

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора физико-математических наук

Пушино – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Научный консультант:

доктор физико-математических наук
Якушевич Людмила Владимировна

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, профессор
Ризниченко Галина Юрьевна
(ФГБОУВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», кафедра биофизики);

доктор физико-математических наук, профессор
Постнов Дмитрий Энгелевич
(ФГБОУВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», кафедра оптики и биофотоники);

доктор химических наук, главный научный сотрудник

Федотова Марина Витальевна
(ФГБУН Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН).

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «**Московский государственный технологический университет «СТАНКИН»**

Защита диссертации состоится 06.02.2024 г. в 13:30 на заседании **диссертационного совета** на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук **24.1.127.02**, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук, по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пушкино, 142290, Московская область.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке ПНЦ РАН по адресу: ул. Институтская, 3, г. Пушкино, 142290, Московская область, и на сайте ИТЭБ РАН: <https://iteb.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Л.Г.Бобылева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

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 развития 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 (Vanwarth-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.

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 рТТQ18. Впервые показана регуляция динамики кинков тепловыми флуктуациями и постоянным торсионным моментом. Показана динамическая регуляция экспрессии генов на примере плазмиды рPF1.

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 variability 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 рассматривается 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 (Vich 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 сахара-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.

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 солитоноподобную 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.

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.

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.

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.

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 учебные курсы для обучения студентов приемам и методам моделирования живых систем.

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.

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.

Личный вклад

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

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.

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, Пушино, 2013, Дубна, 2014, Пушино, 2015); Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика' 13, 14» (Пушино, 2013, 2014); 18я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 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» (Пушино, 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» (Пушино, 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).

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Моделирование кровотока в сердечно-сосудистой системе человека

Сердечно-сосудистую систему человека можно рассматривать как сложный многомодульный комплекс, функционирование которого обеспечивается

процессами, протекающими на разных уровнях организации живой материи, начиная от субклеточного, клеточного, тканевого, органного и заканчивая системным уровнем организма, как единого целого. Особое место в ССС занимает микроциркуляция, которая представляет собой 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". В диссертации используется замкнутая система связанных эластичных резервуаров как физический гидродинамический аналог для моделирования кровообращения в ССС как в едином органе, состоящем из упрощенных моделей 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. Колебаниям подвержены как кровоток, включая микроциркуляторный, так и сердечный ритм, что выражается в его вариабельности, как способе адаптации ССС к внешним и внутренним воздействиям. 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.

Феномен респираторной синусовой аритмии в нестационарных условиях

Вариабельность сердечного ритма (ВСР) человека представляет собой временной ряд изменений периодов сердечных сокращений или интервалов между началом одного цикла сердечного сокращения и началом другого, следующего, цикла. 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), низкочастотный (LF) и высокочастотный (HF). Установлено, что ВСР тесно связана с дыханием. Эта связь заключается в циклическом увеличении частоты сердечных сокращений (ЧСС) в фазу вдоха и её уменьшении в фазу выдоха. Связь ВСР с дыханием называют респираторной синусовой аритмией (РСА).

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 (Krasnikov, et al. 2013). При этом кривая такой зависимости имеет форму колокола с максимумом на частоте 0.1 Гц.

Ясного и однозначного понимания механизмов формирования колоколообразной зависимости ВСР от частоты дыхания в условиях

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

Модель «PNEUMA» описывает взаимодействие между сердечно-сосудистой, респираторной и вегетативной системами (рис. 1). Для воспроизведения условий контролируемого дыхания в модели отключалось формирование варибельной частоты дыхания респираторным водителем ритма (РВР) и задавались ей постоянные значения.

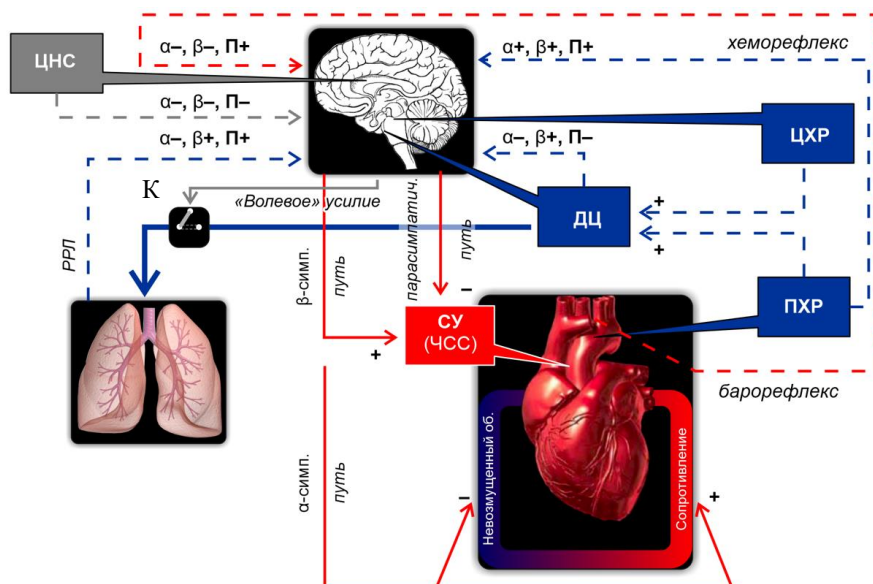


Рисунок 1. Схема вегетативного контроля. Сплошные стрелки – эфферентные сигналы. Пунктирные стрелки – афферентные сигналы. ПХР, ЦХР – периферические и центральные хеморецепторы, соответственно. РРЛ – рецепторы растяжения лёгких. ЦНС – центральная нервная система. ДЦ – дыхательный центр. СУ – синусовый узел. К – коммутатор. α, β, П – альфа-, бета- и парасимпатическая регуляция, соответственно. «+»/«-» – увеличение/уменьшение значения параметра или активности компонента системы.

В компьютерных экспериментах исследовался отклик сердечно-сосудистой системы (ВСП) на дыхание с фиксированными частотами (0.03, 0.05, 0.07, 0.1, 0.16 и 0.25 Гц). Значения частот совпадали со значениями частот контролируемого дыхания, используемых в реальных экспериментах. В результате получали, что модель «PNEUMA» при неизменных значениях параметров модели, за исключением частоты дыхания, воспроизводила феномен РСА – характерный пик в амплитудно-частотных спектрах ВСП на фиксированных частотах дыхания (рис. 2А), однако амплитуды этих пиков (рис. 2Б) не воспроизводили колоколообразную форму кривой, наблюдаемую в экспериментах.

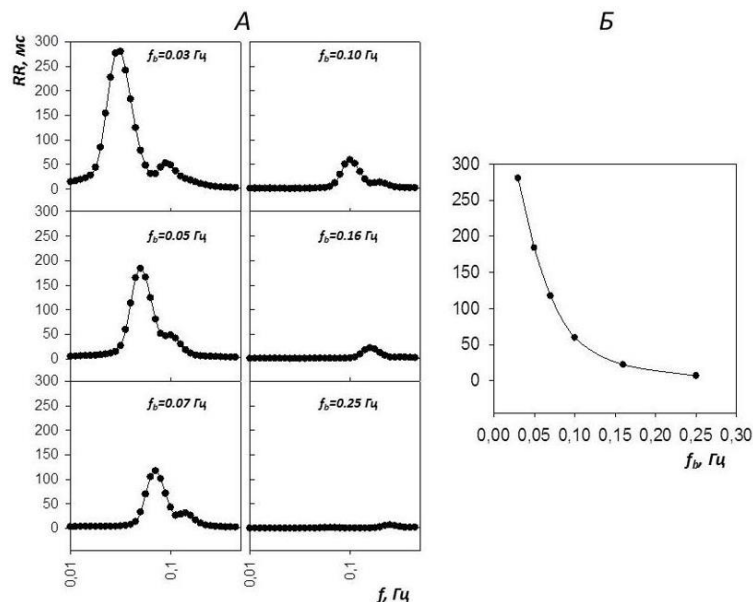


Рисунок 2. Амплитудно-частотные спектры ВСР при различных частотах (f_b) контролируемого дыхания (А), и их максимальные значения (Б), полученные для оригинальных (неизменённых) значений параметров модели.

Для снятия этого ограничения модель модифицировалась введением коэффициентов S_p и S_β , которые, при изменении частоты дыхания f_b , изменяют величину сигналов, регулирующих кровоток в ССС по парасимпатическому и бета-симпатическому путям регуляции, соответственно. В результате проведенных численных расчетов получено качественное соответствие между амплитудно-частотными спектрами моделируемой ВСР и экспериментальными данными (рис. 3).

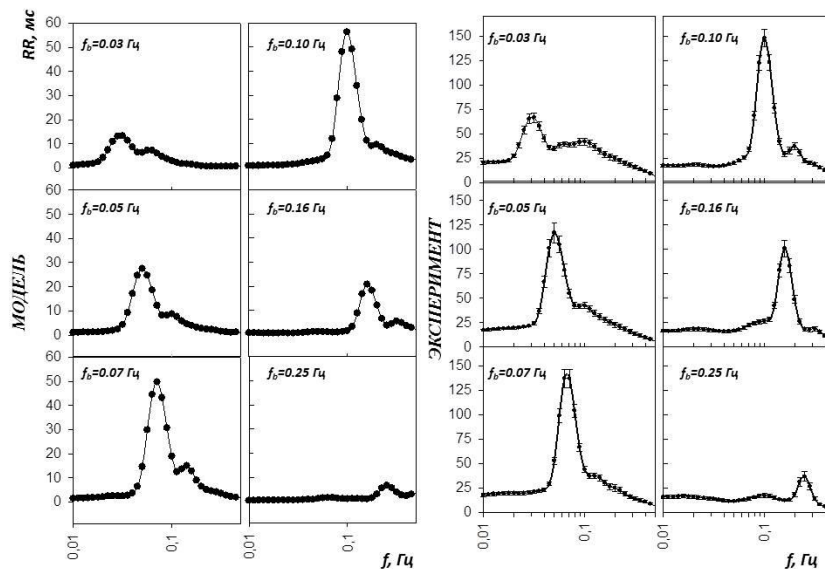


Рисунок 3. Амплитудно-частотные спектры ВСР при различных частотах (f_b) контролируемого дыхания. Слева – данные модели, полученные для частотно-зависимой парасимпатической и бета-симпатической регуляции ЧСС. Справа – экспериментальные данные, взятые из (Krasnikov, et al. 2013).

