектория кинка в исследуемой последовательности.

На рисунке III.4.38 представлены траектории кинка в последовательности рТТQ18 при различных начальных значениях скорости. Видно, что, когда начальная скорость кинка была равна 250 м/с, полной энергии кинка было недостаточно для преодоления границы с CDS-1 участком (Рисунок III.4.38а,б). Кинк отражался от этой границы. В случае, изображенном на рисунке III.4.38 (в и г), начальная скорость кинка равна 350 м/с. Тогда полная энергия кинка достаточно велика, чтобы преодолеть границу с CDS-1 участком, но недостаточна для преодоления границы с CDS-2 участком.

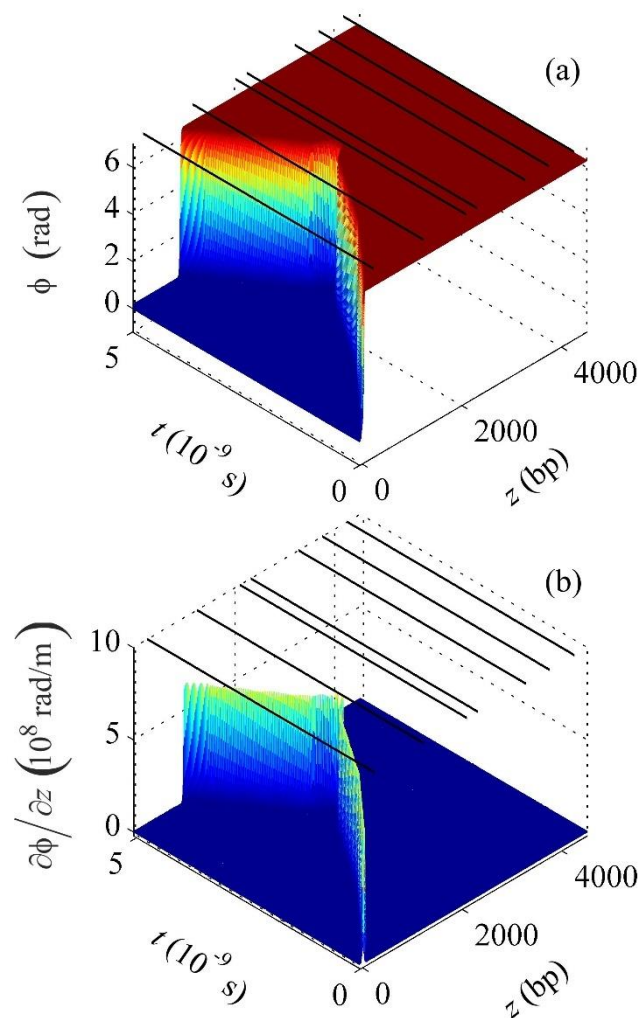


Рисунок Ш.4.37. (а) – решение $\phi(z,t)$ и (б) – производная $\partial\phi(z,t)/\partial z$ для плазмы рТТQ18. Начальная скорость $v_0 = 350$ м/с.

При увеличении начальной скорости до 380 м/с (Рисунок Ш.4.38д,е) кинк преодолевал обе границы с CDS-1 и с CDS-2, но отражался от границы с терминаторным участком. В последнем случае (Рисунок Ш.4.38ж,з) начальная скорость кинка была такова (450 м/с), что его полной энергии хватало на преодоление всех границ и он проходил всю последовательность.

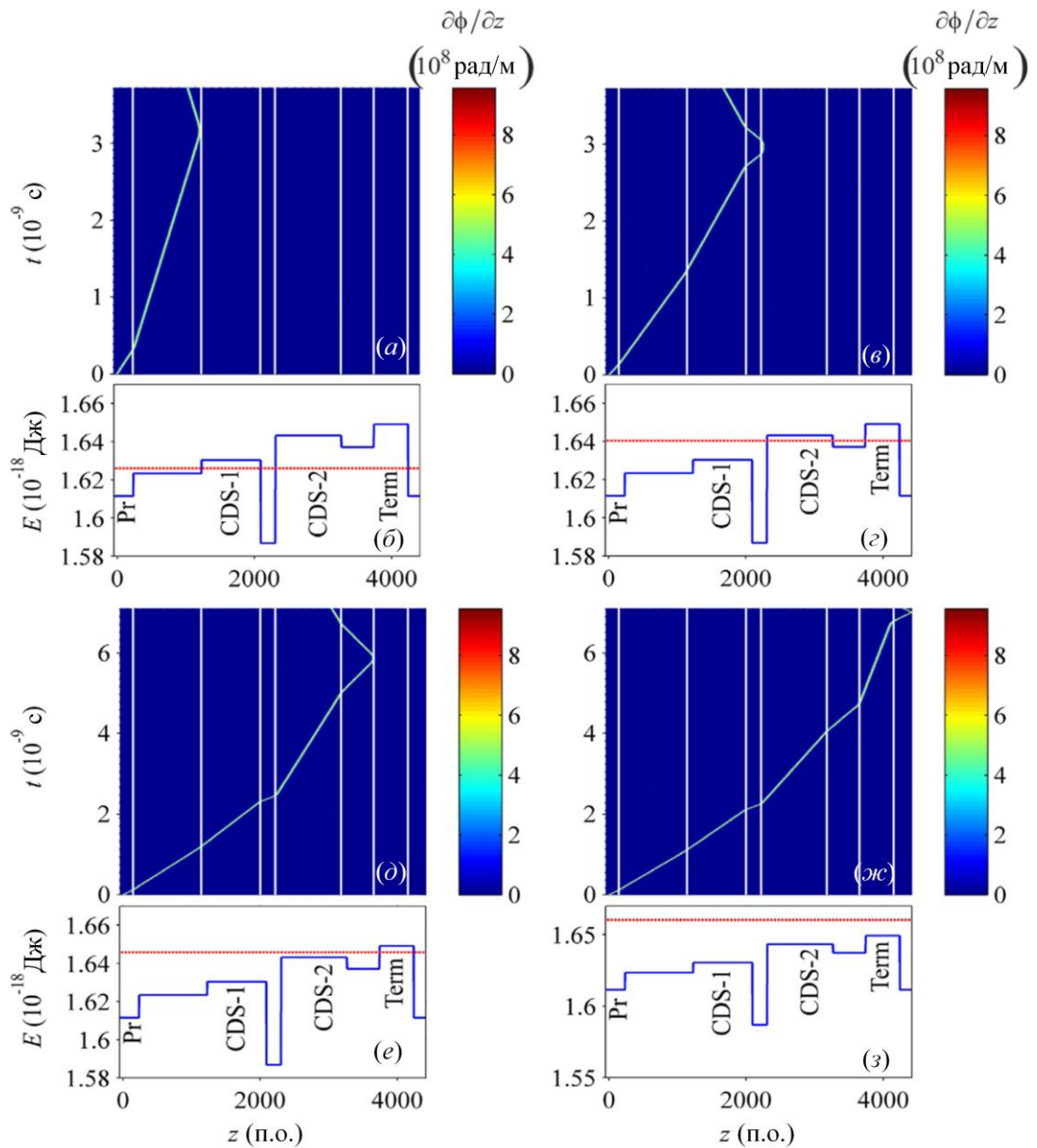


Рисунок III.4.38. Траектории кинка [(а), (б), (д), (ж)], энергетические профили плазмы рТТQ18 (сплошная линия) и полные энергии кинка (точечная линия) [(б), (г), (е), (з)] движущегося в плазме рТТQ18 с начальными скоростями: $v_0 = 250$ м/св (а) и (б), $v_0 = 350$ м/св (в) и (г), $v_0 = 380$ м/св (д) и (е), $v_0 = 450$ м/св (ж) и (з).

III.4.6.2.2 Эффект диссипации

С учетом диссипации картина сильно менялась. Так как диссипация снижала полную энергию кинка со временем, то даже при начальной скорости 450 м/с кинк не мог преодолеть первую границу с неcodирующим участком

(Рисунок III.4.39a). При увеличении скорости до очень большого значения (1800 м/с) позволило кинку добраться до CDS-1 и там остановиться (Рисунок III.4.39б). Однако, снижение коэффициентов диссипации до $\sim 10^{-36}$ Джс, что не выходило за рамки экспериментальных оценок, приводило к тому, что кинк достигал границы с терминаторным участком при начальной скорости 450 м/с (Рисунок III.4.39в). При дополнительном 5% снижении значений коэффициентов кинк преодолевал всю последовательность (Рисунок III.4.39г).

Полученные результаты показывают зависимость динамического поведения кинка или открытого состояния, распространяющегося в реальной последовательности pTTQ18, от расположения, длины и нуклеотидного состава основных функционально значимых участков. Это свидетельствует о наличие прямой взаимосвязи между функциональными и динамическими свойствами молекулы ДНК.

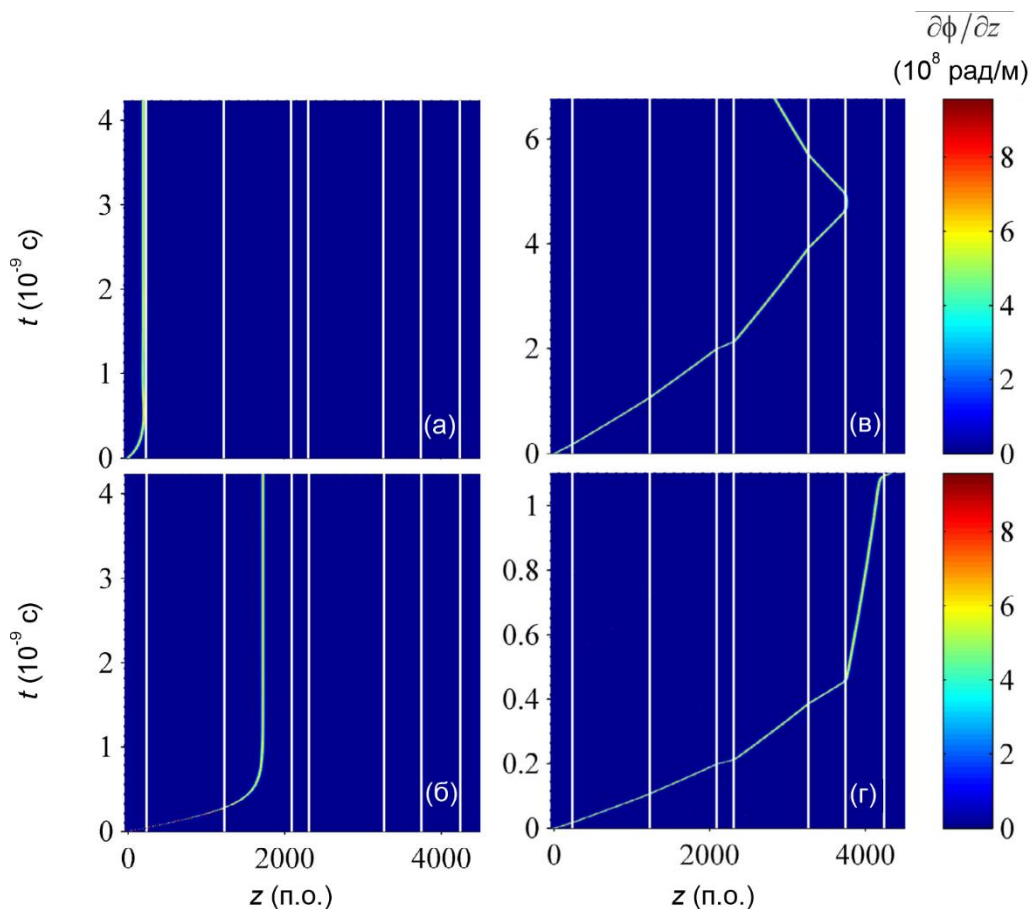


Рисунок Ш.4.39. Траектории кинка в последовательности рТТQ18. Начальная скорость: (а, в, з) – $v_0 = 450$ м/с и (б) – $v_0 = 1800$ м/с. Коэффициенты диссипации: (а, б) $\sim 10^{-34}$ Дж с, (в, з) $\sim 10^{-36}$ Дж с.

Ш.4.6.3 Ограничения

Применение рассматриваемой модели к изучению динамических свойств последовательности плазмид выявило ограничение модели. Оно связано с высокими значениями энергий активации кинка в функционально значимых участках, формирующих энергетические барьеры. Для преодоления этих энергетических барьеров кинку необходимо задавать относительно большие значения начальных скоростей, особенно при учете действия сил трения. Можно предположить, что для снятия этого ограничения в модели необходимо учитывать дополнительные внешние силы, влияющие на динамику кинка в ДНК, которые могут быть как тепловой природы, так и формироваться благодаря внутренним структурным особенностям молекулы.

Ш.4.7 Влияние внешних воздействий

Изучение динамики открытых состояний под воздействием внешних сил в молекуле ДНК является актуальной задачей. В настоящий момент активно обсуждается гипотеза о том, какие динамические условия, связанные с увеличением или с уменьшением скорости распространения транскрипционного «пузыря» (открытого состояния), могут быть ответственны за ускорения или замедления процесса транскрипции. Для исследования влияния внешних сил на динамику открытых состояний при помощи математического моделирования неоднородная модель ДНК была дополнена членом, описывающим воздействие внешних сил:

$$I(z) \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} - K'(z) a^2 \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} + V(z) \sin(\phi) - \frac{K'(z) a^2}{R(z)} \left(2 \frac{\partial \phi}{\partial z} \frac{\partial R}{\partial z} + \phi \frac{\partial^2 R}{\partial z^2} \right) + \lambda(z) \frac{\partial \phi}{\partial t} = M(z, t) \quad (\text{Ш.4.93})$$

где функция $M(z, t)$ описывает момент внешних сил. Из многообразия сил, влияющих на динамику открытых состояний в ДНК, можно выделить два основных воздействия: тепловые флуктуации и торсионный момент.

Влияние температуры на скорость транскрипции очевидно. Однако, вопрос зависимости динамики открытых состояний от температуры остается открытым. Этот вопрос исследовался на искусственной последовательности $poly(A)-poly(T)-poly(C)-poly(G)$, которая подвергалась воздействию тепловых флуктуаций. Для моделирования тепловых флуктуаций в правую часть уравнения (III.4.93) подставлялся момент случайной силы, определяемой Ланжевеновским термостатом:

$$\begin{aligned} M^{\text{случ}}(z, t) &= k_z \sqrt{2\lambda(z)k_B T} \zeta(z, t), \\ \langle \zeta(z, t) \rangle &= 0, \quad \langle \zeta(z, t), \zeta(z', t') \rangle = \delta(z - z') \delta(t - t'). \end{aligned} \quad (\text{III.4.94})$$

Здесь k_z – коэффициент, характеризующий тепловое равновесие между термостатом и ДНК, k_B – постоянная Больцмана, $T = 310\text{K}$ – температура термостата, $\delta(x - x')$ – дельта-функция Дирака.

Начальные условия задавались как и ранее в виде кинка (III.4.91), где 1 в подстрочных индексах параметров указывает на то, что параметры берутся для первого участка исследуемой искусственной последовательности (Рисунок III.4.40a, б). Граничные условия были константами так, как в (III.4.92).

Для перехода к безразмерным переменным использовалась замена z, t на z', t' , где z', t' – безразмерные координата и время:

$$\begin{aligned} t' &= \mu t, \quad z' = \eta z, \\ \mu &= \sqrt{V_1/I_1}, \quad \eta = \sqrt{V_1/(K_1' a^2)}. \end{aligned} \quad (\text{III.4.95})$$

Здесь I_1 , V_1 и K_1' – момент инерции азотистого основания, энергия взаимодействия между комплементарными основаниями и крутильная жесткость сахаро-фосфатного остова в первой однородной области соответственно. После замены переменных модельное уравнение (III.4.93) с Ланжевеновским термостатом в правой части (III.4.94) в безразмерном виде выглядело следующим образом:

$$\begin{aligned}
& \tilde{I}(z') \frac{\partial^2 \phi}{\partial t'^2} - \tilde{K}'(z') a^2 \frac{\partial^2 \phi}{\partial z'^2} + \tilde{V}(z') \sin(\phi) = \\
& = \frac{\tilde{K}'(z') a^2}{\tilde{R}(z')} \left(2 \frac{\partial \phi}{\partial z'} \frac{\partial \tilde{R}}{\partial z'} + \phi \frac{\partial^2 \tilde{R}}{\partial z'^2} \right) - \tilde{\lambda}(z') \frac{\partial \phi}{\partial t'} + \\
& \quad + \tilde{k}_z \sqrt{2 \tilde{\lambda}(z') \frac{k_B T}{\sqrt{V_1 K_1}}} \tilde{\zeta}(z', t')
\end{aligned}
\tag{III.4.96}$$

где $\tilde{k}_z = k_z / \sqrt{a}$, а $\tilde{\zeta}(z', t')$ – безразмерная случайная величина, обладающая следующими свойствами:

$$\langle \tilde{\zeta}(z', t') \rangle = 0, \quad \langle \tilde{\zeta}(z', t'), \tilde{\zeta}(z'', t'') \rangle = \tilde{\delta}(z' - z'') \tilde{\delta}(t' - t'') \tag{III.4.97}$$

Здесь $\tilde{\delta}(x - x')$ – безразмерная дельта-функция Дирака. Безразмерные динамические функции $\tilde{I}, \tilde{V}, \tilde{K}', \tilde{\lambda}$ определяются формулой (III.4.42).

