

Асташев Максим Евгеньевич

**НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ОПИСАНИЮ ДИНАМИКИ МОЛЕКУЛЯРНЫХ
КОМПЛЕКСОВ, КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ И ТКАНЕЙ**

1.5.2. — Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук**

Пущино - 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова
Российской академии наук»

Научный консультант: доктор биологических наук, профессор
Гудков Сергей Владимирович

Официальные оппоненты: **Караваев Анатолий Сергеевич**
доктор физико-математических наук, профессор,
Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г.
Чернышевского, Институт физики, кафедра
динамического моделирования и биомедицинской
инженерии, заведующий
Постников Евгений Борисович
доктор физико-математических наук, доцент,
Курский государственный университет, факультет
физики, математики, информатики, кафедра физики и
нанотехнологий, профессор
Ширманова Марина Вадимовна
доктор биологических наук, Приволжский
исследовательский медицинский университет, НИИ
экспериментальной онкологии и биомедицинских
технологий, заместитель директора

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
"Государственный научный центр Российской
Федерации - Федеральный медицинский
биофизический центр имени А.И. Бурназяна" ФМБА
России

Защита диссертации состоится «05» февраля 2026 года в 14 ч 00 мин на заседании
диссертационного совета **24.1.232.01** на базе Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр
биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290, Московская
область, г. Серпухов, г. Пушино, ул. Институтская, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного
бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушинский
научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290,
Московская область, г. Серпухов, г. Пушино, ул. Институтская 3 и на сайте
<http://www.pbcras.ru/>

Автореферат разослан " __ " _____ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 24.1.232.01,

доктор биологических наук _____ Дегтярева Ольга Васильевна

Общая характеристика работы

Актуальность и степень разработанности проблемы

Системная биология (Zieglängsberger & Tölle, 1993) — это научное направление, в котором теория систем применяется для изучения и описания сложных систем с сетевой организацией (von Bertalanffy, 1950). Перспективы системной биологии заключаются в преодолении кризиса предсказательной силы моделей, построенных на редукционном подходе (Ahn et al., 2006). Экспериментальный подход системной биологии представляет собой цикл, состоящий из нескольких этапов (Kitano, 2002): 1) теоретический анализ имеющихся данных, 2) построение математической модели системы, 3) симуляция, 4) формирование гипотезы, 5) дизайн эксперимента и разработка экспериментального оборудования, 6) биологический эксперимент, 7) описание экспериментальных данных и 8) синтез новых научных данных и переход в начало цикла. Первые четыре этапа относятся к вычислительной биологии (dry biology), последующие — к экспериментальной (wet biology). Реализация такого цикла требует решения разнородных задач: математических — для формализации математической модели и анализа данных; биологических — для формирования гипотезы на основе имеющихся биологических данных и получения экспериментальных данных; технических — для построения оптимального дизайна эксперимента.

Несмотря на перспективы системной биологии, успешных примеров реализации экспериментальных исследований на молекулярном, клеточном и тканевом уровне немного (Fröhlich et al., 2018). На уровне органов, значительный прогресс достигнут в анализе процессов электрогенеза в мозге (Tewarie et al., 2019). Наиболее продуктивными направлениями системной биологии являются геномика, метаболомика и прочие направления -омики (Veenstra, 2021), основным отличием которых от других направлений биологии является доступ к экспериментальным данным большого объема.

Поскольку модельное описание сложной системы требует верификации модели с применением высокоинформативных экспериментальных данных (Kreutz&Timmer, 2009), их получение невозможно без автоматизации измерительного процесса (King et al., 2009). В случае флаксомики, физиологии, электрофизиологии, экспериментальной биофизики данные часто получают в виде временных рядов, т.е. результатов синхронного многоканального измерения физико-химических параметров биологической системы во времени. Синхронное многоканальное измерение различных параметров многократно повышает информативное качество экспериментальных данных, поскольку появляется возможность оценки

фазовой синхронизации ритмических процессов. Это является эффективным инструментом для анализа динамического поведения сложных сетевых систем, которые их генерируют (Baboukani et al., 2019).

Ключевые особенности планирования эксперимента системной биологии (Kreutz&Timmer, 2009): 1) верификация динамических моделей осуществляется путем исследования реакции биологической системы на провокационное возмущение; 2) наиболее информативными являются измерения на клеточном уровне; 3) для создания математических моделей требуется относительно большой объем данных: количество независимых параметров, определяемых по экспериментальным данным должно превышать количество параметров модели; 4) критерии, используемые для описания данных, должны быть чувствительны к используемым провокационным тестам.

Критерии описания временных рядов можно условно разделить на линейные и нелинейные. Первые обладают свойством аддитивности: сумма временных рядов двух сигналов в результате анализа даёт критерии, являющиеся суммой критериев сигналов. К таковым можно отнести критерии, основанные на статистических моментах: среднее, среднеквадратическое отклонение, асимметрия и эксцесс (Серов и др., 2019) и время-частотные методы (Morales& Bowers, 2022). Нелинейные критерии основаны на мерах из теории фракталов: фрактальная размерность, показатели Херста и Гёльдера (Казаченко и др., 2004; Браже и др., 2004); на теории информации: информационная энтропия (Karbowski, 2024), на исследовании фазовых портретов (Альмухамедов, 2009); на свертках временных рядов: сингулярный спектральный анализ (Ахметшин, 2013), на свертках частотных спектров: фиккер-шумовая спектроскопия (Тимашев, 2007; Абдулаев и др., 2018), на коэффициентах нелинейных или гармонических искажений (Бондарь и др., 2019), на спектральных методах второго и более высоких порядков, например, вейвлет-когерентный анализ (Bandrivskyu et al., 2004), биспектральный анализ, основанный на вейвлет-преобразовании (Newman et al., 2021) и др. Спектральные методы второго порядка представляют собой усложнение время-частотных методов (оконного Фурье-преобразования или непрерывного комплексного вейвлет-преобразования) путем сверток по времени комплексных корреляционных коэффициентов, зависящих от частоты (Sigl&Chamoun, 1994). Преимуществами этих методов являются: возможность вычисления сдвига фаз ритмических составляющих временных рядов в широком частотном диапазоне, – следовательно, и оценки фазовой синхронизации. В случае

биспектрального анализа на основе вейвлет-разложения (вейвлет-биспектрального анализа), преимуществами также является возможность анализа как одноканальных, так и многоканальных временных рядов, возможность анализа нестационарных по амплитуде сигналов, возможность вычисления межчастотных фазово-синхронных коэффициентов когерентности.

Основная цель данной работы заключается в том, чтобы преодолеть трудности, связанные с недостатком экспериментальных данных и отсутствием эффективных методов для их анализа. Это открывает путь для использования концепции системной биологии в экспериментальной биофизике при изучении биологических объектов на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях. В диссертационной работе рассматривается ряд усовершенствованных методов регистрации временных рядов физических и химических величин, применение новых критериев для описания этих временных рядов на основе вейвлет-биспектрального анализа, оценка чувствительности этих критериев к провокационным воздействиям. В качестве опорной гармоник сигнала рассматриваются как естественные для биологических объектов стохастические или периодические сигналы, так и навязанные периодические воздействия.

Цель и задачи исследования

Цель: Разработка и совершенствование методов регистрации, анализа временных рядов и подходов для их описания для построения моделей передачи и трансформации сигналов в сложных биологических системах молекулярного, клеточного и органного уровня организации.

Задачи:

1) Разработать аппаратные и программные средства для получения и анализа синхронных, многоканальных временных рядов различных типов (концентрация внутриклеточных сигнальных молекул, импеданс тканей, электрофизиологические потенциалы) в экспериментальном цикле системной биологии для описания сложных биосистем молекулярного, клеточного и органного уровня организации.

2) Разработать математическую модель передачи и трансформации сигнала в сложных биологических системах молекулярного, клеточного и органного уровня организации, регистрации и анализа временного ряда этого сигнала с помощью биспектрального анализа, основанного на вейвлет-преобразовании, для определения критерия описания биофизических сигналов с помощью показателя биспектра.

3) Исследовать синхронизацию и синтез гармоник во временных рядах открывания и закрывания воротного механизма потенциалозависимого калиевого канала в мембранах нейронов большого прудовика и кальций-зависимого калиевого канала почечных клеток Vero, а также сравнить динамику воротного механизма природных каналов с динамикой воротного механизма математической модели калиевого канала.

4) С помощью критерия, основанного на показателе биспектра, изучить изменения в динамике флуоресценции пигментов фотосистемы растений под влиянием периодического внешнего светового воздействия в условиях стресса, вызванного засухой.

5) С помощью внешних физических и химических факторов исследовать в культуре клеток эндотелиоцитов изменение синхронизации внутриклеточных и внеклеточных сигналов, а также появление в них высших гармоник и элементов сетевой организации.

6) Изучить фазовую синхронизацию ритмических компонентов локальных полевых потенциалов структур мозга животных, а также их изменение в результате физической или химической стимуляции.

Научная новизна работы

Впервые в биологических системах разного уровня организации были сопоставлены данные об изменениях в амплитуде гармоник и межканальной синхронизации временных рядов при стрессе. Для этого разработан уникальный комплект приборов, включающий: трехволновой микрофлюорометрический комплекс со светодиодным возбуждением флуоресценции, восьмиканальную систему сбора данных для электроэнцефалографии, дистанционный импульсный флуориметр с непрерывным режимом измерения и импедансометр для исследования тканей растений. Разработан новый метод определения амплитуд вторых гармоник во временных рядах в широком диапазоне частот, позволяющий обнаруживать направление передачи сигнала в сложных сетевых структурах. Впервые установлена связь степени синхронизации механизмов активации и инактивации воротного механизма калиевого канала с трансмембранным потенциалом, выражающаяся в увеличении модуля показателя биспектра при увеличении трансмембранного потенциала – как для модельного, так и для природных ионных каналов. Впервые показано изменение процента синхронизированных клеток и степени синхронизации колебаний внутриклеточных мессенджеров в культуре эндотелиоцитов при изменении температуры. Также показано, что показатель биспектра увеличивается при увеличении температуры, при этом при увеличении температуры от 37 до 40°C наблюдается увеличение доли клеток, с синхронизированными

колебаниями концентрации кальция, а доля клеток, синхронизированных по колебаниям NO уменьшается. С помощью метода определения амплитуд вторых гармоник во временных рядах впервые показано, что при нормальных условиях полива реакция на периодические вспышки света не содержит высших гармоник исходного периодического сигнала, при засухе происходит увеличение показателя биспектра на частоте вспышек света. Впервые показано, что в результате физической или химической стимуляции ритмы центральной нервной системы грызунов усиливаются по амплитуде и фазовой синхронизации, причем рост степени фазовой синхронизации ритмов более выражен и наблюдается во всех исследованных структурах центральной нервной системы, тогда как существенное увеличение амплитуды наблюдается не в каждой изученной структуре.

Научно-практическое значение

В ходе выполнения диссертационного исследования были разработаны методы увеличения информативности биофизических экспериментальных методов исследования, для чего были разработаны приборы и программное обеспечение для автоматизированной регистрации временных рядов следующих физиологических параметров: концентрации внутриклеточных сигнальных молекул, импеданса биологических тканей, электрофизиологических потенциалов, импульсной флуоресценции растительных пигментов. Были разработаны критерии на базе биспектрального анализа, основанного на вейвлет-преобразовании, которые помогают изучать фазовую синхронизацию и генерацию гармоник в нелинейных системах, отвечающих за передачу биологических сигналов. Эти критерии могут применяться к сигналам, содержащим как естественные внутренние, так и к внешние ритмы в качестве базовой гармоники. В случае использования естественных внутренних ритмов обеспечивается неинвазивный анализ сигнала в широкой частотной полосе, а в описании сигнала измеряется частота основного ритма. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, имеют практическое значение как в биологии, так и в сельском хозяйстве. В частности, они могут быть использованы для создания неинвазивных систем, которые способны выявлять признаки стресса у растений.

Методология и методы диссертационного исследования

С целью построения математической модели и выявления структурных связей по динамическим характеристикам путей трансдукции сигналов были проанализированы биосистемы разной степени сложности: одиночные калиевые каналы из нейронов большого прудовика и культуры клеток *Vero*, эндотелиоциты микрососудов мыши, центральная нервная система морских

свинок, растения салата латук. Работа выполнена с использованием широкого спектра современных биофизических, электрофизиологических, флуориметрических методов, а также методов математического моделирования и анализа сигналов в цифровой форме. Экспериментальные методы включали: динамическую микрофлуориметрию с флуоресцентными зондами Fura2-AM и DAF-FM, регистрацию токов через одиночные ионные каналы в режиме локальной фиксации потенциалов в конфигурации "inside-out", импульсную флуориметрию и регистрацию локальных потенциалов имплантируемых электродов. Для анализа экспериментальных данных были использованы: непрерывное комплексное вейвлет-преобразование с материнскими вейвлетами Морле и лог-нормальным вейвлетом, расчет статистических моментов 3-го и 4-го порядков, основанный на вейвлет-преобразовании, биспектральный анализ, фазовый вейвлет-когерентный анализ.

Все эксперименты с лабораторными животными проводились в соответствии с нормативно-правовым актом Министерства здравоохранения РФ №199-н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики, международно-правовыми нормами указанных в Европейской конвенции ETS №123 «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» и руководством по работе с лабораторными животными ИБК РАН №57.30.12.2011. Все эксперименты проведены в соответствии с протоколами, одобренными комитетом по этике Института биофизики клетки РАН (№.12306, 2006). Животные были адаптированы к конвенциональным условиям и получали питье и корм *accessio libero*.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработана методика количественной оценки амплитуды вторых гармоник и глубины взаимосвязи между каналами многоканального цифрового сигнала, что дает возможность исследовать направление передачи сигналов в биологической системе.
2. Одиночный ионный канал является минимальной структурной единицей клетки, формирующей нелинейные колебания.
3. Присутствие второй гармоники в динамике флуоресцентного ответа фотосистемы II при внешнем периодическом воздействии света может быть маркером развития стресса у растений.
4. Температура влияет на степень синхронизации культуры эндотелиоцитов и амплитуду колебаний цитозольной концентрации внутриклеточных мессенджеров.

5. Раздражение центральной нервной системы с помощью периодических световых импульсов и кратковременного протокола инъекций L-глутамата приводит к увеличению амплитуды ритмов локальных полевых потенциалов в структурах, ответственных за когнитивные функции, и к усилению фазовой синхронизации между ритмами во всех исследованных структурах мозга.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и статистическим анализом с контролем вероятности ошибки не хуже $p < 0.05$, а также надежностью применяемых методов и широкой апробацией. Дизайн эксперимента включал многократные независимые биологические повторы и соответствующие контрольные испытания. Результаты исследования были представлены на конференциях "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация" 2013, 2017, 2019, 2023, 2025 г.г., конференции Гиппокамп и память: норма и патология 2018, VI, VII Съездах биофизиков России (2019, 2023), третьей всероссийской конференции "Физика водных растворов" 2020, International Conference Volga Neuroscience Meeting 2021, Всероссийском симпозиуме "Физико-химические характеристики и дизайн биомакромолекул" 2023, VII Всероссийской Конференции Физика Водных Растворов (2024), X Международной конференции Лазерные, плазменные исследования и технологии ЛаПлаз-2024 (2024), 75-й, 77-й и 78-й Международной школе-конференции "Биосистемы: организация, поведение, управление" (2022, 2024, 2025), The 31st International Conference on Advanced Laser Technologies (2024).