Значения максимумов спектральных компонент на частотах дыхания при этом формировали колоколообразную кривую зависимости ВСП от частоты дыхания (рис. 4), что соответствует полученным ранее экспериментальным данным (Krasnikov, et al. 2013). Пик этой кривой соответствовал частоте 0.1 Гц.

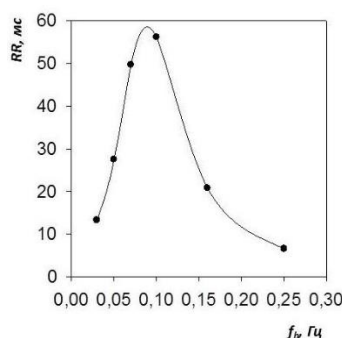


Рисунок 4. Максимальные значения спектров ВСП для различных значений частоты f_b контролируемого дыхания. Данные получены для случая частотно-зависимой пара- и бета-симпатической регуляции ЧСС.

Используя модифицированную модель «PNEUMA» удалось выявить закономерность формирования РСА при нестационарных напряженных режимах дыхания. Была показана динамическая связь между коэффициентами S_p и S_β и амплитудой РВР (A_{RD}), характеризующей интенсивность сигнала, формируемого дыхательным центром. Эта связь описывается обратным степенным законом:

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

где $i = p, \beta$.

Таким образом, в условиях напряжённых нестационарных режимов дыхания изменение активности вегетативного контроля может приводить к колоколообразной зависимости ВСП от контролируемой частоты дыхания с пиком на частоте 0.1 Гц. Само изменение активности вегетативного контроля связано с амплитудой респираторного водителя ритма обратным степенным законом.

Моделирование 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 не решенной. 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 предполагают существование центрального механизма регуляции кожной перфузии в области низких частот. С помощью математической модели удалось показать, 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.

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 (рис. 5). 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.

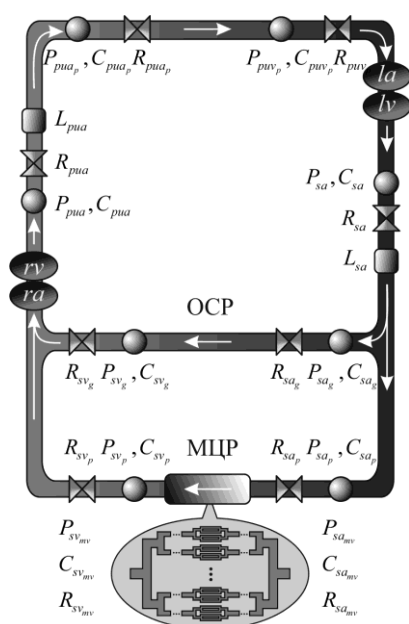


Рисунок 5. Схема моделируемого сердечно-сосудистого русла человека. ra , rv , la , lv – правое предсердие и желудочек, а также левое предсердие и желудочек соответственно. P_n , C_n , R_n – давление, эластичность и сопротивление n -го сосудистого резервуара. Обозначения резервуаров: pua – пульмональная обобщенная артерия, pua_p – артериальная часть пульмональной обобщенной периферии, puv_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.

Параметризация модели была проведена таким образом, чтобы величины давления в сердце и в сосудистых резервуарах соответствовали физиологической норме в покое (рис. 6) 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. В результате моделирования получали записи объемной скорости и давления кровотока для всех сосудистых резервуаров. Длительность записей составляла 600 с.

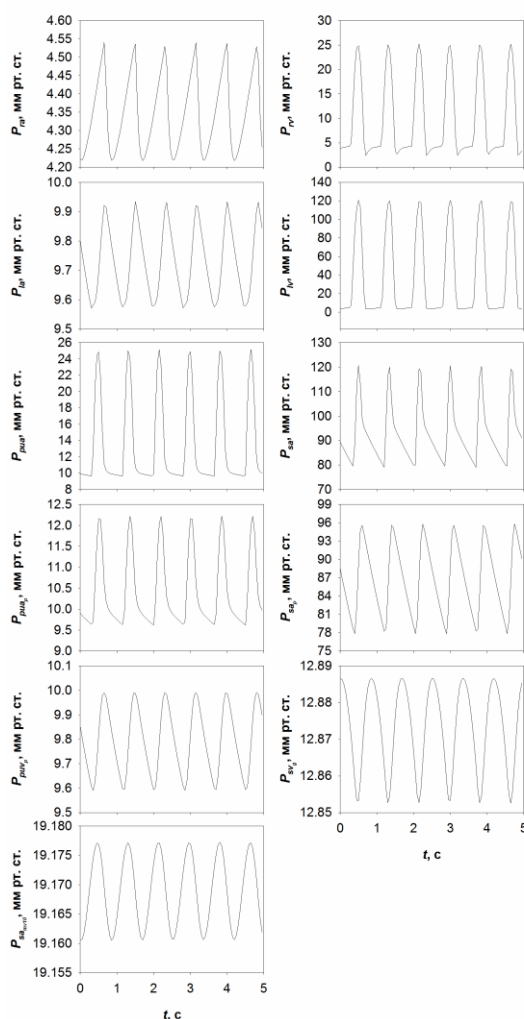


Рисунок 6. Модельные записи колебаний давления кровотока в левом и правом предсердиях (P_{la}, P_{ra}), в левом и правом желудочках (P_{lv}, P_{rv}), в системной артерии P_{sa} , в пульмональной артерии P_{pua} , в периферической системной P_{sap} и пульмональной P_{puap} артерии, в МЦР на 10-ом уровне ветвления P_{samv10} , в венозной части ОСР P_{svg} и в пульмональной периферической вене P_{puvp} .

Для проверки возможности формирования низкочастотных колебаний кровотока в МЦР центральным источником, исследовался отклик МЦР, как гидродинамической системы, на аддитивное стохастическое воздействие на тонус стенок желудочков. При этом, для анализа объемной скорости кровотока в МЦР использовали усредненную по 4-м уровням ветвления ($amv9, amv10, vmv10, vmv9$) величину, на которые приходится более 75% всех микрососудов моделируемого МЦР (рис. 7a). В результате, 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 мм^3 зондируемого объема ткани.

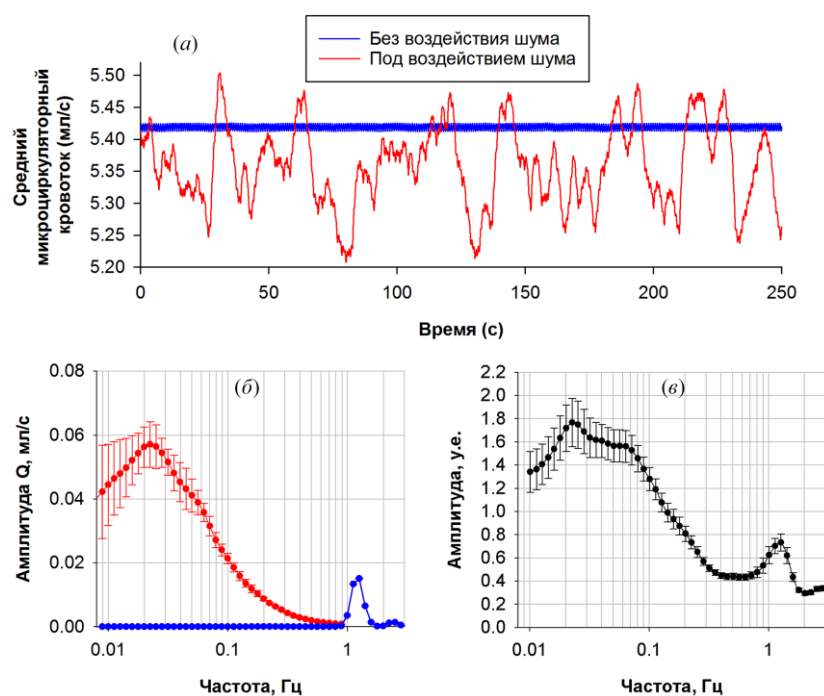


Рисунок 7. Усредненная модельная объемная скорость микроциркуляторного кровотока (а), спектры колебаний модельной и экспериментальной объемной скорости кровотока в МЦР (б) и (в), соответственно. Экспериментальная кривая отражает спектр кожной перфузии условно здоровых добровольцев (Krasnikov et. al. 2013). Данные представлены как средние \pm стандартное отклонение по 10 реализациям случайного сигнала в модельном случае и как средние \pm стандартное отклонение в экспериментальном случае.

На рис. 7б представлены амплитудно-частотные спектры колебаний объемных скоростей кровотока невозмущенной (синяя кривая) и возмущенной (красная кривая) системы. Видно, что для невозмущенной системы в спектрах присутствует только компонент на частоте сердечных сокращений ($F_h = 1.2 \text{ Гц}$) и гармоника этого компонента (пик меньшей амплитуды справа). Возмущающее воздействие на жесткость стенок желудочков низкоинтенсивным стохастическим сигналом, спектральная мощность которого не превышала 0.5% от спектральной мощности колебаний давления крови в левом желудочке, приводило к формированию низкочастотных колебаний кровотока в МЦР. Спектральная характеристика этих колебаний оказывалась качественно схожей с экспериментально наблюдаемой кожной перфузией, измеренной с помощью лазерной доплеровской флоуметрии у 29 молодых (18-26 лет) испытуемых на подушечке указательного пальца в покое (Krasnikov, et al. 2013) (рис. 7в).