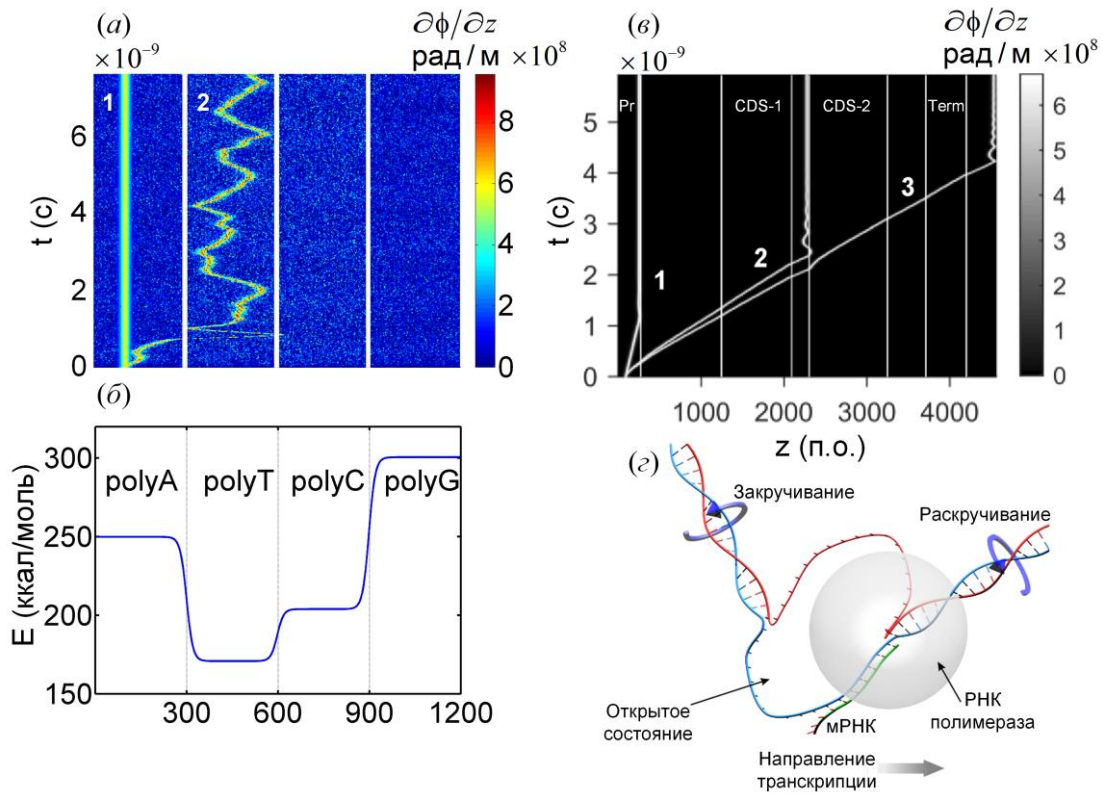


Рисунок III.4.40. Динамика открытого состояния, описываемого кинком, при внешних воздействиях в ДНК. (а) – траектории кинка с нулевой начальной скоростью в искусственной последовательности *poly(A)-poly(T)-poly(C)-poly(G)* без воздействия (1) и при воздействии (2) тепловых флуктуаций ($T = 310\text{K}$). (б) – энергетический профиль последовательности *poly(A)-poly(T)-poly(C)-poly(G)*. (в) – траектории кинка с начальной скоростью $v_0 = 50 \text{ м/с}$ в последовательности

pTQ18 при воздействии различных значений торсионного момента: $M_\tau = 7.73 \times 10^{-24}$ Дж (1), $M_\tau = 5.41 \times 10^{-23}$ Дж (2), $M_\tau = 6.18 \times 10^{-23}$ Дж (3). (z) – схема процесса транскрипции в ДНК с изображением торсионных моментов по разные стороны от транскрипционного «пузыря».

Случайный член уравнения (III.4.97) моделировался приближенным белым шумом (Кузнецов, 1998). Это кусочно-постоянный случайный процесс, который позволяет получать независимые случайные значения, не меняющиеся на промежутках времени ε_t и пространственных интервалах ε_z (корреляционные интервалы). В приближении кусочно-постоянного случайного процесса $\tilde{\zeta}(z', t')$ изменяется следующим образом:

$$\tilde{\zeta}(z', t') \rightarrow \frac{\tilde{\zeta}(z', t')}{\sqrt{\varepsilon_t \varepsilon_z}}, \quad (\text{III.4.98})$$

где ε_t и ε_z – временной и пространственный безразмерные корреляционные интервалы соответственно, а $\tilde{\zeta}(z', t')$ удовлетворяет условиям (III.4.97).

При таком приближении стохастические уравнения можно интегрировать с помощью обычных схем численного интегрирования. Для решения уравнения (III.4.93) использовалась безразмерная сетка с шагами $h=0.05$ по координате и $\tau=0.025$ по времени:

$$\begin{aligned} t'_i &= \tau i = 0, \dots, t'_{total}, \quad i = 0, \dots, N_t, \\ z'_j &= Z'_L + hj = Z'_L, \dots, Z'_R, \quad j = 0, \dots, N_z. \end{aligned} \quad (\text{III.4.99})$$

Здесь t'_{total} – общее безразмерное время численного расчета (число точек по оси $t' = 160000$), а Z'_L и Z'_R – безразмерные координаты левого и правого концов молекулы (общее число точек по оси $z' = 2303$). Соотношения между размерными и безразмерными параметрами сетки, следующие:

$$\begin{aligned} \tau &= \mu \Delta t, \quad t'_{total} = \mu t_{total}, \\ h &= \eta \Delta z, \quad Z' = \eta Z, \end{aligned} \quad (\text{III.4.100})$$

где Δt и Δz – размерные шаги сетки интегрирования.

Численное решение безразмерного уравнения (III.4.96)) проводилось с использованием разностной схемы:

$$\begin{aligned}
& \tilde{\Phi}_j^{i+1} - 2\tilde{\Phi}_j^i + \tilde{\Phi}_j^{i-1} + \frac{\tilde{\lambda}_j}{\tilde{I}_j} \tau (\tilde{\Phi}_j^{i+1} - \tilde{\Phi}_j^i) = \\
& = \frac{\tilde{K}_j}{\tilde{I}_j} \frac{\tau^2}{h^2} [\theta (\tilde{\Phi}_{j+1}^{i+1} - 2\tilde{\Phi}_j^{i+1} + \tilde{\Phi}_{j-1}^{i+1}) + (1 - \theta) (\tilde{\Phi}_{j+1}^i - 2\tilde{\Phi}_j^i + \tilde{\Phi}_{j-1}^i)] - \\
& - \tau^2 \frac{\tilde{V}_j}{\tilde{I}_j} \sin(\tilde{\Phi}_j^i) + \tau^2 \frac{\tilde{K}_j}{\tilde{I}_j \tilde{R}_j} \left[\frac{2\partial_{z'} \tilde{R}_j}{h} (\theta (\tilde{\Phi}_{j+1}^{i+1} - \tilde{\Phi}_j^{i+1}) + (1 - \theta) (\tilde{\Phi}_{j+1}^i - \tilde{\Phi}_j^i)) + \tilde{\Phi}_j^i \partial_{z'} \tilde{R}_j \right] + \quad (\text{Ш.4.101}) \\
& \quad + \frac{\tilde{\kappa}_{z,j}}{\tilde{I}_j \sqrt{\varepsilon_t \varepsilon_z}} \sqrt{2\tilde{\lambda}_j \frac{k_B T}{\sqrt{V_1 K_1}}} \tilde{\zeta}_j^i \tau^2,
\end{aligned}$$

где θ – параметр схемы интегрирования, а $\tilde{\zeta}_j^i$ – матрица независимых гауссовых случайных величин с нулевым средним и единичной дисперсией. Полученная система алгебраических уравнений была решена методом прогонки, где корреляционные интервалы выбирались равными безразмерным шагам интегрирования: $\varepsilon_t = \tau$, $\varepsilon_z = h$.

Оценка влияния тепловых флуктуаций на поведения кинка, описывавшего динамику открытого состояния в исследуемой последовательности, проводилась при помощи сравнения поведения траекторий кинка, полученных для двух случаев. Первый случай – без внешнего воздействия ($M(z, t) = 0$), второй случай – при воздействии тепловых флуктуаций на ДНК. Было показано, что поведение кинка менялось (Рисунок Ш.4.40а). Без внешнего воздействия кинк, имеющий нулевую начальную скорость, оставался в покое, не совершая поступательных движений вдоль последовательности (Рисунок Ш.4.40а (1)). Координату, где кинк покоится или прекращает свое поступательное движение в следствии диссипации, будем называть точкой покоя. После добавления в систему случайной силы кинк начинал совершать случайные блуждания возле точки покоя (Рисунок Ш.4.40а (2)). Через некоторое время это приводило к тому, что кинк, достигнув границы между первым и вторым участками, «сваливался» в потенциальную яму (Рисунок Ш.4.40б), формируемую последовательностью оснований на втором участке (*poly(T)*). В результате точка покоя перемещалась во второй участок, но при этом кинк не прекращал движение, а продолжал совершать случайные блуждания вблизи новой точки покоя (Рисунок Ш.4.40а (2)).

Важным моментом при моделировании систем с термостатом является соответствие задаваемой температуры термостата внутренней энергии системы при термодинамическом равновесии. Это означает, что через некоторый интервал времени модельная система должна достигнуть теплового равновесия и ее средняя температура \bar{T} должна стать равной температуре термостата. Температура \bar{T} определялась через удельное среднее значение кинетической энергии ϵ_k [Шайтан, Терёшкина, 2004]. С одной стороны, ϵ_k равно:

$$\epsilon_k = \sum_n \frac{I_n \left(\frac{d\phi_n}{dt} \right)}{2N}. \quad (\text{III.4.102})$$

С другой стороны, для одномерной системы:

$$\epsilon_k = \frac{k_B T}{2}. \quad (\text{III.4.103})$$

Отсюда находили сначала мгновенное значение температуры:

$$T = \sum_n \frac{I_n \left(\frac{d\phi_n}{dt} \right)^2}{Nk_B}. \quad (\text{III.4.104})$$

А затем, усреднив (III.4.104) по времени, получали среднюю температуру в модели:

$$\bar{T} = \frac{1}{Nk_B \tau} \int_{t_0}^{t_0 + \tau} \sum_n I_n \left(\frac{d\phi_n}{dt} \right)^2 dt = \frac{2}{k_B \tau} \int_{t_0}^{t_0 + \tau} \epsilon_k dt. \quad (\text{III.4.105})$$

Далее, для примера, рассматривался первый участок последовательности, для которого строилась временная зависимость ϵ_k . Уравнение (III.4.93) на этом участке будет иметь вид:

$$\begin{aligned} I_A \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} - K'_A a^2 \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} + V_A \sin(\phi) &= \\ &= -\lambda_A \frac{\partial \phi}{\partial t} + M_A^{\text{случ}}(t). \end{aligned} \quad (\text{III.4.106})$$

Начальные и граничные условия выбирались в виде:

$$\begin{aligned} \phi(z, 0) &= 0, \quad \partial_t \phi(z, 0) = 0, \\ \phi(Z_L, t) &= 0, \quad \phi(Z_R, t) = 0. \end{aligned} \quad (\text{III.4.107})$$

Используя описанную выше схему численного решения модельного уравнения, а также формулу (III.4.102), получали график временной зависимости удельной кинетической энергии ϵ_k (Рисунок III.4.41). Чтобы избежать влияния

«замороженных оснований» на концах последовательности, при проведении расчетов были исключены краевые области по 50 оснований слева и справа.

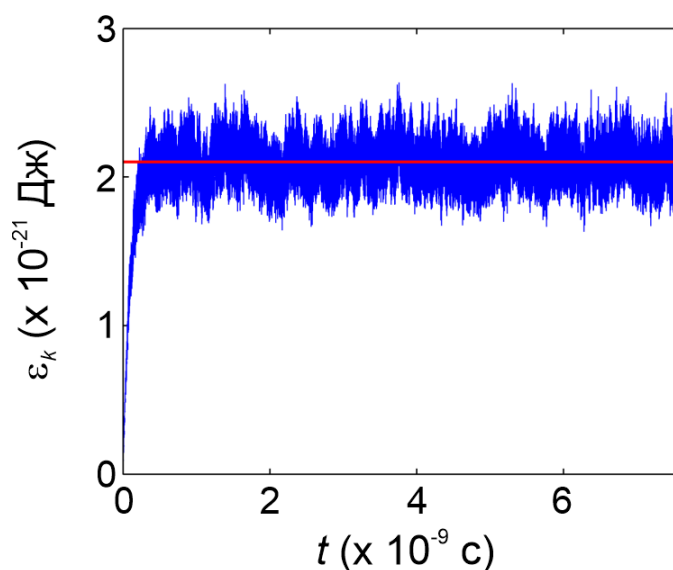


Рисунок Ш.4.41. Зависимость удельной кинетической энергии ϵ_k от времени (синяя кривая) и ее среднее значение (красная линия). Расчеты выполнены для однородной последовательности оснований (polyA).

Из рисунка Ш.4.41 видно, что время разогрева (релаксации) модельной системы мало. Оно примерно равно $t_r \approx 0.7 \times 10^{-9}$ с, в то время как общее время счета равно $t_{tot} = 8 \times 10^{-9}$ с. Кроме того, полагая, что в области, соответствующей 2-ой половине времени счета, система находится в термодинамическом равновесии, можно найти значение $\kappa_A = 0.894$, при котором средняя температура на первом участке модельной системы совпадает с температурой термостата ($T \approx 310$ K).

Таким образом, показано, что случайные тепловые флуктуации изменяют динамическое поведение открытых состояний в ДНК. Воздействие тепловых флуктуаций на кинк, моделирующий открытое состояние в искусственной последовательности, приводило к хаотическому блужданию кинка вдоль последовательности и к спонтанным переходам кинка между однородными областями.

Для изучения динамического поведения открытых состояний при внешнем воздействии в реальной последовательности ДНК использовалась плазида рТТQ18, состоящая из 4-х функционально значимых участков: промоутер (Pr), 1-я кодирующая область (CDS-1), 2-я кодирующая область (CDS-2) и терминатор (Term), и 4-х некодирующих участков (Рисунок III.4.36а,б). Исследовалось влияние внешнего торсионного момента M_τ , который формируется в процессе транскрипции за счет сил расплетающих двойную спираль ДНК перед транскрипционным «пузырем» и сворачивающих ДНК обратно после транскрипционного «пузыря» (Рисунок III.4.40з), на динамику открытого состояния с использованием математического моделирования. Для этого использовалось квази-однородное приближение (III.4.90) для уравнения (III.4.93), где $M(z, t) = M_\tau = \text{constant}$.

Численные расчеты показали, что при начальной скорости кинка $v_0 = 50$ м/с, которая была много меньше скорости звука в ДНК, и при значении торсионного момента $M_\tau = 7.73 \times 10^{-24}$ Дж кинк проходил первый участок (промоутер) и останавливался на границе с некодирующим участком, так как его энергии не хватало для преодоления энергетического барьера (Рисунок III.4.40в (1)). При той же самой начальной скорости, увеличение торсионного момента до $M_\tau = 5.41 \times 10^{-23}$ Дж приводило к тому, что кинк, пройдя первую кодирующую область (CDS-1), достигал границы с CDS-2 (Рисунок III.4.40в (2)). Дальнейшее увеличение торсионного момента до $M_\tau = 6.18 \times 10^{-23}$ Дж позволило кинку достигнуть конца последовательности (Рисунок III.4.40в (3)).

Выяснилось, что скорость кинка,двигающегося по i -му квази-однородному участку последовательности, через некоторый релаксационный период достигала стационарного значения $v_{st,i}$. Это значение не зависло от начальной скорости кинка, а определялось только значением торсионного момента:

$$v_{st,i} = \frac{\bar{c}_i}{\sqrt{1 + \left(\frac{4\lambda_i}{M_\tau \pi}\right)^2 \frac{\bar{v}_i}{\bar{I}_i}}}, \quad \bar{c}_i = \sqrt{\frac{K'_i a^2}{\bar{I}_i}}. \quad (\text{III.4.108})$$

Оценка релаксационного периода показала, что его значение составляло порядка нескольких сотен пико секунд ($T_{st} \sim 10^{-10}$ с). Зная связь стационарной скорости кинка с торсионным моментом и энергетический профиль последовательности, можно оценить минимальные значения торсионного момента, достаточные для преодоления границ с участками, для которых на энергетическом профиле формируется барьер. Результаты показаны в таблице III.4.10.

Таблица III.4.10. Минимальные значения торсионного момента для преодоления границ с «барьерными» участками в последовательности pTTQ18.

Граница	Торсионный момент M_τ^{\min} , Дж
1 → 2	2.74×10^{-23}
2 → 3	1.81×10^{-23}
4 → 5	5.39×10^{-23}
6 → 7	5.09×10^{-23}

Сравнение поведения траекторий кинка (Рисунок III.4.40в) с минимальными значениями торсионного момента (Таблица III.4.10) показало, что оценка M_τ^{\min} применима к анализу поведения кинка только в том случае, когда длина участка перед барьером достаточна для достижения кинком стационарной скорости, или время прохождения участка должно быть больше периода релаксации. Например, длина участка 4 перед CDS-2 слишком мала, в результате при значении торсионного момента $M_\tau = 5.41 \times 10^{-23}$ Дж большем, чем $M_{\tau,4 \rightarrow 5}^{\min} = 5.39 \times 10^{-23}$ кинк не смог преодолеть энергетический барьер и отразился.

Таким образом, исследования показали, что при заданной силе трения и при любых начальных скоростях $v_0 \ll C$, где C – скорость звука в ДНК, динамика открытых состояний определяется только величиной торсионного момента. Это снимает ограничение с модели, касающееся необходимости задания кинку относительно больших значений начальных скоростей для преодоления высоких энергетических барьеров в функционально значимых участках.

В целом, было показано, что внешние воздействия на открытые состояния в ДНК играют важную роль в их динамическом поведении. Тепловые флуктуации могут приводить к спонтанным переходам открытых состояний между однородными участками в последовательности, а торсионный момент к детерминистическому контролю их динамического поведения, что определяет динамическую регуляцию экспрессии генов.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Физика является одним из ярчайших примеров успешности применения методов математического моделирования к изучению природных явлений. Все известные на сегодняшний момент фундаментальные законы природы имеют математическую формализацию. Это позволяет правильно структурировать экспериментальные данные, адекватно их интерпретировать, прогнозировать исход и планировать новые эксперименты.

В диссертации показано, что для математического моделирования сложных биологических динамических систем, находящихся на разных уровнях иерархической организации, удобно применять физические аналоги. Они позволяют не только использовать соответствующий математический аппарат, но и проводить, в ходе описания, разумные редуцирования и применять адекватные приближения. Это позволило исследовать и выявить новые механизмы динамической регуляции функционального поведения биологических систем при аperiodических и периодических воздействиях,

обусловленной динамическим поведением структурных элементов специфическим для рассматриваемого масштаба структурной организации.

На организменном уровне с использованием модифицированной математической модели «PNEUMA» был показан новый механизм динамической регуляции ВСП и ее зависимости от частоты контролируемого дыхания. При помощи разработанной гидродинамической модели сердечно-сосудистой системы человека была выявлена принципиальная динамическая связь между низкочастотными колебаниями кровотока в периферическом микроциркуляторном русле и активностью сердца при низкоинтенсивном стохастическом воздействии в условиях отсутствия контроля со стороны вегетативной нервной системы. Это говорит о прямом вкладе системной регуляции в низкочастотную регуляцию микрогемодинамики периферического кровотока, которую обычно ассоциируют с функциональной активностью локальных регуляторных систем.

Для понимания нарушений регуляторных механизмов периферической микрогемодинамики на клеточном уровне, обусловленных окислительным стрессом при метаболических расстройствах, была разработана математическая модель 4-х стадийного фагоцитарного ответа нейтрофилов на микробную провокацию, учитывающая активацию и функционирование NADPH-оксидазы, опосредующей респираторный взрыв. Модель описывает кинетику респираторного взрыва нейтрофилов, соответствующую экспериментально наблюдаемой кинетики хемилюминесцентных кривых в ответ на опсонизированный зимозан для нормального и высокого уровня *D*-глюкозы в крови здоровых и больных сахарным диабетом 2-го типа. При помощи модели впервые были выявлены скрытые механизмы динамической регуляции АФК-зависимого фагоцитоза и показана связь между изменениями кинетических параметров респираторного взрыва нейтрофилов и нарушениями молекулярного механизма выработки супероксида у больных.