Публикации

Основные положения диссертации опубликованы в 19 печатных работах, индексируемых в библиографической системе Scopus.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 412 стр. и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы, включающего 532 источников. Работа содержит 92 рисунка, 17 таблиц и 73 формулы.

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в разработке уникального научного оборудования и программного обеспечения для анализа данных, разработке, в проведении экспериментальных и теоретических исследований, в анализе и

обобщении результатов, поиске и анализе литературных данных, подготовке статей к публикации в научных изданиях, представлении материалов исследований на профильных научных конференциях. Все экспериментальные и теоретические результаты, представленные на защиту, получены лично диссертантом или при его непосредственном участии. Материалы, вошедшие в работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами. Эксперименты по регистрации флуоресценции внутриклеточных зондов в эндотелиоцитах выполнялись совместно с Серовым Д.А. (ИОФ РАН). Адаптация фрактальной модели калиевого канала, получение синтезированных временных рядов модели ионного канала выполнялись совместно с Гриневичем А.А. (ИБК РАН). Эксперименты по регистрации электро-энцефалограмм у морских свинок выполнялись на базе ИТЭБ РАН совместно с Асташевой Е.В. и Кичигиной В.Ф..

Основное содержание работы

Материалы и методы

В случаях регистрации аналоговых сигналов (метод локальной фиксации потенциала – пэтч-метод, регистрация локальных полевых потенциалов – ЭЭГ, регистрация физиологических параметров у мышей) использовалась разработанная автором система многоканальной синхронной регистрации на базе платы аналогово-цифрового преобразования L791 (L-Card, Россия) и модифицированной автором программы WinEDR(John Dempster, University of Strathclyde, UK). Регистрация одиночных калиевых каналов пэтч-методом производилась по стандартной методике, описанной в работе (Гелетюк, Казаченко, 1983). Использовали усилитель с преобразователем ток-напряжение на микросхеме OPA129 (BurrBroun, США), блок аналоговой фильтрации и усиления (ИБП РАН, Россия). Регистрация микроизображений клеток с синхронным анализом динамики изменения флуоресценции двух зондов Fura2-AM и DAF-FM проводилась с помощью разработанной автором автоматизированной установки для микрофлуоресцентного анализа на основе модифицированного для работы в УФ части спектра микроскопа Motic AE31T (Рис. 1А) с флуоресцентным осветителем (Рис. 1Б) на основе светодиодов 340 нм, 380 нм, 460 нм (Серов, Асташев et al. 2019), а также модифицированной автором программы (Рис. 1Е) WinFluor (John Dempster, University of Strathclyde, UK). Измерение электрических характеристик образцов растений с помощью электроимпедансной спектроскопии производили с помощью портативного измерителя импеданса, разработанного автором на базе модуля (Рис. 1В) измерения AD5933 (Astashevet al. 2022). Приготовление селеновых наночастиц производили методом лазерной абляции (Gudkov et al. 2020).

Импульсная флуориметрия (Рис. 1Д) и методы анализа динамики флуоресценции пигментов фотосистемы растений описаны в работе (Astashev et al. 2024). Регистрацию полевых потенциалов головного мозга (Рис. 1Ж), определение позиций электродов производили, как описано в работах (Astasheva et al. 2015; Astasheva et al. 2016, Astasheva et al. 2018).

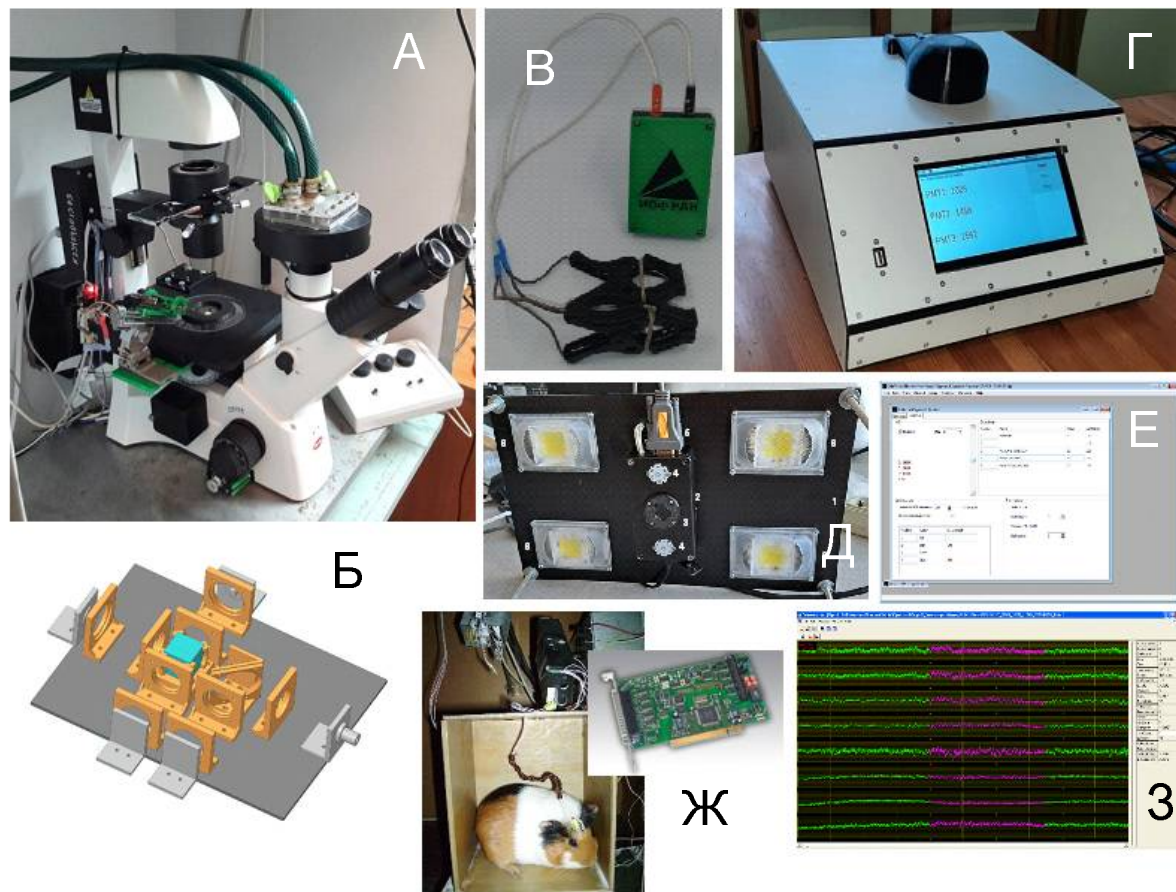


Рисунок 1. – Используемые в работе авторские аппаратные и программные средства изучения ритмических процессов в объектах разного уровня организации. А - микрофлуориметрическая система для регистрации динамики внутриклеточных мессенджеров со светодиодным возбуждением флуоресценции. Б - оптическая схема светодиодного осветителя на 4 длины волны, используемая в микрофлуориметрической системе. В - электроимпедансометр для исследования сосудистой системы растений. Г - трехканальный хемилюминометр. Д - импульсная флуориметрическая система для исследования состояния фотосинтетического аппарата растений. Е - интерфейс модифицированной автором программы WinFluor. Ж - вид установки для регистрации ЭЭГ. З - программное обеспечение для анализа многоканальных записей с помощью вейвлет-преобразования, вейвлет-когерентности, биспектрального анализа. Рисунок автора.

Вейвлет-анализ, расчет показателей вейвлет-когерентности производился с помощью программного обеспечения (Рис. 13), разработанного автором. (Рис. 1Ж), определение позиций электродов производили, как описано в работах (Astasheva et al. 2015; Astasheva et al. 2016, Astasheva et al. 2018).

Вейвлет-анализ, расчет показателей вейвлет-когерентности производился с помощью программного обеспечения (Рис. 13), разработанного автором.

Применение биспектрального анализа для исследования нелинейных процессов передачи сигнала. Поиск приемника и передатчика

Задача описания динамики различных процессов в биологических системах разного уровня организации, путем выделения в них ритмических компонентов с характерными центральными частотами, хорошо решена с помощью разложения сигналов в спектр по частотам с помощью преобразования Фурье (Sannita et al. 1995); Казаченко и др., 2001) или вейвлет-преобразования (Tankanag and Chemeris 2008). Основная идея, лежащая в основе такого подхода, заключается в предположении, что каждый отдельный ритм, присутствующий в сигнале, характеризует свою собственную физиологическую функцию и свой собственный источник в биологической системе.

Методы исследования когерентности основаны на вычислении сдвига фазы между сигналами. Для получения высокой когерентности необходимо сохранение постоянного сдвига фазы в двух исследуемых сигналах на определенной частоте. Применение комплексного вейвлет-разложения в качестве основы для дальнейшего анализа корреляции и когерентности ритмических процессов в сигналах обладает тем преимуществом, что точность определения фазы комплексного вейвлет-коэффициента не зависит от частоты, на которой сигнал анализируется и зависит только от величины, обратной модулю вейвлет-коэффициента (при нулевом модуле фаза определяется абсолютно неточно). Поэтому для анализа коэффициента когерентности важно сопоставлять его с картами модулей вейвлет-коэффициентов, так как это представлено на Рис. 4.

Применение корреляционного и когерентного анализа, основанного на вейвлет-преобразовании (Танканаг et al. 2020) позволяет выявить взаимосвязь колебательных процессов в различных частях биологического объекта путем регистрации отдельных сигналов из каждой области интереса в объекте. Но вопрос о выявлении источника колебаний остается открытым.

Биспектральный анализ, основанный на вейвлет-преобразовании, является разновидностью комплексного корреляционного анализа частотно-временных компонентов разложения сигналов с помощью вейвлет-преобразования. Зависящий от двух частот показатель биспектра определяется трехкомпонентной комплексной корреляционной сверткой по времени как:

$$\rho_{123}(\omega_1, \omega_2) = \int_{-\infty}^{\infty} \Phi_1(t, \omega_1) \Phi_2(t, \omega_2) \overline{\Phi_3(t, \omega_1 + \omega_2)} dt .$$

На Рис. 5 можно увидеть пример зависимости модуля показателя биспектра от частоты в виде двумерной карты. Анализ простой системы генерации, нелинейной передачи и регистрации сигналов, изображенной на Рис. 2, показывает, что в первом и во втором канале регистрации будут присутствовать компоненты с частотами, представленными в Таблице 1. Биспектральный анализ предоставляет широкие возможности для комбинации анализируемых сигналов: показатель биспектра ρ_{111} позволяет определить частоты, на которых основная гармоника сигнала дополняется ее второй гармоникой, показатель биспектра ρ_{121} позволяет определить частоты, на которых основные гармоники колебаний в первом и во втором канале дополняются их комбинацией в первом канале, и так далее. В диссертации аналитически доказано, что соотношение амплитуд пиков на карте биспектра позволяет оценить коэффициент передачи сигнала в системе как качественно, так и количественно. Также можно определить амплитуду высших гармоник исходных ритмов, которые возникают из-за нелинейной функции передачи сигнала. Анализ пиковых значений нормированных кросс-биспектров позволяет оценить степень нелинейности в исследуемой системе по наличию соответствующих высших гармоник в сигнале. Предполагая, что амплитуда высших гармоник будет возрастать по мере удаления места регистрации сигнала от места генерации ритма, можно проанализировать структуру аналоговой обработки и передачи сигнала в этой системе.

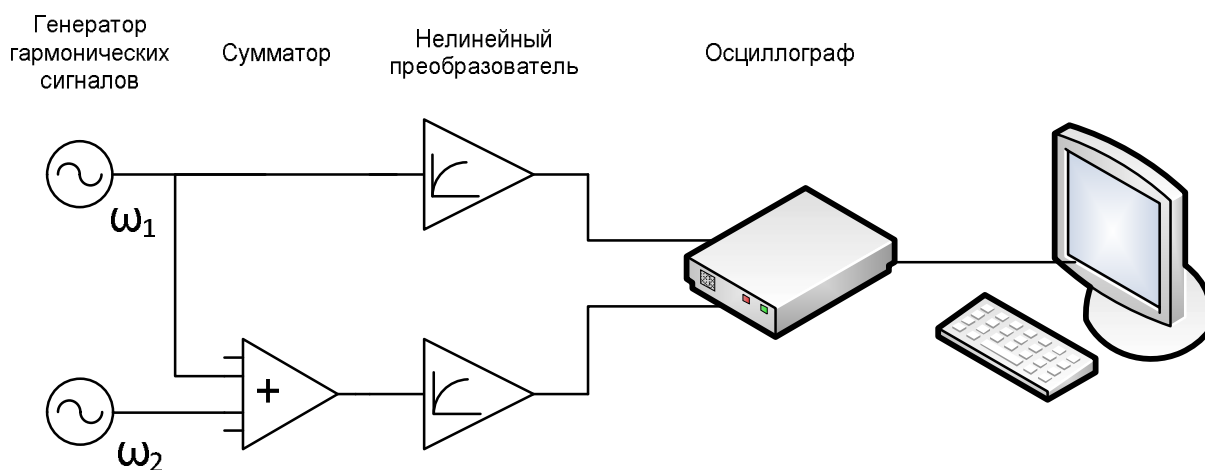


Рисунок 2. – Схема генерации, передачи и регистрации сигналов. Из [7] списка работ по теме диссертации.

Таблица 1. Вейвлет-коэффициенты частотных компонентов для схемы, представленной на рисунке 2. Из [7] списка работ по теме диссертации.

Frequency	$\Phi_1(t, \omega)$	$\Phi_2(t, \omega)$
ω_1	$A_1 \exp(j\omega_1 t)$	$k A_1 \exp(j\omega_1 t)$
$2\omega_1$	$A_1^2 B_1 \exp(j(2\omega_1 t + \pi/2))/2$	$k^2 A_1^2 B_2 \exp(j(2\omega_1 t + \pi/2))/2$
ω_2	0	$A_2 \exp(j\omega_2 t)$
$2\omega_2$	0	$A_2^2 B_2 \exp(j(2\omega_2 t + \pi/2))/2$
$\omega_1 + \omega_2$	0	$k A_1 A_2 B_2 \exp(j((\omega_1 + \omega_2)t - \pi/2))$

Синхронизация колебаний на уровне молекул: воротный механизм ионных каналов

Динамика воротного процесса ионного канала представляет собой идеальный модельный природный объект с возможностью регистрации конформационных переходов одиночного белка-машины между фиксированными состояниями в диапазоне времен наблюдения от 0,001 до 1000 секунд. Четкая визуализация фиксированных конформационных состояний в виде полностью закрытого (синий цвет на Рис. 3) и полностью открытого (красный цвет) состояния позволяет определить каждое индивидуальное событие перехода канала, что дает широкие возможности для исследования динамики отдельной белковой структуры. В качестве временного ряда при анализе динамики воротного механизма ионного канала используется набор времен жизни канала в открытом и закрытом состоянии, т.е. функции частотной модуляции активационного и инактивационного процессов воротного механизма.