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.

Таким образом, с помощью математического моделирования показано, что даже в отсутствии 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.

Нормальное функционирование ССС определяется согласованной работой механизмов, регулирующих колебания кровотока, которая может нарушаться при патофизиологических 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.

Моделирование фагоцитарного ответа гранулоцитов на микробные частицы у здоровых и больных сахарным диабетом 2-го типа

Математическая модель описывает фагоцитарный ответ и кинетику респираторного взрыва нейтрофилов в крови. В модели рассмотрены четыре состояния нейтрофилов в популяции клеток (рис. 8): (I) – покой, (II) – взаимодействие с патогеном и захват его, в результате инициируется сборка комплексов NADPH – оксидазы. Из этого состояния нейтрофилы могут переходить в I или III состояние; (III) - активированные клетки, интенсивно продуцирующие супероксид при катализе NADPH-оксидазы. Отсюда нейтрофилы могут переходить во II или IV состояние (апоптоз/некроз или нетоз).

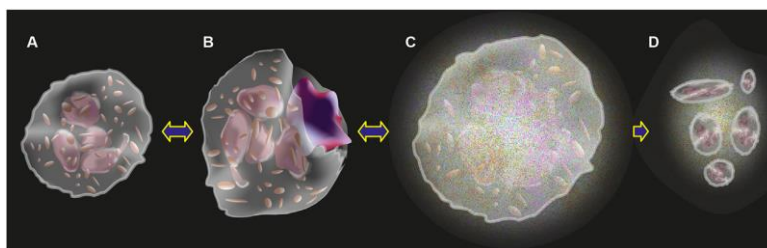


Рисунок 8. Схема состояний нейтрофилов, описанная в математической модели. (А) Покоящийся нейтрофил, I состояние. (В) Нейтрофил, взаимодействующий с патогеном, II состояние. (С) Активированный нейтрофил, III состояние. (D) Инактивированный/мертвый нейтрофил, IV состояние. Стрелки указывают на переходы 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. Были рассчитаны модельные кривые респираторного взрыва нейтрофилов, описывающие кинетику хемиллюминесцентных кривых (CL-кривые) ответа нейтрофилов на микробную провокацию в крови человека. Для уточнения специфических динамических свойств и регуляторных механизмов активации NADPH-оксидазы и выявления нарушений этих механизмов при хронической гипергликемии у больных сахарным диабетом 2-го типа (СД2Т) было проведено сравнение экспериментальных и модельных CL-кривых для двух концентраций глюкозы (рис. 9): нормальной (5.5 ммол/л) и высокой (22 ммол/л). Как показал коэффициент детерминации $R^2 = 1$ модель хорошо описывала экспериментальные кривые (рис. 9).

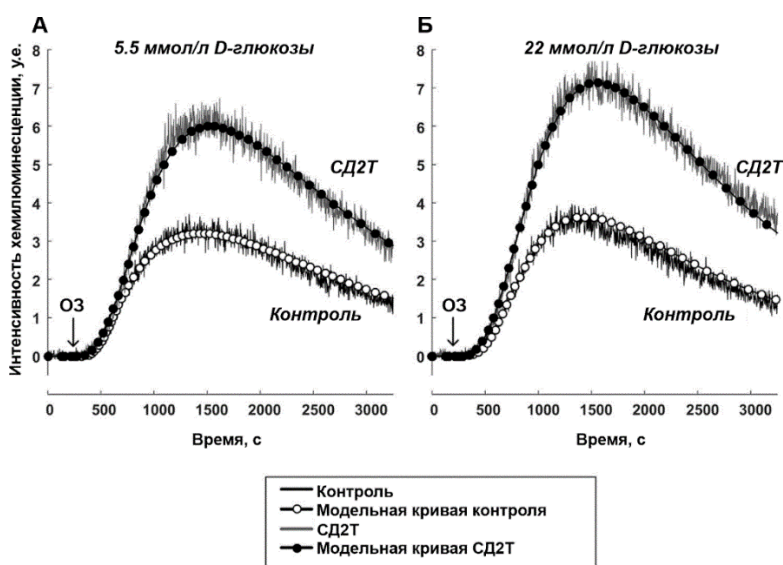


Рисунок 9. Экспериментальные и модельные кинетические кривые реакций на опсонизированный зимозан (O3) в образцах крови. (А) 5.5 ммоль/л *D*-глюкозы. (Б) 22 ммоль/л *D*-глюкозы. Для регистрации экспериментальных кривых использовались образцы крови пациента (СД2Т) и здорового человека (контроль). Стрелки указывают на добавление 15.6 мг/л O3.

Описание экспериментальных CL-кривых с помощью модели прояснило связь кинетических параметров со стадиями фагоцитоза в крови и причинами изменения кинетики кривых при сахарном диабете (рис. 9). Увеличение амплитуды ответа нейтрофилов на опсонизированный зимозан (OЗ) в образцах крови у пациентов было связано с повышением модельных параметров, определяющих способность к фагоцитозу, снижением смертности фагоцитов и/или нарушением антиоксидантных систем. 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 сборки NADPH-комплексов и выработку супероксида в контроле таким же образом, как и хроническая при диабете. Это объясняло почему скорость ответов была значимым предиктором, который, как и амплитуда ответов, являлась наиболее чувствительным и специфичным параметром кинетики респираторного взрыва нейтрофилов, позволяющим отличать пациентов от здоровых испытуемых. Баланс между снижением синхронизации сборки комплексов и увеличением выработки супероксида смещался в сторону снижения синхронизации в контроле при высоком уровне глюкозы, при диабете, наоборот, он сразу был смещен в сторону увеличения выработки супероксида. Скорость сборки NADPH-оксидазы в модели 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.

Таким образом, разработанная математическая модель фагоцитарного ответа нейтрофилов на микробную провокацию позволила выявить скрытые механизмы динамической регуляции фагоцитоза и динамические факторы, влияющие на этот процесс, 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 механизмов регуляции ионного тока 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.

Моделирование одиночного ионного канала в биологической мембране

Ионные каналы в биологических мембранах представляют собой крупные гликопротеиновые комплексы, встроенные в липидный бислой. В структуре канала имеются модули, ответственные за управление ионным током, текущим через канал – воротный механизм. Частицы воротного механизма совершают конформационные переходы между двумя функциональными состояниями, соответствующими открытому каналу (ионный ток течет через канал) и закрытому каналу (ионный ток

не течет через канал). В результате этого формируются импульсы ионного тока приблизительно одной и той же амплитуды, но различной длительности (τ_o), перемежающиеся закрытыми состояниями канала (τ_c). Функциональная характеристика индивидуального канала может быть экспериментально получена в экспериментах пэтч-методом в виде записи тока через канал. Последовательности времен $\{\tau_o\}$ и $\{\tau_c\}$ жизни канала в открытом и закрытом состояниях соответственно, характеризуют кинетику активности канала, и являются его кинетическими параметрами.

Экспериментальное исследование активности K^+ -каналов методами анализа нестационарных временных рядов (метод Херста, бестрендовый флуктуационный анализ (БФА)) показало, что в последовательностях открытых и закрытых состояний каналов наблюдается высокая степень корреляции между событиями на больших временах (от нескольких секунд до десятков секунд). Эти корреляции характеризуются показателем Херста H , который является безразмерным параметром и изменяется от 0 до 1.

Из экспериментальных исследований известно, что показатель Херста зависит от электрического трансмембранного потенциала. Однако механизм этого явления остается не ясным. В диссертации представлена математическая модель, позволяющая описать это явление.

Модель построена на базе предложенной ранее простой схемы одиночного ионного канала (рис. 10). Схема основана на рентгеноструктурных данных бактериального K^+ -канала (KcsA-канала). В схеме подвижные части трансмембранных сегментов TM2, являющиеся воротными частицами, моделируются жесткими стержнями.

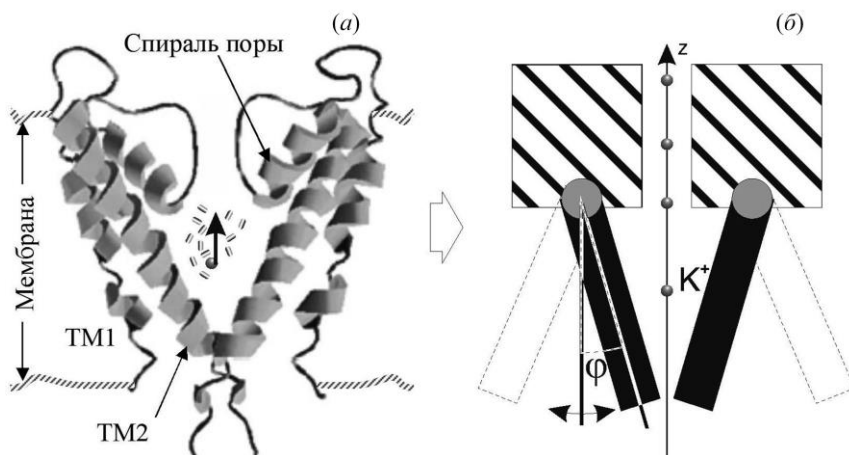


Рисунок 10. (а) – KcsA-канал (вид сбоку). Маленькие серые шарики – ионы K^+ , маленькие черно-белые цилиндры внутри поры – молекулы воды, черная стрелка показывает направление движения ионов. (б) – схема модельного ионного канала, построенного на основе структуры KcsA-канала. φ – угол отклонения подвижных частей трансмембранных сегментов TM2 канального белка при его открывании и закрывании.

