

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологий

Базовая кафедра медико–биологических систем и комплексов

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ А. Н. Шуваев

подпись инициалы, фамилия

« _____ » _____ 20 ____ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Молекулярное исследование РФП для диагностики метастатического
поражения костей на основе фермента лизилоксидазы

тема

03.04.02 Физика

код и наименование направления

03.04.02.09 Технологическое сопровождение ядерной медицины и
медицинского оборудования

код и наименование магистерской программы

Научный руководитель _____ к. ф.-м. н., доцент
подпись, дата должность, ученая степень

А. Н. Шуваев
инициалы, фамилия

Выпускник _____
подпись, дата

М. А. Лукшина
инициалы, фамилия

Рецензент _____ к. б. н., профессор
подпись, дата должность, ученая степень

Н. М. Титова
инициалы, фамилия

Красноярск 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	6
1.1 Раковые опухоли.....	6
1.2 Метастазирование.....	7
1.3 Рак молочной железы.....	9
1.3.1 Костные метастазы при раке молочной железы.....	10
1.4 Лизилоксидаза.....	12
1.4.1 Кофакторы фермента лизилоксидаза.....	16
1.5 Субстрат к ферменту лизилоксидаза LOX.....	17
1.6 In silico моделирование.....	18
2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	23
2.1 Объект исследования.....	23
2.1.1 Кофактор лизилтирозилхинон.....	23
2.2 Методы исследования.....	24
2.2.1 Метод молекулярной механики.....	26
2.2.2 Метод молекулярного докинга.....	31
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
3.1 Квантово-химическое моделирование.....	35
3.2 Молекулярный докинг исследуемых молекул.....	37
3.3 Молекулярная механика.....	43
3.4 Сравнение полученных данных с существующим РФП.....	45
3.5 Биогенез кофактора лизилтирозилхинона.....	47
3.6 Синтез кофактора лизилтирозилхинона LTQ3.....	49
3.7 Присоединение радиоактивной метки F18.....	50
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	52
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	54
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	55

ВВЕДЕНИЕ

В мире около 1,5 млн больных онкологией имеют метастазы в костях. Пациенты с раком легких, молочной железы, предстательной железы и щитовидной железы имеют крайне высокий риск развития костных повреждений и связанных с ними осложнений [1].

Основным методом выявления костных метастазов является рентгенологический метод. Однако этот метод имеет свои пределы и возможности. Недостаточно высока и чувствительность этого метода, делающая раннюю диагностику костных метастазов недостаточно точной. При рентгенографии определяются лишь те деструктивные зоны, где деминерализация костной структуры превышает 30%.

Учитывая множественный характер метастатического поражения костей при метастазировании рака, возникает необходимость в исследовании всего скелета, что практически неосуществимо с помощью рентгенографии, и успешно реализуется посредством метода радионуклидной диагностики.

Опухолевая прогрессия и метастатическое распространение являются сложными, многоступенчатыми процессами, включающими динамические взаимодействия между опухолевыми клетками, стромальными клетками и внеклеточным матриксом (ЕСМ). Гипоксия и ЕСМ являются двумя основными неклеточными компонентами микроокружения опухоли, которые влияют на метастазы [2]. Семейство ферментов лизилоксидазы (LOX) является центральным игроком в ремоделировании ЕСМ, связанным с раком.

Гипоксические клетки рака молочной железы вырабатывают избыточное количество LOX, которое играет критическую роль в прогрессировании опухоли и метастазировании.

Лизилоксидаза играет значительную роль в качестве промотора, опухолевой прогрессии и метастазирования. Это делает LOX идеальной мишенью для ранней диагностики метастазирования костей.

В настоящее время Наганом и Каганом предложен радиофармпрепарат на основе субстрата к ферменту лизилоксидаза. Для взаимодействия же кофактор лизилоксидазы лизилтирозилхилона (LTQ) необходима меньшая концентрация, в связи с большей аффинностью, так как кофактор – это небелковое химическое соединение, которое необходимо для активности фермента. [3].

ЦЕЛЬ: Целью данной работы является предложить молекулярную модель РФП на основе кофактора фермента лизилоксидазы лизилтирозилхилона для ранней диагностики метастазирования костной ткани при раке молочной железы.

Исходя из этого, были поставлены следующие задачи:

- Построить квантово-химическую модель меченного кофактора лизилоксидазы – лизилтирозилхилона.
- Изучить квантово-химические свойства меченого кофактора лизилтирозилхилона.
- Провести докинг пролизилоксидазы с меченым кофактором и лизилоксидазы LOX с субстратом (уже существующего РФП).
- Провести сравнительный анализ моделей взаимодействия РФП на основе кофактора и субстрата для LOX.

Функциональная молекулярная визуализация экспрессии фермента LOX *in vivo* откроет новые возможности для неинвазивного обнаружения, постановки и мониторинга терапии рака. Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) была использована для многочисленных диагностических и

прогностических применений при визуализации рака молочной железы, включая мониторинг реакции на лечение.

В ПЭТ используются короткоживущие радиоизотопы (например, фтор-18 [^{18}F]) для динамического мониторинга биохимических процессов в реальном времени, таких как метаболическая и пролиферативная активность на молекулярном уровне. ПЭТ-визуализация экспрессии ферментов LOX *in vivo* требует разработки LOX-ферментов, нацеленных на лучевые камеры.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Раковые опухоли

Опухолью называется бесконтрольная пролиферация клеток из-за воздействия экзогенных факторов, негативно влияющих на генетический материал (ДНК) клеток и вызывающих мутации. В итоге, патологические нарушения в ДНК клеток ведут к разрастанию раковой опухоли в организме, и она преобразуется в злокачественную [4].

Формирование опухоли происходит из скопления клеток и посредством их пролиферации она разрастается (опухоль растет из себя). Одни новообразования развиваются экспансивно, а другие – инвазивно[5].

Экспансивное развитие опухоли характеризуется тем, что она растет сама из себя, отодвигая ближайшие ткани. Клетки опухоли только отодвигают и сдавливают соседствующие ткани. Данный рост присущ многим зрелым и доброкачественным новообразованиям. Нередко вокруг такой опухоли имеется капсула, образуемая из-за атрофии оттесняемой ткани или реактивного воспаления[6].