Ранее были предприняты обширные исследования "долговременной памяти" в работе ионных каналов. Результатом этих работ стало установление факта персистентности в последовательностях времен жизни в открытом и закрытом состоянии воротного механизма двух типов природных калиевых каналов (Brazhe et al. 2004, Kazachenko et al. 2004) и искусственного аламетицинового канала (Astashev et al. 2007). Также была разработана модель фрактальной кинетики калиевого канала (Grinevich et al. 2007). Вопросы, на которые не было получено ответа в ходе ранних работ, но которые возможно рассмотреть с помощью аппарата когерентного (Bandrivsky et al. 2004) и биспектрального (Newman et al. 2021) анализа: 1) связаны ли друг с другом процессы перехода природного канала из открытого в закрытое состояние и обратно (структурно, такая связь возможна); 2) существуют ли в активности канала медленные (десятки и сотни секунд) периодические или резонансные процессы, которые могли бы проявляться в модуляции клеточных процессов или быть их источником?

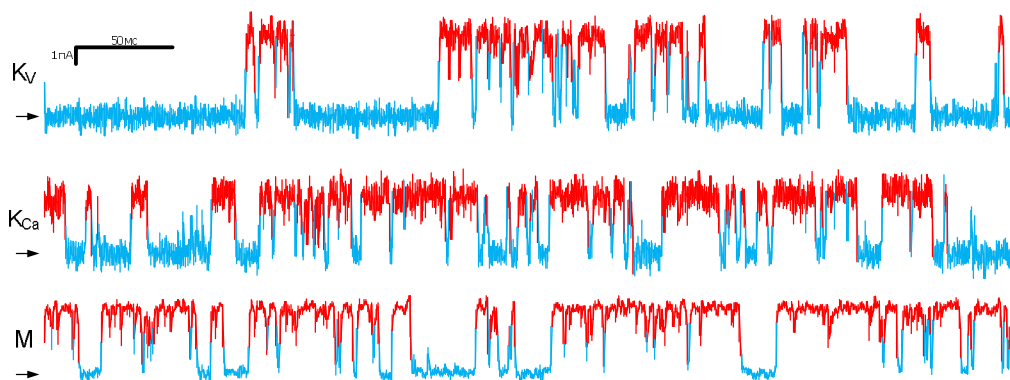


Рисунок 3. – Исходные записи токов потенциалозависимого (K_V), кальций-зависимого (K_{Ca}) и модельного (M) каналов. Цветом обозначены открытые (красным) и закрытые (синим) состояния канала. Потенциал 20мВ. Из [1] списка работ по теме диссертации.

Результат вейвлет-разложения логарифмированных времен жизни потенциалозависимого калиевого канала изображен на Рис. 4. Красный цвет на картах модулей вейвлет-коэффициентов (Рис. 4 А и Б) соответствует наличию устойчивых колебаний. Действительно, в каналах, где около 1000 периодов открывания-закрывания (что соответствует периоду колебаний около 11 секунд) наблюдаются полосы красного цвета, соответствующие

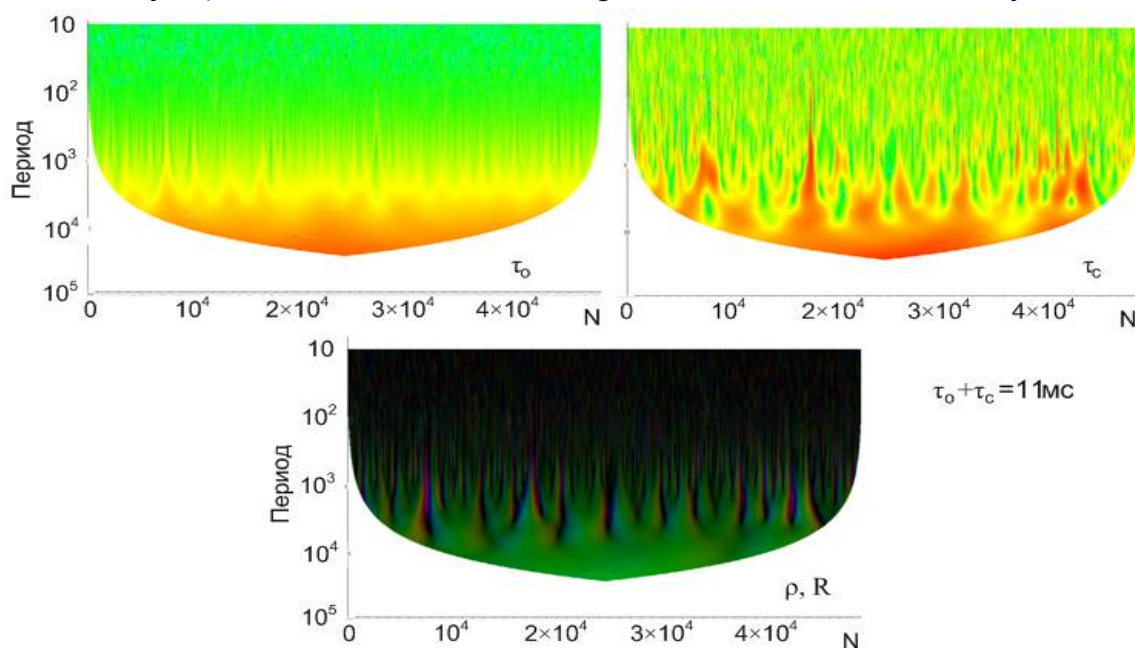


Рисунок 4. – Когерентность в активности потенциалозависимого калиевого канала из нейрона прудовика *Lymnaea st.* А - коэффициенты вейвлет-разложения последовательности открытых времен жизни, Б - коэффициенты вейвлет-разложения последовательности закрытых времен жизни, В - сдвиг фазы вейвлет - коэффициентов открытых времен относительно закрытых времен. По оси абсцисс номер события, по оси ординат период колебаний в единицах штук событий. Яркость цвета на графике В – это корреляция модулей вейвлет-коэффициентов. Среднее время цикла открывания-закрывания канала 11 мс. Из [1] списка работ по теме диссертации.

устойчивым колебаниям. При этом на графике сдвига фазы (см. Рис. 4 В) видно также полосу одинакового цвета, что соответствует постоянному сдвигу. Это говорит о наличии в этом канале когерентности у последовательностей открытых и закрытых времен жизни для периода 11 секунд. Чтобы выявить степень согласованности модуляции активационного и инактивационного процессов воротного механизма ионного канала от характерного времени процесса, был проведен биспектральный анализ последовательностей времен жизни калиевых каналов (Рис. 5), базирующийся на непрерывном комплексном вейвлет-преобразовании с использованием лог-нормального вейвлета (Newman et al. 2021). При анализе графиков показателей биспектра для потенциалозависимого, кальций-зависимого и модельного K^+ -канала видны множественные максимумы в широком диапазоне частот (Рис. 6) – как для отдельного сравнения последовательностей открытых и закрытых времен жизни, так и для анализа взаимодействия последовательностей открытых и закрытых времен. Кроме того, обращает на себя внимание сходство графиков показателей биспектров для природных и модельного каналов: широкий диапазон частот, в которых показатель биспектра имеет ненулевые значения, примерно одинаковые значения максимумов.

При анализе зависимости пиковых значений показателя биспектра для последовательностей модельного канала видно, что существует тенденция к увеличению пикового значения для взаимодействия последовательностей открытых и закрытых времен (Рис. 7) при увеличении трансмембранного потенциала от 0 мВ до 30 мВ. Аналогичный анализ, проведенный для

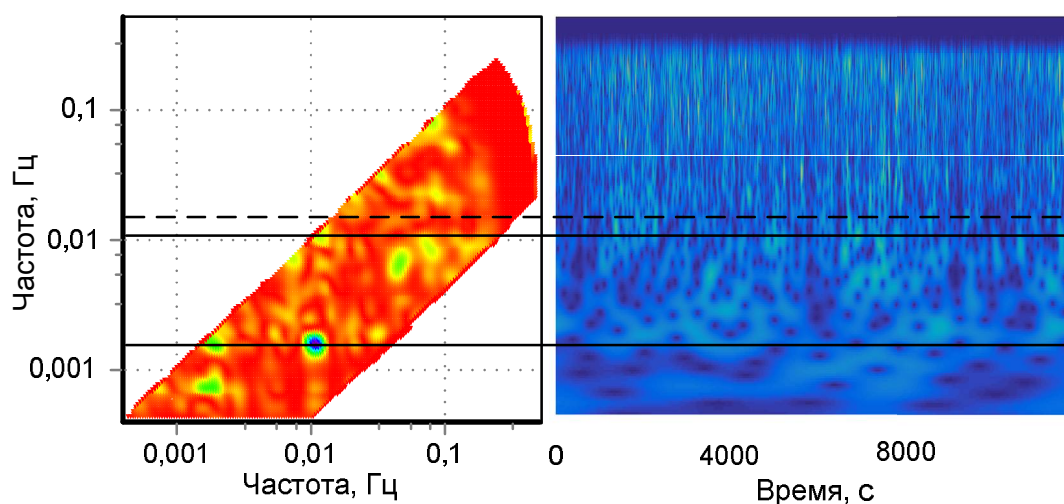


Рисунок 5. – Биспектр и исходная карта вейвлет-коэффициентов времен жизни K_v -канала в открытом состоянии. Сплошными линиями показаны основные частоты, а штриховой - обертона, их фазовая и амплитудная синхронизация необходима для появления точечного максимума на биспектре для частот 0,011 Гц и 0,0012 Гц. То есть дополнительно к указанным частотам на частоте 0,0122 Гц также должен быть обертона, синхронизированный по фазе с первыми двумя. Из [1] списка работ по теме диссертации.

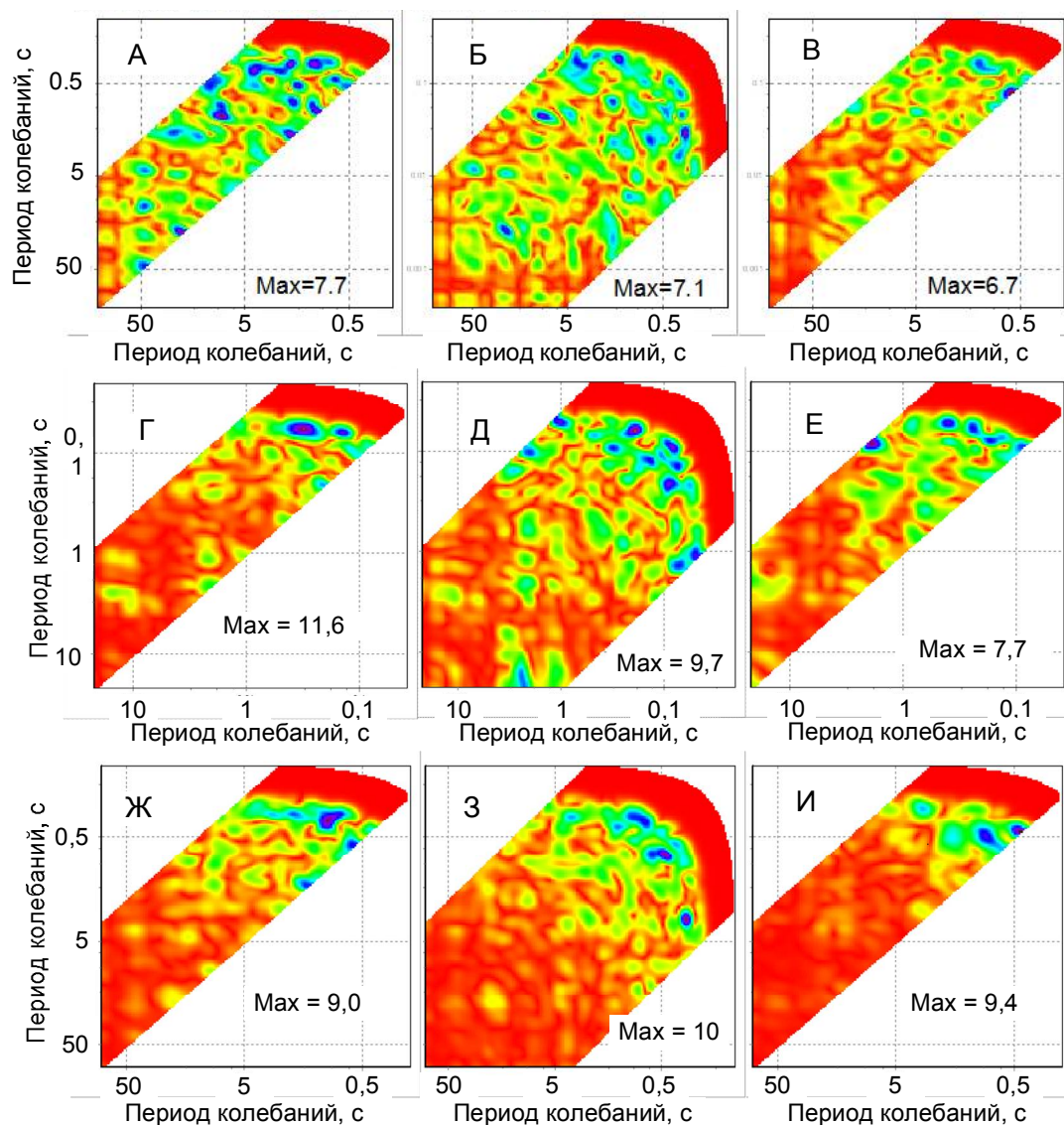


Рисунок 6. – Графики биспектров для последовательности времен жизни K_v -канала из *Lytnaea st.* (А, Б, В), кальций-зависимого K_{Ca} -канала (Г, Д, Е) и модельного канала (Ж, З, И). Трансмембранный потенциал 10 мВ. А, Г, Ж - анализ последовательности открытых времен жизни, В, Е и И - анализ последовательности закрытых времен жизни, Б, Д и З - анализ взаимодействия последовательностей открытых и закрытых времен жизни. Масштаб цветовой кодировки указан на графиках в виде максимальных значений, соответствующих синему цвету, красный соответствует нулю. Из [1] списка работ по теме диссертации.

природных ионных каналов, также демонстрирует, что пиковое значение показателя биспектра, которое отражает взаимосвязь между последовательностями открытых и закрытых времен жизни, достоверно увеличивается при увеличении трансмембранного потенциала (Рис. 8).