Динамика этих стержней (воротных частиц) описывается разработанной ранее базовой моделью, которая позволяет получить кинетику ионного тока через канал с

высокой степенью корреляции между событиями открывания и закрывания, характеризуемыми показателями Херста схожими с экспериментальными значениями. Данная модель не описывала зависимость показателя Херста от трансмембранного электрического потенциала и была модифицирована.

Основная конформационная переменная $\varphi(t)$ в базовой модели соответствует углу отклонения воротных частиц во время открывания/закрывания канала. Зависимость угла φ от времени моделируется уравнением Ланжевена, которое в безразмерном случае имеет вид:

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

Здесь $\tau = \tilde{\gamma}t$ – безразмерное время, $\tilde{\gamma} = \gamma/3I_g$ – 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, $\tilde{U} = U/E_g$ – 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.

Безразмерная потенциальная функция \tilde{U} имеет вид:

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

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 следующим образом:

$$\begin{aligned} A(W, \psi, V_m) &= \frac{E_c(W, \psi, V_m)}{(4 + B(W, \psi, V_m))^3 (12 - B(W, \psi, V_m))} \\ B(W, \psi, V_m) &= \\ &= \begin{cases} -4 \frac{E_c(W, \psi, V_m) - E_o(\psi, V_m)}{|E_c(W, \psi, V_m) - E_o(\psi, V_m)|} (\alpha(W, \psi, V_m) - \beta(W, \psi, V_m)), & \text{при } E_c \neq E_o, \\ 0, & \text{при } E_c = E_o \end{cases} \\ \alpha(W, \psi, V_m) &= \sqrt{1 + \left(4 \frac{E_c(W, \psi, V_m) E_o(\psi, V_m)}{(E_c(W, \psi, V_m) - E_o(\psi, V_m))^2} \right)^{\frac{1}{3}}}, \\ \beta(W, \psi, V_m) &= \\ &= \sqrt{2 + \frac{2(E_c(W, \psi, V_m) + E_o(\psi, V_m))}{\alpha(W, \psi, V_m) |E_c(W, \psi, V_m) - E_o(\psi, V_m)|} - \left(4 \frac{E_c(W, \psi, V_m) E_o(\psi, V_m)}{(E_c(W, \psi, V_m) - E_o(\psi, V_m))^2} \right)^{\frac{1}{3}}} \end{aligned}$$

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:

$$\begin{aligned} E_c(W, \psi, V_m) &= \frac{1}{1+e^{a_c(V_m-V_c)}} \frac{1}{2} (1 + \varepsilon_W W(\tau) + \varepsilon_\psi \psi(\tau)) \\ E_o(\psi, V_m) &= \frac{1}{1+e^{-a_o(V_m-V_o)}} \frac{1}{2} (1 - \varepsilon_\psi \psi(\tau)) \end{aligned} \quad (4)$$

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:

$$\frac{d}{d\tau} W(\tau) = \frac{\alpha_W}{\tilde{\gamma}} (g_W(\varphi) + \beta_W(1 - g_W(\varphi))) (-W(\tau) - 2g_W(\varphi) + 1), \quad (5)$$

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:

$$\frac{d}{d\tau} \psi(\tau) = -\frac{\alpha_\psi}{\tilde{\gamma}} (\psi(\tau) + \tilde{L} \sin(\varphi)), \quad (6)$$

где α_ψ константа.

Ток через канал описывался уравнением, учитывающим наличие фильтра низких частот и шум измерительной установки:

$$\frac{d}{d\tau} I(\tau) = \frac{f}{\tilde{\gamma}} (-I(\tau) + g_i(\varphi(\tau))(V - V_0) + \delta\zeta(\tau)), \quad (7)$$

где f – частота среза фильтра, $g_i(\varphi) = \frac{g_{\max}}{1+e^{\tilde{\mu}_i \tilde{L}(\sin(\varphi) - \sin(\varphi_i))}}$ – проводимость ионной поры канала, g_{\max} – максимальная проводимость канала, μ_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.

Первая модификация базовой модели для описания зависимости показателя Херста от трансмембранного потенциала V_m была основана на предположении зависимости инерционного фактора α_ψ от V_m , который определяет корреляционные соотношения в последовательностях закрытых и открытых времен жизни канала. Была выбрана следующая зависимость:

$$\alpha_\psi(V_m) = \alpha_{\psi,1} e^{-b_{\psi,1} V_m} + \alpha_{\psi,2} e^{b_{\psi,2} V_m}, \quad (8)$$

где $\alpha_{\psi,1}$, $b_{\psi,1}$, $\alpha_{\psi,2}$, $b_{\psi,2}$ – свободные параметры.

Вторая модификация была сделана в соответствии с предположением зависимости относительной скорости вытеснения молекул воды β_W из гидрофобной поры канала в закрытом состоянии от V_m . Для этого использовалось следующее выражение:

$$\beta_W(V_m) = \beta_{W,\min} + \frac{\beta_{W,\max}}{1 + e^{-(V_m - V_{0,W})/b_W}}, \quad (9)$$

где $\beta_{W,\min}$, $\beta_{W,\max}$, $V_{0,W}$, b_W – свободные параметры.

Численно решая уравнения модели и ее модификаций с учетом уравнения (7), получали записи модельного тока, из которых методом полуамплитудного уровня получали кинетические параметры $\{\tau_c\}$ и $\{\tau_o\}$ (рис. 11).

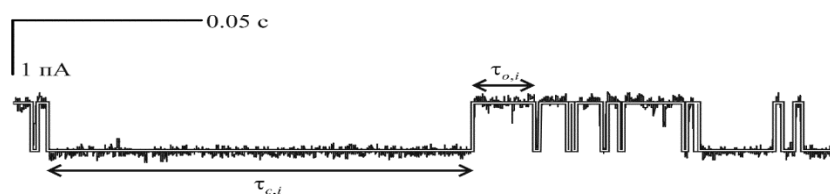


Рисунок 11. Фрагмент записи ионного тока через модельный канал (черная линия) и аппроксимация последовательности импульсов тока методом полуамплитудного уровня (белая линия). $\tau_{c,i}$, $\tau_{o,i}$ – времена жизни канала i -го участка последовательности в закрытом и открытом состоянии, соответственно.

Для анализа кинетических параметров модельного и экспериментального тока использовался метод БФА. В результате получали зависимости усредненной вариации от длины отрезков разбиения исследуемых последовательностей времен жизни канала, которые аппроксимировали одним или несколькими прямыми отрезками (рис. 12). Наклоны отрезков определяют искомые показатели Херста.

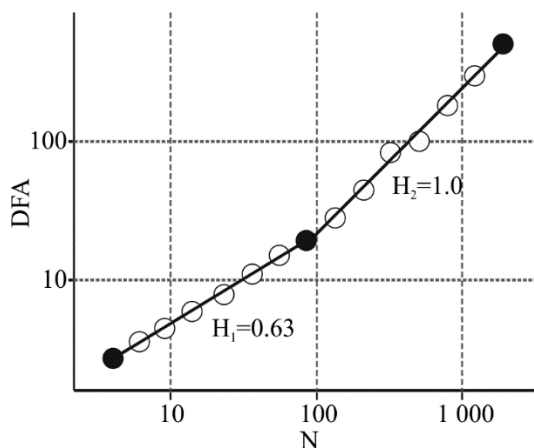


Рисунок 12. Показатели Херста, полученные методом БФА. Кружки – анализ кинетических параметров ионного тока через модельный канал, прямые линии – линейная аппроксимация методом наименьших квадратов.

Результаты расчетов на основе базовой модели и ее модификаций представлены на рисунке 13а,б,в. Экспериментальные данные (Казаченко и др. 2004) по зависимости показателей Херста (H_1 , H_2) от величины трансмембранного потенциала

V_m показаны на рисунке 13г. Из рисунка 13а,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 (рис. 13г) и говорит о почти случайном характере воротного 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 (рис. 13в).

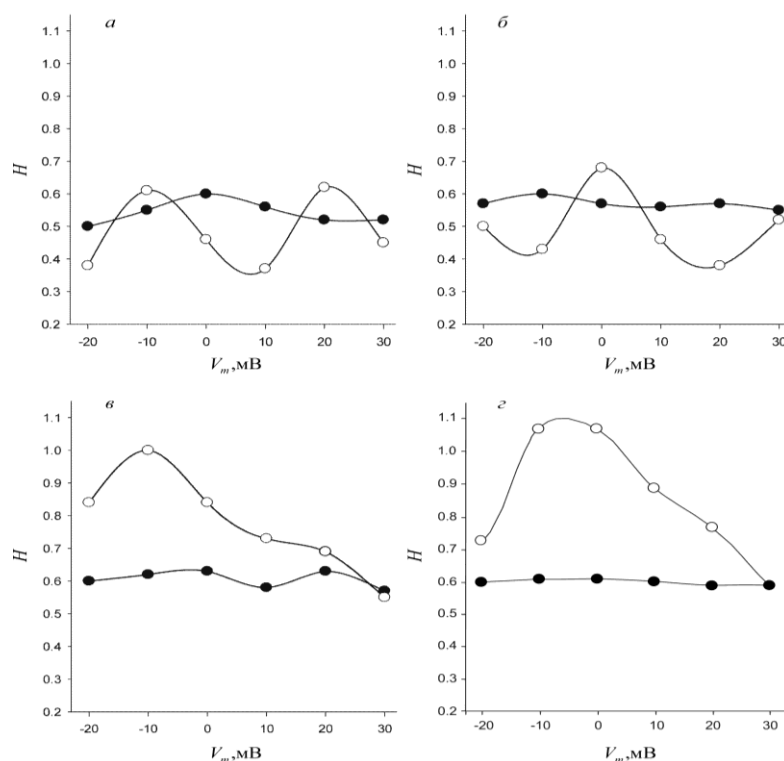


Рисунок 13. Сравнение модельных (а, б, в) и экспериментальных (г) зависимостей показателей Херста от трансмембранного потенциала V_m . Модельные расчеты выполнены на основе (а) – базовой модели с постоянными параметрами, (б) – модели, учитывающей зависимость фактора инерционности от V_m , (в) – модели, учитывающей зависимость гидрофобного фактора от V_m . (г) – экспериментальные данные. Белые кружки – H_2 , черные кружки – H_1 . На всех графиках кружки соответствуют значениям V_m для экспериментальных кривых.