При инвазивном росте происходит врастание клеток в соседствующие ткани по уже имеющимся щелям с тканевой жидкостью. Клетки также погружаются по ходу капилляров и лимфатических узлов[7].

Распространяясь за свои пределы, опухоль может разрушает даже мембраны органов. Вышесказанное развитие свойственно для злокачественных новообразований. Инфильтрирующие новообразование прочно сцепляется с ближайшими тканями.

Злокачественные опухоли классифицируют по типу пораженных клеток, основными вариациями являются:

- Карцинома - опухоль, которая поражает эпителиальные клетки. Карцинома пролиферирует в любой тканевой структуре, включающей клетки эпителия. К примеру, в коже и тканях, выстилающих внутренние органы.
- Саркома - опухоль, которая поражает соединительную ткань. Возникает в костной, хрящевой, жировой, мышечной тканях, а также в кровеносных сосудах и соединительных тканях.
- Лейкемия - раковые новообразования кроветворной системы. Возникают в кроветворных тканях красного костного мозга. Злокачественные клетки, попадая в кровь, распространяются через кровеносную систему.
- Лимфома –опухолевые клетки, образующиеся в лимфатической системе организма.
- Рак центральной нервной системы - заболевание, в результате которого новообразования разрастаются по тканям головного и спинного мозга[8].

1.2 Метастазирование

Опухолевая прогрессия не останавливается в одной органе или ткани, а стремится непрерывно распространиться и «выжить», Метастазирование - стадия развития злокачественного опухолевого процесса, который приводит к возникновению вторичных, дочерних, узлов опухоли (рисунок1). Опухоль, инфильтруя ткани, углубляется в кровеносную и лимфатическую системы, а ее обособленные клетки с кровотоком переносятся в другие органы[9].

Лимфогенные метастазы возникают в начале в ближайших по отношению к пораженному органу, лимфатических узлах. К примеру, при раке губы, метастазы первоначально появляются в подчелюстных лимфатических узлах[10].

Гематогенные метастазы могут быть очень отдаленными от основного узла и множественными. Распространение метастаз может идти и путем

разрастания опухоли по поверхности брюшины, плевре, мозговым оболочкам[11].

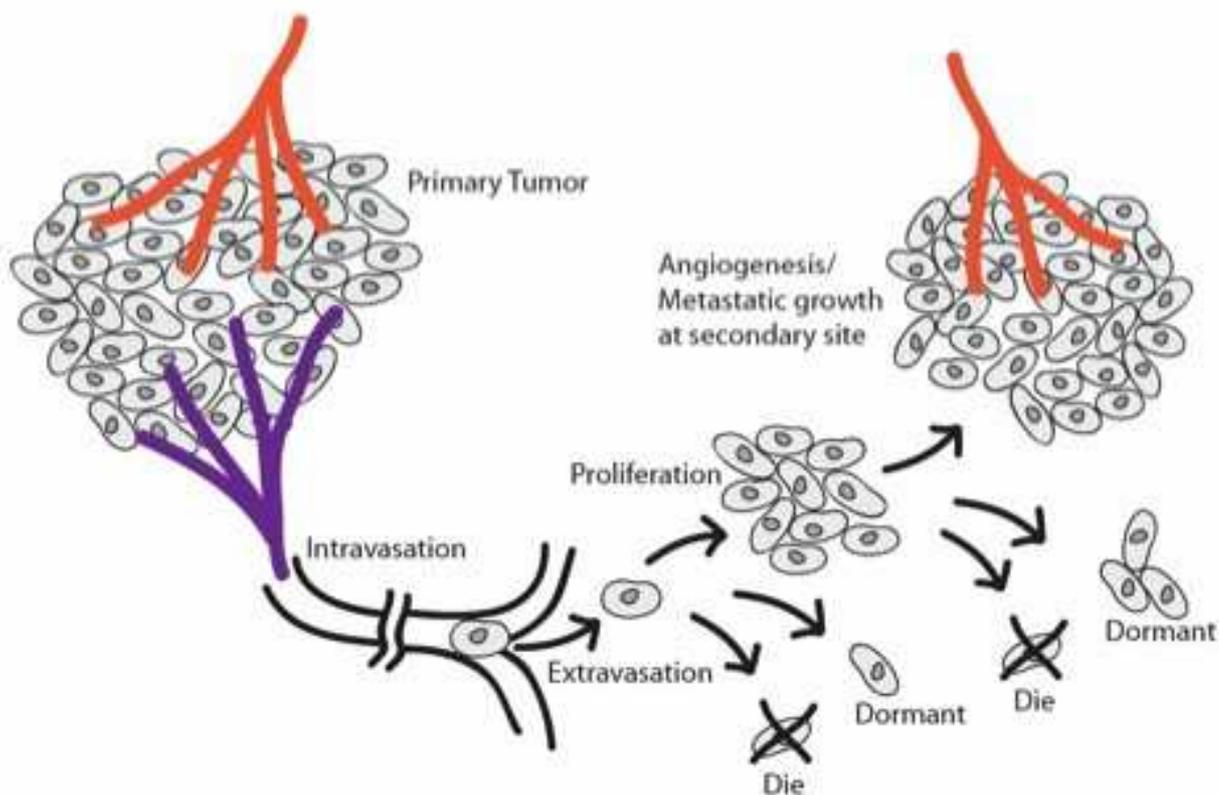


Рисунок 1 – Метастазирование [9]

Костная ткань стоит на четвертом месте по частоте возникновения метастаз злокачественных опухолей. Хотя присутствие костных метастазов считается относительно благоприятным прогностическим признаком по сравнению с поражением висцеральных органов для онкобольных, они значительно влияют на продолжительность жизни: 5 летняя выживаемость таких пациентов около 20%[12].

Костные метастазы значительно затрудняют течение болезни, уменьшают качество жизни пациента, так как возникает болевой синдром, патологическая угроза перелома, нарушается функционирование конечностей и возрастает риск появления гиперкальциемии. В таких случаях к основной противоопухолевой

терапии добавляют набор дополнительных особенных только для определенной ситуации лечебных и диагностических мероприятий[13].

В иностранных источниках протекание метастазирования костной ткани не редко объединяют в группу, называемую skeletal related events (SRE).