Увеличение показателя биспектра при возрастании трансмембранного потенциала свидетельствует об усилении взаимосвязи между процессами открывания и закрывания воротного механизма. Это происходит из-за роста внутренних напряжений в структуре канала, которые возникают под

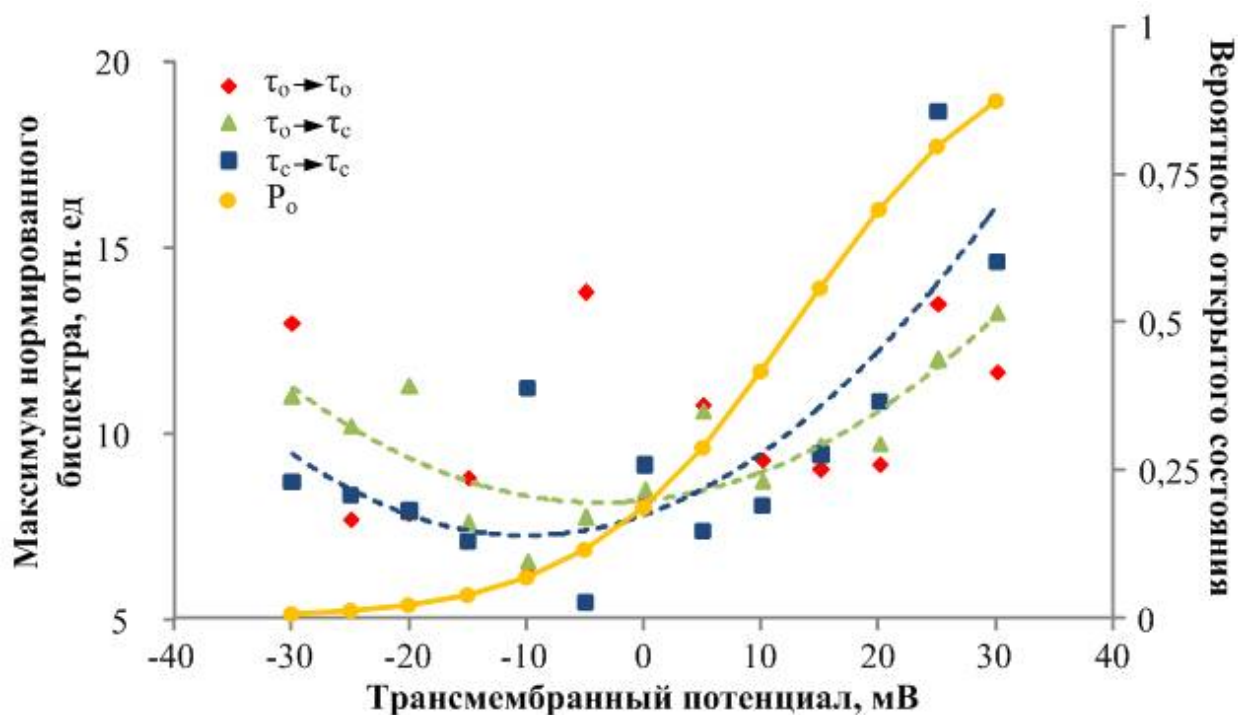


Рисунок 7. – Зависимость максимального показателя биспектра от V_m у модельных ионных каналов. Адаптировано из [1] списка работ по теме диссертации.

воздействием трансмембранного потенциала на сенсор напряжения, представляющий собой сегмент S4 ионного канала. Второй возможный механизм увеличения показателей биспектра при увеличении потенциала – это увеличение нелинейной механики ионного канала за счет увеличения локальной температуры белковой глобулы из-за протекания ионного тока через селективный фильтр.

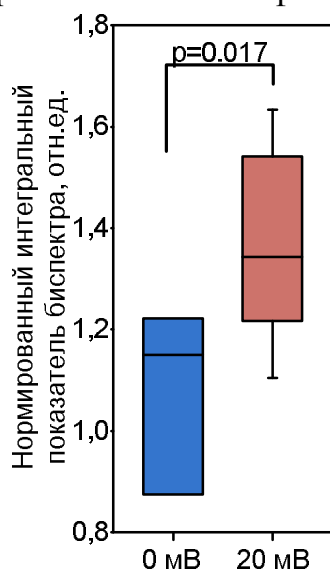


Рисунок 8. – Зависимость показателя биспектра при анализе взаимодействия последовательностей открытых и закрытых времен жизни от трансмембранного потенциала у природных ионных каналов, нормированного на показатели перемешанных рядов показателей для K_v - каналов для трансмембранных потенциалов 0 мВ ($n=3$) и 20 мВ ($n=6$). Из [1] списка работ по теме диссертации.

Процессы активации и инактивации в воротном механизме ионного канала синхронизованы в широком диапазоне характерных времен от десятков до десятых долей секунды, что подтверждает ранее установленную

персистентность работы ионного канала. Модель калиевого канала, которая учитывает гидродинамическое взаимодействие молекул воды с каналом, демонстрирует распределение показателей биспектра, аналогичное наблюдаемому в природных каналах. При увеличении трансмембранного потенциала синхронизация процессов открывания и закрывания ионного канала увеличивается как для модельного, так и для природных ионных каналов.

Исследование передачи сигналов в популяциях невозбудимых клеток

Ранее были обнаружены колебания концентрации внутриклеточных сигнальных молекул (кальций и NO) в культивируемых эндотелиоцитах микрососудов мыши, совпадающие по частоте с эндотелиальным ритмом скорости кровотока в микрососудистом русле (Astashchev et al. 2019). Тем не менее, синхронизация этих колебаний как внутри клетки, так и между клетками оставалась недостаточно исследованной. Колебания были описаны феноменологически: эффекты внешних провокационных воздействий оценивали по изменению амплитуды и частоты пика (Serov et al. 2022) в амплитудно-частотной характеристике (АЧХ) колебаний внутриклеточной концентрации кальция и NO в области NO-независимого эндотелиального ритма микрососудов (Рис. 9). Данные работы позволили сформулировать и подтвердить утверждение, что первоисточником эндотелиального ритма в микрососудах являются сами эндотелиальные клетки. В диссертационной работе показан один из возможных механизмов реализации генератора ритма с периодом около 100-150 секунд – синхронизации колебаний двух и более клеток в поле зрения с сигнальной связью в виде *диффузии* какого-либо внеклеточного агента от клетки к клетке. Для решения этой задачи автором разработано программное обеспечение для анализа однократных кратковременных сигналов (по статистическим моментам высоких порядков), и периодических процессов. Также была разработана система регистрации флуоресценции в виде временных рядов от большой популяции клеток (>400 в одном поле зрения) при одновременной окраске зондами Fura2-AM и DAF-FM, со светодиодным возбуждением флуоресценции. Данная система регистрации была протестирована на отсутствие артефактов в АЧХ регистрируемых рядов данных.

Выявление клеток с повышенной сигнальной активностью происходило по высоким показателям ($>0,6$) асимметрии в динамическом ряду внутриклеточной концентрации кальция. Далее для таких клеток строили корреляционные матрицы по когерентности и показателям

биспектра. Поскольку статистические моменты высоких порядков (асимметрия и коэффициент эксцесса) динамики внутриклеточных мессенджеров являются важными маркерами активности неэлектровозбудимых клеток, были проведены исследования изменения этих параметров при действии внешних стимулов-лигандов на нейтрофилы, являющиеся клетками с более широким спектром доступных внешних стимулов.

Получены достоверные данные (Рис. 10) об изменении количества активных клеток в популяции при действии таких стимулов, как иммуноглобулин G (0,5 мг/мл), наночастицы селена (1010 мл-1), АТФ (10мкМ), никотин (1

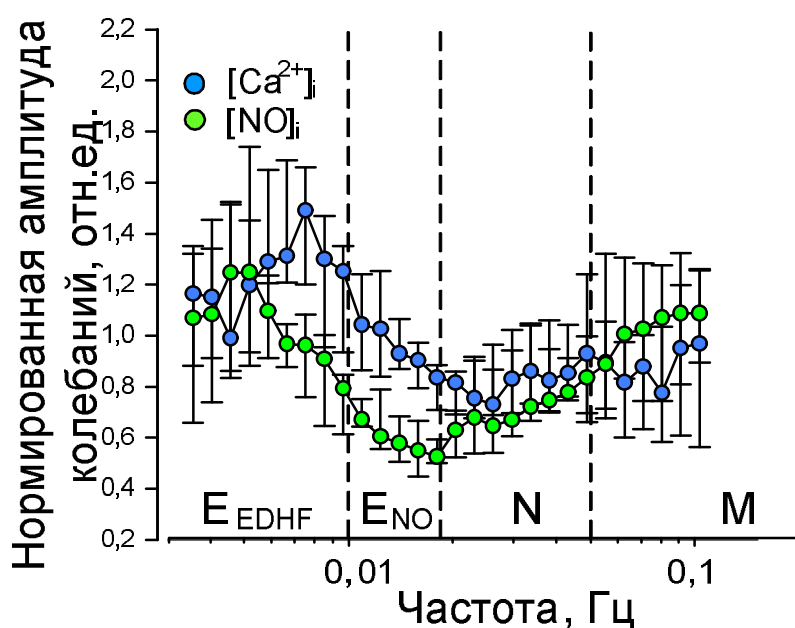


Рисунок 9. – Усредненные нормированные аналого-частотные характеристики колебаний динамики внутриклеточного кальция и NO в культивируемых эндотелиоцитах микрососудов мыши. адаптировано из [17] списка работ по теме диссертации.

мкМ), и для таких типов клеток как эндотелиоциты и нейтрофилы. Таким образом ценность данного метода автоматической сортировки клеток по степени кальций-мобилизующей активности можно считать доказанной.

В результате сортировки эндотелиоцитов, – в начале по высокой асимметрии, затем по высоким показателям в матрице когерентности на частотах в диапазоне эндотелиального ритма, – в популяции выявлены синхронизованные между собой клетки, и определено среднее расстояние между ними. Характерное расстояние между синхронизованными клетками составило около 400 мкм, при почти полном отсутствии синхронизации при меньших расстояниях, что позволяет охарактеризовать молекулу, скорость диффузии которой обеспечит необходимую задержку для генерации с периодом 100-150 секунд. Время распространения сигнала на этом

расстоянии равно половине от периода, т.е. 50-70 секунд. Коэффициент, оцененный по формуле скорости диффузии составляет $0,8 \times 10^{-9}$ м²/с,

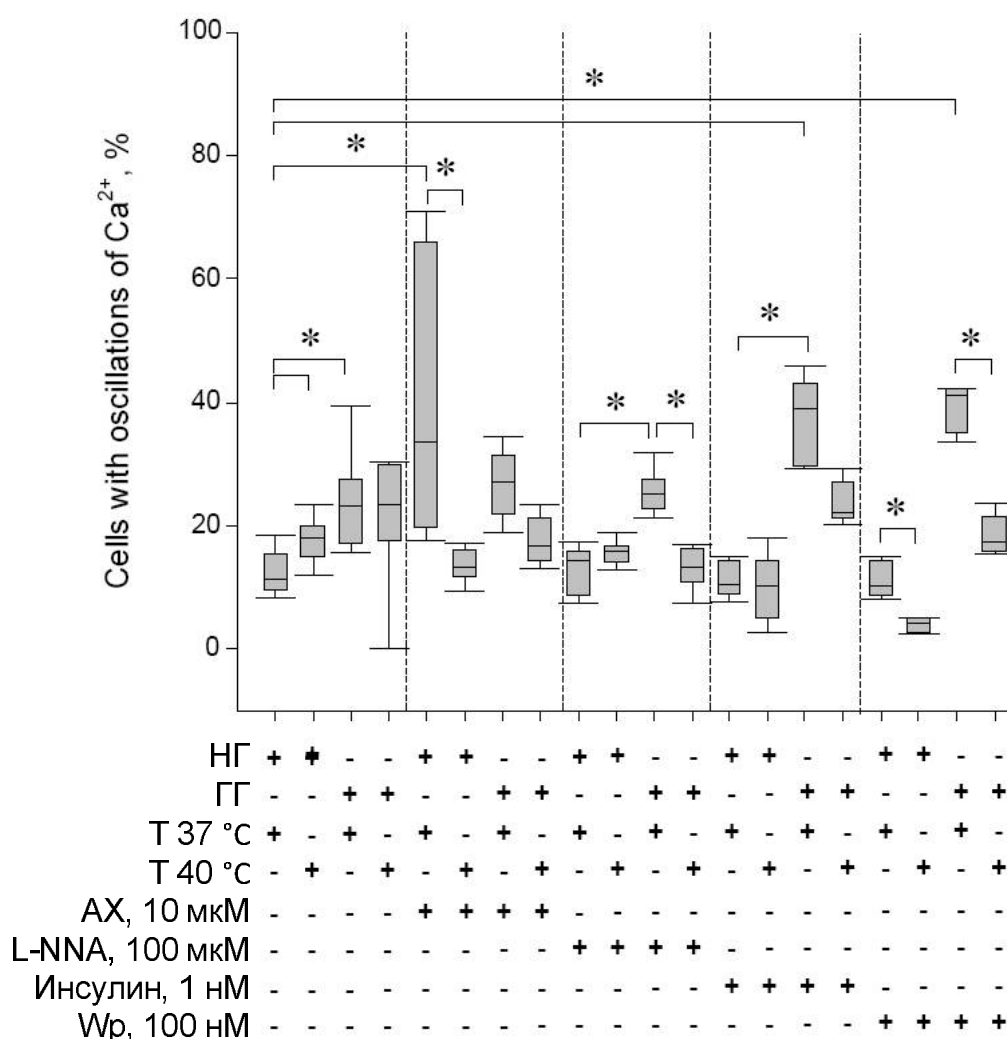


Рисунок 10. – Влияние химических стимулов на количество клеток с осцилляциями концентрации цитоплазматического кальция в эндотелиальных клетках микрососудов кожи мышей при различном воздействии. * - $p < 0,05$ ($n = 8$). Однофакторный дисперсионный анализ Крускала-Уоллиса с последующим множественным сравнением с использованием критерия Даннетта. Из [17] списка работ по теме диссертации.

что по порядку величины совпадает с коэффициентом диффузии оксида азота, который мы считаем наиболее вероятным кандидатом на роль межклеточного посредника в данном случае. Поэтому мы провели анализ синхронных временных рядов, в которых одновременно регистрировались концентрации внутриклеточного кальция и оксида азота. Чтобы определить направление передачи сигнала, мы изучили карты показателя биспектра, которые учитывают нелинейные искажения, возникающие при передаче

(Рис. 11). При этом карты строились как для пар клеток по рядам $[Ca^{2+}]_i$, $[NO]_i$, так и перекрестно, когда для одной клетки брали ряд $[Ca^{2+}]_i$, а для другой ряд $[NO]_i$. Анализ карт биспектров выполнялся путем поиска пиковой величины показателей биспектра внутри области интереса, ограниченной частотами эндотелиального ритма ($0,002 \div 0,01$ Гц). Это позволило проводить статистический анализ по популяциям, вычисляя средний по клеточной популяции нормированный (на среднюю по всей карте биспектра величину) показатель биспектра, а с помощью применения пороговой процедуры (порог $\rho > 0,5$) – долю синхронизованных пар. Рис. 12 демонстрирует результат такого анализа.