На молекулярно-клеточном уровне исследовались механизмы регуляции ионной проводимости биологических мембран, играющей ключевую роль в

функциональных ответах клеток на внешние стимулы и в межклеточной коммуникации. В частности, изучался механизм формирования немарковской кинетики ионного тока через ионный канал. Для этого была построена математическая модель воротного механизма одиночного ионного канала, учитывающая динамическую регуляцию скорости вытеснения молекул воды из гидрофобной поры канала и ее зависимость от трансмембранного электрического потенциала. С помощью модели впервые показана динамическая связь между гидрофобным вытеснением воды из поры канал и формированием немарковской кинетики ионного тока через канал при разных значениях электрического трансмембранного потенциала.

На молекулярном уровне исследовалась функциональная активность молекулы ДНК, определяющая базовую регуляцию функционирования всех живых систем. Для этого была разработана математическая модель, описывающая угловую динамику азотистых оснований в неоднородной ДНК. Решения уравнений модели (кинки), моделирующие открытые состояния в ДНК, а также разработанные новые методы оценки энергетического профиля ДНК и визуализации движения кинков впервые позволили выявить условия существования эффекта Касмана, оценить возможность управления поведением кинков внешними воздействиями, показать связь между динамикой кинка и функционально значимыми участками (промоторами, терминаторами и кодирующими областями) в ДНК и показать возможность динамического регулирования экспрессией генов.

Таким образом, полученные результаты исследования динамики структурных элементов и их параметров в различных биологических системах свидетельствуют о том, что наравне с экспериментальными методами исследования в биологии и медицине, моделирование биофизических процессов с использованием физических аналогов является перспективным направлением в изучении живой природы, позволяющее уточнить механизмы их динамической регуляции.

V. ВЫВОДЫ

1. Используя методы математического моделирования, предложен новый механизм динамической регуляции сердечного ритма при резонансно-подобном низкочастотном отклике сердечно-сосудистой системы на респираторное воздействие, проявляемого в процессе респираторной синусовой аритмии с контролем частоты дыхания. Показано, что механизм заключается в существовании обратной степенной зависимости симпатической и парасимпатической регуляции сердечного ритма от респираторного водителя ритма.
2. С помощью разработанной гидродинамической модели сердечно-сосудистой системы человека показан вклад активности сердца в низкочастотную регуляцию кровотока в периферическом микроциркуляторном русле при низкоинтенсивных случайных возмущениях тонуса стенок желудочков. Эта регуляторная роль обусловлена гидродинамическими параметрами сердечно-сосудистого русла без участия вегетативной нервной системы и показывает новый механизм динамической связи между низкочастотными колебаниями микроциркуляторного кровотока и функционированием сердца.
3. Построена математическая модель 4-х стадийного фагоцитарного ответа гранулоцитов на микробную провокацию, учитывающая активацию и функционирование NADPH-оксидазы, опосредующую респираторный взрыв. Обнаружены нарушения в механизмах динамической регуляции ответа нейтрофилов на провоцирующий стимул в крови больных сахарным диабетом 2-го типа при нормальной и высокой концентрациях *D*-глюкозы. Показано, что гипергликемия повышала способность гранулоцитов к фагоцитозу, снижала синхронизацию сборки комплекса NADPH -оксидазы и повышала его стабильность у больных. Эти нарушения могут служить причиной изменений в механизмах регуляции периферического кровотока при метаболических расстройствах.

4. На базе построенной математической модели, описывающей динамику воротных трансмембранных сегментов ионного канала, регулируемую ионную проводимость биологических мембран, показано, что гидрофобность поры играет определяющую роль в формировании экспериментально наблюдаемой колоколообразной зависимости параметров немарковской кинетики ионного тока через канал от электрического трансмембранного потенциала.
5. Построена математическая модель ДНК, учитывающая неоднородную структуру молекулы. С помощью модели и разработанного метода траекторий исследована динамика локально расплетенных участков ДНК, которые моделировались односолитонными решениями (кинками). Показана зависимость динамики кинков от функционально значимых участков в ДНК и внешнего торсионного момента, определяющая динамическую регуляцию экспрессии генов в процессе транскрипции.
6. В результате решения поставленных задач были выявлены динамические свойства регуляторных механизмов, определяющих динамическую регуляцию биофизических процессов и тип динамического поведения оптимально соответствующего функциональным задачам, выполняемым биологическими системами в зависимости от их уровня структурно-функциональной организации, что свидетельствует о ведущей роли динамической регуляции биофизических процессов в формировании адекватного отклика живых организмов на разные эндо- и экзогенные факторы.

VI. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

ССС – сердечно-сосудистая система;

NADPH-оксидаза – никотинамид-аденин-динуклеотидфосфат оксидаза;

АФК – активные формы кислорода;

BCP – вариабельность сердечного ритма;

ВНС – вегетативная нервная система;
IL – интерлейкин;
HF – высокочастотный;
LF – низкочастотный⁴
VLF – очень низкочастотный;
ЧСС – частота сердечных сокращений;
РСА – респираторная синусовая аритмия;
ЭК – эндотелиальные клетки;
АТФ – аденозинтрифосфорная кислота;
ГМК – гладкомышечные клетки;
ЛДФ – лазерная доплеровская флоуметрия;
NOS – NO-синтаза;
ККТ – красные кровяные тельца;
РАФ – фактор активации тромбоцитов;
LTB₄ – лейкотриен В₄;
fMLF – N-формилметиониллейцилфенилаланин;
РАМР – патогенассоциированные молекулярные паттерны;
PRR – рецепторы распознавания паттернов;
TLR – toll-подобные рецепторы;
СД/СД₂T – сахарный диабет / сахарный диабет 2го типа;
ALL – осевое рассеяние света;
IAS – интенсивность рассеяния под промежуточным углом;
PSS – поляризованное боковое рассеяние;
KcsA – калиевый канал из стрептомицетов A;
K_v – потенциал-зависимый калиевый канал;
MthK – кальций-активируемый калиевый канал из *Methanobacterium thermoautotrophicum*;
мРНК – матричная РНК;
СА – синоатриальный узел;
БВК – блок вегетативного контроля;

ЦНС – центральная нервная система;
АД – артериальное давление;
САД – системное артериальное давление;
РВР – респираторный водитель ритма;
ОСР – обобщенный сосудистый резервуар;
ЭГС – эффективное гидродинамическое сопротивление;
БШО – белый шум с ограниченной полосой частот;
МЦР – микроциркуляторное русло;
СL-кривые – хемилюминесцентные кривые;
ОЗ – опсонизированный зимозан;
БФА – бестрендовый флуктуационный анализ;
СГ – синус-Гордона;

VII. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баевский, Р.М., Берсенева, А.П. Оценка адаптационных возможностей организма и риск развития заболеваний. Москва: Медицина, 1997.
2. Буллаф Р., Кодри Ф. (ред.). Солитоны — Мир, 1983. — с. 408.
3. Гриднев В.И., Киселев А.Р., Котельникова Е.В., и др. Влияние внешних периодических стимулов на вариабельность сердечного ритма у здоровых лиц и у пациентов с ишемической болезнью сердца // Физиология человека. – 2006. – Т.32. – №5. – С.74–83.
4. Гриневич А.А., Асташев М.Е. 2010. Фрактальные свойства ионных каналов. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing. 148 с.
5. Гриневич А.А., Асташев М.Е., Казаченко В.Н. 2007. Мультифрактальная кинетика воротного механизма ионных каналов в биологических мембранах. Биол. мембраны. 24 (3), 234–250.
6. Гринченко, В.Т., Рудницкий, А.Г. Модель взаимодействия сердечно-сосудистой и респираторной систем. // Акустичний вісник. 2006. - Т. 9 (3). - С. 16 – 26.

7. Гусев, Н.Б. Внутриклеточные связывающие белки часть 1. Классификация и структура // Соросовский образовательный журнал. - 1998. - Т. 5. - С. 5-9.
8. Казаченко, В.Н., Кочетков, К.В., Асташев, М.Е., Гриневич, А.А. Фрактальные свойства воротного механизма потенциалозависимых каналов в нейронах *L.stagnalis* // Биофизика. – 2004. – Т. 49. – С. 852–865.
9. Кирилина, Т.В., Красников, Г.В., Танканаг, А.В., Пискунова, Г.М., Чемерис, Н.К. Пространственная синхронизация колебаний кровотока в системе микроциркуляции кожи человека. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2009. – Т. 8(3). – С. 32–36.
10. Киселев, А.Р., Гриднев, В.И. Колебательные процессы в вегетативной регуляции сердечно-сосудистой системы // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т.7. – №1. – С.34–39.
11. Киселев, А.Р., Киричук, В.Ф., Посненкова, О.М., Гриднев, В.И. Изучение природы периодических колебаний сердечного ритма на основе проб с управляемым дыханием // Физиология человека. 2005. – Т. 31. № 3. – С. 76–83.
12. Кузнецов Д.Ф. Некоторые вопросы теории численного решения стохастических дифференциальных уравнений Ито // Дифференциальные уравнения и процессы управления. — 1998. — Т. 1. — С. 66–367.
13. Мун, Ф. Хаотические колебания. М.: Мир, 1990.
14. Рясик А.А., Якушевич Л.В. Динамические характеристики кинков и антикинков ДНК // Компьютерные исследования и моделирование. 2012 Т. 4(1) С. 209–217.
15. Танканаг А.В., Гриневич А.А., Тихонова И.В., Чаплыгина А.В., Чемерис Н.К. Фазовая синхронизация колебаний кожного кровотока человека при асимметричном локальном нагреве // Биофизика, 2017, т. 62, № 4, с. 769-776.
16. Танканаг А.В., Чемерис Н.К. Адаптивный вейвлет-анализ колебаний периферического кровотока кожи человека. Биофизика. 2009. Т. 54. № 3. С. 537–544.

17. Тюрина, М.Й., Красников, Г.В., Танканаг, А.В., Пискунова, Г.М., Чемерис, Н.К. Спектры девиации частоты сердечных сокращений человека при контролируемом дыхании // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2011. – Т. 2. – С. 64–70.
18. Шестакова, М.В., Викулова, О.К., Исаков, М.А., Дедов, И.И. Сахарный диабет и COVID-19: анализ клинических исходов по данным регистра сахарного диабета российской федерации // Проблемы Эндокринологии. 2020. – Т. 66(1). – С. 35-46.
19. Шустер, Г. Детерминированный хаос. М.: Мир. 1988.
20. Якушевич Л. В. Нелинейная физика ДНК. — Ижевск: НИЦ РХД, 2007. — с. 252.
21. Якушевич Л.В., Краснобаева Л.А. Влияние диссипации и внешнего поля на динамику локальных конформационных возмущений в ДНК // Биофизика. 2007. Т. 52(2). С. 237-243.
22. Якушевич Л.В., Краснобаева Л.А., Шаповалов А.В. и др. Биофизика. 50, 450 (2005).
23. Якушевич Л.В., Рясик А.А. Компьютерные исследования и моделирование. 4 (1), 209 (2012).
24. Якушевич, Л.В., Савин, А.В., Маневич, Л.И. Нелинейные волны в молекулах ДНК, содержащих границу между двумя однородными областями // Компьютерные исследования и моделирование. 2009. Т. 1. С. 209–215.
25. Abdulhameed, Y.A., Lancaster, G., McClintock, P.V.E., Stefanovska, A. On the suitability of laser-Doppler flowmetry for capturing microvascular blood flow dynamics from darkly pigmented skin // *Physiol Meas.* 2019. – V. 40. – P. 074005.
26. Achermann P., Borbely A.A. Mathematical models of sleep regulation. *Front. Biosci.* 2003. V. 8. P. s683–s693.
27. Adcock, S.A., McCammon, J.A. Molecular Dynamics: Survey of Methods for Simulating the Activity of Proteins // *Chem. Rev.* - 2006. - V. 106. - N 2. - P. 1589–1615.

28. Agarwal, S.C., Allen, J., Murray, A., Purcell, I.F. Comparative reproducibility of dermal microvascular blood flow changes in response to acetyl-choline iontophoresis, hyperthermia and reactive hyperemia // *Physiol Meas.* 2010. – V. 31. – P. 1-11.
29. Aggarwal, S.K., MacKinnon, R. Contribution of the S4 segment to gating charge in the *Shaker* K⁺ channel // *Neuron.* - 1996. - V. 16. - P. 1169-1177.
30. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
31. Albrecht, H.E., Damaschke, N., Borys, M., Tropea, C. (2003) *Laser Doppler and Phase Doppler Measurement Techniques.* New York: Springer, pp. 4–30.
32. Aldrich, R.W., Corey, D.P., Stevens, C.F. A reinterpretation of mammalian sodium channel gating based on single channel recording // *Nature.* - 1983. - V. 306. - P. 436-441.
33. Allen, T.W., Kuyucak, S., Chung, S.H. Molecular dynamics study of the KscA potassium channel // *Biophys. J.* - 1999. - V. 77. - P. 2502-2516.
34. AlMomani, T.D., Vigmostad, S.C., Chivukula, V.K., et al. Red blood cell flow in the cardiovascular system: a fluid dynamics perspective // *Crit Rev Biomed Eng.* 2012. – V. 40. – P. 427–440.
35. Altan-Bonnet, G., Libchaber, A., Krichevsky, O. Bubble dynamics in double-stranded DNA // *Phys Rev Lett.* 2003. – V. 90. – P. 138101.
36. Angelone A, Coulter NA. Respiratory sinus arrhythmia: a frequency dependent phenomenon. *Journal of Applied Physiology.* 1964;19(3):479–82.
37. Apostolova, N., Iannantuoni, F., Gruevska, A., Muntane, J., Rocha, M., Victor, V.M. Mechanisms of action of metformin in type 2 diabetes: Effects on mitochondria and leukocyte-endothelium interactions // *Redox Biol.* – 2020. – V. 34. – P. 101517.
38. Arciero, J.C., Causin, P., Malgaroli, F. Mathematical methods for modeling the microcirculation. *AIMS Biophysics.* 2017. – V. 4. – P. 362-399.
39. Armstrong, C.M., Bezanilla, F. Inactivation of sodium channel. II. Gating current experiments // *J. Gen. Physiol.* - 1977. - V. 70. - P. 567-590.

40. Ashby, R. An introduction to cybernetics. Chapman & Hall. 1956. London.
41. Atkinson, N.S., Robertson, G.A., Ganetzky, B. A component of calcium-activated potassium channels encoded by the *Drosophila slo* locus // Science. - 1991. - V. 253. - P. 551-555.
42. Auerbach, A. A statistical analysis of acetylcholine receptor activation in *Xenopus* myocytes: stepwise versus concerted models of gating // J. Physiol. - 1993. - V. 461. - P. 339-378.
43. Austin, R.H., Beson, K.W., Eisenstein, L., Frauenfelder, H., Gunsalus, I.C. Dynamics of ligand binding to myoglobin // Biochemistry. - 1975. - V. 14. - P. 5335-5373.
44. Awrejcewicz J., Gapa S., and Yakushevich L.V. Rotational oscillations of bases in the DNA short fragments. In: Dynamical Systems. Theory and Applications (Eds. Awrejcewicz J., Kazmierczak M., Mrozowski J., and Olejnik P.). Left Grupa, Lodz, 2011, pp. 269–274.
45. Bajorath, J., Raghunathan, S., Hinrichs, W., Saenger, W. Long-range structural changes in proteinase K triggered by calcium ion removal // Nature. - 1989. - V. 337. - P. 481-484.
46. Ball, F.G., Samson, M.S.P. Ion channel gating mechanism: model identification and parameter estimation from single channel recording // Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. - 1989. - V. 236. - P. 385-416.
47. Bandeira, H.T., Barbosa, C.T., Oliveira, R.C., Aguiar, J.F., Nogueira, R.A. Chaotic model and memory in single calcium-activated potassium channel kinetics // Chaos. – 2008. – V. 18. – P. 033136-033136–6.
48. Banwarth-Kuhn M, Sindi S. How and why to build a mathematical model: A case study using prion aggregation. J Biol Chem. 2020;295(15):5022-5035.
49. Barkley MD. Salt dependence of the kinetics of the lac repressor-operator interaction: role of nonoperator deoxyribonucleic acid in the association reaction. Biochemistry. 1981;20(13):3833-42.
50. Bashford, J. D. Salerno's model of DNA reanalysed: could solitons have biological significance? // J.Biol.Phys. 2006. V. 32. P. 27-47.

51. Basu RS, Warner BA, Molodtsov V, Pupov D, Esyunina D, Fernández-Tornero C, Kulbachinskiy A, Murakami KS. Structural basis of transcription initiation by bacterial RNA polymerase holoenzyme. *J Biol Chem.* 2014;289(35):24549-59.
52. Battaglia, M. Neutrophils and type 1 autoimmune diabetes // *Curr Opin Hematol.* 2014. – V. 21. – P. 8–15.
53. Bechtel, W. (2007) Biological mechanisms: organized to maintain autonomy. In: Boogerd, F., Bruggerman, F., Hofmeyr, J.H., Westerhoff, H.V. (eds) *Systems biology: philosophical foundations.* Elsevier, Amsterdam, pp 269–302.
54. Bell, S. P., Dutta, A. DNA replication in eukaryotic cells // *Annu. Rev. Biochem.* — 2002. — Vol. 71. — P. 333–374.
55. Bennink ML, Leuba SH, Leno GH, Zlatanova J, de Grooth BG, Greve J. Unfolding individual nucleosomes by stretching single chromatin fibers with optical tweezers. *Nat Struct Biol.* 2001;8(7):606-10.
56. Berg OG, von Hippel PH. Diffusion-controlled macromolecular interactions. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1985;14:131-60.
57. Berg OG, Winter RB, von Hippel PH. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory. *Biochemistry.* 1981;20(24):6929-48.
58. Berger, R.D., Saul, J.P., Cohen, R.J. Assessment of autonomic response by broadband respiration *IEEE Trans // Biomed. Eng.* 1989. – V. 36. – P. 1061-1065.
59. Bernard, C. *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux.* Bailliére. 1878. Paris.
60. Bernardi, L, Hayoz, D, Wenzel, R, Passino, C, Calciati, A, Weber, R, Noll, G. Synchronous and baroreceptor-sensitive oscillations in skin microcirculation: evidence for central autonomic control // *Am J Physiol.* 1997. – V. 273. – P. H1867–H1878.
61. Bernardi, L., Porta, C., Casucci, G., Balsamo, R., Bernardi, N.F., Fogari, R., Sleight, P. Dynamic Interactions Between Musical, Cardiovascular, and Cerebral Rhythms in Humans // *Circulation.* 2009. – V. 119. – P. 3171–3180.