Особо частым симптомом костных метастаз оказывается болевой. Механическими источниками боли считают повышение внутрикостного давления, сдавление мягких тканей и механическую компрессию кости. Химическими источниками считают простагландин E, ацидоз, сопровождающий остеолит и факторы, продуцируемые или активируемые опухолью[14].

На ранних стадиях развития метастаз боль обусловлена раздражением внутрикостных и периостальных нервных окончаний из-за выделения цитокинов и увеличения содержания внутрикостного кальция. Подобная боль не связана с нагрузкой на кость и может даже усиливаться в состоянии покоя. Однако по мере нарастания деструкции появляется, так называемая, функциональная боль, обусловленная механическим ослаблением костных структур и их нестабильностью[15].

Функциональная боль возрастает с добавлением нагрузки на пораженную костную ткань и говорит о повышенном риске развития патологического перелома. Лечение болевого синдрома, обусловленного метастазами в кости, включает специфическую противоопухолевую терапию, ненаркотические и наркотические анальгетики, радиотерапию и ингибиторы остеокластов (кальцитонин и бисфосфонаты) [16].

1.3 Рак молочной железы

Чаще всего костные метастазы сопровождают миеломную болезнь, рак щитовидной железы, предстательной и молочной железы.

Рак молочной железы (РМЖ) считается одной из главных причин смертности среди женщин от онкологии. В случае диагностики заболевания на этапе регионарного метастазирования уровень 5-тилетней выживаемости составляет 83%, при наличии отдаленных метастазов он составляет 26% [17].

Выделяют три подтипа рака молочной железы:

1. Эстроген-рецептор положительный (ER-положительный) рак молочной железы. Гормон эстроген, необходимый для развития данного типа рака, увеличивает скорость разрастания раковых клеток и предохраняет их от гибели. ER-положительный рак молочной железы является менее агрессивной формой РМЖ, часто излечимой с помощью лекарственных средств из группы селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов.

2. HER2-положительный рак молочной железы. Специфический белок-протоонкогена HER2, содержащийся в раковых клетках в избытке, помогает им расти и пролиферировать.

3. Тройной негативный (ER-негативный/PR-негативный/HER2-негативный) рак молочной железы считается самым агрессивным видом РМЖ, который обладает особо неблагоприятным прогнозом. При тройном негативном РМЖ злокачественные клетки не несут в себе рецепторов к эстрогенам, прогестерону и белку HER2[18].

1.3.1 Костные метастазы при раке молочной железы

При раке молочной железы в 80% случаев выявляются остеолитические очаги, они характеризуются увеличением активности остеокластов и ускорением деструктивных процессов, в 20% случаев выявляются остеобластические и смешанные метастазы[19]. Причиной остеобластического типа метастазирования является увеличение остеобластной активности по отношению к уровню резорбции костной ткани остеокластами, что

способствует образованию патологической костной ткани[20]. Как остеобластические, так и остеолитические костные метастазы могут вызывать ряд осложнений, таких как костные боли, патологические переломы, компрессионные переломы позвоночника со сдавлением спинного мозга, гиперкальциемию.

Метастазирование в кости является многоступенчатым процессом. Опухолевые клетки отделяются от первичной опухоли и путем локальной миграции внедряются в кровеносные сосуды. Находясь в кровотоке, они могут адгезироваться на поверхность кости, их взаимодействие с костным микроокружением способствует появлению клеточных циклов с опухолевым ростом и костной деструкцией[21].

Опухолевые клетки секретируют факторы, которые стимулируют деструкцию кости посредством воздействия на остеокласты, что способствует появлению более агрессивного опухолевого фенотипа.

Считается, что костное микроокружение играет критическую роль в развитии дефектных циклов, путем изменения фенотипа опухолевых клеток и формирования высоко агрессивных метастатических очагов. Костный матрикс богат различными факторами роста, такими как трансформирующий фактор роста – β (TGF- β), инсулиноподобные факторы роста I и II (IGF-I и IGF-II), которые высвобождаются при остеоллизисе и могут стимулировать пролиферацию костных и опухолевых клеток[22].

Физические факторы в костном матриксе, включая низкий уровень оксигенации, кислотный pH и высокий внеклеточный уровень концентрации Ca^{2+} , обеспечивают создание условий, благоприятных для опухолевого роста. Гипоксия, ацидоз, высокий уровень Ca^{2+} , а также факторы роста TGF- β , IGF-I и IGF-II способствуют в комбинации развитию дефектных циклов и появлению костных метастазов.

Все вышеперечисленное приводит к значительной перестройке экспрессии ряда генов и изменению секретома (набора белков, выделяющихся

из раковых клеток), особенно резко возрастает количество фермента лизилоксидазы (Lysyloxidase, LOX) [23].

1.4 Лизилоксидаза

Семейство ферментов лизилоксидаз (LOX), секретируемых медь-зависимых аминоксидаз, состоит из пяти гомологов: LOX и LOX-like 1-4 (LOXL 1-4). Основная функция семейства ферментов LOX заключается в катализе ковалентной сшивки коллагена и эластина во внеклеточном матриксе (рисунок 2).