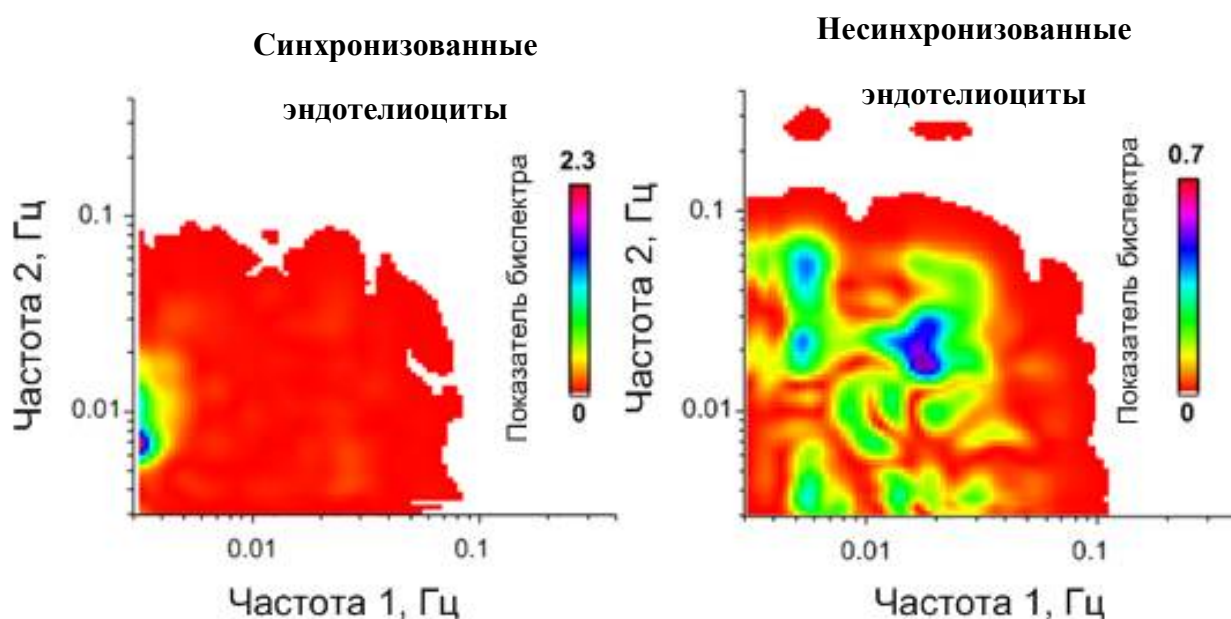


Рисунок 10. - Характерные карты показателей биспектра, построенных по временным рядам $[Ca^{2+}]_i$ двух синхронизованных (слева) и несинхронизованных (справа) культивированных эндотелиоцитов мыши при нормальных условиях. Из [7] списка работ по теме диссертации.

Показано, что при повышении температуры от 37 до 40 °C увеличивается и нормированный показатель биспектра, и доля синхронизованных по кальцию пар клеток в популяции, что указывает на рост синхронизации кальциевых сигналов между клетками за счет образования в популяции новых пар синхронизованных клеток. В то же время, для динамики $[NO]_i$, происходит полное подавление синхронных колебаний при увеличении температуры, что, скорее всего, указывает на выход в насыщение системы модуляции $[NO]_i$ колебаний. Анализ положения пиков карт биспектров (Рис. 13) по частотам позволяет оценить среднюю

частоту синхронной ритмической активности. Средняя частота ритмической активности $[Ca^{2+}]_i$ при 37 °C составляет 2,0 мГц, а при 40 °C увеличивается

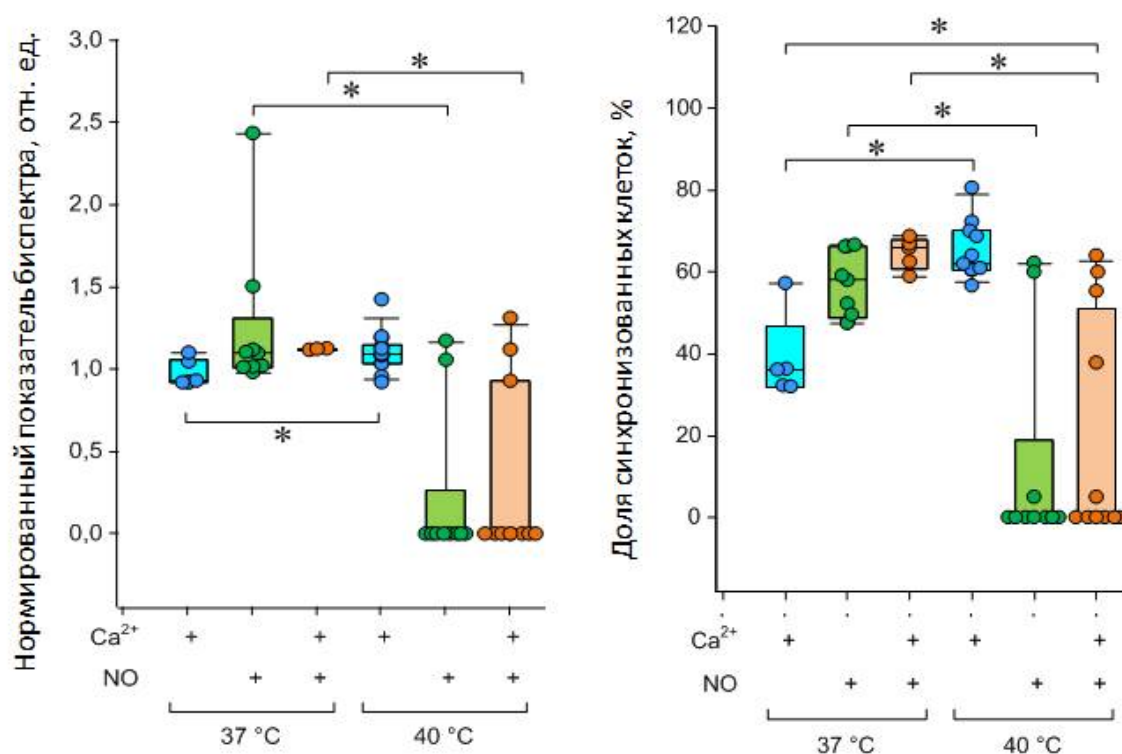


Рисунок 11. – Сравнение средних показателей биспектра с графиком доли синхронизованных клеток при усреднении по всей анализируемой популяции клеток. График отражает основной механизм уменьшения среднего показателя биспектра для NO: полное выключение части клеток из синхронной генерации. * - $p < 0.05$ ANOVA Крускала-Уоллиса, $N \geq 5$ Из [7] списка работ по теме диссертации.

до 2,6 мГц. Средняя частота ритмической активности $[NO]_i$ при 37 °C составляет 2,2 мГц, а при 40 °C увеличивается до 2,7 мГц. Эти частоты соответствуют NO-независимому диапазону эндотелиального ритма микроциркуляторного русла. Также Рис. 13 демонстрирует увеличение амплитуды пиков биспектров при увеличении температуры при отсутствии процедуры нормировки карты биспектра на среднее по всей карте значение. Это может указывать либо на увеличение нелинейных характеристик по всему исследованному частотному диапазону, либо на увеличение мощности ритмической активности в самих сигналах $[Ca^{2+}]_i$ и $[NO]_i$.

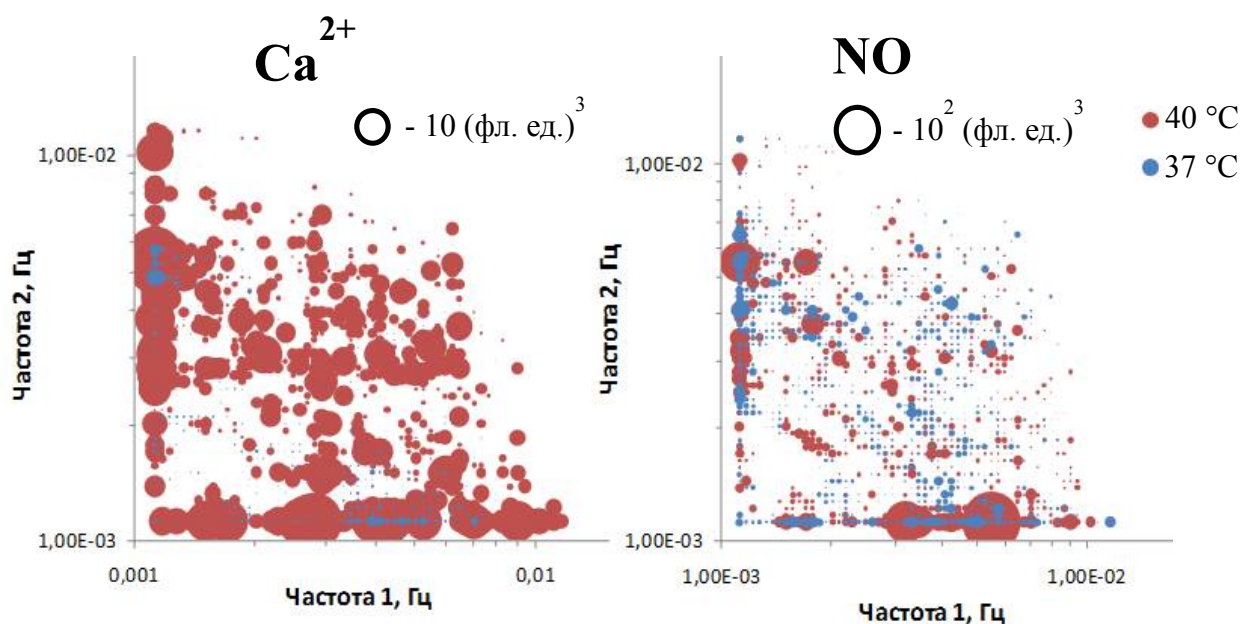


Рисунок 12. – Анализ положения пиков на картах биспектров для динамики $[Ca^{2+}]_i$ и $[NO]_i$ при изменении температуры. Биспектры в данном случае не подвергались нормировке по среднему для всей карты значению. Черные кружки обозначают масштаб амплитуд пиков. Из [7] списка работ по теме диссертации.

Исследование влияния засухи на изменение динамики флуоресценции хлорофилла у растений

Безусловно, самым главным периодическим явлением, определяющим физиологические процессы растения, является период вращения Земли, задающий строгий 24 часовой ритм. В рамках своей диссертации автор сосредоточился на исследовании и описании ритмических процессов с периодом менее 24 часов, т.к. необходимый период измерений при этом сокращается и появляется возможность зарегистрировать временные ряды в относительно стабильных условиях. Эти ритмические процессы доступны для неинвазивного изучения и связаны с изменениями в условиях содержания растений, которые могут привести к стрессу или патологиям. Такие явления весьма интересны для сельского хозяйства, т.к. существует дефицит методов непрерывного динамического контроля за состоянием растения в полевых условиях и в закрытом грунте.

Среди неинвазивных непрерывных методов регистрации состояния растения есть два относительно доступных: это электро-импедансная спектрометрия и импульсная флуориметрия фотосинтетических пигментов. Первый метод позволяет охарактеризовать электрическую проводимость стеблей и ветвей растения, и тем самым, определить степень повреждения системы питания растения. Второй метод позволяет определить состояние фотосинтетического аппарата растения. Он помогает выявить минимальный

и максимальный уровень флуоресценции хлорофилла, который наблюдается у полностью адаптированного к темноте растения и после вспышки света, насыщающей электрон-транспортную цепь. Также этот метод позволяет изучить динамику темновой адаптации растения и другие важные параметры. Автором были разработаны приборы для исследования обоими методами. Дополнительные технические требования, которые были сформулированы для измерений (главным образом, регистрация временных рядов без ограничения максимального времени записи, отсутствие артефактов в амплитудно-частотной характеристике), не позволили использовать коммерческое оборудование для проведения измерений.

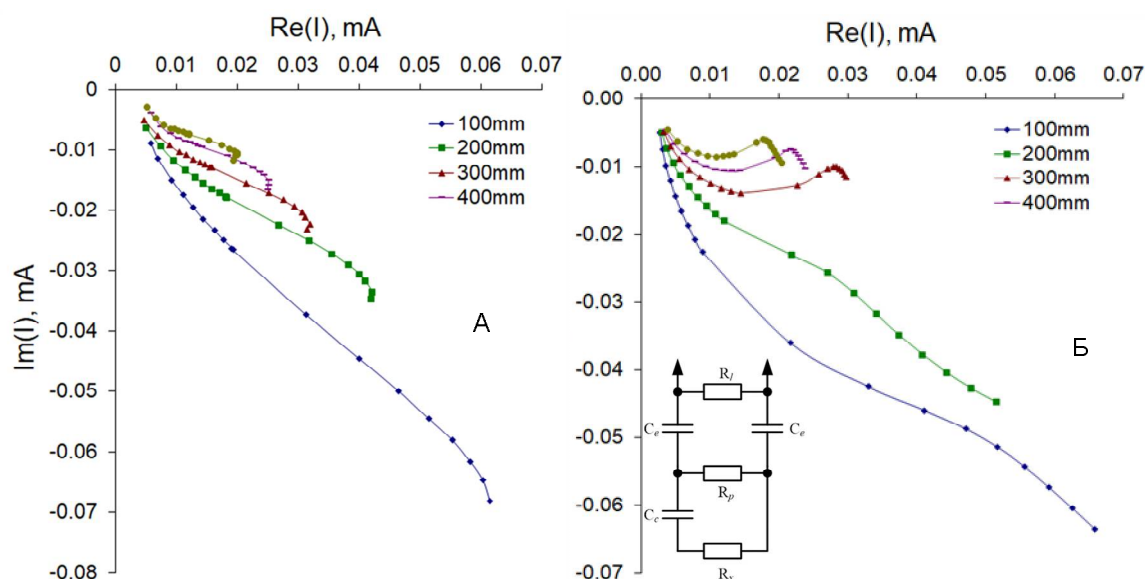


Рисунок 13. – Диаграмма Найквиста для образцов разной длины. А - ветки яблони. Диаметр всех образцов – 23 мм, количество образцов в каждой экспериментальной группе — 5, количество повторных измерений — 5; данные представлены в виде средних значений. Б - результат расчета импеданса модельных ветвей диаметром 23 мм различной длины. На врезке – электрическая модель участка ветки дерева, подключенного к измерителю импеданса. Обозначения на схеме: R_l — сопротивление утечки, формирующее ток утечки по поверхности коры, R_p — сопротивление флоэмы, R_x — сопротивление ксилемы, C_e — конденсаторы, образованные точками соединения электродов и непроводящими слоями склеренхимы, перидермы и эпидермиса. C_c — конденсатор, образованный непроводящим слоем камбия; стрелки — точки крепления к измерительной аппаратуре. Из [3] списка работ по теме диссертации.