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.

Таким образом, используя физическую мезоскопическую модель 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.

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).

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 диссертации исследовалась неоднородная модель и ее применение для выявления связи между динамическими и функциональными свойствами ДНК.

Одно из наиболее интересных проявлений внутренней динамики является образование открытых состояний, характеризуемых разрывом водородных связей между комплиментарными основаниями. Изучение открытых состояний важно, например, в контексте процессов транскрипции, где открытое состояние формируется в результате взаимодействия РНК полимеразы с промоторным участком последовательности ДНК.

Угловые отклонения оснований от положения равновесия являются энергетически наименее затратными в молекуле ДНК (Yakushevich, 1989). Далее рассматриваются только эти степени свободы. При таких допущениях одним из наиболее адекватных физических аналогов, который подходит для описания динамики угловых колебаний оснований, является две взаимодействующие цепочки связанных осцилляторов (Рис. 14).

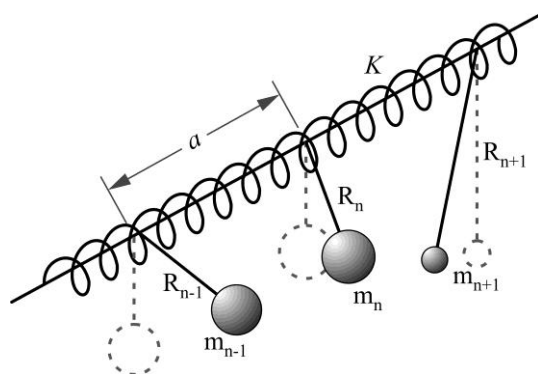


Рисунок 14. Цепочка связанных маятников. a – расстояние между соседними маятниками, K – коэффициент упругости линии подвеса, R_n и m_n – радиус и масса маятника n , соответственно.

Линия подвеса, с заданной крутильной жесткостью и связывающая осцилляторы между собой, соответствует сахаро-фосфатному остову ДНК, а маятники соответствуют основаниям. Взаимодействие между маятниками соответствует взаимодействию между комплементарными основаниями. Если рассматривать одну цепочку ДНК в среднем поле комплементарной цепочки, то уравнения, описывающие две цепочки осцилляторов, можно разделить и явно рассматривать динамику только в одной цепочке. Примером является модель 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:

$$I \frac{\partial^2 \phi(z, t)}{\partial t^2} - K' a^2 \frac{\partial^2 \phi(z, t)}{\partial z^2} + V \sin(\phi(z, t)) = 0. \tag{10}$$

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 основаниями.

Уравнение (10) — это уравнение синус-Гордона (СГ). Известно, что в приближении бегущей волны,двигающейся со скоростью v , это уравнение имеет односолитонное решение в виде кинка (+) или антикинка (-):

$$\phi(z, t) = 4 \arctg \left\{ \exp \left[\pm \frac{\gamma}{d} (z - vt - z_0) \right] \right\}, \tag{11}$$

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 (рис. 15) (Yakushevich, 1989).

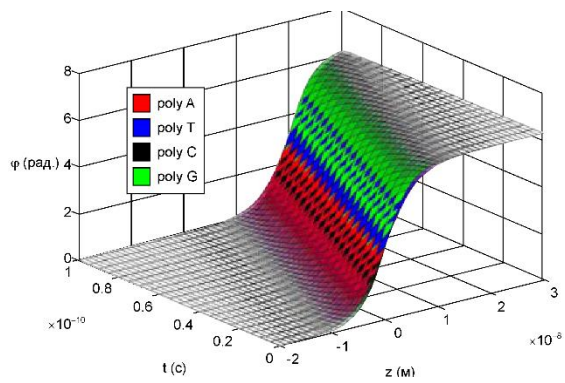


Рисунок 15. График функции (11) $\phi(z, t)$, отображающий движение кинков вдоль четырех однородных последовательностей: $poly(A)$, $poly(T)$, $poly(C)$, $poly(G)$.

Однако, модели, которые используют такой подход, хорошо описывают однородные молекулы ДНК. Это означает, что в модели Ингландера коэффициенты уравнения (10) I, K', V являются константами. Для понимания связи динамики и функции ДНК этого недостаточно. Важно учитывать неоднородность последовательностей. Модель Ингландера ограничена описанием однородных искусственных последовательностей. Для снятия этого ограничения была построена неоднородная модель ДНК.

Описание модели

Построенная модель описывает динамику открытого состояния в молекуле ДНК с учетом ее неоднородной структуры и влияния окружающей среды. Уравнение модели имеет следующий вид:

$$\begin{aligned}
 I(z) \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} - K'(z) a^2 \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} + \lambda(z) \frac{\partial \phi}{\partial t} + V(z) \sin(\phi) - \frac{K'(z) a^2}{R(z)} \left(2 \frac{\partial \phi}{\partial z} \frac{\partial R}{\partial z} + \phi \frac{\partial^2 R}{\partial z^2} \right) &= 0, \\
 I(z) = I_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{I_{\zeta} - I_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\frac{z_{b_{\zeta-1}} - z}{\sigma}\right)}, V(z) = V_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{V_{\zeta} - V_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\frac{z_{b_{\zeta-1}} - z}{\sigma}\right)}, \\
 K'(z) = K'_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{K'_{\zeta} - K'_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\frac{z_{b_{\zeta-1}} - z}{\sigma}\right)}, \lambda(z) = \lambda_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{\lambda_{\zeta} - \lambda_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\frac{z_{b_{\zeta-1}} - z}{\sigma}\right)}, \\
 R(z) = R_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{R_{\zeta} - R_{\zeta-1}}{1 + \exp\left(\frac{z_{b_{\zeta-1}} - z}{\sigma}\right)}.
 \end{aligned} \tag{12}$$

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, λ_i — коэффициент трения i -го основания, n — число оснований в последовательности, z_{b_i} — координата i -го основания, σ — параметр, определяющий плавность изменения значений коэффициентов для соседних оснований различного типа.

Для проверки адекватности модели была исследована искусственная последовательность, состоящая из трех однородных участков $poly(A)$, $poly(T)$ и $poly(G)$. Как показано на рисунке 16а, 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 использовалась проекция $\partial \phi / \partial z$ на плоскость (z, t) . Этот метод был назван методом траекторий. Он позволяет отслеживать направление движения кинка вдоль ДНК и изменение его скорости. На рисунке 16б показана траектория кинка,двигающегося вдоль исследуемой последовательности без учета диссипации. Видно, что если двигаться по траектории в сторону увеличения времени, то траектория будет показывать направление движения 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 (рис. 16в).

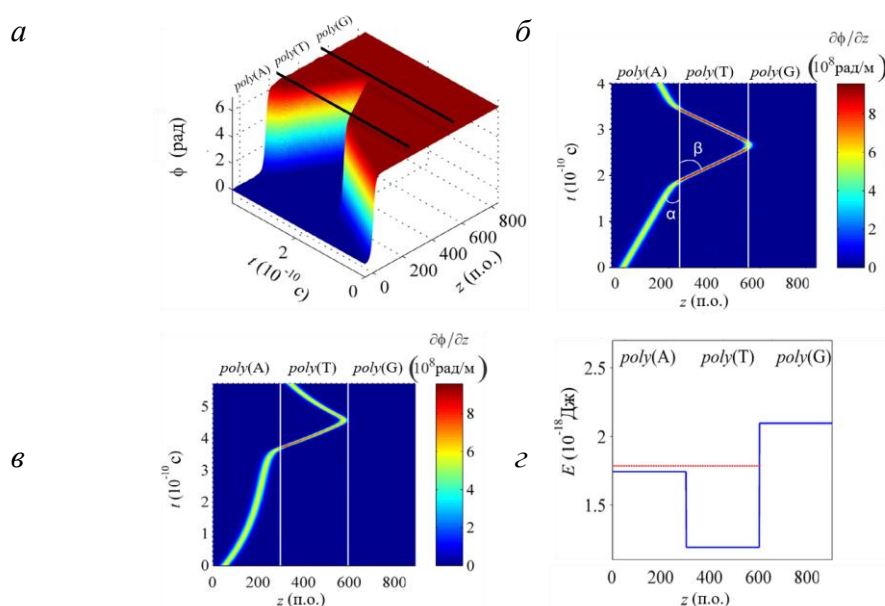


Рисунок 16. Движение кинка в искусственной последовательности, состоящей из трех однородных участков *poly(A)*, *poly(T)* и *poly(G)*. (а) – трехмерное изображение движения кинка без учета диссипации. Жирные черные прямые линии обозначают границы между однородными участками. (б) – траектория кинка без 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 (рис. 16г), который представляет собой чередование ям и барьеров. Для получения энергетического профиля использовалась следующая формула:

$$E_0(z) = 8\sqrt{V(z)K'(z)}, \quad (13)$$

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)*. Таким образом, было показано, что 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 неоднородной молекуле ДНК на основе классического уравнения СГ.