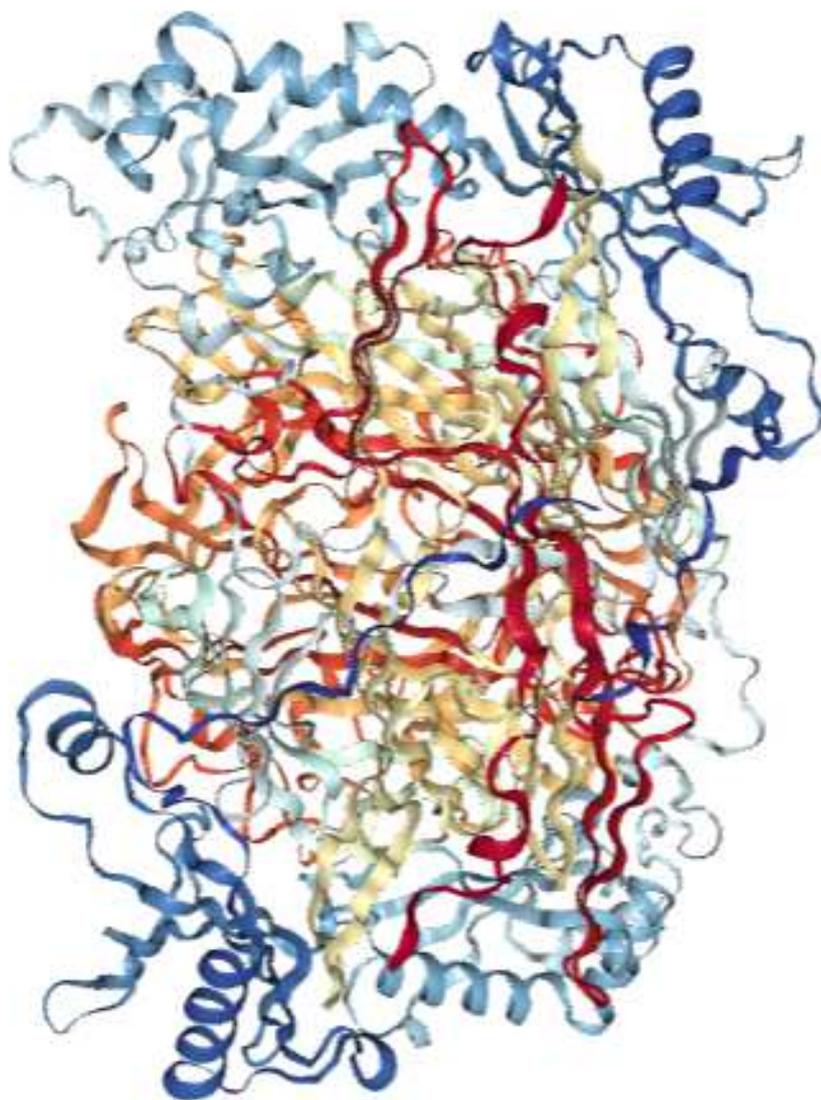


Рисунок 2 - Фермент лизилоксидаза [11]

Сначала внеклеточный фермент лизилоксидаза дезаминирует определенные остатки лизина и гидроксилизина, что ведет к образованию высокоактивных альдегидных групп (рисунок 3). Затем эти группы образуют ковалентные связи между собой или с другими остатками лизина и гидроксилизина. Только после многократного сшивания фибрилл коллаген приобретает свою уникальную прочность, становится нерастяжимым волокном[24].

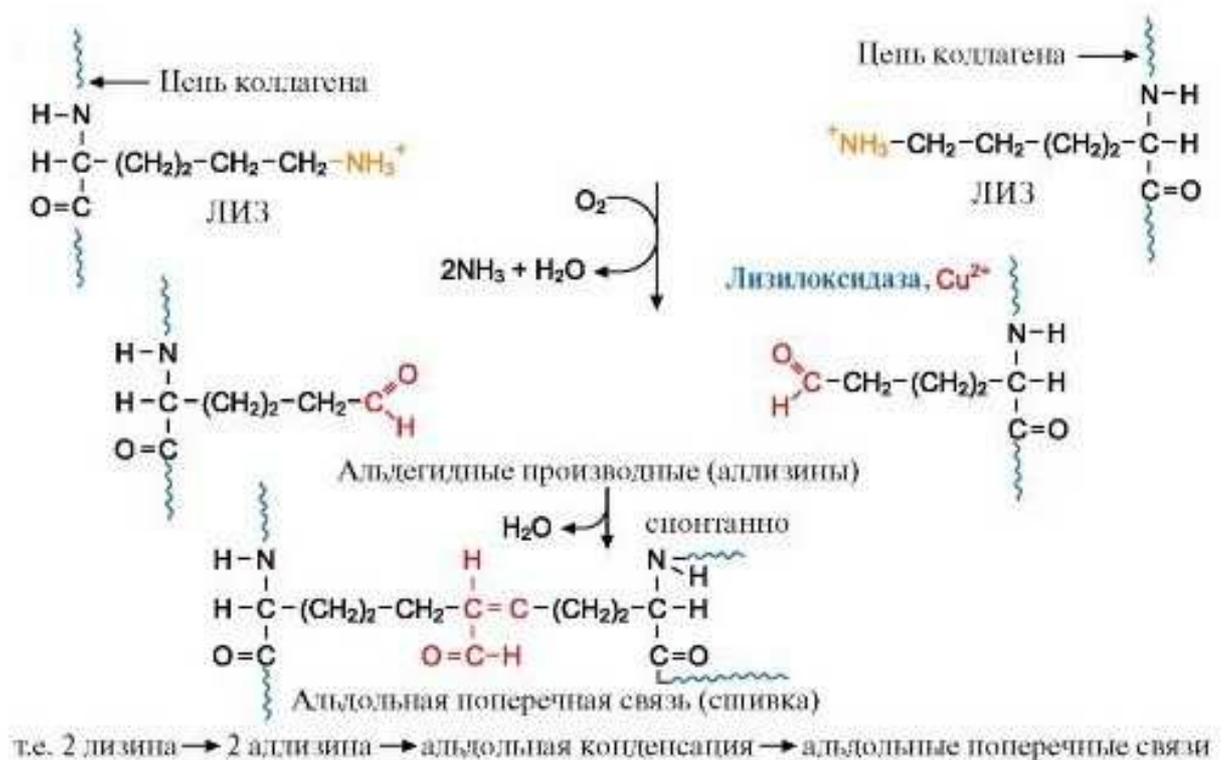


Рисунок 3 – Образование поперечных связей в коллагене [37]

Недавние исследования показывают доказательство того, что биологическая роль LOX может простираться далеко за пределы структурного созревания эластина и коллагена, демонстрируя связи между LOX-активностью и подвижностью раковых клеток и опухолегенезом[25].

Экспрессия LOX регулируется гипоксически-индуцируемыми факторами (HIF), и, следовательно, экспрессия LOX часто регулируется гипоксической опухолью груди, головы и шеи. Пациенты с высокими LOX-экспрессирующими опухолями имеют низкую общую выживаемость. Кроме того, было показано, что ингибирование LOX устраняет метастазы у мышей.

Фактически, недавние исследования показали, что чрезмерная экспрессия LOX является решающей для содействия росту опухоли и метастазированию в нескольких раках, включая рак молочной железы, меланому, не мелкоклеточный рак легких и колоректальный рак[16].