Методом электро-импедансной спектроскопии были исследованы образцы ветвей яблони. Были получены зависимости импеданса от частоты тестирующего сигнала в диапазоне от 1 до 100 кГц для образцов различной длины (см Рис. 14 А) и различного диаметра (0,8–2,2 см) при различной температуре (4, 23, 36 °C), под воздействием плазма-активированной воды.

Эти данные позволили определить структуру и характеристики электротехнической модели, соответствующей наблюдаемому в эксперименте импедансу (см Рис. 14 Б, врезка). Таким образом, с точки зрения электротехники, стебель растения представляет собой RC - фильтр. Подгоняя параметры модели к экспериментально измеренным комплексным характеристикам электрической проводимости всего стебля в широком диапазоне частот, можно оценить электропроводность отдельных элементов сосудистой системы растения. Недостатком электро-импедансной спектрометрии для длительных экспериментов является способ подключения электродов к образцу. Для обеспечения неинвазивного метода используют мостик из электролита, который на длительности в несколько минут не влияет на электрические характеристики образца, но за несколько часов происходит размокание коры растения, и конденсаторные элементы демонстрируют заметную утечку.

Метод импульсной флуориметрии больше приспособлен для длительных экспериментов. В литературе встречаются примеры многосуточных исследований флуоресценции пигментов фотосинтетической системы (Barták and Váczi 2014), однако анализа амплитудно-частотных характеристик этих записей нет. Нами были получены и исследованы трехсуточные записи базового уровня флуоресценции F_0 . Для получения динамики без влияния суточного ритма эксперименты проводили в затемненном помещении. В качестве образцов использовали растения салата латук (*Lactuca sativa*) в горшке. Размер растения составлял 25 см в высоту. Прибор размещали сбоку от растения, на расстоянии 12 см от ближайшего листа.

Эксперимент с одним образцом проводили в течении 6 дней в 2 этапа. В первые 3 дня растению обеспечивали необходимый полив. При этом проводили регистрацию базового уровня флуоресценции с периодом измерения 11 секунд. В последующие 3 дня растение не обеспечивали поливом и также проводили регистрацию базового уровня флуоресценции с периодом измерения 11 секунд (Рис. 15). В результате от каждого растения получали 2 записи длиной около 23 тысяч измерений.

На графиках вейвлет - коэффициентов (Рис. 16 А и Б) хорошо видны линии, соответствующие периоду 1 час, а также удвоенному и половинному периоду. Заметных отличий нет. Однако на графиках биспектров есть существенная разница. В случае анализа данных здорового растения (Рис. 16В) биспектральный анализ выделяет только высокочастотную область в районе периода колебаний 1000 с. На графике биспектра для растения в

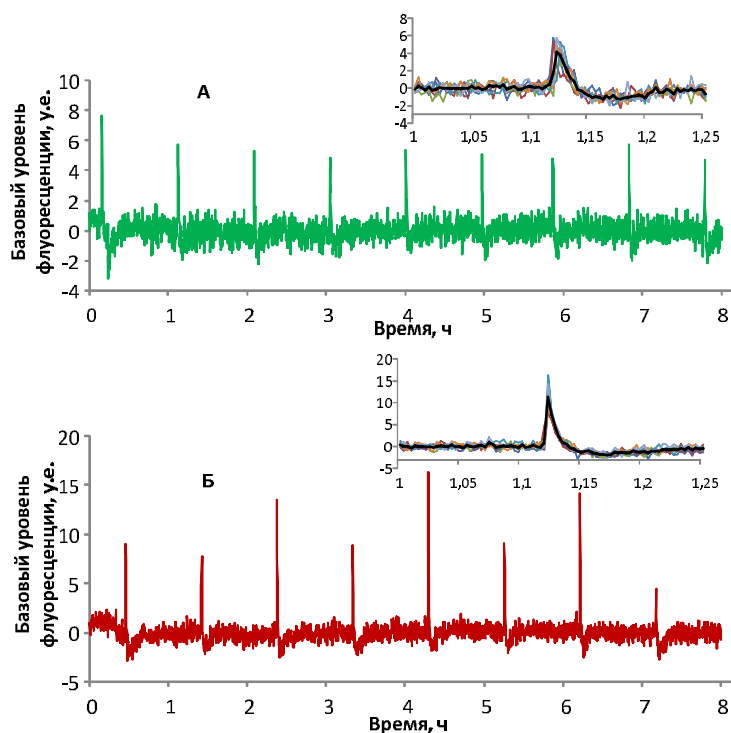


Рисунок 14. – Примеры записей базового уровня флуоресценции в круглосуточном режиме без ростового освещения. А - запись флуоресценции растения с нормальным поливом. Б - запись растения в условиях засухи. На врезках - выровненные по началу импульса насыщающего освещения 7 последовательных реакций на насыщающий импульс. Черная линия на врезках - усредненное значение. Из [6] списка работ по теме диссертации.

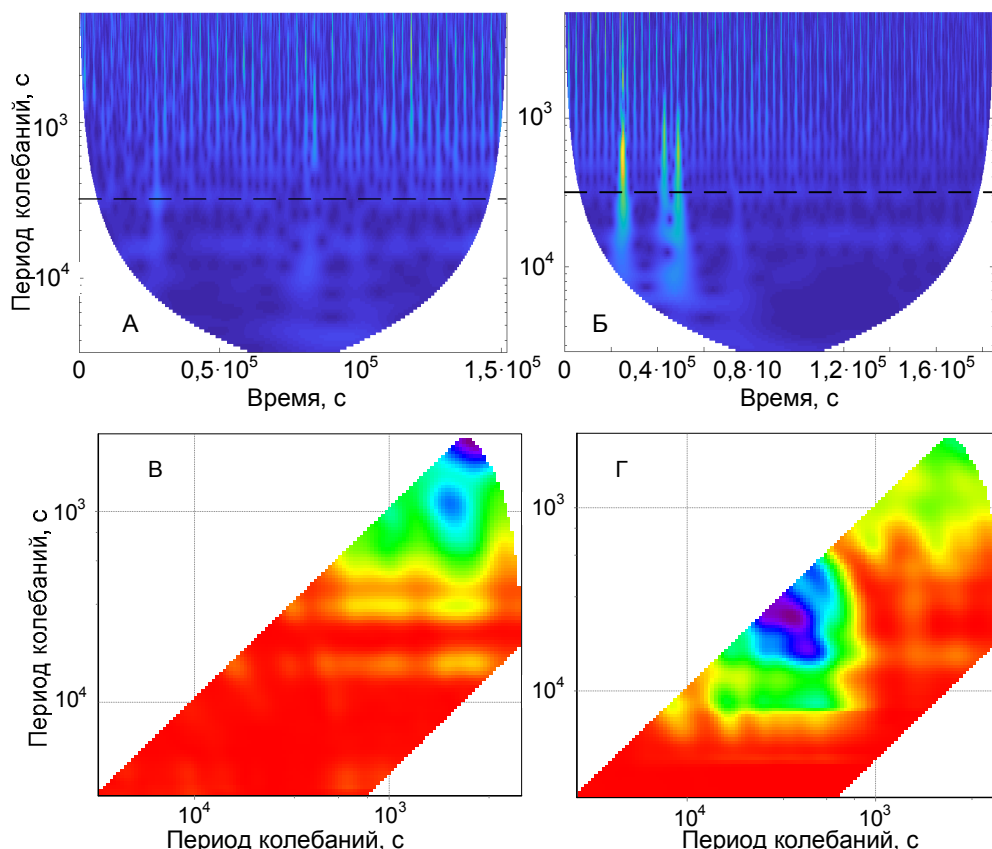


Рисунок 15. – Вейвлет-коэффициенты записей базового уровня флуоресценции в круглосуточном режиме без ростового освещения. А - запись флуоресценции растения с нормальным поливом. Б - запись растения в условиях засухи. Штриховая линия - период колебаний, соответствующий 1 часу. В – карта зависимости показателя биспектра от периодов колебаний для растений с нормальным поливом. Г - карта зависимости показателя биспектра от периодов колебаний для растений в условиях засухи. Из [6] списка работ по теме диссертации.

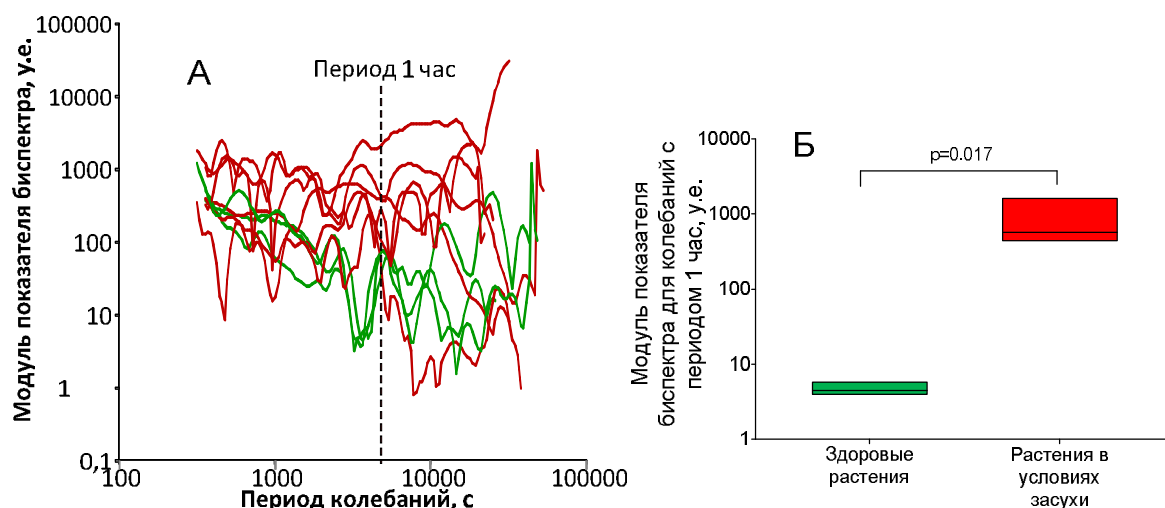


Рисунок 16. – График зависимости коэффициентов биспектра от частоты (А) и сравнение коэффициентов биспектра для периода 3600 с у здоровых растений и растений в состоянии стресса (Б). Зеленым цветом обозначены данные, полученные для здоровых растений, красным цветом обозначены данные, полученные для растений в условиях засухи. Из [6] списка работ по теме диссертации.

стрессовых условиях (Рис. 16 Г) засухи появляется пятно, соответствующее периоду 3600 с, т.е. проявляется ритм насыщающих вспышек с периодичностью 1 час.

На графике зависимости этих показателей биспектра от частоты (Рис. 17 А) хорошо видно, что для периода 3600 секунд (1 час) для здоровых растений (сплошные линии) наблюдается провал, а для растений в стресс-условиях (пунктирные линии) наблюдаются достоверно отличающиеся значения (Рис. 17 Б), с уровнем значимости $p=0,017$. Это свидетельствует о том, что биспектральный анализ может быть эффективным инструментом для выявления стрессового состояния растений, что также было подтверждено в экспериментах с хлопчатником. Растения, находящиеся под воздействием стресса от засухи, модифицируют динамику флуоресцентного ответа хлорофилла. Вероятно, это приводит к формированию когерентного сигнала второй гармоники от периодического сигнала насыщающей вспышки при передаче сигнала по регуляторным путям фотосинтеза. Таким образом, разработан новый способ диагностики стрессовых состояний у растения путем косвенных, неинвазивных измерений.

Исследование синхронизации ритмических процессов в ритмах центральной нервной системы

Исследование функционального состояния центральной нервной системы является хорошим примером применения спектрально-амплитудного анализа для описания характеристик временных рядов

локальных полевых потенциалов посредством выделения ритмических диапазонов: дельта- (1-4 Гц), тета- (4-8 Гц), альфа- (8-13 Гц), бета- (14-40) и гамма- (30-80 Гц) ритмов. Высокочастотные колебания выше 80 Гц относят к высокочастотным пульсациям. Несмотря на то, что ритмы в центральной нервной системе не являются гармоническими колебаниями, они локализованы в узких частотных диапазонах и чаще всего для их анализа используют оконное преобразование Фурье. В диссертационной работе усилия были сконцентрированы на определении фазовой синхронизации ритмов, регистрируемых в восьми структурах, связанных с выполнением когнитивных функций: энторинальная кора (EC), супрааммилярное ядро (SM), центральное ядро миндалины (CA), медиальный септум, зубчатая фасция (DG), гиппокамп (Hip), фронтальная кора (PC), латеральный септум (LS). Для выполнения этой работы автором были разработаны как специальные аппаратные, так и программные средства. Поскольку интерес не ограничивался стандартным для электро-энцефалографии диапазоном частот от 1 до 100 Гц, были предприняты попытки поиска синхронной ритмической активности в более низкочастотном и более высокочастотном диапазоне, была разработана широкополосная восьмиканальная система регистрации биопотенциалов с частотой цифровки сигналов 10 кГц и без обычной для такой задачи фильтрации высоких частот. Таким образом, доступный для анализа диапазон частот составил 0,001-1000 Гц. Для анализа сигналов автором было разработано программное обеспечение, позволяющее оценивать мощность соответствующих ритмических компонент по модулю коэффициентов комплексного непрерывного вейвлет-преобразования, а синхронизацию – по вейвлет-когерентности. Эксперименты проводились на морских свинках, в каждой серии использовано минимум 3 животных. Длительность записи минимум 10 минут. В качестве провокативных тестов использовали сенсорную стимуляцию (вспышки света, частота вспышек 10 Гц, длительность воздействия 10 с) и хроническое введение L-глутамата в медиальный септум.

Здоровые животные демонстрировали высокую степень когерентности ритмов в следующих парах структур: медиальный и латеральный септум; супрааммилярное ядро и центральное ядро миндалины, гиппокамп и зубчатая фасция (Рис. 18). Также стоит отметить снижение степени когерентности с увеличением центральной частоты ритма, что можно интерпретировать как увеличение локальности ритма при увеличении частоты, что совпадает с литературными данными. Анализируя степень синхронизации между структурами в связи с частотой, легко заметить, что

для медленных ритмов синхронизованы далеко расположенные между собой структуры (дельта и тета- ритм охватывает латеральный и медиальный септум, супрааммилярное ядро и центральное ядро миндалины). Для высокочастотных ритмов синхронизация наблюдается в близко расположенных структурах (гиппокамп и зубчатая фасция).