62. Bernardi, L., Porta, C., Gabutti, A., Spicuzza, L., Sleight, P. Modulatory effects of respiration // *Auton Neurosci*. 2001. – V. 90. – P. 47–56.
63. Bernjak A., Clarkson P.B.M., McClintock P.V.E, et al. *Microvasc. Res*. 2008. 76(3):224.
64. Berntson GG, Thomas Bigger J, Eckberg DL, et al. Heart rate variability: Origins, methods, and interpretive caveats. *Psychophysiology*. 1997;34(6):623–48.
65. Bernstein, J. Untersuchungen zur Thermodynamik der bioelektrischen Ströme // *Pflügers Arch*. 1902. – V. 92. – P. 521–562.
66. Bertuglia S., Colantuoni A., and Intaglietta M. *Microvasc. Res*. 1994. 48(1):68.
67. Bezanilla, F. The voltage sensor in voltage-dependent ion channels // *Physiol. Rev*. - 2000. - V. 80. - P. 555-592.
68. Bezanilla, F., Perozo, E., Stefani, E. Gating of *Shaker* K⁺ channels. II. The components of gating currents and a model of channel activation // *Biophys. J*. - 1994. - V. 66. - P. 1011-1021.
69. Bich, L., Damiano, L. On the emergence of biology from chemistry: a discontinuist perspective from the point of view of stability and regulation // *Orig Life Evol Biosph*. – 2012. – V. 42(5). – P. 475–482.
70. Bich, L., Mossio, M., Ruiz-Mirazo, K. et al. Biological regulation: controlling the system from within // *Biol Philos*. – 2016. – V. 31. – P. 237–265.
71. Blatz, A.L., Magleby, K.L. Quantitative description of three modes of activity of fast chloride channels from rat skeletal muscle // *J. Physiol*. - 1986. - V. 378. - P. 141-174.
72. Borbely A.A., Achermann P. Sleep homeostasis and models of sleep regulation. In: *Principles and Practice of Sleep Medicine*. Eds. Kogger M.H., Roth T., Dement W.C. Philadelphia: Saunders WB, 2000.
73. Bothfeld, W., Kapov, G., Tyo, K.E.J. A glucose-sensing toggle switch for autonomous, high productivity genetic control // *ACS Synth Biol*. – 2017. – V. 6. – P. 1296–1304.

74. Boyaci, H., Chen, J., Jansen, R. et al. Structures of an RNA polymerase promoter melting intermediate elucidate DNA unwinding // *Nature*. 2019 – V. 565. – P. 382–385.
75. Braverman, I.M., Keh-Yen, A. Ultrastructure of the human dermal microcirculation. III. The vessels in the mid- and lower dermis and subcutaneous fat // *J Invest Dermatol*. 1981. – V. 77. – P. 297-304.
76. Braverman, I.M. The cutaneous microcirculation // *J Invest Dermatol Symp Proc*. 2000. – V. 5. – P. 3-9.
77. Bremer H, Dennis PP (1996) Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. Neidhardt, et al. eds. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed.
78. Brockman, I.M., Prather, K.L.J. Dynamic metabolic engineering: New strategies for developing responsive cell factories // *Biotechnol J*. – 2015. – V. 10. – P. 1360–1369.
79. Brower-Toland BD, Smith CL, Yeh RC, Lis JT, Peterson CL, Wang MD. Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):1960-5.
80. Bruggeman F.J., Westerhoff H.V. The nature of systems biology // *Trends in Microbiology*. 2007. – V. 15. – P. 45-50.
81. Bryant Z, Stone MD, Gore J, Smith SB, Cozzarelli NR, Bustamante C. Structural transitions and elasticity from torque measurements on DNA. *Nature*. 2003;424(6946):338-41.
82. Bustamante C, Bryant Z, Smith SB. Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics. *Nature*. 2003;421(6921):423-7.
83. Bustamante C, Smith SB, Liphardt J, Smith D. Single-molecule studies of DNA mechanics. *Curr Opin Struct Biol*. 2000;10(3):279-85.
84. Cadoni, M., De Leo, R., Demelio, S. Soliton Propagation in Homogeneous and Inhomogeneous Models for DNA Torsion Dynamics // *J. Nonlinear Math. Phys.* 2011. V. 18(2). P. 287–319.

85. Cadoni, M., De Leo, R., Gaeta G. A composite model for DNA torsion dynamics // *Phys.Rev. E*. 2007. – V. 75. – P. 021919.
86. Caielli, S., Banchereau, J., Pascual, V. Neutrophils come of age in chronic inflammation // *Curr Opin Immunol*. 2012. – V. 24. – P. 671–677.
87. Cameron, N.E., Eaton, S.E., Cotter, M.A., Tesfaye, S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy // *Diabetologia*. 2001. – V. 44(11). – P. 1973-88.
88. Cannon, W.B. Organization for physiological homeostasis // *Physiol Rev*. – 1929. – V. 9(3). – P. 399–431.
89. Careri, G, Fasella, P, Gratton, E. Statistical time events in enzymes: a physical assessment // *CRC Crit. Rev. Biochem.* - 1975. - V. 3. - P. 141-164.
90. Carrizzo, A., Izzo, C., Oliveti, M., Alfano, A., Virtuoso, N., Capunzo, M., Di Pietro, P., Calabrese, M., De Simone, E., Sciarretta, S., Frati, G., Migliarino, S., Damato, A., Ambrosio, M., De Caro, F., Vecchione, C. The Main Determinants of Diabetes Mellitus Vascular Complications: Endothelial Dysfunction and Platelet Hyperaggregation // *Int J Mol Sci*. 2018. – V. 19(10). – P. 2968.
91. Cavalcanti, S., Fontanazzi, F. Deterministic model of ion channel flipping with fractal scaling of kinetics rates // *Ann. Biomed. Engr.* - 1999. - V. 27. - P. 682-695.
92. Cha, A., Bezanilla, F. Structural implications of fluorescence quenching in the *Shaker* K⁺ channel // *J. Gen. Physiol.* - 1998. - V. 112. - P. 391-408.
93. Cha, A., Snyder, G.E., Selvin, P.R., Bezanilla, F. Atomic scale movement of the voltage sensing region in a potassium channel measured via spectroscopy // *Nature*. - 1999. - V. 402. - P. 809-813.
94. Chalancon, G., Ravarani, C.N., Balaji, S., Martinez-Arias, A., Aravind, L., Jothi, R., Babu, M.M. Interplay between gene expression, noise, and regulatory network architecture // *Trends Genet.* – 2012. – V. 28(5). – P. 221–232.
95. Chaudhury, A., Sohani, A.R., Higgins, J.M. Mathematical modeling of white blood cell population dynamics for diagnosis and prognosis // *Blood*. 2016. – V. 128(22). – P. 1333.

96. Cheetham G. M., Steitz, T. A. Insights into transcription: structure and function of single-subunit DNA-dependent RNA polymerases // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 2000. — Vol. 10. — P. 117–123.
97. Chen, D.P., Barcilon, V., Eisenberg, R.S. Constant fields and constant gradients in open ionic channels // *Biophys. J.* - 1992. - V. 61. - P. 1372-1393.
98. Chen, D.P., Eisenberg, R.S., Jerome, J.W., Shu, C.-W. Hydrodynamic model of temperature change in open ionic channels // *Biophys. J.* - 1995. - V. 69. - P. 2304-2322.
99. Chen, J., Chiu, C., Gopalkrishnan, S., et al. Stepwise Promoter Melting by Bacterial RNA Polymerase // *Mol Cell.* 2020. – V. 78. – P. 275.
100. Chen, S.H., Chan, N.L., Hsieh, T.S. New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases // *Annu Rev Biochem.* – 2013. – V. 82. – P. 139-70.
101. Chen, X.J., Luo, C.H., Chen, M.H., Zhou, X. Combination of “quadratic adaptive algorithm” and “hybrid operator splitting” or uniformization algorithms for stability against acceleration in the Markov model of sodium ion channels in the ventricular cell model // *Med Biol Eng Comput.* – 2019. – V. 57. – P. 1367–1379.
102. Chen Z, Yang H, Pavletich NP. Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature.* 2008;453(7194):489-4.
103. Cheng L, Ivanova O, Fan H-H, Khoo MCK. An integrative model of respiratory and cardiovascular control in sleep-disordered breathing. *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 2010;174(1-2):4–28.
104. Chinarov, V.A., Gaididu, Y.B., Kharkyanen, V.N., Sit’ko, S.P. Ion pores in biological membranes as self-organized bistable systems // *Phys. Rev. A.* - 1992. - V. 46. - P. 5232-5241.
105. Chrousos, G.P. Stress and disorders of the stress system // *Nat Rev Endocrinol.* 2009. – V. 5. – P. 374-381.
106. Chung, B., Johnson, P.C., Popel, A.S. Application of Chimera grid to modelling cell motion and aggregation in a narrow tube // *Int J Numer Meth Fluids.* 2007. – V. 53. – P. 105–128.

107. Chung, S., Allen, T.W., Kuyucak, S. Conducting-state properties of the KcsA potassium channel from molecular and Brownian dynamics simulations // *Biophys. J.* - 2002. - V. 82. - P. 628-645.
108. Clauner, K.S., Manuzzu, L.M., Gandhi, C.F., Isakoff, E.Y. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the *Shaker* potassium channel // *Nature.* - 1999. - V. 402. - P. 813-817.
109. Clemson, P.T., Hoag, J.B., Cooke, W.H., Eckberg, D.L., Stefanovska, A. Beyond the Baroreflex: A New Measure of Autonomic Regulation Based on the Time-Frequency Assessment of Variability, Phase Coherence and Couplings // *Front. Netw. Physiol.* – 2022. – V. 2. – P. 891604.
110. Cohen, J.E. Mathematics is biology's next microscope, only better; biology is mathematics' next physics, only better // *PLoS Biol.* – 2004. – V. 2. – N. 12. – P. e439.
111. Cohen, M.A., Taylor, J.A. Short-term cardiovascular oscillations in man: measuring and modelling the physiologies // *The Journal of Physiology.* 2002. – V. 542. – P. 669–83.
112. Colizzi, F., Perez-Gonzalez, C., Fritzen, R., et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2019. – V. 116. – N. 45. – P. 22471.
113. Colquhoun, D., Hawkes, A.G. On the stochastic properties of single ion channels // *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* - 1981. - V. 211. - P. 205-235.
114. Colquhoun, D., Hawkes, A.G., Srodzinski, K. Joint distribution of apparent open times and shut times of single ion channel and maximum likelihood fitting of mechanisms // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. A.* - 1996. - V. 354. - P. 2555-2590.
115. Cortes, D., Perozo, E. Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K⁺ channel (SKC1): oligomeric stoichiometry and stability // *Biochemistry.* - 1997. - V. 36. - P. 10343-10352.
116. Cox, D.H., Cui, J., Aldrich, R.W. Allosteric gating of large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel // *J. Gen. Physiol.* - 1997. - V. 110. - P. 257-281.

117. Cracowski, J.L., Roustit, M. Current methods to assess human cutaneous blood flow: an updated focus on laser-based-techniques // *Microcirculation*. 2016. – V. 23. – P. 337–344.
118. Cracowski, J.L., Roustit, M. Human Skin Microcirculation // *Compr Physiol*. 2020. – V. 10. – P. 1105-1154.
119. Christensen, W. (2007) The evolutionary origins of volition. In: Ross, D., Spurrett, D., Kincaid, H., Stephens, G.L. (eds) *Distributed cognition and the will: individual volition and social context*. MIT Press, Cambridge, pp 255–287.
120. Cristini, V., Kassab, G.S. Computer modeling of red blood cell rheology in the microcirculation: a brief overview // *Ann Biomed Eng*. 2005. – V. 33. – P. 1724–1727.
121. Cuenda, S., Sanchez, A. Disorder and fluctuations in nonlinear excitations in DNA // *Fluctuation and Noise Letters*. - 2004a. - V. 4. - P. L-571.
122. Cuenda, S., Sanchez, A. Nonlinear excitations in DNA: Aperiodic model versus actual genome sequences // *Phys. Rev.* - 2004b. - V. E-70. - P. 05193.
123. Cui, J., Cox, D.H., Aldrich, R.W. Intrinsic voltage dependence and Ca^{2+} regulation of *mslo* large conductance Ca -activated K^+ channels // *J. Gen. Physiol.* - 1997. - V. 109. - P. 647-673.
124. Cui Y, Bustamante C. Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(1):127-32.
125. Daan S., Beersma D.G., Borbely A.A. Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *Am. J. Physiol.* 1984. V. 246. P. R161–R183.
126. Davenport RJ, Wuite GJ, Landick R, Bustamante C. Single-molecule study of transcriptional pausing and arrest by *E. coli* RNA polymerase. *Science*. 2000;287(5462):2497-500.
127. Davidson, E.H. *The regulatory genome*. Academic Press. 2006. New York.
128. De La Fuente, I.M., Malaina, I., Pérez-Samartín, A. et al. Dynamic properties of calcium-activated chloride currents in *Xenopus laevis* oocytes // *Sci Rep*. – 2017. – V. 7. – P. 41791.

129. Deamer, D. Systems biology, synthetic biology and the origin of life // EMBO Rep. – 2009. – V. 10. – P. 1–4.
130. Decker KB, Hinton DM. Transcription regulation at the core: similarities among bacterial, archaeal, and eukaryotic RNA polymerases. *Annu Rev Microbiol.* 2013;67:113-39.
131. Deufel C, Forth S, Simmons CR, Dejgosha S, Wang MD. Nanofabricated quartz cylinders for angular trapping: DNA supercoiling torque detection. *Nat Methods.* 2007;4(3):223-5.
132. Diaz, L., Meera, P., Amigo, J., Stefani, E., Alvarez, O., Toro, L., Latorre, R. Role of the S4 segment in a voltage-dependent calcium sensitive potassium (*hSlo*) channel // *J. Biol. Chem.* - 1998. - V. 273. - P. 32430-32436.
133. Dominguez-Adame, F., Sanchez, A., Kivshar, Yu.S. Soliton pinning by long-range order in aperiodic systems // *Phys. Rev.* - 1995. - V. E-52. - P. 2183.
134. Doong, S.J., Gupta, A., Prather, K.L.J. Layered dynamic regulation for improving metabolic pathway productivity in *Escherichia coli* // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2018. – V. 115(12). – P. 2964-9.
135. Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Glubis, J.M., Cohen, S.L., Cahit, B.T., MacKinnon, R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity // *Science.* - 1998. - V. 280. - P. 69-76.
136. Draghici, A.E., Taylor, J.A. The physiological basis and measurement of heart rate variability in humans // *Journal of Physiological Anthropology.* – 2016. – V. 35. – N. 1. – P. 22.
137. Duffin J., Mohan R.M., Vasiliou P., Stephenson R., Mahamed S. A model of the chemoreflex control of breathing in humans: model parameters measurement. *Respir. Physiol.* 2000. V. 120. P. 13–26.
138. Duzdevich D, Redding S, and Greene EC. DNA Dynamics and Single-Molecule Biology. *Chem. Rev.* 2014. 114(6):3072–3086.
139. Easton, D.M. Exponentiated exponential model (Gompertz kinetics) of Na⁺ and K⁺ conductance changes in squid giant axon // *Biophys. J.* - 1978. - V. 22. - P. 15-28.

140. Eigen, M. New looks and outlooks on physical enzymology // *Q. Rev. Biophys.* - 1968. - V. 1. - P. 3-33.
141. Eigen, M., Hammes, G. G. Elementary steps in enzyme reactions // *Adv. Enzym.* - 1963. - V. 25. - P. 1-39.
142. El-Benna, J., Dang, P.M., Gougerot-Pocidalò, M.A., Elbim, C. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses // *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2005. – V. 53. – P. 199–206.
143. El-Benna, J., Hurtado-Nedelec, M., Marzaioli, V., Marie, J.-C., Gougerot-Pocidalò, M.-A., My-Chan Dang, P. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation // *Immunological Reviews*. 2016. – V. 273. – P. 180–193.
144. El Hanafi D, Bossi L. Activation and silencing of leu-500 promoter by transcription-induced DNA supercoiling in the Salmonella chromosome. *Mol Microbiol*. 2000;37(3):583-94.
145. Englander, S. W., Kallenbach, N. R., Heeger, A. J., Krumhansl, J. A., Litwin, S. Nature of the open state in long polynucleotide double helices: Possibility of soliton excitations // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1980. — Vol. 77. — P. 7222–7226.
146. Fabrega C, Shen V, Shuman S, Lima CD. Structure of an mRNA capping enzyme bound to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Cell*. 2003;11(6):1549-61.
147. Feklístov A, Sharon BD, Darst SA, Gross CA. Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annu Rev Microbiol*. 2014;68:357-76.
148. Fell, D. Understanding the control of metabolism. Portland University Press. 1997. London.
149. Ferraro-Gideon J, Sheykhani R, Zhu Q, Duquette ML, Berns MW, Forer A. Measurements of forces produced by the mitotic spindle using optical tweezers. *Mol Biol Cell*. 2013;24(9):1375-86.

150. Fitz V, Shin J, Ehrlich C, Farnung L, Cramer P, Ziburdaev V, Grill SW. Nucleosomal arrangement affects single-molecule transcription dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(45):12733-12738.
151. Flavahan, N.A. A vascular mechanistic approach to understanding Raynaud phenomenon // *Nat Rev Rheumatol*. 2015. – V. 11. – P. 146-158.
152. Forde NR, Izhaky D, Woodcock GR, Wuite GJ, Bustamante C. Using mechanical force to probe the mechanism of pausing and arrest during continuous elongation by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(18):11682-7.
153. Forth S, Deufel C, Sheinin MY, Daniels B, Sethna JP, Wang MD. Abrupt buckling transition observed during the plectoneme formation of individual DNA molecules. *Phys Rev Lett*. 2008;100(14):148301.
154. Fournié, C., Chouchou, F., Dalleau, G., Caderby, T., Cabrera, Q., Verkindt, C. Heart rate variability biofeedback in chronic disease management: A systematic review // *Complementary Therapies in Medicine*. 2021. – V. 60. – P. 102750.
155. Frauenfelder, H., Parak, F., Young, R.D. Conformational substates in proteins // *Annu. Rev. Biophys. Chem.* - 1988. - V. 17. - P. 451-479.
156. Fuchs, D., Dupon, P.P., Schaap, L.A., Draijer, R. The association between diabetes and dermal microvascular dysfunction non-invasively assessed by laser Doppler with local thermal hyperemia: a systematic review with meta-analysis // *Cardiovasc Diabetol*. 2017. – V. 16. – P. 11.
157. Gaeta, G. A realistic version of the Y model for DNA dynamics and selection of soliton speed // *Phys. Lett. A*. 1994. – V. 190. – P. 301.
158. Gaeta, G. On a model of DNA torsion dynamics // *Phys. Lett. A*. 1990. – V. 143. – P. 227.
159. Gaeta, G. Solitons in Yakushevich-like models of DNA dynamics with improved intrapair potential // *J. Nonlinear Math. Phys.* 2007. – V. 14. – P. 57.
160. Gaeta, G. Solitons in the Yakushevich model of DNA beyond the contact approximation // *Phys. Rev. E*. 2006. – V. 74. – P. 021921.