LOX, секретируемый гипоксическими опухолевыми клетками молочной железы, сшивает коллаген в основной мембране и имеет важное значение для рекрутирования CD11b + миелоидных клеток. Клетки CD11b + в свою очередь придерживаются сшитого коллагена и продуцируют матриксную металлопротеиназу-2, которая расщепляет коллаген, усиливая инвазию метастазирующих опухолевых клеток. Напротив, ингибирование LOX предотвращает рекомбинацию клеток CD11b + и метастатический рост.

Повышенная экспрессия LOX и LOXL2 присутствует в различных типах рака (колоректальный, молочной и предстательной желез, легких, мочевого пузыря) [26].

LOX и LOXL2 тесно связаны с десмопластическими областями на инвазивном фронте инфильтрирующих опухолей. Они опосредуют сшивание коллагена / эластина, что увеличивает жесткость внеклеточного матрикса, связанного с увеличением инвазии опухолевых клеток при раке молочной железы и колоректальном раке. LOX и LOXL2 опосредованное сшивание коллагена также отвечает за усиление роста в метастатических моделях ксенотрансплантата рака молочной железы [27].

Кроме того, LOX усиливает метастатический признак ксенотрансплантатов молочной железы у животных, стимулируя транскрипцию TWIST1 в опухолевых клетках. В том же духе индуцируемый гипоксией фактор-1 (HIF-1) вызывает экспрессию нескольких членов семейства LOX в клетках рака молочной железы, включая LOX и LOXL2.

Уровень LOXL2 в сыворотке связан с прогрессированием идиопатического легочного фиброза, что делает его потенциальным диагностическим биомаркером [28].

Таким образом, существует множество экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что LOX и LOXL2 способствуют развитию метастазов в отдаленных органах, таких как легкие, печень и мозг.

Удивительно, но мало известно о роли LOX-белков при образовании метастазов в кости.

LOX синтезируется как предварительный профермент, который отщепляется от эндоплазматического ретикулаума перед гликозилированием образовавшегося N-концевого пропептида и последующим сгибанием C-конца. После введения меди в каталитический сайт профермент высвобождается во внеклеточное пространство[29]. Первоначально предполагалось, что действует LOX в основном как супрессор опухолей, но члены семейства ферментов LOX приобретают все большее значение в роли промоторов прогрессирования опухолей и метастаз. Это делает семейство ферментов LOX идеальной мишенью для диагностики и в дальнейшем лечения метастатических поражений[30].

Большинство исследований было проведено на различных моделях рака молочной железы для оценки потенциальных ролей семейства ферментов LOX в качестве молекулярных мишеней при разработке новых терапевтических препаратов. Гипоксические клетки рака молочной железы вырабатывают повышенный уровень LOXL2, который играет критическую роль в прогрессировании опухоли и метастазировании.

Функциональная молекулярная визуализация экспрессии фермента LOX *in vivo* откроет новые возможности для неинвазивного обнаружения, постановки и мониторинга терапии рака. Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) была использована для многочисленных диагностических и прогностических применений при визуализации рака молочной железы, включая мониторинг реакции на лечение [31]. В ПЭТ используются короткоживущие радиоизотопы (например, фтор-18 [¹⁸F]), чтобы обеспечить динамический мониторинг биохимических процессов в реальном времени процессов, таких как метаболическая и пролиферативная активность на молекулярном уровне[32].

1.4.1 Кофакторы фермента лизилоксидаза

В структуре фермента LOX особый интерес представляют два кофактора: лизилтирозилхинон (LTQ) и связанный ион Cu (II).

1.4.1.1 Лизил тирозилхинон (LTQ)

Фермент LOX попадает в категорию хинон содержащих медь-аминоксидаз, и реакция сильно зависит от кофактора лизилтирозилхинона (LTQ). Кофактор LTQ, представленный на рисунке 4, является уникальным среди хинонов из-за его структуры орто / бензохинона и нейтрального заряда при физиологическом pH. Было показано, что LTQ образуется в процессе самосборки, катализируемая медью реакция между конкретными последовательными остатками тирозина и лизина в присутствии молекулярного кислорода [33].

LTQ имеет решающее значение для LOX-катализируемого превращения лизиновых остатков в α -аминоадипид- δ -полуальдегиды, обычно называемые аллизинами. При окислении лизина ϵ -амин сначала превращается в основание Шиффа посредством реакции с LTQ. В то время как LTQ все еще связан с субстратом, ограничивающее скорость удаление ϵ -протона выдает в качестве промежуточного соединения имин. Последующий гидролиз ими́на приводит к высвобождению альдегидного продукта, аллизина [34].

Молекулярный кислород и ион меди используются для повторного окисления кофактора и получения другого ими́на, получая перекись водорода в качестве побочного продукта.

Дополнительный гидролиз высвобождает аммиак и оригинальный кофактор, завершая каталитический цикл [35].

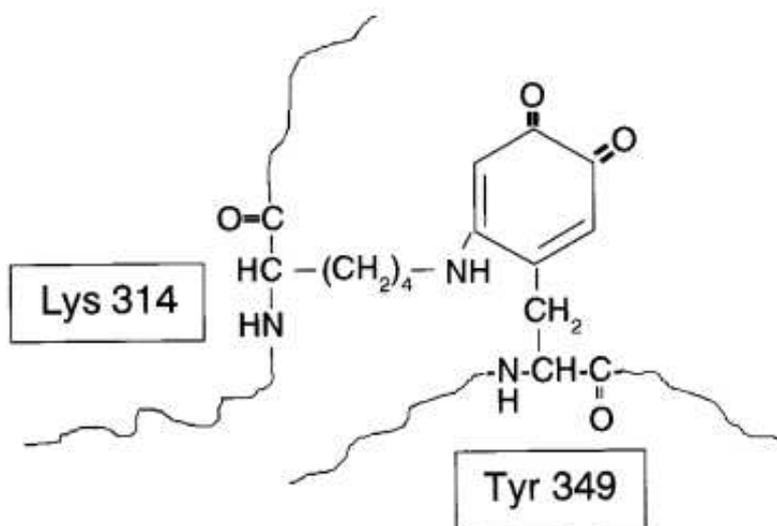


Рисунок 4 – Кофактор лизилтирозиллицин

1.5 Субстрат к ферменту лизилоксидаза LOX

Фермент лизилоксидаза окисляет лизин содержащие олигопептиды и имеет как положительную, так и отрицательную чувствительность к длине пептида и к конкретным положениям дикарбоновых аминокислот к лизину в пределах этих пептидов. Каталитическая эффективность (kcat / KM) увеличивалась с увеличением длины пептидов, содержащих один остаток лизина, симметрично помещенный на фоне увеличения количества глициновых остатков[36].