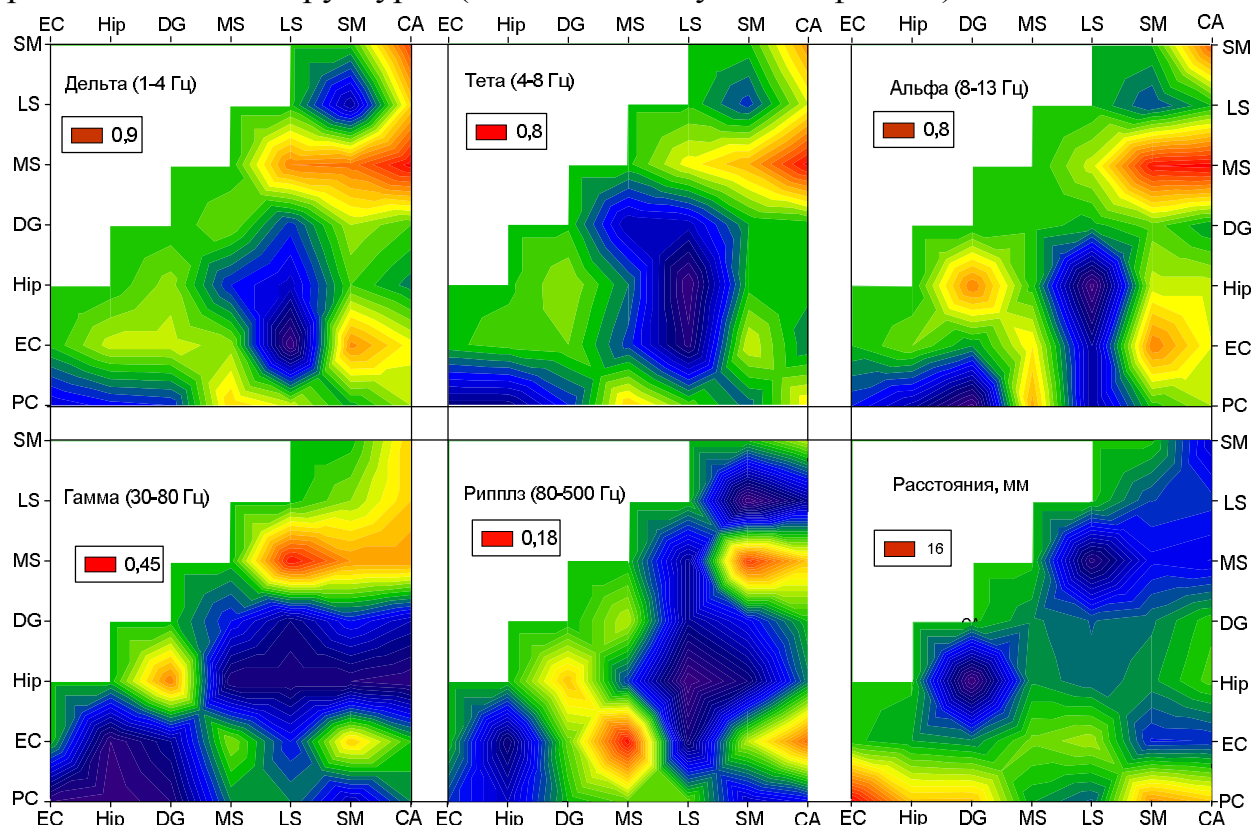


Рисунок 17. – Взаимосвязь структур мозга здоровых животных и расстояния между структурами по координатам стереотаксиса. Показаны средние значения ($n=10$) модулей вейвлет-когерентности. Обозначения структур в тексте. Для каждого графика указаны принятые максимальные значения. Из [8] списка работ по теме диссертации

Вейвлет анализ мощности осцилляций (по модулям вейвлет-коэффициентов) показали, что осцилляции, как низкочастотные (тета и альфа), так и высокочастотные (гамма), присутствуют во всех исследованных кортикальных и субкортикальных областях. Амплитуда ритмической активности разных диапазонов в фоновых локальных полевых потенциалах слегка варьировала в различных структурах; средний коэффициент вейвлет-мощности для различных типов осцилляций в восьми структурах показан на Рис. 19. Во время сенсорной стимуляции осцилляции в низкочастотных полосах имели тенденцию к возрастанию в большинстве структур.

Наиболее отчетливый эффект сенсорной стимуляции на выраженность тета- ритма наблюдался в энторинальной коре, где тета-мощность возрастала

от $0,005 \pm 0,002$ до $0,02 \pm 0,01$ отн. ед. при сенсорной стимуляции. Анализ изменения синхронизации ритмов (тета, альфа и гамма), оцененных по фазовой вейвлет-когерентности (с учетом скорости набег фазы по частоте) показал, что во всех структурах сенсорная стимуляция приводит к увеличению синхронности ритмов, причем альфа-ритм хорошо синхронизован с тета-ритмом и гамма-ритмом, но тета- и гамма-ритм между собой синхронизованы хуже (Рис. 20). Это может указывать на первичный

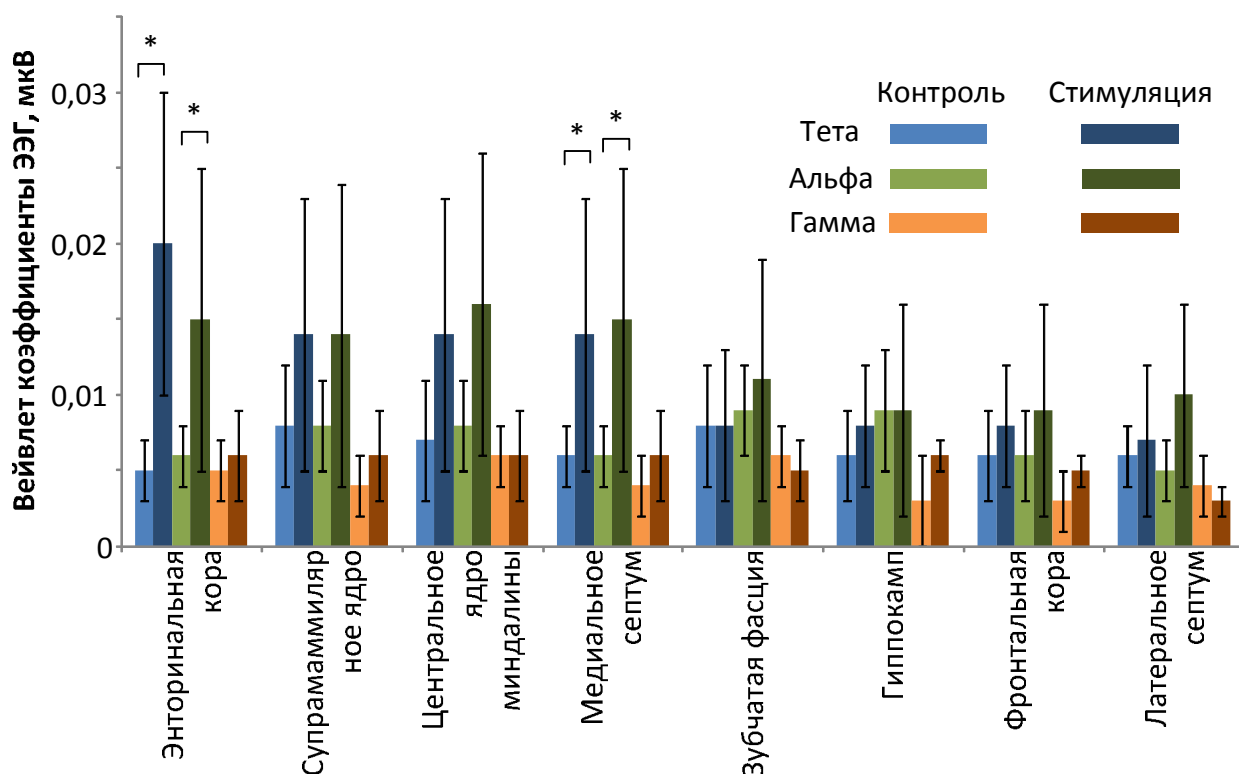


Рисунок 18. – Средние коэффициенты вейвлет-мощности для осцилляций у контрольной группы животных и после сенсорной стимуляции в характерных частотных диапазонах в восьми структурах. Приведены средние и стандартное отклонение. Достоверные отличия $p < 0.05$ (ANOVA), $n=10$. Из [9] списка работ по теме диссертации

характер альфа-ритма в запуске осцилляций в головном мозге. Следует также отметить, что альфа- и гамма-ритмы имели высокую степень синхронизации в исходном состоянии в энторинальной коре, гиппокампе и фронтальной коре. Инъекции L-глутамата (одного из нейромедиаторов ЦНС) в медиальную септум позволили оценить долговременные эффекты возбуждения ЦНС, и вызвали схожие с сенсорной стимуляцией эффекты при введении в течение 5 дней (усиление ритмической активности, особенно в тета-ритме (Рис. 21 А), и обратный эффект (Рис. 21 Б) при долгосрочном введении в течение 30 дней (при адаптации). Основным результатом данной части работы является выявление резкого усиления после световой стимуляции взаимной когерентности тета-, альфа- и гамма-ритмов, – как в

кортикальных, так и в субкортикальных структурах. Интересно, что в некоторых структурах (а именно, в ЛС и ЗФ) не было возрастания тета-осцилляций при действии самого стимула, но наблюдалось усиление тета-альфа и тета-гамма когерентностей. Аналогично, в гиппокампе не было возрастания альфа-ритма после раздражения мозга животного посредством вспышек, но было усиление альфа-тета и альфа-гамма синхронизации. В целом можно отметить, что оценка изменения взаимосвязей ритмов оказалась более чувствительным параметром, чем изменение мощности

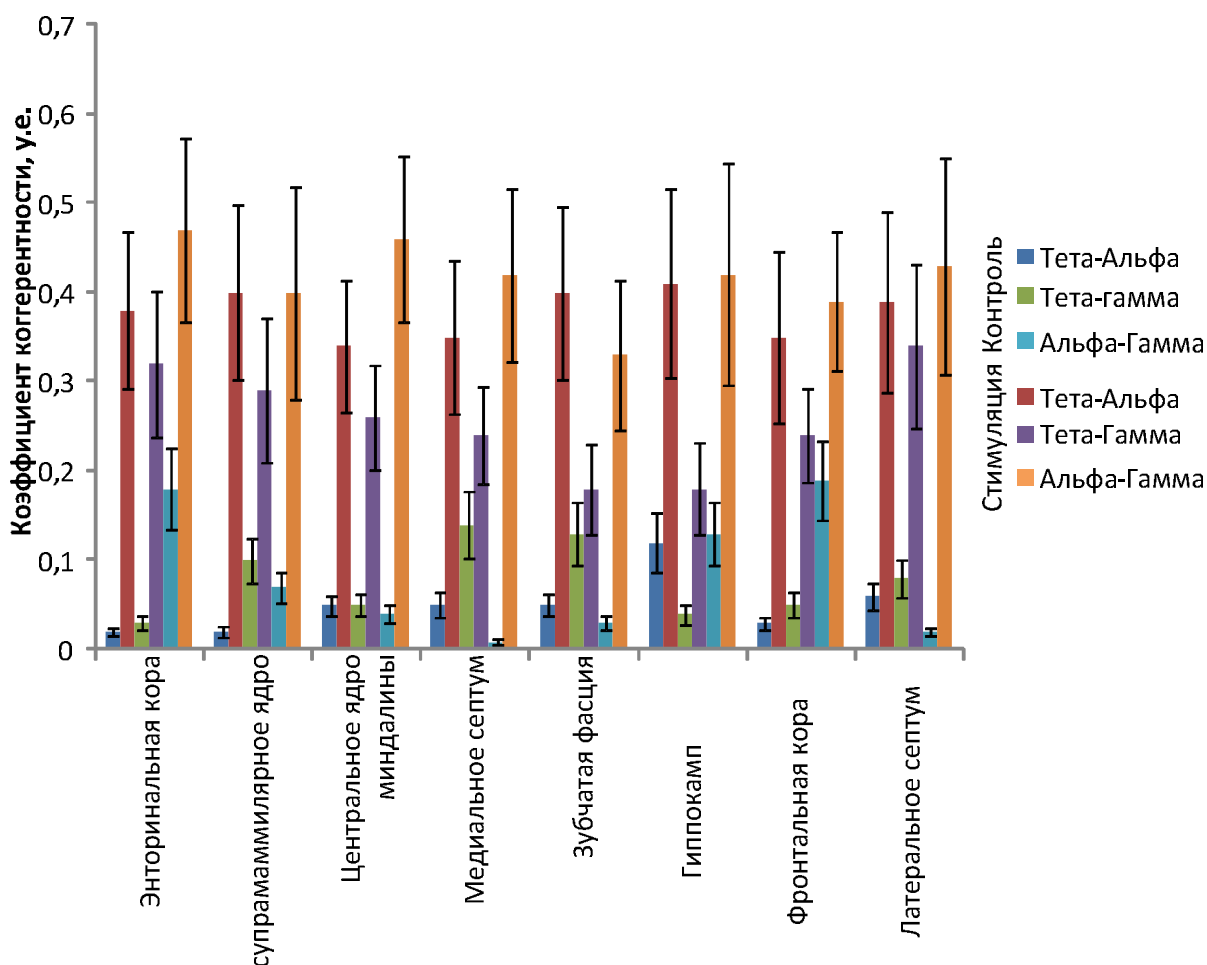


Рисунок 19. – Изменение синхронизации ритмов по коэффициенту фазовой вейвлет-когерентности после сенсорной стимуляции в различных структурах мозга. Из [9] списка работ по теме диссертации

ритмов при исследовании изменений связанных с сенсорной стимуляцией. Наблюдающаяся фазовая синхронизация (когерентность) ритмов, кратно отличающихся по частоте (тета- 4-8 Гц, альфа- 8-13 Гц, гамма- 30-80 Гц), указывает на то, что после стимуляции процессы генерации в данных диапазонах не являются самостоятельными, а ритмические сигналы формируются по принципу генерации гармоник в нелинейной системе передачи сигналов. Появление этих гармоник в регистрируемых сигналах

может означать либо усиление этой генерации, либо ослабление фильтрующих свойств нейрональных сетей в условиях стресса. Кроме того, выявление изменений в фазовой синхронизации кажется более многообещающим подходом, чем анализ амплитуд ритмов при сенсорной стимуляции. Поскольку хроническое фармакологическое и сенсорное раздражение центральной нервной системы используют как модель эпилептогенеза, в силу схожести изменений в ритмической картине ЭЭГ и поведении животных, полученные в данной работе результаты также применимы для разработки систем автоматического прогнозирования эпилептических припадков в медицинских приложениях.