161. Ganesan, P., He, S., Xu, H. Analysis of retinal circulation using an image-based network model of retinal vasculature // *Microvasc Res.* 2010. – V. 80. – P. 99–109.
162. Gang Y, Malik M. Heart rate variability analysis in general medicine. *Indian Pacing Electrophysiol. J.* 2003;3:34–40.
163. Ganji M, Kim SH, van der Torre J, Abbondanzieri E, Dekker C. Intercalation-Based Single-Molecule Fluorescence Assay To Study DNA Supercoil Dynamics. *Nano Lett.* 2016;16(7):4699-707.
164. Ganti, T. Chemoton theory. Kluwer Academic/Plenum Publisher. 2003a. New York.
165. Ganti, T. The principles of life. Oxford University Press. 2003. Oxford.
166. Gartenberg MR, Wang JC. Positive supercoiling of DNA greatly diminishes mRNA synthesis in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(23):11461-5.
167. Gaudier M, Schuwirth BS, Westcott SL, Wigley DB. Structural basis of DNA replication origin recognition by an ORC protein. *Science.* 2007;317(5842):1213-6.
168. Gerland U, Moroz JD, Hwa T. Physical constraints and functional characteristics of transcription factor-DNA interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 17;99(19):12015-20.
169. Ghosh, A., Bansal, M. A. A glossary of DNA structures from A to Z // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* — 2003. — Vol. 59. — 602–626 p.
170. Goldman SR, Ebright RH, Nickels BE. Direct detection of abortive RNA transcripts in vivo. *Science.* 2009;324(5929):927-8.
171. Gomez-Lagunas, F., Armstrong, C.M. Inactivation in *Shaker* B K⁺ channels: a test for the number of inactivating particles on each channel // *Biophys. J.* - 1995. - V. 68. - P. 89-95.
172. Goodman SD, Nash HA. Functional replacement of a protein-induced bend in a DNA recombination site. *Nature.* 1989;341(6239):251-4.
173. Goodwill, A.G., Frisbee, J.C. Oxidant stress and skeletal muscle microvasculopathy in the metabolic syndrome // *Vasc. Pharmacol.* 2012. – V. 57. – P. 150–159.

174. Gosak M., Markovič R., Dolencek J., Rupnik M.S., Marhl M., Stožer A., Perc M. Network science of biological systems at different scales: A review // *Physics of Life Reviews*. 2018. – V. 24. – P. 118-135.
175. Gralla JD, Carpousis AJ, Stefano JE. Productive and abortive initiation of transcription in vitro at the lac UV5 promoter. *Biochemistry*. 1980;19(25):5864-9.
176. Greenleaf A. Getting a grip on the CTD of Pol II. *Structure*. 2003;11(8):900-2.
177. Greenman, R.L., Panasyuk, S., Wang, X., Lyons, T.E., Dinh, T., Longoria, L., Giurini, J.M., Freeman, J., Khaodhiar, L., Veves, A. Early changes in the skin microcirculation and muscle metabolism of the diabetic foot // *Lancet*. 2005. – V. 366(9498). – P. 1711-7.
178. Griesemer, J., Szathmáry, E. Ganti's chemoton model and life criteria. In: Rasmussen, S., Bedau, M., Chen, L., Deamer, D., Krakauer, D.C., Packard, N.H., Stadler, P.F. (eds) *Protocells. Bridging nonliving and living matter*. MIT Press. 2009. Cambridge, pp 481–513
179. Groemping, Y., Rittinger, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective // *Biochem J*. 2005. – V. 386. – P. 401–416.
180. Gibb, A.J., Colquhoun, D. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by L-glutamate in cells dissociated from adult rat hippocampus // *J. Physiol.* - 1992. - V. 456. - P. 143-179.
181. Goncharov, N.V., Nadeev, A.D., Jenkins, R.O., Avdonin, P.V. Markers and Biomarkers of Endothelium: When Something Is Rotten in the State // *Oxid Med Cell Longev*. – 2017. P. – 9759735.
182. Gould, I.G., Linninger, A.A. Hematocrit distribution and tissue oxygenation in large microcirculatory networks // *Microcirculation*. 2015. – V. 22. – P. 1–18.
183. Gruber TM, Gross CA. Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:441-66.
184. Guéron, M., Kochoyan, M. and Leroy, J.L. A single mode of DNA base-pair opening drives imino proton exchange // *Nature*. 1987. – V. 328. – P. 89–92.
185. Guven, G., Hilty, M.P., Ince, C. Microcirculation: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Application // *Blood Purif*. 2020. – V. 49. – P. 143-150.

186. Ha T. Single-molecule methods leap ahead. *Nat Methods*. 2014;11(10):1015-8.
187. de Haan, J.B., Cooper, M.E. Targeted antioxidant therapies in hyperglycemia-mediated endothelial dysfunction // *Front Biosci (Schol Ed)*. – 2011. – V. 3(2). – P. 709-29.
188. Hahn, R. Removal of inactivation causes time-invariant sodium current decays // *J. Gen. Physiol.* - 1988. - V. 92. - P. 331-350.
189. Halford SE, Marko JF. How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucleic Acids Res*. 2004;32(10):3040-52.
190. Halford SE, Szczelkun MD. How to get from A to B: strategies for analysing protein motion on DNA. *Eur Biophys J*. 2002 Jul;31(4):257-67.
191. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, D., Sigworth, F.J. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // *Pflugers Arch.* - 1981. - V. 391. - P. 85-100.
192. Hampton, M.B., Kettle, A.J., Winterbourn, C.C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing // *Blood* 1998. – V. 12. – P. 3007–3017.
193. Hanaoka, K., Wright, J.M., Cheglakov, I.B., Morita, T., Guggino, W.B. A 59 amino acid insertion increases Ca^{2+} sensitivity of rbsl01, a Ca^{2+} -activated K^+ channel in renal epithelia // *J. Membr. Biol.* - 1999. - V. 172. - P. 193-201.
194. Hanke, A. and Metzler, R. Bubble dynamics in DNA // *J. Phys. A: Math. Gen.* 2003. – V. 36. – P. L473.
195. Harada, Y., Ohara, O., Takatsuki, A., Itoh, H., Shimamoto, N., Kinosita, K. Jr. Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase // *Nature*. – 2001. – V. 409. – N. 6816. – P. 113-5.
196. Hayashi, F., Means, T.K., Luster, A.D. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function // *Blood*. 2003. – V. 102. – P. 2660–2669.
197. Heginbotham, L., Odessey, E., Miller, C. Tetrameric stoichiometry of a prokaryotic K^+ channel // *Biochemistry*. - 1997. - V. 36. - P. 10335-10342.

198. Hellums, J.D., Nair, P.K., Huang, N.S., et al. Simulation of intraluminal gas transport processes in the microcirculation // *Ann Biomed Eng.* 1996. – V. 24. – P. 1–24.
199. Hellums, J.D. The resistance to oxygen transport in the capillaries relative to that in the surrounding tissue // *Microvasc Res.* 1977. – V. 13. – P. 131–136.
200. Herbert, A., Rich, A. The biology of left-handed Z-DNA // *J Biol Chem.* – 1996. – V. 271. – N. 20. – P. 11595-8.
201. Heyduk, E., Kuznedelov, K., Severinov, K., et al. // *J Biol Chem.* - 2006 – V. 281 – N. 18. – P. 12362.
202. Hicks, G.A., Marrion, N.V. Ca^{2+} -dependent inactivation of large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channels in rat hippocampal neurons produced by pore block from an associated particle // *J. Physiol. (London).* - 1998. - V. 508. - P. 721-734.
203. Hille, B. Ionic selectivity, saturation, and block in sodium channels. A four-barrier model // *J. Gen. Physiol.* - 1975. - V. 66. - P. 535-560.
204. Hille, B. Ionic channels of excitable membranes. 2rd. ed. Sinauer Associates. Sunderland. MA. 1992.
205. Hille, B. Ionic channels of excitable membranes. 3rd. ed. Sinauer Associates. Sunderland. MA. 2001.
206. von Hippel, P.H., Berg, O.G. Facilitated target location in biological systems // *J Biol Chem.* – 1989. – V. 264. - N. 2. - P. 675-8.
207. von Hippel, P. H. DNA-Protein Interactions to the Macromolecular Machines of Gene Expression // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* — 2007. — Vol. 36. — P. 79–105.
208. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. Current carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol.* - 1952. - V. 116. - P. 449-472.
209. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. The component of membrane conductance in the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol.* – 1952a. - V. 116. - P. 473-496.

210. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. Quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve // J. Physiol. - 1952b. - V. 117. - P. 500-544.
211. Holmgren, M., Jurman, M.E., Yellen, G. N-type inactivation and the S4-S5 region of the *Shaker* K⁺ channel // J. Gen. Physiol. - 1996. - V. 108. - P. 195-206.
212. Holmgren, M., Smith, P.L., Yellen, G. Trapping of organic blockers by closing of voltage-dependent K⁺ channels: evidence for a trap door mechanism of activation gating // J.Gen.Physiol. - 1997. - V. 109. - P. 527-535.
213. Horn, R. Statistical methods for model discrimination. Applications to gating kinetics and permeation of the acetylcholine receptor channel // Biophys. J. - 1987. - V. 51. - P. 255-263.
214. Horn, R., Lange K. Estimating kinetic constants from single channel data // Biophys. J. - 1983. - V. 43. - P. 207-223.
215. Horrigan, F.T., Aldrich, R.W. Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels // J. Gen. Physiol. - 2002. - V. 120. - P. 267-305.
216. Hoshi, T., Zagotta, V.N., Aldrich, R.W. Biophysical and molecular mechanisms of *Shaker* potassium channel inactivation // Science. - 1990. - V. 250. - P. 533-538.
217. Hoshi, T., Zagotta, V.N., Aldrich, R.W. Two types of inactivation in *Shaker* K⁺ channels. Effects of alteration in the carboxyterminal region // Neuron. - 1991. - V. 7. - P. 547-556.
218. Hsu, LM. Monitoring abortive initiation // Methods. – 2009. – V. 47. - N 1. – P. 25-36.
219. Hsu LM. Promoter clearance and escape in prokaryotes. Biochim Biophys Acta. 2002;1577(2):191-207.
220. <http://medbiol.ru/medbiol/anatomia/000007e7.htm> (дата обращения: 30.10.2018).
221. <http://meduniver.com/Medical/Physiology/357.html> (дата обращения: 30.10.2018).
222. <http://www.amedgrup.ru/davlen.html> (дата обращения: 30.10.2018).

223. <http://www.km.ru/zdorove/encyclopedia/pokazateli-deyatelnosti-serdtsa> (дата обращения: 30.10.2018).
224. <http://www.lifesci.dundee.ac.uk/groups/mikestark/pTTQ18DNA.txt> (дата обращения: 13.01.2015).
225. [https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET_and_duet_vectors_\(novagen\)&plasmid=pET-28b\(%2B\)](https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=pET_and_duet_vectors_(novagen)&plasmid=pET-28b(%2B)) (дата обращения: 01.11.2020).
226. Hunter P. Biology is the new physics. *EMBO Rep.* 2010;11(5):350-2.
227. Hutchings, C.J., Colussi, P., Clark, T.G. Ion channels as therapeutic antibody targets // *Mabs.* – 2019. – V. 11. – P. 265–296.
228. Hwa, T., Marinari, E., Sneppen, K., Tang, L.-H. Localization of denaturation bubbles in random DNA sequences // *P. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 2003. – V. 100. – P. 4411-4416.
229. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes—2021 // *Diabetes Care*. 2021. – V. 44 (Supplement_1). – P. S1–S2.
230. Isakoff, E.Y., Jan, Y.-N., Jan, L.-N. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the *Shaker* K⁺ channel // *Nature*. - 1991. - V. 353. - P. 86-90.
231. Jacob, F. *La logique du vivant. Une histoire de l'hérédité.* Gallimard. 1970. Paris.
232. Jacob, F., Monod, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins // *J Mol Biol.* – 1961. – V. 3. – P. 318–356.
233. Jensen M.O., Borhani D.W., Lindorff-Larsen K., Maragakis P., Jogini V., Eastwood M.P., Dror R.O., and Shaw D.E. 2010. Principles of conduction and hydrophobic gating in K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(13), 5833–5838.
234. Johnson, J., Jagers, R.M., Gopalkrishna S, Dahdah A, Murphy AJ, Hanssen NMJ, Nagareddy PR. Oxidative Stress in Neutrophils: Implications for Diabetic Cardiovascular Complications // *Antioxid Redox Signal.* – 2022. – V. 36(10-12). – P. 652-666.
235. Jonsson, F., et al. Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis // *J Clin Invest.* 2011. – V. 121. – P. 1484–1496.

236. Kadlec, A.O., Gutterman, D.D. Redox Regulation of the Microcirculation. *Compr Physiol.* – 2019. – V. 10. – P. 229-259.
237. Kannengiesser, C., et al. Molecular epidemiology of chronic granulomatous disease in a series of 80 kindreds: identification of 31 novel mutations // *Hum Mutat.* 2008. – V. 29. – P. E132–E149.
238. Karavaev, A.S., Prokhorov, M.D., Ponomarenko, V.I., Kiselev, A.R., Gridnev, V.I., Ruban, E.I. and Bezruchko, B.F. Synchronization of low-frequency oscillations in the human cardiovascular system // *Chaos.* 2009. – V. 19. – P. 033112.
239. Karpel, R.L. LAST Motifs and SMART Domains in Gene 32 Protein: An Unfolding Story of Autoregulation? // *IUBMB Life.* 2002. – V. 53. – P. 161-166.
240. Karpen ME, deHaseth PL. Base flipping in open complex formation at bacterial promoters. *Biomolecules.* 2015 Apr 28;5(2):668-78.
241. Karplus, M., McCammon, J.A. The internal dynamics of globular proteins // *CRC Crit. Rev. Biochem.* - 1981. - V. 9. - P. 293-349.
242. Kasman, A., LeMesurier, B. Codon Bias, DNA transcription forks, and Kink-Solitons, IMA Workshop on Mathematics of DNA Structure, Function, and Interactions, September 16–21, 2007 [Electronic resource]. — URL: <http://kasmana.people.cofc.edu/DNA-soliton-poster.pdf> (accessed: 12.02.2019).
243. Kelman, Z., O'Donnell, M. DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. // *Annu Rev Biochem.* 1995. V. 64. P. 171-200.
244. Khoo M.C. A model-based evaluation of the single-breath CO₂ ventilatory response test. *J. Appl. Physiol.* 1990. V. 68. P. 393–399.
245. Kim Y, Geiger JH, Hahn S, Sigler PB. Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex. *Nature.* 1993;365(6446):512-20.
246. Kirkegaard K, Buc H, Spassky A, Wang JC. Mapping of single-stranded regions in duplex DNA at the sequence level: single-strand-specific cytosine methylation in RNA polymerase-promoter complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 May;80(9):2544-8.

247. Kiselev, A.R., Gridnev, V.I., Prokhorov, M.D., Karavaev, A.S., Posnenkova, O.M., Ponomarenko, V.I. and Bezruchko, B.P. Selection of optimal dose of beta-blocker treatment in myocardial infarction patients based on changes in synchronization between 0.1 Hz oscillations in heart rate and peripheral microcirculation // *J. Cardiovasc Med.* 2012. – V. 13. – P. 491–498.
248. Klafter, J., Slesinger, M.F. On the relationship among three theories of relaxation in disordered systems // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 1986. - V. 83. - P. 848-851.
249. Kleiger RE, Stein PK, Bigger JT. Heart Rate Variability: Measurement and Clinical Utility. *Annals of Noninvasive Electrocardiology.* 2005;10(1):88–101.
250. Knock, G.A. NADPH oxidase in the vasculature: Expression, regulation and signalling pathways; role in normal cardiovascular physiology and its dysregulation in hypertension // *Free Radic Biol Med.* – 2019. – V. 145. – P. 385-427.
251. Kortis, K., Goldin, A. Sodium channel inactivation is altered by substitution of voltage sensor positive charges // *J. Gen. Physiol.* - 1997. - V. 110. - P. 403-413.
252. Koshland, D.E., Nemethy, G., Filmer, D. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits // *Biochemistry.* - 1966. - V. 5. - P. 365-385.
253. Kotani, K., Struzik, Z.R., Takamasu, K., Stanley, H.E., Yamamoto, Y. Model for complex heart rate dynamics in health and diseases. // *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2005. – V. 72(4 Pt 1). – P. 041904.
254. Kouzine F, Gupta A, Baranello L, Wojtowicz D, Ben-Aissa K, Liu J, Przytycka TM, Levens D. Transcription-dependent dynamic supercoiling is a short-range genomic force. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(3):396-403.
255. Kouzine F, Liu J, Sanford S, Chung HJ, Levens D. The dynamic response of upstream DNA to transcription-generated torsional stress. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(11):1092-100.
256. Kouzine F, Sanford S, Elisha-Feil Z, Levens D. The functional response of upstream DNA to dynamic supercoiling in vivo. *Nat Struct Mol Biol.* 2008;15(2):146-54.