Эффекты на границе

При исследовании искусственных последовательностей ДНК с использованием предложенной новой математической модели был обнаружен интересный динамический эффект, обусловленный неоднородностью структуры молекулы. Было выявлено зигзагообразное возмущение на границе, разделяющей однородные участки на примере последовательности, состоящей из двух однородных участков *poly(A)* и *poly(C)* (рис. 17).

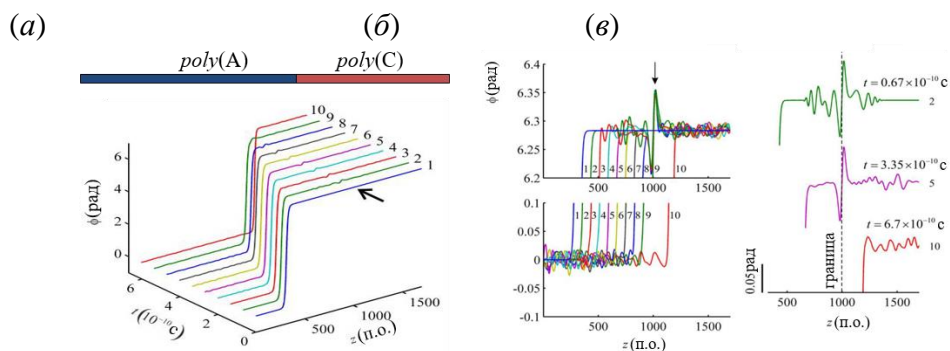


Рисунок 17. Динамика кинка в последовательности *poly(A)-poly(C)*. (a) – последовательность *poly(A)-poly(C)* и трехмерный график движения кинка вдоль последовательности, представленный в виде временных срезов (кривые 1, ..., 10). (б) – верхние и нижние части временных срезов движущегося кинка. (в) – верхние части трех временных срезов, показывающие прохождение кинка через границу. Черные стрелки указывают на зигзагообразное возмущение на границе.

Возмущение имело малую (рис. 17a), но хорошо выраженную (рис. 17б) 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 (рис. 18).

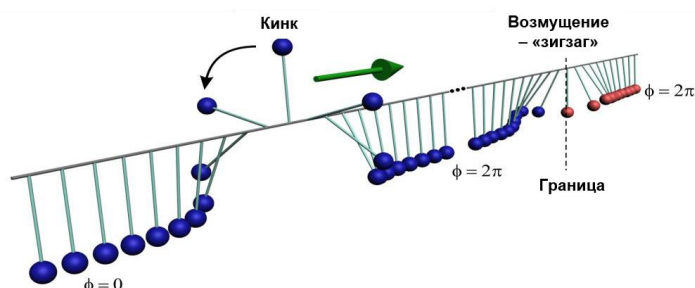


Рисунок 18. Маятниковая модель движения кинка вдоль неоднородной молекулы ДНК, состоящей из двух однородных участков. Цвет шариков обозначает разный тип оснований. Зеленая стрелка указывает направление движение кинка вдоль ДНК, а черная – направление вращения оснований.

Также 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

относительно границы, и что амплитуда возмущения зависела от величины параметра σ по принципу: чем больше σ , тем меньше амплитуда.

Низкоамплитудное зигзагообразное возмущение ранее не наблюдалось в других моделях ДНК и является характерной особенностью системы неоднородных связанных осцилляторов, что показывает четвертое слагаемое ее плотности гамильтониана:

$$\rho_H = \frac{I(z)}{2} \left(\frac{\partial \phi}{\partial t} \right)^2 + V(z)(1 - \cos \phi) + \frac{KR^2(z)a^2}{2} \left(\frac{\partial \phi}{\partial z} \right)^2 + \frac{Ka^2}{2} \left(\phi^2 \left(\frac{dR}{dz} \right)^2 + \phi \frac{\partial \phi}{\partial z} \frac{d^2(R^2)}{dz^2} \right), \quad (14)$$

или в эквивалентной форме:

$$\rho_H = \frac{I(z)}{2} \left(\frac{\partial \phi}{\partial t} \right)^2 + V(z)(1 - \cos \phi) + \frac{K'(z)a^2}{2} \left(\frac{\partial \phi}{\partial z} \right)^2 - \frac{K'(z)a^2}{2} \frac{1}{R(z)} \frac{d^2 R}{dz^2} \phi^2. \quad (15)$$

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.

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 (рис. 19) (Kasman and LeMesurier, 2007). Левая часть первой из последовательностей содержала повторяющиеся триплеты ТТА, 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.

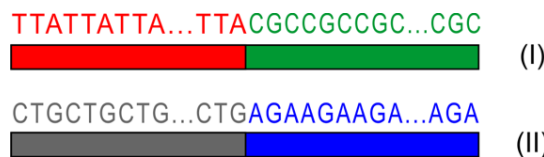


Рисунок 19. Последовательности Касмана. Левые части последовательностей кодируют лейцины, правые – аргинины.

Он показал на модели Салерно, что в одной последовательности кинк отражался от границы, а в другой проходил. Это предполагает, что динамика распространения открытых состояний в функционально одинаковых последовательностях различна. Этот эффект был назван эффектом Касмана. В диссертации эффект Касмана исследуется с помощью новой неоднородной модели ДНК.

Расчет траекторий и оценка энергетических профилей последовательностей проводилась с использованием квази-однородного приближения:

$$\bar{I}(z) \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} - \bar{K}'(z) a^2 \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} + \bar{V}(z) \sin(\phi) - \frac{\bar{K}'(z) a^2}{\bar{R}(z)} \left(2 \frac{\partial \phi}{\partial z} \frac{\partial \bar{R}}{\partial z} + \phi \frac{\partial^2 \bar{R}}{\partial z^2} \right) = 0,$$

$$\bar{I}(z) = \bar{I}_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{I}_\zeta - \bar{I}_{\zeta-1}}{1 + \exp((z_{b_{\zeta-1}} - z)/\sigma)}, \quad \bar{V}(z) = \bar{V}_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{V}_\zeta - \bar{V}_{\zeta-1}}{1 + \exp((z_{b_{\zeta-1}} - z)/\sigma)}, \quad (16)$$

$$\bar{K}'(z) = \bar{K}'_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{K}'_\zeta - \bar{K}'_{\zeta-1}}{1 + \exp((z_{b_{\zeta-1}} - z)/\sigma)}, \quad \bar{R}(z) = \bar{R}_1 + \sum_{\zeta=2}^n \frac{\bar{R}_\zeta - \bar{R}_{\zeta-1}}{1 + \exp((z_{b_{\zeta-1}} - z)/\sigma)}.$$

$$\bar{E}_0(z) = 8\sqrt{\bar{V}(z)\bar{K}'(z)}, \quad (17)$$

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.

Траектории кинков в последовательностях Касмана представлены на рисунке 20а,б.

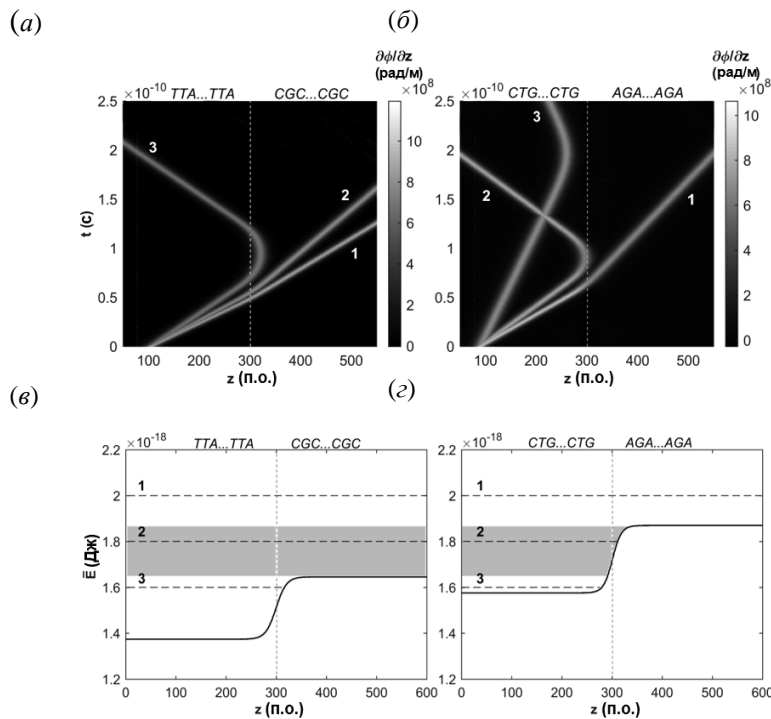


Рисунок 20. Траектории кинка (а) и (б) в последовательностях Касмана (I) и (II) соответственно. Начальные энергии кинков (пунктирные горизонтальные прямые) и энергетические профили (сплошные кривые) (в) и (г) последовательностей Касмана (I) и (II) соответственно. Вертикальные пунктирные прямые обозначают 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.

Они были получены при разных значениях начальных энергий кинка без учета сил трения. Начальные значения энергии кинков и энергетические профили последовательностей показаны на рисунке 20в,г. Видно, что эффект Касмана действительно наблюдается, но в ограниченном диапазоне начальных энергий кинка (серая полоса на рис. 20в,г). Для рассматриваемых последовательностей этот диапазон составляет от 1.647×10^{-18} до 1.871×10^{-18} Дж.

Сравнивая кодоны в последовательностях Касмана, было обнаружено, что некоторые имеют преимущество (энергетическое) перед другими. Можно предположить, что такая закономерность может иметь более общее значение. Для подтверждения этого были рассмотрены все триплеты, кодирующие лейцины и аргинины. Значения энергии покоя кинков в последовательностях, состоящих из этих кодонов, указаны во втором и пятом столбцах таблицы 1. 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.