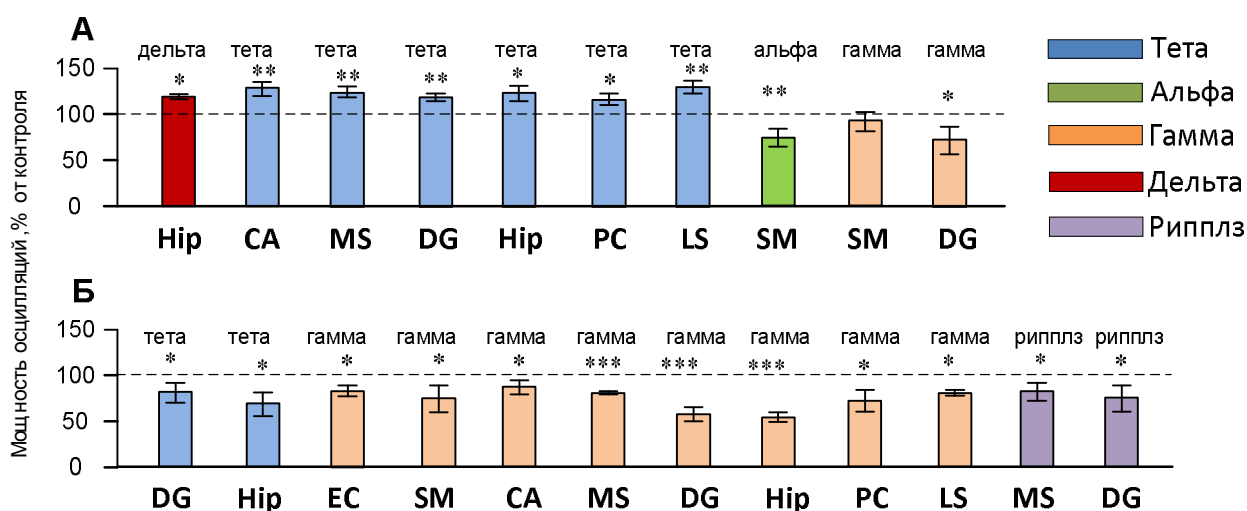


Рисунок 20. – Краткосрочное (А) и долгосрочное (Б) влияние инъекций L-глутамата на мощность локальных полевых потенциалов в различных структурах и для различных ритмов. Представлены средние и ошибка среднего (n=10). Указаны достоверные отличия (ANOVA) при *P < 0,05, **P < 0,01 или *P < 0,001 по сравнению с исходной активностью. Пунктирной линией показана мощность колебаний у интактных животных, принятая за 100%. Обозначения структур в тексте. Из [8] списка работ по теме диссертации.**

Заключение

Разработка адекватных критериев для описания временных рядов, характеризующих динамику параметров биологических систем, является актуальной задачей для экспериментального исследования сложной биологической системы. Такие критерии должны обладать достаточной, но не избыточной информативностью, для адаптации сложной математической модели к наблюдаемым в эксперименте эффектам, достаточной чувствительностью к внешним тестовым воздействиям для выявления слабых эффектов в биологических системах, возможностью анализировать

интактные биологические системы без необходимости подачи гармонических опорных сигналов.

Изменение мощности высших гармоник, появляющихся в процессе прохождения сигнала по нелинейным (по функции передачи сигнала) путям, является интересным свойством сигнала, которое в настоящий момент доступно для исследования с помощью современных методов измерения и анализа биологических сигналов. Это свойство позволяет, в зависимости от дизайна эксперимента, решить 2 задачи:

1. Анализ одноканального или многоканального временного ряда, заключающийся в измерении амплитуды гармоник, полученных в результате воздействия на объект внешнего гармонического воздействия. Такой анализ позволяет выявить взаимосвязь между мощностью высших гармоник в сигналах и самим фактом воздействия. Данный подход напоминает классический метод измерения коэффициента нелинейных искажений.
2. Анализ многоканального временного ряда, заключающийся в измерении амплитуды синтетических, фазово-синхронизованных гармоник, позволяющий исследовать *структуру* передачи сигналов между каналами.

Первый вариант использовался нами в растениях при анализе изменений в динамике флуоресценции хлорофилла. Второй вариант использован в эндотелиоцитах при анализе спонтанных колебаний концентрации внутриклеточных сигнальных молекул, при анализе динамики воротного механизма калиевого канала, локальных полевых потенциалов.

Для анализа синтезированных гармоник в биологических сигналах требуются специальные системы регистрации временных рядов, по возможности, лишенные артефактов в виде внешних периодических помех, синхронно регистрируемых во всех каналах. Это потребовало проведения глубокой модернизации, а в некоторых случаях и разработки оборудования для регистрации сигналов в ходе данного исследования. Кроме того, для анализа данных было необходимо программное обеспечение. К сожалению, биспектральный анализ и непрерывное комплексное вейвлет-разложение с использованием лог-нормального вейвлета не входят в состав пакетов математического анализа (например, в Matlab и подобные системы), и это требовало разработки авторского программного обеспечения. В процессе данной работы были решены все методические трудности и получены вдохновляющие результаты.

Для формулирования критериев описания временных рядов, нами были исследованы математические модели генерации сигналов, с учетом нелинейной функции искажения сигнала в виде квадратичной функции. Были получены правила нормировки показателей биспектра, позволяющие непосредственно оценивать величину квадратичного члена функции искажения сигнала.

Во всех изученных нами биологических системах при переходе из нормального состояния в состояние стресса в регистрируемых в данной системе временных рядах (динамика концентрации внутриклеточных сигнальных молекул, динамика флуоресценции хлорофилла растений, ритмические компоненты электрических сигналов структур центральной нервной системы) наблюдается увеличение амплитуды гармоник основного внешнего (стимулирующего) или внутреннего ритма, что легко детектируется с помощью критериев описания синхронизации и амплитуды гармонических искажений, и позволяет использовать этот эффект в прикладных задачах разработки сенсоров в биологии, медицине и сельском хозяйстве.

Выводы

- 1) Разработан уникальный комплект приборов для выполнения синхронных многоканальных динамических измерений биофизических характеристик биологических объектов разного уровня организации от молекулярного до системного с минимальными вносимыми искажениями на низких частотах (от 0,001 до 0,1 Гц). Для анализа данных разработано авторское программное обеспечение с реализацией комплексного вейвлет-преобразования, вейвлет-когерентного анализа, биспектрального анализа.
- 2) Разработан метод определения направления передачи и параметров нелинейных искажений в пути трансдукции физиологически значимых сигналов в биологических объектах. Аналитически и путем численного моделирования показана возможность обнаружения маршрута распространения сигнала.
- 3) Установлено, что синхронизация активационного и инактивационного процессов в воротном механизме ионного канала распределена в широком диапазоне характерных времен, что подтверждает установленную ранее персистентность воротного процесса ионного канала. Модель калиевого канала, учитывающая гидродинамическое наполнение устья молекулами воды, дает сходное с природным каналом распределение показателей биспектра вдоль характерных времен двумерной карты. Впервые

установлена зависимость синхронизации динамики воротного механизма канала от трансмембранного потенциала.

4) Синхронизация колебаний концентрации кальция и оксида азота в эндотелиоцитах в диапазоне NO-независимого эндотелиального ритма изменяется при тепловом стрессе (нагрев от 37 до 40°C). Доля клеток, с синхронизированными колебаниями концентрации кальция, увеличивается, а доля клеток, демонстрировавших синхронизированные колебания NO, уменьшается. При увеличении температуры возрастает модуль показателя биспектра динамики колебаний Ca^{2+} и NO в диапазоне эндотелиального ритма.

5) Установлено, что при стрессе, вызванном засухой у растений, изменяется динамика флуоресценного ответа пигментов фотосистемы, в норме реакция на периодические вспышки света не содержит высших гармоник исходного периодического сигнала; при засухе происходит увеличение нелинейных искажений сигнала, выражающееся в увеличении показателя биспектра на частоте стимулирующего светового воздействия.

6) При сенсорной периодической стимуляции ритмы центральной нервной системы животных усиливаются как по амплитуде, так и по фазовой синхронизации, причем изменения по фазовой синхронизации носят более заметный характер, чем изменения амплитуд сигналов в известных ритмических диапазонах α , γ и θ ритмов.

Статьи автора по теме диссертации

1. **Astashev M.E.**, Grinevich A. A., Serov D.A., Simakin A.V., Yusim V.A., Tankanag A.V. Study of the synchronization and the transmission of gating modulation in the single potassium channel // *Opera medica et physiologica*. – 2024. – Т. 11, № 3. – С. 158-173. DOI: 10.24412/2500-2295-2024-3-158-173
2. **Astashev M. E.**, Bolotskova P. N., Bunkin N. F., Gudkov S. V., Kozlov V. A., Okuneva M. A. Swelling of Polymer Membrane in an Aqueous Protein Suspension: Photoluminescence Spectroscopy Experiments // *Physics of Wave Phenomena*. – 2021. – Т. 29, № 2. – С. 123-130. DOI: 10.3103/s1541308x21020035
3. **Astashev M. E.**, Konchekov E. M., Kolik L. V., Gudkov S. V. Electric Impedance Spectroscopy in Trees Condition Analysis: Theory and Experiment // *Sensors*. – 2022. – Т. 22, № 21. DOI: 10.3390/s22218310
4. **Astashev M. E.**, Serov D. A., Gudkov S. V. Application of Spectral Methods of Analysis for Description of Ultradian Biorhythms at the Levels of Physiological Systems, Cells and Molecules (Review) // *Mathematics*. – 2023. – Т. 11, № 15. DOI: 10.3390/math11153307

5. **Astashev M. E.**, Serov D. A., Sarimov R. M., Gudkov S. V. Influence of the Vibration Impact Mode on the Spontaneous Chemiluminescence of Aqueous Protein Solutions // *Physics of Wave Phenomena*. – 2023. – T. 31, № 3. – C. 189-199. DOI: 10.3103/s1541308x23030020
6. **Astashev M. E.**, Burmistrov D. E., Yanykin D. V., Grishin A. A., Knyazeva I. V., Dorokhov A. S., Gudkov S. V. Application of Bispectral Analysis to Assess the Effect of Drought on the Photosynthetic Activity of Lettuce Plants *Lactuca sativa* L // *Mathematical and Computational Applications*. – 2024. – T. 29, № 5. DOI: 10.3390/mca29050093
7. **Astashev M. E.**, Serov D. A., Tankanag A. V., Knyazeva I. V., Dorokhov A. A., Simakin A. V., Gudkov S. V. Study of the Synchronization and Transmission of Intracellular Signaling Oscillations in Cells Using Bispectral Analysis // *Biology*. – 2024. – T. 13, № 9. DOI: 10.3390/biology13090685
8. Astasheva E., **Astashev M.**, Kitchigina V. Changes in the behavior and oscillatory activity in cortical and subcortical brain structures induced by repeated l-glutamate injections to the medial septal area in guinea pigs // *Epilepsy Res.* – 2015. – T. 109. – C. 134-45. DOI: 10.1016/j.epilepsyres.2014.10.022
9. Astasheva E. V., Kichigina V. F., **Astashev M. E.** Oscillatory Activity and Cross-Frequency Interactions in the Hippocampus and Connected Brain Structures during Sensory Information Processing // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2018. – T. 48, № 6. – C. 758-763. DOI: 10.1007/s11055-018-0627-z
10. Gorbacheva E. V., Ershova V. S., **Astashev M. E.**, Vulfius C. A. Two Subtypes of Nicotinic Acetylcholine Receptors in *Lymnaea stagnalis* Neurons Control Chloride Conductance // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. – 2018. – T. 12, № 3. – C. 261-267. DOI: 10.1134/s1990747818030042
11. Gudkov S. V., Shafeev G. A., Glinushkin A. P., Shkirin A. V., Barmina E. V., Rakov, II, Simakin A. V., Kislov A. V., **Astashev M. E.**, Vodeneev V. A., Kalinitchenko V. P. Production and Use of Selenium Nanoparticles as Fertilizers // *ACS Omega*. – 2020. – T. 5, № 28. – C. 17767-17774. DOI: 10.1021/acsomega.0c02448
12. Gudkov S.V., Sarimov R.M., **Astashev M.E.**, Pishchalnikov R.Yu., Yanykin D.V., Simakin A.V., Shkirin A.V., Serov D.A., Konchekov E.M., Gusein-zade N.G., Lednev V.N., Grishin M.Ya., Sdvizhenskii P.A., Pershin S.M., Bunkin A.F., Ashurov M.Kh., Aksenov A.G., Chilingaryan N.O., Smirnov I.G., Pavkin D.Yu., Hort D.O., Moskovskii M.N., Sibirev A.V., Lobachevsky Ya.P.,

- Dorokhov A.S., Izmailov A.Yu. Modern physical methods and technologies in agriculture. // *Phys. Usp.* – 2024. – Vol. 67, P. 194–210. DOI: 10.3367/UFNe.2023.09.039577
13. Khabatova V. V., Serov D. A., Tikhonova I. V., **Astashev M. E.**, Nagaev E. I., Sarimov R. M., Matveyeva T. A., Simakin A. V., Gudkov S. V. Selenium Nanoparticles Can Influence the Immune Response Due to Interactions with Antibodies and Modulation of the Physiological State of Granulocytes // *Pharmaceutics*. – 2022. – T. 14, № 12. DOI: 10.3390/pharmaceutics14122772
 14. Kuzin A., Solovchenko A., Khort D., Filippov R., Lukanin V., Lukina N., **Astashev M.**, Konchekov E. Effects of Plasma-Activated Water on Leaf and Fruit Biochemical Composition and Scion Growth in Apple // *Plants*. – 2023. – T. 12, № 2. DOI: 10.3390/plants12020385
 15. Serov D. A., **Astashev M. E.**, Tikhonova I. V., Safronova V. G. The Influence of Exogenous ATP on Functional Responses of Murine Bone Marrow Granulocytes // *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*. – 2020. – T. 14, № 1. – C. 34-43. DOI: 10.1134/s1990747819060096
 16. Serov D.A., Khabatova V.V., Tikhonova I.V., Reut V.E., Pobedonostsev R.V., **Astashev M.E.** Study of the Effects of Selenium Nanoparticles and Their Combination with Immunoglobulins on the Survival and Functional State of Polymorphonuclear Cells // *Opera Medica Physiol.* – 2022. – T. 9, № 4. – C. 137-159. DOI: 10.24412/2500-2295-2022-4-137-159
 17. Serov D.A., Voronina D.Yu., **Astashev M.E.**, Tankanag A.V. Effect of hyperglycemia on oscillations in calcium and nitric oxide concentrations in mouse skin endotheliocytes // *Opera medica et physiologica*. – 2024. – T. 11, № 4. – C. 166-198. DOI: 10.24412/2500-2295-2024-4-166-198
 18. Shurygin B., Chivkunova O., Solovchenko O., Solovchenko A., Dorokhov A., Smirnov I., **Astashev M. E.**, Khort D. Comparison of the Non-Invasive Monitoring of Fresh-Cut Lettuce Condition with Imaging Reflectance Hyperspectrometer and Imaging PAM-Fluorimeter // *Photonics*. – 2021. – T. 8, № 10. – C. 425. DOI: 10.3390/photonics8100425
 19. Shumeyko S.A., Yanykin D.V., Pashkin M.O., Lukanin V.I., Zakharov D.A., Astashev M.E., Pishchalnikov R.Y., Sarimov R.M., Ashurov M.K., Ashurov E.M. The Effect of Liquids Activated by Plasma Generated with a Microwave Plasmatron and High-Frequency Glow Discharge on Cotton Plant Development. // *Plants*. – 2025. – T. 14, № 3. – C. 304. DOI: 10.3390/plants14030304