257. Kozlov, I., Zhrebtsov, E., Masalygina, G., Podmasteryev, K., Dunaev, A. Laser Doppler Spectrum Analysis Based on Calculation of Cumulative Sums Detects Changes in Skin Capillary Blood Flow in Type 2 Diabetes Melitus // *Diagnostics* (Basel). 2021. – V. 11(2). – P. 267.
258. Krasilnikov AS, Podtelezhnikov A, Vologodskii A, Mirkin SM. Large-scale effects of transcriptional DNA supercoiling in vivo. *J Mol Biol.* 1999;292(5):1149-60.
259. Krasnikov, G.V., Tyurina, M.Y., Tankanag, A.V., Piskunova, G.M., Chemeris, N.K. Analysis of heart rate variability and skin blood flow oscillations under deep controlled breathing. // *Respir Physiol Neurobiol.* 2013. – V. 185(3). – P. 562–70.
260. Krasnobaeva L.A. and Yakushevich L.V. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology.* 13 (1) 1540002 (2015).
261. Krasnobaeva L.A. and Yakushevich L.V. The effects of dissipation and external field on the dynamics of local conformational perturbations in DNA // *Biofizika.* 2007. V. 52, P. 237–243 (in Russian).
262. Krichevsky, O. and Bonnet, G. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications // *Rep. Prog. Phys.* 2002. – V. 65. – P. 251.
263. Kromenacker, B.W., Sanova, A.A., Marcus, F.I., Allen, J.J.B., Lane, R.D. Vagal mediation of low-frequency heart rate variability during slow yogic breathing // *Psychosom. Med.* 2018. – V. 80. – P. 581-587.
264. Krupatkin, A.I. Blood flow oscillations at a frequency of about 0.1 Hz in skin microvessels do not reflect the sympathetic regulation of their tone // *Hum Physiol.* 2009. – V. 35. – P. 183–191.
265. Kvandal, P., Landsverk, S.A., Bernjak, A., Stefanovska, A., Kvernmo, H.D., Kirkeboen, K.A. Low-frequency oscillations of the laser Doppler per-fusion signal in human skin // *Microvasc Res.* 2006. – V. 72. – P. 120-127.
266. Kitano, H. (ed) *Foundations of systems biology.* MIT Press. 2001. Cambridge
267. Kvandal, P., Stefanovska, A., Veber, M., Kvernmo, H.D., Kirkeboen, K.A. Regulation of human cutaneous circulation evaluated by laser Doppler flowmetry,

- iontophoresis, and spectral analysis: importance of nitricoxide and prostaglandins // *Microvasc Res.* 2003. – V. 65. – P. 160-171.
268. Kvernmo, H.D., Stefanovska, A., Kirkeboen, K.A. Enhanced endothelial activity reflected in cutaneous blood flow oscillations of athletes // *Eur J Appl Physiol.* 2003. – V. 90. – P. 16-22.
269. Kvernmo, H.D., Stefanovska, A., Kirkeboen, K.A., Kvernebo, K. Oscillations in the human cutaneous blood perfusion signal modified by endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators // *Microvasc Res.* 1999. – V. 57. – P. 298-309.
270. La Porta A, Wang MD. Optical torque wrench: angular trapping, rotation, and torque detection of quartz microparticles. *Phys Rev Lett.* 2004;92(19):190801.
271. Landick R. RNA polymerase slides home: pause and termination site recognition. *Cell.* 1997;88(6):741-4.
272. Landsverk S.A., Kvandal P., Kjelstrup T., et al. *Anesthesiology.* 2006. 105(3):478.
273. Latorre, R., Oberhauser, A., Labarca, P., Alvarez, O. Varieties of calcium-activated potassium channels // *Annu. Rev. Physiol.* - 1989. - V. 51. - P. 385-399.
274. Lauffenburger, D. Mathematical analysis of the macrophage response to bacterial challenge in the lung. In: van Furth R, editor. *Mononuclear Phagocytes: Characteristics, Physiology and Function.* Martinus Nijhoff Publishers; The Netherlands: 1985. pp. 351–357.
275. Lauger, P. Internal motions in proteins and gating kinetics of ionic channels // *Biophys. J.* - 1988. - V. 53. - P. 877-884.
276. Leider, M. On the Weight of the Skin // *J Invest Dermatol.* 1949. – V. 12. – P. 187-191.
277. Leng F, Amado L, McMacken R. Coupling DNA supercoiling to transcription in defined protein systems. *J Biol Chem.* 2004;279(46):47564-71.
278. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated // *Nat Rev Immunol.* 2007. – V. 7. – P. 678–689.

279. Li, Z., Kessler, W., van den Heuvel, J., Rinas, U. Simple defined autoinduction medium for high-level recombinant protein production using T7-based Escherichia coli expression systems // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2011. – V. 91. – P. 1203–1213.
280. Liao, F., and Jan, Y.-K. Enhanced phase synchronization of blood flow oscillations between heated and adjacent non-heated sacral skin. *Med Biol Eng Comput.* 2012. – V. 50. – P. 1059–1070.
281. Liebovitch, L.S. Testing fractal and Markov models of ion channel kinetics // *Biophys. J.* - 1989. - V. 55. - P. 373-377.
282. Liebovitch, L.S., Czegledy, F.P. A model of ion channel kinetics based on deterministic, chaotic motion in a potential with two local minima // *Ann. Biomed. Eng.* - 1992. - V. 20. - P. 517-531.
283. Liebovitch, L.S., Fischbarg, J., Koniarek, J.P. Ion channel kinetics: a model based on fractal scaling rather than multistate Markov processes // *Math. Biosci.* - 1987. - V. 84. - P. 37-68.
284. Liebovitch, L.S., Krekora, P. The physical basis of ion channel kinetics: the importance of dynamics // *Proc. Instit. Math. and its Appl. Univ. Minn.* - 2002. - V. 129. - P. 27-52.
285. Liebovitch, L.S., Sullivan, J.M. Fractal analysis of a voltage-dependent potassium channel from cultured mouse hippocampal neurons // *Biophys. J.* - 1987. - V. 52. - P. 979-988.
286. Liebovitch, L.S., Todorov, A. T. Using fractals and nonlinear dynamics to determine the physical properties of ion channel proteins // *Crit. Rev. Neurobiol.* - 1996. - V. 10. - P. 169-187.
287. Liebovitch, L.S., Toth, T. A model of ion channel kinetics using deterministic chaotic rather than stochastic processes // *J. Theor. Biol.* - 1991. - V. 148. - P. 243-267.
288. Linninger, A.A., Gould, I.G., Marinnan, T., et al. Cerebral microcirculation and oxygen tension in the human secondary cortex // *Ann Biomed Eng.* 2013. – V. 41. – P. 2264–2284.

289. Lipfert J, Kerssemakers JW, Jager T, Dekker NH. Magnetic torque tweezers: measuring torsional stiffness in DNA and RecA-DNA filaments. *Nat Methods*. 2010;7(12):977-80.
290. Lipfert J, Wiggin M, Kerssemakers JW, Pedaci F, Dekker NH. Freely orbiting magnetic tweezers to directly monitor changes in the twist of nucleic acids. *Nat Commun*. 2011;2:439.
291. Lipowsky, H.H., Usami, S., Chien, S. In vivo measurements of "apparent viscosity" and microvessel hematocrit in the mesentery of the cat // *Microvasc Res*/ 1980. – V. 19. – P. 297–319.
292. Lipscombe, D., Wyllie, D.J.A. Editorial Overview: Ion Channels. *Current Opinion in Physiology*. 2018.
293. Liu, D., Evans, T., Zhang, F. Applications and advances of metabolite biosensors for metabolic engineering // *Metab Eng*. – 2015. – V. 31. – P. 35–43.
294. Liu, D., Wood, N.B., Witt, N., et al. Computational analysis of oxygen transport in the retinal arterial network // *Curr Eye Res*. 2009. – V. 34. – P. 945–956.
295. Liu LF, Wang JC. Supercoiling of the DNA template during transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(20):7024-7.
296. Liu, W., Caffrey, M. Gramicidin structure and disposition in highly curved membranes // *J Struct Biol*. – 2005. – V. 150. – P. 23–40.
297. Liu, Y., Jurman, M.E., Yellen, G. Dynamic rearrangement of the outer mouth of a K⁺ channel during gating // *Neuron*. - 1996. - V. 16. - P. 859-867.
298. Lopez-Quintela, M.A., Casado, J. Revision of the methodology in enzyme kinetics: a fractal approach // *J. Theor. Biol*. - 1989. - V. 139. - P. 129-139.
299. Ma J, Bai L, Wang MD. Transcription under torsion. *Science*. 2013;340(6140):1580-3.
300. Ma J, Wang MD. DNA supercoiling during transcription. *Biophys Rev*. 2016; 8(Suppl 1): 75–87.
301. MacKinnon, R., Aldrich, R.W., Lee, A.W. Functional stoichiometry of *Shaker* potassium channel inactivation // *Science*. - 1993. - V. 262. - P. 757-759.

302. Madonna, R., Balistreri, C.R., Geng, Y.J., De Caterina, R. Diabetic microangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches // *Vascul Pharmacol.* 2017. – V. 90. – P. 1-7.
303. Madonna, R., Pieragostino, D., Balistreri, C.R., Rossi, C., Geng, Y.J., Del Boccio, P., De Caterina, R. Diabetic macroangiopathy: Pathogenetic insights and novel therapeutic approaches with focus on high glucose-mediated vascular damage // *Vascul Pharmacol.* 2018. – V. 6. – P. S1537-1891(17)30322-1.
304. Magleby, K.L., Stevens C.F. The effect of voltage on the time course of end-plate currents // *J. Physiol.* - 1972. - V. 223. - P. 151-171.
305. Magosso E., Ursino M. A mathematical model of CO₂ effect on cardiovascular regulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001. V. 281. P. H2036–H2052.
306. Malpas, S. Neural influences on cardiovascular variability: possibilities and pitfalls // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002. – V. 282. – P. H6–H20.
307. Mandal SS, Chu C, Wada T, Handa H, Shatkin AJ, Reinberg D. Functional interactions of RNA-capping enzyme with factors that positively and negatively regulate promoter escape by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(20):7572-7.
308. Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., Jaillon, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity // *Nat Rev Immunol.* 2011. – V. 11. – P. 519–531.
309. Marban, E., Yamagishi, T., Tomaselli, G.F. Structure and function of voltage-gated sodium channels // *J. Physiol. (London).* - 1998. - V. 508. - P. 647-657.
310. Masulis IS, Babaeva ZSh, Chernyshov SV, et al. *Sci. Rep.* 5, 11449 (2015).
311. Matsumoto K, Hirose S. Visualization of unconstrained negative supercoils of DNA on polytene chromosomes of *Drosophila*. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 17):3797-805.
312. McCammon, J.A., Harvey, S.C. Dynamics of proteins and nucleic acids. New York: Cambridge University Press, 1987.

313. McDaniel, M., Keller, J.M., White, S., Baird, A. A Whole-Body Mathematical Model of Sepsis Progression and Treatment Designed in the BioGears Physiology Engine // *Front Physiol.* 2019. – V. 10. – P. 1321.
314. McLaughlin D.W. and Scott A.C. Solitons in Action (Eds. K. Longgren and A. C. Scott). Academic Press: N.Y. 1978.
315. McManus, O.B., Magleby, K.L. Accounting for the Ca^{2+} -dependent kinetics of single large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels in rat skeletal muscle // *J. Physiol. (London)*. - 1991. - V. 443. - P. 739-777.
316. McManus, O.B., Magleby, K.L. Kinetic time constants independ of previous single-channel activity suggest Markov gating for a large conductance Ca^{2+} -activated K channel // *J. Gen. Physiol.* - 1989. - V. 94. - P. 1037-1070.
317. Meyer, M.F., Rose, C.J., Hulsmann, J.-O., Schatz, H., Pfohl, M. Impaired 0.1 Hz Vasomotion Assessed by Laser Doppler Anemometry as an Early Index of Peripheral Sympathetic Neuropathy in Diabetes // *Microvasc. Res.* 2003. – V. 65. – P. 88.
318. Miller H, Zhou Z, Shepherd J, Wollman AJM, Leake MC. Single-molecule techniques in biophysics: a review of the progress in methods and applications. *Rep Prog Phys.* 2018;81(2):024601.
319. Millhauser, G.L., Salpeter, E.E., Oswald, R.E. Diffusion models of ion-channel gating and the origin of power-law distribution from single-channel recording // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1988. - V. 85. - P. 1502-1507.
320. Mizuuchi K, Mizuuchi M, Gellert M. Cruciform structures in palindromic DNA are favored by DNA supercoiling. *J Mol Biol.* 1982;156(2):229-43.
321. Mocsai, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond // *J Exp Med.* 2013. – V. 210. – P. 1283–1299.
322. Moczydlowski, E., Latorre, R. Gating kinetics of Ca^{2+} -activated K^+ channels from reat muscle incorporated into planar lipid bilayers. Evidence for two voltage-dependent Ca^{2+} binding reactions // *J. Gen. Physiol.* - 1983. - V. 82. - P. 511-542.
323. Moffatt, L. Estimation of ion channel kinetics from fluctuations of macroscopic currents // *Biophys J.* – 2007. – V. 93. – P. 74-91.

324. Monod, J. Les hasard et la nécessité. Seuil. 1970. Paris.
325. Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.-P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model // J. Mol. Biol. - 1965. - V. 12. - P. 88-118.
326. Montaña SP, Pigli YZ, Rice PA. The μ transpososome structure sheds light on DDE recombinase evolution. Nature. 2012;491(7424):413-7.
327. Mooney, R.A., Artsimovitch, I., Landick, R. Information processing by RNA polymerase: recognition of regulatory signals during RNA chain elongation // J Bacteriol. – 1998. – V.180. – N. 13. – P. 3265-75.
328. Morais-Cabral, J.H., Zhou, Y., MacKinnon, R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K^+ selectivity filter // Nature. - 2001. - V. 414. - P. 37-42.
329. Moreno, A., Mossio, M. Biological autonomy: a philosophical and theoretical enquiry. Springer. 2015. New York.
330. Morita, T., Hanaoka, K., Morales, M.M., Montrose-Rafizadeh, C., Guggino, W.B. Cloning and characterization of maxi K^+ channel α -subunit in rabbit kidney // Am. J. Physiol. - 1997. - V. 273. - P. F615-F624.
331. Moss, B.L., Silberberg, S.D., Nimigean, C.M., Magleby, K.L. Ca^{2+} -dependent gating mechanism for *dslo*, a large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channel // Biophys. J. - 1999. - V. 76. - P. 3099-3117.
332. Moss, G.W., Marshall, J., Moczydlowski, E. Hypothesis for a serine protease – like domain at the C-terminus of *slowpoke* calcium-activated potassium channels // J. Gen. Physiol. - 1996. - V. 108. - P. 473-484.
333. Moure, C.M., Gimble, F.S., Quioco, F.A. Crystal structure of the intein homing endonuclease PI-SceI bound to its recognition sequence // Nat Struct Biol. – 2002. – V. 9. – N. 10. – P. 764-70.
334. Mück-Weymann M.E., Albrecht H.-P., Hager D., et al., Microvasc. Res. 1996. 52(1):69.
335. Muller, L.O., Toro, E.F. A global multiscale mathematical model for the human circulation with emphasis on the venous system // Int J Numer Method Biomed Eng. 2014. – V. 30. – P. 681–725.

336. Mulvany, M.J., Aalkjaer, C. Structure and function of small arteries // *Physiol Rev.* 1990. – V. 70. – P. 921-961.
337. Murakami KS, Darst SA. Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr Opin Struct Biol.* 2003;13(1):31-9.
338. Nakamura T., Nakanishi M., Saijo Y., and Tsuboi M. Stopped-flow ultraviolet spectroscopy for hydrogen-exchange studies of nucleic acids // *FEBS Lett.* 1977. V. 81, P. 61–64.
339. Nakanishi M. and Tsuboi M. Two channels of hydrogen exchange in a double helical nucleic acid // *J. Mol. Biol.* 1978. V. 124, P. 61–71.
340. Nauseef, W.M., Borregaard, N. Neutrophils at work // *Nat Immunol.* 2014. – V. 15. – P. 602–611.
341. Neofytou, P. Comparison of blood rheological models for physiological flow simulation // *Biorheology.* 2004. – V. 41. – P. 693–714.
342. Newsholme, P., Cruzat, V.F., Keane, K.N., Carlessi, R., de Bittencourt, P.I. Jr. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes // *Biochem J.* – 2016. – V. 473(24). – P. 4527-4550.
343. Ni, C., Dinh, C.V., Prather, K.L.J. Dynamic Control of Metabolism // *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering.* – 2021. – V. 12(1). – P. 519-41.
344. Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Takai, T., Rayanao, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Ranoka, Y., Miniamino, N., Rangawa, R., Natsuo, H., Raftery, M. A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T., Numa, S. Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence // *Nature.* - 1984. - V. 312. - P. 121-127.
345. Nogueira, R.A., Varanda, W.A., Liebovitch, L.S. Hurst analysis in the study of ion channel kinetics // *Braz J Med Biol Res.* – 1995. – V. 28. – P. 491–496.
346. Oaklander, A.L., Siegel, S.M. Cutaneous innervation: Form and function // *J Am Acad Dermatol.* 2005. – V. 53. – P. 1027-1037.

347. Oberstrass FC, Fernandes LE, Lebel P, Bryant Z. Torque spectroscopy of DNA: base-pair stability, boundary effects, backbending, and breathing dynamics. *Phys Rev Lett.* 2013;110(17):178103.
348. Ogielska, E.M., Zagotta, W.N., Hoshi, T., Heinemann, S.H., Haab, J., Aldrich, R.W. Cooperative subunit interaction in C-type inactivation of K⁺ channels // *Biophys. J.* - 1995. - V. 69. - P. 2449-2457.
349. Oguntibeju, O.O. Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links // *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol.* – 2019. – V. 11(3). – P. 45-63.
350. Ono, S., Egawa, G., Kabashima, K. Regulation of blood vascular permeability in the skin // *Inflamm Regen.* 2017. – V. 37. – P. 11.
351. Orio, P., Latorre, R. Differential effects of beta1 and beta2 subunits on BK channel activity // *J. Gen. Physiol.* - 2005. - V. 125. - P. 395-411.
352. Oussatcheva EA, Pavlicek J, Sankey OF, Sinden RR, Lyubchenko YL, Potaman VN. Influence of global DNA topology on cruciform formation in supercoiled DNA. *J Mol Biol.* 2004;338(4):735-43.
353. Pallotta, B.S. N-bromoacetamide removes a calcium-dependent component of channel opening from calcium-activated potassium channels in rat skeletal muscle // *J. Gen. Physiol.* - 1985. - V. 86. - P. 601-611.
354. Panyi, G., Sheng, Z., Tu, L., Deutsch, C. C-type inactivation of voltage-gated K⁺ channel occurs by a cooperative mechanism // *Biophys. J.* - 1995. - V. 69. - P. 896-903.
355. Park, S.W., Jun, H.O., Kwon, E., Yun, J.W., Kim, J.H., Park, Y.J., Kang, B.C., Kim, J.H. Antiangiogenic effect of betaine on pathologic retinal neovascularization via suppression of reactive oxygen species mediated vascular endothelial growth factor signaling // *Vascul Pharmacol.* – 2017. – V. 90. – P. 19-26.
356. Parker SC, Tullius TD. DNA shape, genetic codes, and evolution. *Curr Opin Struct Biol.* 2011 Jun;21(3):342-7.