ПЭТ-визуализация экспрессии ферментов LOX *in vivo* требует разработки LOX-ферментов, нацеленных на лучевые камеры. Наган и Каган идентифицировали олигопептид $\text{Ac-GGGDPKGGGGG-NH}_2$ в качестве субстрата с благоприятными кинетическими свойствами для LOX-опосредованного окисления пептидил лизина. Это делает пептидную последовательность GGGDPKGGGGG подходящим вектором нацеливания lead для разработки радиотерапевтического ПЭТ-луча для молекулярной

визуализации LOX. Введение ^{18}F в пептиды - это хорошо зарекомендовавшая себя техника радиолокализации. Пептидную последовательность GGGDPKGGGGG ацилировали протеолитной группой N-сукцинимидил-4- [^{18}F] фторбензоата ([^{18}F] SFB) (рисунок 5) [37].

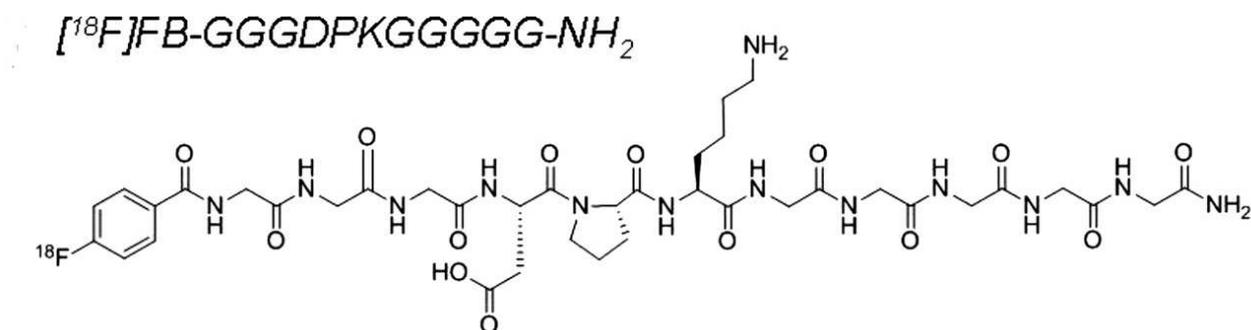


Рисунок 5 - Структура субстрата ^{18}F - GGGDPKGGGGG

1.6 In silico моделирование

In silico моделирование, в котором компьютерные модели разработаны для моделирования фармакологического или физиологического процесса, является логическим продолжением контролируемых экспериментов in vitro. Это естественный результат взрывного увеличения вычислительной мощности, доступный исследователю, постоянно снижаясь[38].

В отличие от экспериментов in vitro, которые существуют изолированно, в in silico моделях исследователь может включать практически неограниченное множество параметров, которые делают результаты более применимыми к организму в целом. In silico моделирование наиболее применимо в фармакокинетических экспериментах, наиболее известным примером которого является разработка трехкамерной модели.

Полезность этих моделей основана как на обоснованности модельной структуры, так и на соответствующих предположениях. Эксперименты *in vivo* подтвердили некоторые, но не все из применяемых силиконовых стратегий[39].

Мы представляем обзор, иллюстрирующий пример того, как в *in silico* моделировании применяется ряд сердечно-респираторных проблем в состояниях здоровья и болезней, целью которых является дать читателю ощущение сложности и допущений, лежащих в основе этого разнообразного и недооцененную стратегию исследований, а также введение в стратегию исследований, которая, вероятно, будет продолжать расти по важности.

В течение последних нескольких лет методы молекулярного моделирования достигли уровня, который позволяет их практически применять в молекулярной биологии, биотехнологии и химической технологии. В академических и промышленных институтах растет число теоретических исследовательских групп, которые изучают структуру и динамику ферментов, нуклеиновых кислот и других биополимеров; проводить рациональный дизайн лекарств; анализировать квантовые свойства простых биомолекул; исследование сгибания белка; и т. д. Все чаще в таких структурных исследованиях используются методы компьютерного моделирования, основанные на уравнениях, описывающих физику биомолекулярных процессов[40].

Химические и биологические явления являются результатом электромагнитных взаимодействий, которые могут быть очень точно описаны на уровне основных квантовых и классических физических теорий. Однако в практических приложениях этого недостаточно.

Во-первых, на основе первых принципов, регулирующих поведение электронов и ядер, мы можем изучать только относительно небольшие молекулы с высокими уровнями точности. Молекулы биологического интереса обычно содержат слишком много атомов для непосредственного использования таких методов[41].

Во-вторых, некоторые интересные свойства, такие как эффективные электростатические движущие силы, гидрофобные взаимодействия, потенциалы средней силы или других многочастичных коллективных явлений, являются неотъемлемыми свойствами больших скопления атомов или молекул и работают на длительных временных масштабах порядка 10^{-10} до 10^{-5} сек. (Для сравнения типичные микроскопические атомные движения, такие как квазипериодические колебания химических связей или углы связи, происходят во временном масштабе от 10^{-14} до 10^{-12} сек.).

Во многих случаях уравнения, описывающие такие коллективные эффекты, были сформулированы, основываясь, грубо говоря, на микроскопических взаимодействиях первого порядка, усредненных по ансамблям атомов или молекул в их стационарных или нестационарных состояниях. Такие «грубозернистые» процедуры приводят, вообще говоря, к не зависящим от времени или зависящим от времени дифференциальным уравнениям, которые очень специфичны для данного класса проблем[42].

Из сказанного выше видно, что эффективность методов молекулярного моделирования ограничена размером молекулярной системы, надежностью теоретических моделей для больших сборок атомов / молекул, эффективностью алгоритмов, применяемых для решения полученных дифференциальных уравнений, а также мощности современных компьютерных технологий.

Элементы эффективной стратегии молекулярного моделирования включают следующее: формулирование надежных теоретических моделей; оптимизация алгоритмов компьютерного моделирования для доступных компьютерных архитектур; моделирование интересующих биомолекулярных процессов; сравнение результатов моделирования с доступными экспериментальными данными и использование проверенных методов для прогнозирования новых структур и новых молекулярных свойств или процессов[43].