Таблица 1. 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
ТТА	0.140	6	AGA	0.190	7
СТG	0.160	8	CGC	0.167	9
СТА	0.149	7	AGG	0.179	8
СТC	0.138	8	CGA	0.179	8
СТT	0.130	7	CGC	0.167	9
ТТG	0.153	7	CGT	0.160	8

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 СGT кодонов.

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 был рассмотрен более интересный случай с использованием реальной последовательности.

Плазмида pPF1

Векторная плазмида pPF1 (рис. 21) была получена из плазмиды pET-28b и дополнена двумя генами, кодирующими зеленый и красный флуоресцентные белки Egfr и mCherry, соответственно. 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, небольших фрагментов *Escherichia coli*, взятых из так называемых промоторных островов – областей, высоко насыщенных промоторо-подобными участками. 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.

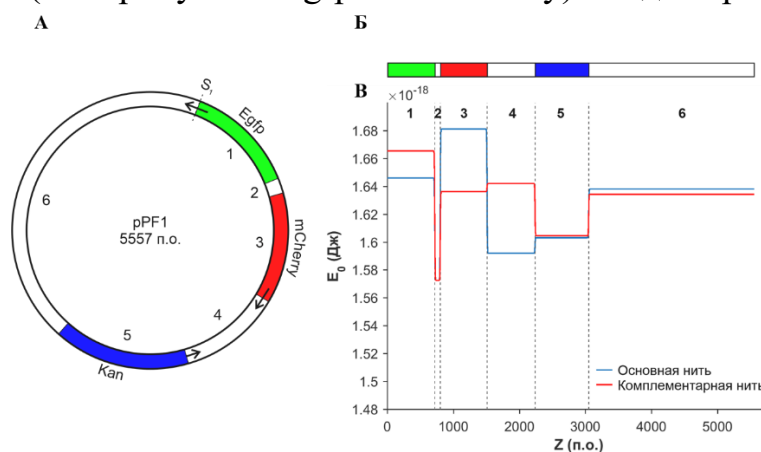


Рисунок 21. Кольцевая (А), линейная (Б) схемы и энергетический профиль (В) плазмиды pPF1. Ген зеленого белка Egfp (участок 1) и ген устойчивости к канамицину Kan (участок 5) транскрибируются по комплементарной нити. Ген красного белка mCherry (участок 3) транскрибируется по основной нити. S1 – точка, указывающая начало последовательности.

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. Из рис. 21В 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.

Как и в экспериментах по искусственным генетическим манипуляциям *in vitro*, в компьютерных экспериментах проводилось встраивание во 2-й участок небольших последовательностей *Escherichia coli* из промоторных островов *in-3* (рис. 22А) и обратно комплементарной к ней *in-4* (рис. 22Б)

А

```

ТААТСАГГАТГАТГТГСАТТТАТТТТТАТАСААААТТАТАГТТТГСА
ААТТТТААТАААТТТКАТТТААГАТТАААТТАТТАТГАТГТТТТТТА
ТТСТААСТТАТТТСАААГТТАСАТТТТТСААСГСТТАСТАТГСТТТТТАТ
ААСАТАААСТСАСТАСААСГСАСТГГА

```

Б

TTCAGGTGCGTTGTAGTGAGTTTATGTTAATAAAAAAGCATAGTAAGCGT
 TGA AAAATGTAAC TTTGAAATAAGTTAGAATAAAAAACAACATACATATA
 ATAATTTAATCTTAAATGAAATTTATTTAAATTTGCAAAC TATAATTTTGTG
 TATAAAAATATAAATGCACATCATCCTGATTA

Рисунок 22. Последовательности, встраиваемые во 2-й участок плазмиды рPF1. (А) – фрагмент реальной последовательности *Escherichia coli* (*in-3*), взятый из промоторных островов, и (Б) – обратно комплементарный к нему фрагмент (*in-4*).

Результаты расчета энергетического профиля основной и комплементарной последовательностей модифицированной вышеуказанным способом плазмиды рPF1 представлены на рис. 23.

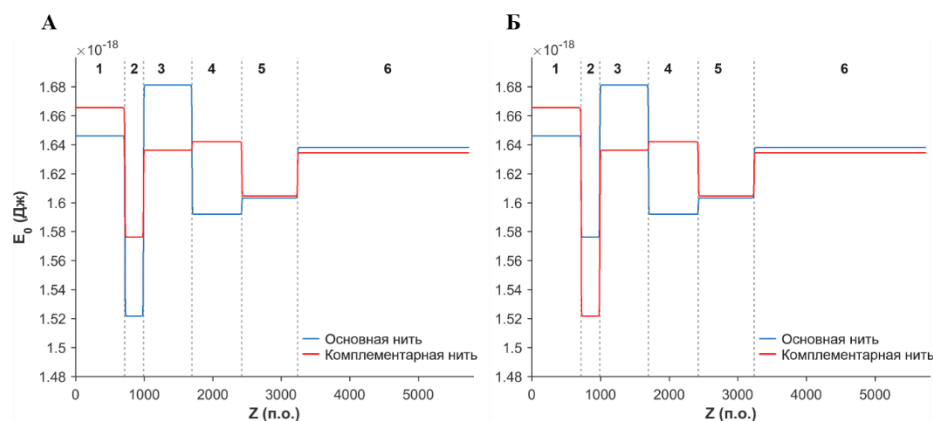


Рисунок 23. Энергетические профили основной (синяя кривая) и комплементарной (красная кривая) последовательностей модифицированной плазмиды рPF1. Цифрами 1–6 обозначены участки последовательностей. Вертикальные пунктирные линии обозначают границы между смежными участками.

Видно, что при интегрировании во 2-й участок фрагмента *in-3*, самая глубокая потенциальная яма приходится на 2-й участок основной последовательности (рис. 23А, синяя 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.

При интегрировании фрагмента *in-4*, самая глубокая потенциальная яма приходится на 2-й участок комплементарной последовательности (рис. 23Б, красная 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.

При моделировании энергетического профиля однородных и природной последовательностей, использованных в 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.

Плазмида *pTTQ18*

Плазмида *pTTQ18* представляет собой небольшую кольцевую молекулу ДНК длиной 4563 пар оснований (рис. 24а). Она содержит четыре функционально значимых участка: промотор (Pr), первая и вторая кодирующие области (CDS-1 и CDS-2), терминатор (Term). Участки, расположенные между функционально значимыми участками, назовем некодирующими. В рамках квази-однородного приближения имеем 8 участков, разделенных 8-ю границами.

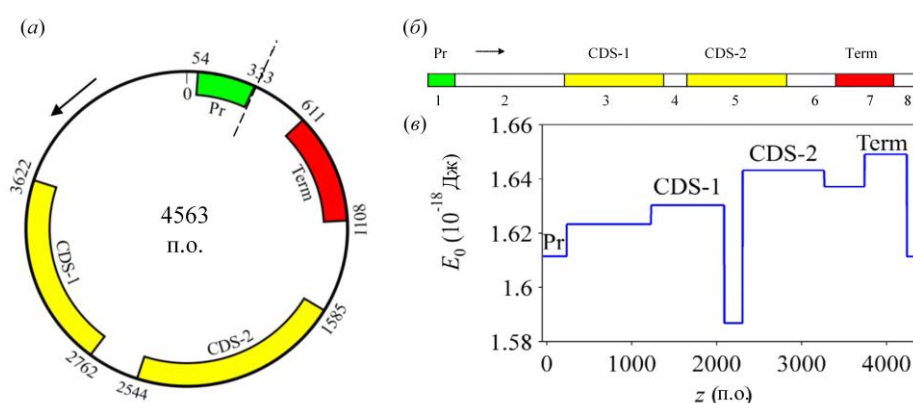


Рисунок 24. Плазмида *pTTQ18* в кольцевом (а) и в линейном (б) представлении. (в) – энергетический профиль плазмиды. Pr – промотор, CDS-1 и CDS-2 – первая и вторая кодирующие области, Term – терминатор. Стрелки показывают направление движения кинка. Пунктирная линия – линия разреза кольцевой плазмиды.

Перед исследованием динамики кинка в плазмиде был сделан переход от ее кольцевой формы к линейной (рис. 24б), разрезав плазмиду так, как показано на рисунке 24а пунктирной линией. Затем была рассмотрена динамика кинка в линейной плазмиде без учета диссипации для разных значений начальных скоростей. Получены следующие результаты. Когда начальная скорость кинка была равна 250 м/с полной энергии кинка было недостаточно для преодоления границы с CDS-1 участком (рис. 25а,б). Кинк отражался от этой границы. В случае, изображенном на рисунке 25 (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. При увеличении начальной скорости до 380 м/с (рис. 25д,е) кинк преодолевал обе границы с CDS-1 и с CDS-2, но отражался от границы с терминаторным участком. В последнем случае (рис. 25ж,з) начальная

скорость кинка была такова (450 м/с), что его полной энергии хватало на преодоление всех границ и он проходил всю последовательность.