357. Parvin JD, McCormick RJ, Sharp PA, Fisher DE. Pre-bending of a promoter sequence enhances affinity for the TATA-binding factor. *Nature*. 1995;373(6516):724-7.
358. Peng C.-K., Buldyrev S.V., Halvin S., Simons M., Stanley H.E., Goldberger A.L. 1994. Mosaic organization of DNA nucleotides. *Phys. Rev.* 49, 1685–1689.
359. Pereira EJ, Smolko CM, Janes KA (2016) Computational models of reactive oxygen species as metabolic byproducts and signal-transduction modulators. *Front Pharmacol* 7:457. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00457>.
360. Perez-Martin J, Espinosa M. Protein-induced bending as a transcriptional switch. *Science*. 1993;260(5109):805-7.
361. Perozo, E. Activation gating in KcsA: structural and functional coupling between elements of the permeation path // *Biophys. J.* - 2001. - V. 80. - P. 17a.
362. Perozo, E., Cortes, D.M., Cuello, L.G. Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating // *Science*. - 1999. - V. 285. - P. 73-78.
363. Persechini, A., Moncrief, N.D., Kretsinger, R.H. The EF-hand family of calcium-modulated proteins // *TINS*. - 1989. - V. 12. - P. 462-467.
364. Peters JP 3rd, Maher LJ. DNA curvature and flexibility in vitro and in vivo. *Q Rev Biophys.* 2010;43(1):23-63.
365. Pilyugin, S., Antia, R. Modeling immune responses with handling time // *Bull. Math. Biol.* 2000. – V. 62. – P. 869–890.
366. Podgornik R, Hansen PL, Parsegian VA. Elastic moduli renormalization in self-interacting stretchable polyelectrolytes. *The Journal of Chemical Physics*. 2000;113:9343-9350.
367. Poland, D. and Scheraga, H.A. *Theory of Helix-Coil Transitions in Biopolymers*. 1970: Academic. New York.
368. Popel, A.S., Johnson, P.C. Microcirculation and hemorheology // *Annu Rev Fluid Mech.* 2005. – V. 37. – P. 43–69.
369. Post, E.H., Kellum, J.A., Bellomo, R., Vincent, J.L. Renal perfusion in sepsis: from macro- to microcirculation // *Kidney Int.* 2017. – V. 91. – P. 45–60.

370. Pries, A.R., Secomb, T.W. Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005. – V. 289. – P. H2657–H2664.
371. Pries, A.R., Secomb, T.W. Rheology of the microcirculation // *Clin Hemorheol Microcirc*. 2003. -V. 29. – P. 143–148.
372. Prince, L.R., Whyte, M.K., Sabroe, I., Parker, L.C. The role of TLRs in neutrophil activation // *Curr Opin Pharmacol*. 2011. – V. 11. – P. 397–403.
373. Prokhorov, M.D., Ponomarenko, V.I., Gridnev, V.I., Bodrov, M.B. and Bespyatov, A.B. Synchronization between main rhythmic processes in the human cardiovascular system // *Phys. Rev. E*. 2003. – V. 68. – P. 041913.
374. Proshkin S, Rahmouni AR, Mironov A, Nudler E. Cooperation between translating ribosomes and RNA polymerase in transcription elongation. *Science*. 2010;328(5977):504-8.
375. Ptashne M and Gann A (2001) *Genes and Signals*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 192 P.
376. Pyne ALB, Noy A, Main KHS, Velasco-Berrelleza V, Piperakis MM, Mitchenall LA, Cugliandolo FM, Beton JG, Stevenson CEM, Hoogenboom BW, Bates AD, Maxwell A, Harris SA. Base-pair resolution analysis of the effect of supercoiling on DNA flexibility and major groove recognition by triplex-forming oligonucleotides. *Nat Commun*. 2021;12(1):1053.
377. Quintero N.R. and Salerno M. Soliton ratchets // *Phys. Rev. E*. 2002. V. 65, P. 025602(R).
378. Rabiet, M.J., Huet, E., Boulay, F. The N-formyl peptide receptors and the anaphylatoxin C5a receptors: an overview // *Biochimie*. 2007. – V. 89. – P. 1089–1106.
379. Razqallah, H. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly // *EMBO J*. — 2008. — Vol. 27. — P. 589–605.
380. Read D.J., Leigh J. Blood-brain tissue P_{CO_2} relationships and ventilation during rebreathing. *J. Appl. Physiol*. 1967. V. 23. P. 53–70.

381. Record M.T.Jr., Reznikoff W.S., Craig M.L., et al., in *Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology*, Ed. by Neidhardt F.C. (ASM Press, Washington, DC, USA, 1996), pp. 792–821.
382. Reviznikov D.L. and Formalev V.F. Numerical Methods // Fizmatlit, Moscow, 2004 (in Russian).
383. Revyakin A, Ebright RH, Strick TR. Promoter unwinding and promoter clearance by RNA polymerase: detection by single-molecule DNA nanomanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(14):4776-80.
384. Revyakin A, Liu C, Ebright RH, Strick TR. Abortive initiation and productive initiation by RNA polymerase involve DNA scrunching. *Science*. 2006;314(5802):1139-43.
385. Revzin, A., editor. *The Biology of Non-Specific DNA-Protein Interactions*. 1990: CRC Press, Boca Raton.
386. Reyes-Lamothe R, Nicolas E, Sherratt DJ. Chromosome replication and segregation in bacteria. *Annu Rev Genet*. 2012;46:121-43.
387. Reynolds, A., Rubin, J., Clermont, G., Day, J., Vodovotz, Y., Bard Ermentrout, G. A reduced mathematical model of the acute inflammatory response: I. Derivation of model and analysis of anti-inflammation // *J. Theor. Biol.* 2006. – V. 242. – P. 220–236.
388. Rice PA, Yang S, Mizuuchi K, Nash HA. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell*. 1996;87(7):1295-306.
389. Richard, E.A., Miller, C. Steady-state coupling of ion-channel conformations to a transmembrane ion gradient // *Science*. - 1990. - V. 247. - P. 1208-1210.
390. Richardson JP, Greenblatt J, Neidhardt FC, Curtiss III R, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (Eds.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (2nd Ed.) (1996): Washington, DC.
391. Richardson JP. Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1577(2):251-260.

392. Riddle W., Younes M. A model for the relation between respiratory neural and mechanical outputs. II. Methods. *J. Appl. Physiol.* 1981. V. 51. P. 979–989.
393. Rosen, R. *Dynamical system theory in biology. Stability theory and its applications.* Wiley. 1970. New York.
394. Rothberg, B.S., Bello, R.A., Magleby, K.L. Two-dimensional components and hidden dependencies provide into channel gating mechanism // *Biophys. J.* - 1997. - V. 72. - P. 2524-2544.
395. Rothberg, B.S., Magleby, K.L. Kinetic structure of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels suggest that the gating includes transitions through intermediate or secondary states // *J. Gen. Physiol.* - 1998. - V. 111. - P. 751-780.
396. Roustit, M., Blaise, S., Millet, C., Cracowski, J.-L. Reproducibility and methodological issues of skin post-occlusive and thermal hyperemia assessed by single-point laser Doppler flowmetry // *Microvasc Res.* 2010. – V. 79. – P. 102-108.
397. Roustit, M., Cracowski, J.-L. Assessment of endothelial and neurovascular function in human skin microcirculation // *Trends Pharmacol Sci.* 2013. – V. 34. – P. 373-384.
398. Roy NS, Debnath S, Chakraborty A, et al. *Phys Chem Chem Phys.* 20 (14), 9449 (2018).
399. Rudnev, S., Romanyukha, A. Mathematical modeling of immune-inflammatory reaction in acute pneumonia // *J. Biol. Sys.* 1995. – V. 3. – P. 429–439.
400. Ruff, E.F., Record, M.T.Jr, Artsimovitch, I. Initial events in bacterial transcription initiation // *Biomolecules.* 2015 – V. 5. – P. 1035.
401. Salerno, M. Dynamical properties of DNA promoters // *Phys. Lett. A.* 1992. V. 167. P. 49–53.
402. Salerno, M., Kivshar, Yu.S. DNA promoters and nonlinear dynamics // *Phys. Lett. A.* 1994. V. 193. P. 263–266.
403. Salerno, M. Nonlinear dynamics of plasmid pB R322 promoters // *Nonlinear Excitations in Biomolecules.* M. Peyrard (ed.). Berlin: Springer-Verlag. 1995. P. 147–153.

404. Samul R, Leng F. Transcription-coupled hypernegative supercoiling of plasmid DNA by T7 RNA polymerase in *Escherichia coli* topoisomerase I-deficient strains. *J Mol Biol.* 2007;374(4):925-35.
405. Sangiorgi, S., Manelli, A., Congiu, T., Bini, A., Pilato, G., Reguzzoni, M., Raspanti, M. Microvascularization of the human digit as studied by corrosion casting // *J Anat.* 2004. – V. 204. – P. 123-131.
406. Sasse-Dwight, S., Gralla, J.D. KMnO₄ as a probe for lac promoter DNA melting and mechanism in vivo // *J Biol Chem.* – 1989. – V. 264. – N. 14. – P. 8074-81.
407. Schaffer, S.W., Jong, C.J., Mozaffari, M. Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: unifying hypothesis of diabetes revisited // *Vascul Pharmacol.* – 2012. – V. 57(5-6). – P. 139-49.
408. Schneider, M.F., Chandler, W.K. Voltage dependent charge movement in skeletal muscle: A possible step in excitation-contraction coupling // *Nature (Lond.)*. - 1973. - V. 242. - P. 244-246.
409. Schreiber, M., Salkoff, L. A novel calcium-sensing domain in the BK channel // *Biophys J.* – 1997. – V. 73. – P. 1344–1363.
410. Schreiber, M., Yuan, A., Salkoff, L. Transplantable sites confer calcium sensitivity to BK channels // *Nat Neurosci.* – 1999. – V. 2. – P. 416–421.
411. Schrempf, H., Schmidt, O., Kümmerlen, R., Hinnah, S., Müller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans* // *EMBO J.* - 1995. - V. 14. - P. 5170-5178.
412. Secomb, T.W., Beard, D.A., Frisbee, J.C., et al. The role of theoretical modeling in microcirculation research. *Microcirculation.* 2008. – V. 15. – P. 693–698.
413. Secomb, T.W. Blood flow in the microcirculation // *Annu Rev Fluid Mech.* 2017. – V. 49. – P. 443–461.
414. Secomb, T.W., Pries, A.R. Blood viscosity in microvessels: experiment and theory // *C R Phys.* 2013. – V. 14. – P. 470–478.
415. Secomb, T.W., Pries, A.R. The microcirculation: physiology at the mesoscale // *J Physiol.* 2011. – V. 589. – P. 1047-52.

416. Segel, G.B., Halterman, M.W., Lichtman, M.A. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *J Leukoc Biol.* 2011;89:359–372.
417. Seoh, S.A., Sigg, D., Parazian, D.M., Bezanilla, F. Voltage-sensing residius in the S2 and S4 segments of *Shaker* K⁺ channel // *Neuron.* - 1996. - V. 16. - P. 1159-1167.
418. Seydnejad, S.R. and Kitney, R.I. Modeling of Mayer Waves Generation Mechanisms. // *IEEE Eng Med Biol Mag.* 2001. – V. 20 (2). – P. 92-100.
419. Shaffer, F. and Ginsberg, J.P. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms // *Front Public Health.* 2017. – V. 5. – P. 258.
420. Shaffer, F., McCraty, R., Zerr, C.L. A healthy heart is not a metronome: An integrative review of the heart's anatomy and heart rate variability // *Front Psychol.* 2014. – P. 5.
421. Shavkunov, K.S., Masulis, I.S., Tutukina, M.N., et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37. – N. 15. – P. 4919.
422. Sheinin MY, Forth S, Marko JF, Wang MD. Underwound DNA under tension: structure, elasticity, and sequence-dependent behaviors. *Phys Rev Lett.* 2011 Sep 2;107(10):108102.
423. Sheinin MY, Li M, Soltani M, Luger K, Wang MD. Torque modulates nucleosome stability and facilitates H2A/H2B dimer loss. *Nat Commun.* 2013;4:2579.
424. Shi, P.A., Manwani, D., Olowokure, O., Nandi, V. Serial assessment of laser Doppler flow during acute pain crises in sickle cell disease // *Blood Cells Mol Dis.* 2014. – V. 53. – P. 277-282.
425. Shibasaki, M., Low, D.A., Davis, S.L., Crandall, C.G., Nitric oxide inhibits cutaneous vasoconstriction to exogenous norepinephrine // *J. Appl. Physiol.* 2008. – V. 105. – P. 1504–1508.
426. Shimada T. The whole set of constitutive promoters recognized by RNA polymerase RpoD holoenzyme of *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2014;9(3):e90447.

427. Shimamoto N. One-dimensional diffusion of proteins along DNA. Its biological and chemical significance revealed by single-molecule measurements. *J Biol Chem.* 1999;274(22):15293-6.
428. Shlesinger, M.F., Montroll, E.W. On the Williams-Watts function of dielectric relaxation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 1984. - V. 81. - P. 1280-1283.
429. Shroff SG, Janicki JS, Weber KT. Evidence and quantitation of left ventricular systolic resistance. *Am J Physiol.* 1985;249:H358-70. doi: 10.1152/ajpheart.1985.249.2.H358. PMID: 4025568.
430. Siebenlist U, Gilbert W. Contacts between *Escherichia coli* RNA polymerase and an early promoter of phage T7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Jan;77(1):122-6.
431. Siggers TW, Silkov A, Honig B. Structural alignment of protein--DNA interfaces: insights into the determinants of binding specificity. *J Mol Biol.* 2005;345(5):1027-45.
432. Sigworth, F.J. Voltage gating of ion channels // *Quart. Rev. Biophys.* - 1994. - V. 27. - P. 1-40.
433. Silva, M.P., Rodrigues, C.G., Varanda, W.A. et al. Memory in Ion Channel Kinetics // *Acta Biotheor.* – 2021. – V. 69. – P. 697–722.
434. Sine, S.M., Claudio, T., Sigworth, F.J. Activation of *Torpedo* acetylcholine receptors expressed in mouse fibroblasts // *J. Gen. Physiol.* - 1990. - V. 96. - P. 395-437.
435. Siwy, Z., Mercik, S., Weron, K., Ausloos, M. Application of dwell-time series in studies of long-range correlation in single channel ion transport: analysis of ion current through a big conductance locust potassium channel // *Phys A.* – 2001. – V. 297. – P. 79–96.
436. Smillie, S.J., Brain, S.D. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its role in hypertension // *Neuropeptides.* 2011. – V. 45. – P. 93–104.
437. Smith, A.M., McCullers, J.A., Adler, F.R. Mathematical model of a three-stage innate immune response to a pneumococcal lung infection // *J Theor Biol.* 2011. – V. 276(1). – P. 106-16.

438. Sobetzko P. Transcription-coupled DNA supercoiling dictates the chromosomal arrangement of bacterial genes. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(4):1514-24.
439. Soehnlein, O., Lindbom, L., Weber, C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment // *Blood.* 2009. – V. 114. – P. 4613–4623.
440. Sokolnicki, L.A., Roberts, S.K., Wilkins, B.W., Basu, A., Charkoudian, N. Contribution of nitric oxide to cutaneous microvascular dilation in individuals with type 2 diabetes mellitus // *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007. – V. 292. – P. E314–E318.
441. Solaro, C.R., Ding, J.P., Li, Z.W., Lingle, C.J. The cytosolic inactivation domain of BK_i channels in rat chromaffin cells do not behave like simple, open-channel blockers // *Biophys. J.* - 1997. - V. 73. - P. 819-830.
442. Solaro, C.R., Lingle, C.J. Trypsin-sensitive, rapid inactivation of calcium-activated potassium channel // *Science.* - 1992. - V. 257. - P. 1694-1698.
443. Song, H.S., Lehrer, P.M. The effects of specific respiratory rates on heart rate and heart rate variability // *App. Psychophysiology and Biofeedback.* 2003. – V. 28. – P. 13–23.
444. Stark MJR. Multicopy expression vectors carrying the lac repressor gene for regulated high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Gene.* 1987;51:255–67.
445. Stefanovska A, Bracic M, Kvernmo HD. Wavelet analysis of oscillations in the peripheral blood circulation measured by laser Doppler technique. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering.* 1999;46(10):1230–9. doi: 10.1109/10.790500.
446. Stern, M.D. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering // *Nature.* 1975. – V. 254. – P. 56-58.
447. Stewart, J.M., Taneja, I., Goligorsky, M.S., Medow, M.S. Noninvasive measure of microvascular nitric oxide function in humans using very low-frequency cutaneous laser Doppler flow spectra // *Microcirculation.* 2007. – V. 14. – P. 169-180.

448. Stirban, A. Microvascular dysfunction in the context of diabetic neuropathy // *Curr Diab Rep.* 2014. – V. 14. – P. 541.
449. Stracy M, Kapanidis AN. Single-molecule and super-resolution imaging of transcription in living bacteria. *Methods.* 2017;120:103-114.
450. Strain, W.D., Paldánus, P.M. Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation // *Cardiovasc Diabetol.* – 2018. – V. 17(1). – P. 57.
451. Strauss JK, Maher LJ, 3rd. DNA bending by asymmetric phosphate neutralization. *Science.* 1994;266(5192):1829-34.
452. Strick, T.R., Allemand, J.F., Bensimon, D., Bensimon, A., Croquette, V. The elasticity of a single supercoiled DNA molecule // *Science.* 1996. – V. 271. – P. 1835-7.
453. Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M., Chilvers, E.R. Neutrophil kinetics in health and disease // *Trends Immunol.* 2010. – V. 31. – P. 318–324.
454. Tabuchi H, Handa H, Hirose S. Underwinding of DNA on binding of yeast TFIID to the TATA element. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993;192(3):1432-8.
455. Takahashi, T., Nagaoka, T., Yanagida, H., et al. A mathematical model for the distribution of hemodynamic parameters in the human retinal microvascular network // *J Biorheol.* 2009. – V. 23. – P. 77–86.
456. Tankanag A.V. Applications of the Adaptive Wavelet Transform for Analyzing Peripheral Blood Flow Oscillations in the Human Skin. *Medical Physics.* Ed. Balcerzyk M. NY: Nova Science Publishers, 2013. P. 85–104.
457. Tankanag A.V., Chemeris N.K. A method of adaptive wavelet filtering of the peripheral blood flow oscillations under stationary and non-stationary conditions. *Phys. Med. Biol.* 2009. V. 54. № 19. P. 5935–5948.
458. Tankanag A.V., Chemeris N.K. Application of the adaptive wavelet transform for analysis of blood flow oscillations in the human skin. *Phys. Med. Biol.* 2008;53:5967. Doi: 10.1088/0031-9155/53/21/005.