Квантовая динамика (КД) в нерелятивистском приближении основана на зависящем от времени уравнении Шредингера. Решая зависящее от времени

уравнение Шредингера для системы частиц, например, электронов или протонов в молекулах, получается зависящая от времени волновая функция, которая может быть использована для вычисления, зависящего от времени распределения электронов или протонного заряда и других электронных свойств[44].

В частности, диссоциация химической связи вещества проявляется в уменьшении электронной плотности в области связи. В свою очередь, если мы изучаем процессы переноса протонов с использованием КД, квантовая волновая функция дает распределение вероятности протона, которое, первоначально локализованное в области донора протонов, изменяет свое среднее положение на область акцептора протонов. Решая зависящее от времени уравнение Шредингера, автоматически учитывается туннельный эффект, квантовое свойство, позволяющее легким частицам проникать в те области энергетических барьеров, которые классически запрещены.

Молекулы состоят из ядер и электронов, поэтому применяются методы квантовой механики. Вычислительные химики часто пытаются решить нерелятивистское уравнение Шредингера с добавлением релятивистских поправок, хотя был достигнут определенный прогресс в решении полностью релятивистского уравнения Дирака. В принципе, можно решить уравнение Шредингера либо в его зависящей от времени, либо в независимой от времени форме, в зависимости от задачи; на практике это невозможно, за исключением очень небольших систем. Поэтому большое количество приближенных методов стремится достичь наилучшего компромисса между точностью и вычислительными затратами[45].

Точность всегда может быть улучшена за счет больших вычислительных затрат. Значительные ошибки могут появиться в моделях *ab initio*, содержащих много электронов, из-за вычислительной стоимости полных релятивистских включительных методов. Это усложняет изучение молекул, взаимодействующих с атомами большой атомной массы, таких как переходные

металлы и их каталитические свойства[46]. Существующие алгоритмы вычислительной химии могут регулярно вычислять свойства малых молекул, содержащих до 40 электронов с ошибками при энергиях менее нескольких кДж / моль. Для геометрий длины связей можно предсказать в пределах нескольких пикометров и углов связи в пределах 0,5 градуса. Обработка более крупных молекул, которые содержат несколько десятков атомов, можно вычислить с помощью более приближенных методов, таких как теория функционала плотности.

В поле зрения есть некоторый спор о том, достаточно ли последних методов для описания сложных химических реакций, таких как биохимия. Большие молекулы могут быть изучены полуэмпирическими приближенными методами. Еще более крупные молекулы обрабатываются классическими методами механики, использующими так называемую молекулярную механику (ММ)[47].

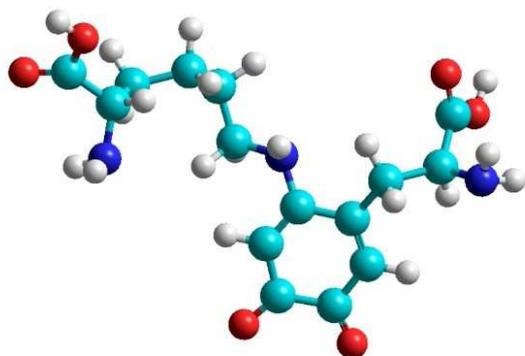
2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объект исследования

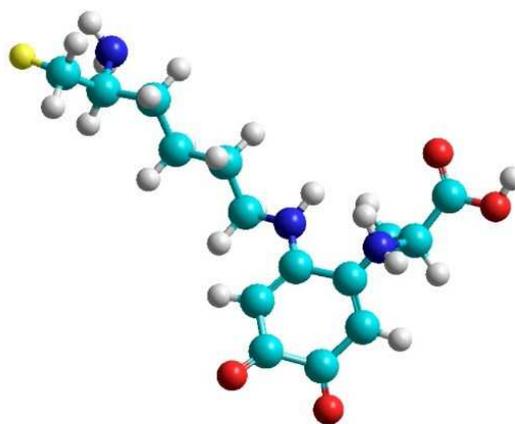
2.1.1 Кофактор лизилтирозилхинон

Объектом исследования является кофактор лизилтирозилхинон к ферменту лизилоксидаза и 3 возможные его конформации с атомом фтора (рисунокб).

А) LTQ



Б) LTQ1



В) LTQ2

Г) LTQ3

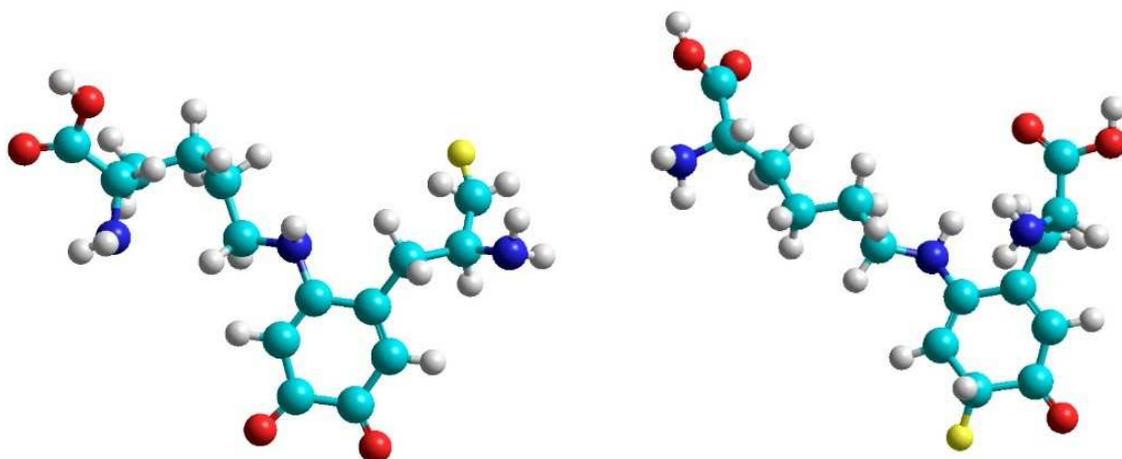


Рисунок 6 - Вторичная структура, а) нативного кофактора лизилтирозиллинона, б) с атомом фтора присоединенным по положению C19 (LTQ1) в) по положению C9 (LTQ2) г) по положению C1 (LTQ3)

Квантово-химическая модель субстрат к ферменту лизилоксидазе – олигопептид ^{18}F - GGGDPKGGGGG, меченый фтором (рисунок 7).