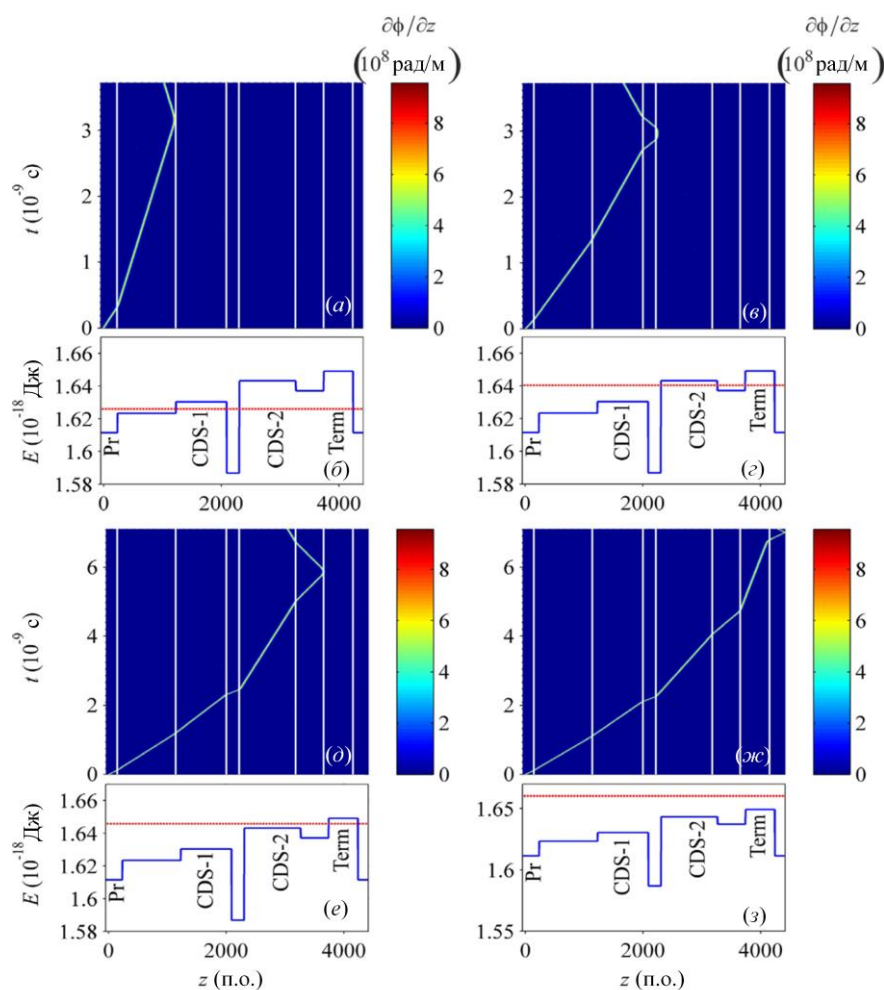


Рисунок 25. Траектории кинка [(а), (б), (д), (ж)], энергетические профили плазмиды рТТQ18 (сплошная линия) и полные энергии кинка (точечная линия) [(б), (з), (е), (з)] движущегося в плазмиде рТТQ18 с начальными скоростями: $v_0 = 250$ м/с в (а) и (б), $v_0 = 350$ м/с в (в) и (з), $v_0 = 380$ м/с в (д) и (е), $v_0 = 450$ м/с в (ж) и (з).

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 некодирующим участком. При увеличении скорости до очень большого значения (1800 м/с) позволило кинку добраться до CDS-1 и там остановиться. 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. При дополнительном 5% снижении значений коэффициентов кинк преодолевал всю последовательность.

Полученные результаты хорошо коррелируют со свойствами функционально значимых участков рассмотренной плазмиды. Промотор имел 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. На

примере реальной последовательности также показана зависимость динамического поведения кинка от расположения, длины и нуклеотидного состава основных функционально значимых участков, что доказывает наличие взаимосвязи между функциональными и динамическими свойствами молекулы ДНК.

Применение модели к изучению динамических свойств реальной последовательности выявило ее ограничение. 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.

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», могут быть ответственны за ускорения или замедления процесса транскрипции. Для исследования влияния внешних сил на динамику открытых состояний использовалось математическое моделирование. Для этого в модель был введен дополнительный член, описывающий воздействие внешних сил:

$$I(z) \frac{\partial^2 \phi}{\partial t^2} - K'(z) a^2 \frac{\partial^2 \phi}{\partial z^2} + V(z) \sin(\phi) - \frac{K'(z) a^2}{R(z)} \left(2 \frac{\partial \phi}{\partial z} \frac{\partial R}{\partial z} + \phi \frac{\partial^2 R}{\partial z^2} \right) + \lambda(z) \frac{\partial \phi}{\partial t} = M(z, t), \quad (18)$$

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 очевидна. Однако, вопрос зависимости динамики открытых состояний от температуры остается открытым. Этот вопрос исследовался на искусственной последовательности *poly(A)-poly(T)-poly(C)-poly(G)* подстановкой в правую часть уравнения (18) момента случайной силы, определяемой Ланжевеновским термостатом:

$$M^{\text{случ}}(z, t) = k_z \sqrt{2\lambda(z)k_B T} \zeta(z, t), \quad (19)$$

$$\langle \zeta(z, t) \rangle = 0, \quad \langle \zeta(z, t), \zeta(z', t') \rangle = \delta(z - z') \delta(t - t').$$

Здесь k_z – коэффициент, характеризующий тепловое равновесие между термостатом и ДНК, k_B – постоянная Больцмана, $T = 310$ К – температура термостата.

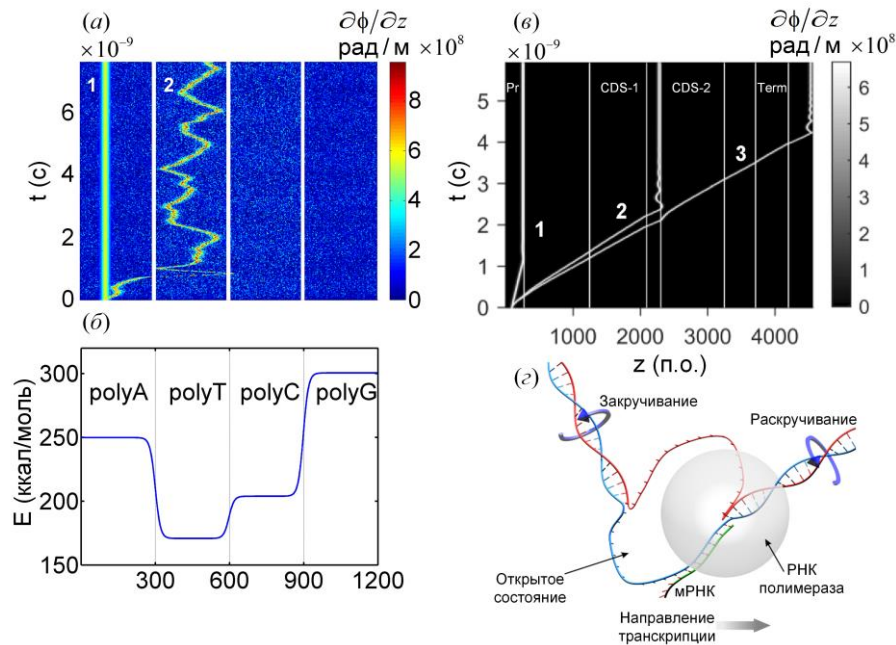


Рисунок 26. Динамика открытого состояния, описываемого кинком, при внешних воздействиях в ДНК. (а) – траектории кинка с нулевой начальной скоростью в искусственной последовательности *poly(A)-poly(T)-poly(C)-poly(G)* без воздействия (1) и при воздействии (2) тепловых флуктуаций ($T = 310$ K). (б) – энергетический профиль последовательности *poly(A)-poly(T)-poly(C)-poly(G)*. (в) – траектории кинка с начальной скоростью $v_0 = 50$ м/с в последовательности pTTQ18 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). (г) – рисунок процесса транскрипции в ДНК с изображением торсионных моментов по разные стороны от транскрипционного «пузыря».

Численное решение уравнения (18) без внешнего воздействия ($M(z, t) = 0$) при тепловом воздействии (19) на ДНК показало, что поведение кинка, описывавшего динамику открытого состояния в исследуемой последовательности, менялось (рис. 26а). Без внешнего воздействия кинк, имеющий нулевую начальную скорость, оставался в покое, не совершая поступательных движений вдоль последовательности (рис. 26а (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 (рис. 26а (2)). Через некоторое время это приводило к тому, что кинк, достигнув границы между первым и вторым участками, «сваливался» в потенциальную яму (рис. 26б), 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 (рис. 26а (2)).

Таким образом было 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 была использована плазида рТТQ18 (рис. 24). 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» (рис. 26з), на динамику открытого состояния при помощи уравнения (18). Для этого применялось квази-однородное приближение для уравнения (18), 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 (промотор) и останавливался на границе с некодирующим участком, так как его энергии не хватало для преодоления энергетического барьера (рис. 26в (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 (рис. 26в (2)). Дальнейшее увеличение торсионного момента до $M_\tau = 6.18 \times 10^{-23}$ Дж позволило кинку достигнуть конца последовательности (рис. 26в (3)).

Показано, 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:

$$v_{st,i} = \frac{\bar{c}_i}{\sqrt{1 + \left(\frac{4\bar{\lambda}_i}{M_\tau\pi}\right)^2 \frac{\bar{v}_i}{\bar{l}_i}}}, \quad \bar{c}_i = \sqrt{\frac{K'_i a^2}{\bar{l}_i}}. \quad (20)$$

Оценка показала, что релаксационный период составлял порядка нескольких сотен пико секунд ($T_{st} \sim 10^{-10}$ с). Зная связь стационарной скорости кинка с торсионным моментом (20) и энергетический профиль последовательности (рис. 24в), можно оценить минимальные значения торсионного момента, достаточные для преодоления границ с участками, для которых на энергетическом профиле формируется барьер. Результаты оценки показаны в таблице 2.

Таблица 2. Минимальные значения торсионного момента для преодоления границ с «барьерными» участками в последовательности рТТQ18.

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 (рис. 26в) с минимальными значениями торсионного момента (таблица 2) 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 больше, 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.

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 апериодических 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.

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.

**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. **Grinevich 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.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ 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 ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ 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.