459. Tankanag A.V., Grinevich A.A., Kirilina T.V., Krasnikov G.V., Piskunova G.M., Chemeris N.K. Wavelet phase coherence analysis of the skin blood flow oscillations in human // *Microvascular Research*. 2014. Vol. 95, P. 53- 59.
460. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use // *Circulation*. 1996. – V. 93. – P. 1043-65.
461. Taylor, J.A., Myers, C.W., Halliwill, J.R., et al. Sympathetic restraint of respiratory sinus arrhythmia: implications for vagal-cardiac tone assessment in humans // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2001. – V. 280. – P. H2804–H2814.
462. Tempel, B.L., Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Jan, Y.N., Yan, L.Y. Sequence of a probable potassium channel component encoded at a *Shaker* locus of *Drosophila* // *Science*. - 1987. - V. 237. - P. 770-775.
463. Tew, G.A., Klonizakis, M., Moss, J., Ruddock, A.D., Saxton, J.M., Hodges, G.J. Reproducibility of cutaneous thermal hyperaemia assessed by laser Doppler flowmetry in young and older adults // *Microvasc Res*. 2011. – V. 81. – P. 177-182.
464. Ticcinelli V., Stankovski T., Iatsenko D., et al., *Frontiers Physiol*. 8, 749 (2017).
465. Tikhonova, I.V., Grinevich, A.A., Guseva, I.E., Safronova, V.G. Modified kinetics of generation of reactive species in peripheral blood of patients with type 2 diabetes // *Free Radic Biol Med*. – 2020. – V. 159. – P. 76-86.
466. Tooke, J.E. Microvasculature in diabetes // *Cardiovasc Res*. 1996. – V. 32(4). – P. 764-71.
467. Toro, L., Stefani, E., Latorre, R. Internal blockade of a Ca²⁺-activated K⁺ channel by *Shaker* B inactivating “ball” peptide // *Neuron*. - 1992. - V. 9. - P. 237-245.
468. Tripathi KK. Respiration and heart rate variability: a review with special reference to its application in aerospace medicine. *Indian J. Aerosp. Med*. 2004;48(1):64–75.
469. Tsao YP, Wu HY, Liu LF. Transcription-driven supercoiling of DNA: direct biochemical evidence from in vitro studies. *Cell*. 1989;56(1):111-8.

470. Tsokolov, S. A theory of circular organization and negative feedback: defining life in a cybernetic context // *Astrobiology*. – 2010. – V. 10(10). – P. 1031–1042.
471. Vafabakhsh, R., Ha, T. Extreme bendability of DNA less than 100 base pairs long revealed by single-molecule cyclization // *Science*. – 2012. – V. 337. – N. 6098. – P. 1097-101.
472. Vale, R.D., Milligan, R.A. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins // *Science*. – 2000. – V. 288. – N. 5463. – P. 88-95.
473. Varanda, W.A., Liebovitch, L.S., Figueiroa, J.N., Nogueira, R.A. Hurst analysis applied to the study of single calcium-activated potassium channel kinetics // *J Theor Biol*. – 2000. – V. 206. – P. 343–353.
474. Venayak, N., Anesiadis, N., Cluett, W.R., Mahadevan, R. Engineering metabolism through dynamic control // *Curr Opin Biotechnol*. – 2015. – V. 34. – P. 142–152.
475. Vergara, C., Latorre, R., Marrion, N.V., Adelman, J.P. Calcium-activated potassium channels // *Curr. Opinion Neurobiol*. - 1998. - V. 8. - P. 321-329.
476. Vinik, A.I., Erbas, T., Park, T.S., Nolan, R., Pittenger, G.L. Platelet dysfunction in type 2 diabetes // *Diabetes Care*. 2001. – V. 24(8). – P. 1476-85.
477. Volkenstein, M.V. *Biophysics* AIP, New York, 1975.
478. Unwin, P.N.T, Zampighi, G. Structure of the junction between communicating cells // *Nature*. - 1980. - V. 283. - P. 545-549.
479. Ursino M. Interaction between carotid baroregulation and the pulsating heart: a mathematical model. *Am. J. Physiol*. 1998. V. 275. P. H1733–H1747.
480. Ursino M., Magosso E. Acute cardiovascular response to isocapnic hypoxia. I. A mathematical model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2000. V. 279. P. H149–H165.
481. Ursino, M. and Magosso, E. Role of short term cardiovascular regulation in heart rate variability: a modeling study. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 2003a. – V. 284. – P. H1473–H1494.

482. Ursino M., Magosso E. Short-term autonomic control of cardiovascular function: a mini-review with the help of mathematical models. *J. Integr. Neurosci.* 2003. V. 2. P. 219–247.
483. Wacker, M., Witte, H. Time-frequency techniques in biomedical signal analysis. A tutorial review of similarities and difference // *Methods Inf Med.* 2013. – V. 52. – P. 279-296.
484. Waddington, C.H. (1968) The basic ideas of biology. In: Waddington, C.H. (ed) *Towards a theoretical biology, vol 1., Prolegomena* Atheneum, New York, pp 1–41
485. Wallner, M., Meera, P., Toro, L. Molecular basis of fast inactivation in voltage and Ca^{2+} -activated K^+ channels: a transmembrane β -subunit homolog // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1999. - V. 96. - P. 4137-4142.
486. Wang F. The promoter-search mechanism of *Escherichia coli* RNA polymerase is dominated by three-dimensional diffusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013;20(2):174–181.
487. Wang MD, Schnitzer MJ, Yin H, Landick R, Gelles J, Block SM. Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science.* 1998;282(5390):902-7.
488. Ward, J.D., Boulton, A.J., Simms, J.M., Sandler, D.A., Knight, G. Venous distension in the diabetic neuropathic foot (physical sign of arteriovenous shunting) // *J R Soc Med.* 1983. – V. 76(12). – P. 1011-4.
489. Wartell, R. M., Benight, A. S. Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment // *Physics Reports.* 1985. - V. 126. - P. 67-107.
490. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann AA, Levine M, Losick RM. *Molecular Biology of the Gene* (7th ed.). Pearson. 2013
491. Watson, J. D., Crick, F. H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid // *Nature.* — 1953. — Vol. 171. — P. 737–738.
492. Wawrzekiewicz-Jałowicka, A., Trybek, P., Machura, Ł., Dworakowska, B., Grzywna, Z.J. Mechanosensitivity of the BK Channels in human glioblastoma

- cells: kinetics and dynamical complexity // *J Membr Biol.* – 2018. – V. 251. – P. 667–679.
493. Wculek, S.K., Malanchi, I. Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells // *Nature.* 2015. – V. 528. – P. 413–417.
494. Welch, G.R. *The fluctuating enzyme.* New York: John Wiley & Sons, 1986.
495. Welch, W.J. Intrarenal oxygen and hypertension // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2006. – V. 33. – P. 1002–5.
496. Wiener, N. *Cybernetics: or control and communication in the animal and in the machine.* MIT Press. 1948. Cambridge
497. Williams, M.C., Rouzina, I., Bloomfield, V.A. Thermodynamics of DNA interactions from single molecule stretching experiments // *Acc Chem Res.* 2002. – V. 35. – P. 159-66.
498. Winkelman, J.T., Vvedenskaya, I.O., Zhang, Y., Zhang, Y., Bird, J.G., Taylor, D.M., Gourse, R.L., Ebright, R.H., Nickels, B.E. Multiplexed protein-DNA cross-linking: Scrunching in transcription start site selection. *Science* // 2016. – V. 351. – P. 1090.
499. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., Halbwachs-Mecarelli, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects // *Lab Invest.* 2000. – V. 80. – P. 617–653.
500. Wu HY, Shyy SH, Wang JC, Liu LF. Transcription generates positively and negatively supercoiled domains in the template. *Cell.* 1988;53(3):433-40.
501. Yach, D., Hawkes, C., Gould, C.L., Hofman, K.J. The global burden of chronic diseases: Overcoming impediments to prevention and control // *JAMA.* 2004. – V. 291. – P. 2616.
502. Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii MD. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 31;34(2):564-74.
503. Yakushevich L.V. *J Biol Phys.* 43, 113 (2017).

504. Yakushevich, L.V., Krasnobaeva, L.V. A new approach to studies of non-linear dynamics of kinks activated in inhomogeneous polynucleotide chains // International Journal of Nonlinear Mechanics. 2008. V. 43. P. 1074-1081.
505. Yakushevich, L.V. Nonlinear DNA dynamics: a new model // Phys. Lett. A. — 1989 — Vol. 136. — P. 413–417.
506. Yakushevich L.V. Nonlinear Physics of DNA (Wiley, Chichester, 1998) second edition (2004).
507. Yakushevich, L.V., Savin, A.V., and Manevitch, L.I. Nonlinear dynamics of topological solitons in DNA // Phys. Rev. E. 2002. – V. 66. – P. 016614.
508. Yakushevich, L.V. The effect of damping, external fields and inhomogeneity on the nonlinear dynamics of biopolymers // Studia biophys. 1987. V. 121. P. 201-207.
509. Yan, Y., Shen, G., Xie, K., Tang, C., Wu, X., Xu, Q., Liu, J., Song, J., Jiang, X., Luo, E. Wavelet analysis of acute effects of static magneticfield on resting skin bloodflow at the nail wall in young men // Microvascular Research. 2011. – V. 82. – P. 277–283.
510. Ye, T., Phan-Thien, N., Lim, C.T. Particle-based simulations of red blood cells- A review // J Biomech. 2016. – V. 49. – P. 2255–2266.
511. Yen, A., Braverman, I.M. Ultrastructure of the human dermal microcirculation: The horizontal plexus of the papillary dermis // J Invest Dermatol. 1976. – V. 66. – P. 131-142.
512. Yildiz, M. and Ider, Y.Z. Model based and experimental investigation of respiratory effect on the HRV power spectrum. // Physiol. Meas. 2006. – V. 27. – P. 973–988.
513. Yin H, Wang MD, Svoboda K, Landick R, Block SM, Gelles J. Transcription against an applied force. Science. 1995;270(5242):1653-7.
514. Zafrani, L., Ince, C. Microcirculation in Acute and Chronic Kidney Diseases // Am J Kidney Dis. 2015. – V. 66. – P. 1083–94.

515. Zagotta, W.N., Aldrich, R.W. Voltage-dependent gating of Shaker A-type potassium channels in drosophila muscle // J. Gen. Physiol. - 1990. - V. 95. - P. 29-60.
516. Zagotta, W.N., Hoshi, T., Aldrich, R.W. *Shaker* potassium channel gating. III. Evaluation of kinetic models for activation // J. Gen. Physiol. - 1994. - V. 103. - P. 321-362.
517. Zalewski, P., Słomko, J., Zawadka-Kunikowska, M. Autonomic dysfunction and chronic disease // British Medical Bulletin. 2018. – V. 128. – P. 61–74.
518. Zaslaver, A., Mayo, A.E., Rosenberg, R., Bashkin, P., Sberro, H., et al.. Just-in-time transcription program in metabolic pathways // Nat. Genet. – 2004. – V. 36(5). – P. 486–91.
519. Zhang Y, Feng Y, Chatterjee S, et al. Science. 338 (6110), 1076 (2012).
520. Zhou, Y., MacKinnon, R. The occupancy of ions in K⁺-selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates // J. Mol. Biol. - 2003. - V. 333. - P. 965-975.
521. Xia, X.M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J.E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C.T., Lutsenko, S., Maylie, J., Adelman, J.P. Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels // Nature. - 1998. - V. 395. - P. 503-507.

VIII. ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и РИНЦ

1. **Гриневич А.А.**, Танканаг А.В., Чемерис Н.К. Исследование зависимости спектров сердечного ритма человека от контролируемой частоты дыхания // Матем. биология и биоинформ., 2013. — Т. 8, — № 2. — С. 537–552. Импакт-фактор по SJR: 0.176.

2. **Гриневич А.А.**, Рясик А.А., Якушевич Л.В. Динамические свойства полинуклеотидной цепи, состоящей из двух неодинаковых однородных последовательностей, разделенных границей // Компьютерные исследования и моделирование, 2013. — Т. 5, — № 2. — С. 241–253. Импакт-фактор по SJR: 0.263.
3. **Гриневич А.А.**, Танканаг А.В., Чемерис Н.К. Роль эластичности кровеносных сосудов в формировании высокоамплитудных колебаний кровотока на частоте 0.1 Гц // Матем. биология и биоинформ, 2014. — Т. 9, — № 2. — С. 341–358. Импакт-фактор по SJR: 0.176.
4. Yakushevich L., **Grinevich A.**, Ryasik A. Simulation of a kink movement in homogeneous and heterogeneous DNA sequences taking into account the dissipation // Russian Journal of Numerical Analysis and Mathematical Modelling, 2014. — Т. 29, — № 3. — С. 197–204. Импакт-фактор по JCR: 1.15.
5. Tankanag A.V., **Grinevich A.A.**, Kirilina T.V., Krasnikov G.V., Piskunova G.M., Chemeris N.K. Wavelet phase coherence analysis of the skin blood flow oscillations in human // Microvasc Res, 2014. — Т. 95. — С. 53–59. Импакт-фактор по JCR: 3.75.
6. **Grinevich A.A.**, Ryasik A.A., Yakushevich L.V. Trajectories of DNA bubbles. // Chaos, Solitons and Fractals, 2015. — Т. 75. — С. 62–75. Импакт-фактор по JCR: 9.922.
7. **Гриневич А. А.**, Рясик А. А., Якушевич Л. В. Движение открытых состояний ДНК под действием случайной силы // Компьютерные исследования и моделирование, 2015. — Т. 7, — № 6. — С. 1295–1307. Импакт-фактор по SJR: 0.263.
8. **Grinevich A.A.**, Yakushevich L.V. Kinks behavior near the boundaries separating homogeneous regions of DNA // Математическая биология и биоинформатика, 2015. — Т. 10, — № 1. — С. 164–177. Импакт-фактор по SJR: 0.176.
9. **Гриневич А.А.**, Танканаг А.В., Сафронова В.Г., Чемерис Н.К. Роль аддитивной стохастической модуляции работы сердца в формировании колебаний кровотока частотой 0.1 Гц в сердечно-сосудистой системе

человека // Доклады академии наук, 2016. — Т. 468, — № 3. — С. 342–347.
Импакт-фактор по JCR: 0.834.

10. **Гриневич А.А.**, Якушевич Л.В. О моделировании движения транскрипционного пузыря под действием постоянного торсионного момента. // Биофизика, 2016. — Т. 61, — № 4. — С. 638–646. Импакт-фактор по SJR: 0.205.
11. **Grinevich A.A.**, Tankanag A.V., Chemeris N.K. The role of hydrodynamic parameters in the forming of low-frequency oscillations in arterial blood pressure in human // Mathematical Biology and Bioinformatics, 2016. — Т. 11, — № 2. — С. 233–244. Импакт-фактор по SJR: 0.176.
12. Танканаг А.В., **Гриневич А.А.**, Тихонова И.В., Чаплыгина А.В., Чемерис Н.К. Фазовая синхронизация колебаний кожного кровотока человека при асимметричном локальном нагреве // Биофизика, 2017. — Т. 64, — № 4. — С. 769-776. Импакт-фактор по SJR: 0.205.
13. **Гриневич А.А.** Математические модели в сердечно-сосудистой системе человека. Подходы к описанию колебаний с частотой 0,1 Гц variability ритма сердца и магистрального кровотока // Регионарное кровообращение и микроциркуляция, 2018. — Т. 17, — № 4. — С. 11-23. Импакт-фактор по РИНЦ: 0.795.
14. **Grinevich A.A.**, Yakushevich L.V. The influence of the DNA torque on the dynamics of transcription bubbles in plasmid PTTQ18 // Journal of Theoretical Biology, 2018. — Vol. 453, — P. 68-77. Импакт-фактор по JCR: 2.405.
15. **Grinevicha A.A.**, Tankanag A.V., Chemeris N.K. The Impact of Stochastic Perturbations upon the Hydrodynamic Relationship between the Activity of Human Cardiac Ventricles and Low-Frequency Blood Flow Oscillations in the Microcirculatory Bed // Biophysics, 2019. — Vol. 64, — № 1. — P. 117–128. Импакт-фактор по SJR: 0.205.
16. **Гриневич А.А.**, Асташев М.Е. Моделирование механизма влияния электрического трансмембранного потенциала на показатели Херста в последовательности времен жизни одиночного ионного канала //

Биологические мембраны, 2019. — Т. 36, — № 1. — С. 53-62. Импакт-фактор по SJR: 0.171.

17. **Grinevich A.A.**, Tankanag A.V., Tikhonova I.V., Chemeris N.K. A new approach to the analysis of skin blood flow oscillations in human // *Microvascular Research*, 2019. — Vol. 126, — P. 103889. Импакт-фактор по JCR: 3.75.
18. **Гриневич А. А.**, Якушевич Л. В. О компьютерных экспериментах Касмана // *Компьютерные исследования и моделирование*, 2019. — Т. 11, — № 3. — С. 503-513. Импакт-фактор по SJR: 0.263.
19. Tikhonova I.V., **Grinevich A.A.**, Guseva I.E., Safronova V.G. Modified kinetics of generation of reactive species in peripheral blood of patients with type 2 diabetes // *Free Radical Biology and Medicine*. 2020. V. 159. P. 76–86. Импакт-фактор по JCR: 8.101.
20. **Гриневич А.А.**, Масулис И.С., Якушевич Л.В. Математическое моделирование поведения транскрипционного пузыря в плазмиде pPF1 и ее модификациях. Связь между энергетическим профилем плазмиды и направлением транскрипции. // *БИОФИЗИКА*. 2021. Т. 66. № 2. С. 248–258. Импакт-фактор по SJR: 0.205.

В монографиях

21. **Гриневич А.А.**, Асташев М.Е. Фрактальные свойства ионных каналов. LAP LAMBERT Academic Publishing. 2010. ISBN 978-3-8433-0072-8. 148 с.

Свидетельства автора о регистрации программ для ЭВМ

22. **Гриневич А.А.**, Рясик А.А., Якушевич Л.В., Закирьянов Ф.К. Численное моделирование нелинейных конформационных волн в неоднородных последовательностях ДНК. Федеральная служба по интеллектуальной собственности (Роспатент). Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2014616737 от 02.07.2014.

В сборниках конференций

23. Якушевич Л.В., **Гриневич А.А.**, Рясик А.А. Влияние диссипации на динамические свойства нелинейных конформационных волн в однородных полинуклеотидных цепочках // Синергетика в общественных и естественных науках: Девятые курдюмовские чтения, материалы Международной междисциплинарной научной конференции с элементами научной школы для молодежи. 2013. Тверской государственный университет (Тверь). С. 237–239.
24. **Гриневич А.А.**, Асташев М.Е. Исследование зависимости показателей хёрста от величины электрического трансмембранного потенциала в рамках математической модели воротного механизма одиночного ионного канала // Синергетика в общественных и естественных науках: Девятые курдюмовские чтения, материалы Международной междисциплинарной научной конференции с элементами научной школы для молодежи. 2013. Тверской государственный университет (Тверь). С. 91–95.
25. **Grinevich A.A.**, Tankanag A.V., Chemeris N.K. Formation of the peak amplitude of blood flow oscillations at a frequency of 0.1 Hz in the human cardiovascular system by the noise effect on the heart // Proceedings of SPIE - the international society for optical engineering. 2017. — Vol. 10337, — P. 103371A.