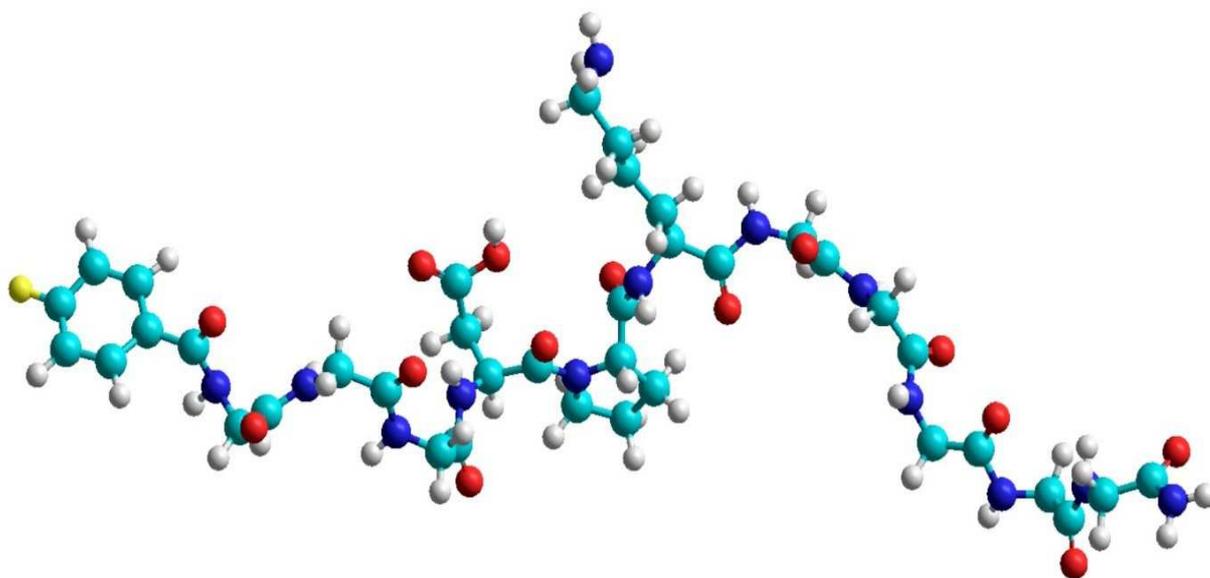


Рисунок 7 – Структура субстрата ^{18}F - GGGDPKGGGGG

2.2 Методы исследования

Молекулярное моделирование, как метод, содержит в себе теоретические и вычислительные методы, используемые для моделирования и имитации действия молекул. Подходы применяются в области химии *in silico*, разработки лекарств, вычислительной биологии и материаловедения для анализа молекулярных систем, начиная от небольших химических молекул и заканчивая крупными биологическими системами.

Элементарные вычисления можно выполнять вручную, но неизбежно компьютеры должны выполнять молекулярное моделирование каждой системы с рациональным размером. Объединяющей чертой подходов молекулярного моделирования служит представление атомистического уровня молекулярных систем. Это включает обработку атомов как минимальной отдельной единицы (молекулярно-механический подход), а также явное моделирование электронов каждого атома (подход квантовой химии).

В настоящее время численно рассчитать энергию многоатомных систем можно используя множество методов. Все методы распределяются на 4 класса: *ab initio* методы, функционала плотности, эмпирические и полуэмпирические методы.

В ядерной физике *ab initio*-методы стремятся описать атомное ядро с нуля путем решения нерелятивистского уравнения Шредингера для всех составляющих нуклонов и сил между ними. Это делается либо для очень легких ядер (до четырех нуклонов), либо путем использования некоторых хорошо контролируемых приближений для более тяжелых ядер. Методы *Ab initio* представляют собой фундаментальный подход. [46].

Для исследования систем, данными методами, используется многоэлектронная волновая функция. Метод функционала плотности для объяснения электронной подсистемы заменяет волновую функцию на функцию электронной плотности. [47].

Полуэмпирические методы квантовой химии основаны на формализме Хартри-Фока, но осуществляют много аппроксимаций и получают некоторые параметры из эмпирических данных. Они очень важны в вычислительной

химии для обработки больших молекул, где полный метод Хартри-Фока без приближений слишком дорог.

В рамках расчетов Хартри-Фока некоторые фрагменты информации (такие как двух электронные интегралы) иногда аппроксимируются или полностью опускаются. Чтобы исправить эту потерю, полуэмпирические методы параметризуются, то есть их результаты устанавливаются набором параметров, как правило, таким образом, чтобы получить результаты, которые наилучшим образом согласуются с экспериментальными данными, но иногда согласуются с *ab initio* результатами.

2.2.1 Метод молекулярной механики

Метод молекулярной механики представляет собой дополнение классической механики, целью изучения которого являются структурные и эмпирические свойства молекулярных систем. Атомы представляются в виде шаров, связанных между собой пружинами или стержнями. Устанавливается функция потенциальной энергии [1] [PW2] $U(r_1, r_2, r_3, \dots)$, которая зависит от расположения атомов, их координат, и численно решается уравнение Ньютона для всех атомов:

$$\frac{-dU}{dr} = m \frac{d^2r}{dt^2} \quad (1)$$

Молекулярная динамика изучает движения атомов в молекулах, молекулярная механика изучает равновесные структуры, переходные состояния и гармонические колебания молекул. Энергии длин связей и валентных углов описываются законом Гука.

Основное применение молекулярной механики относится к области молекулярной динамики. Она использует силовое поле для вычисления сил, действующих на каждую частицу, и подходящего интегратора для моделирования динамики частиц и прогнозирования траекторий. Траектории молекулярной динамики могут быть использованы для оценки

термодинамических параметров кинетических свойств системы или зонда, таких как скорости реакции и механизмы.

Другим применением молекулярной механики является минимизация энергии, при которой силовое поле используется в качестве критерия оптимизации. Этот метод использует соответствующий алгоритм, чтобы найти молекулярную структуру локального минимума энергии. Эти минимумы соответствуют стабильным конформациям молекулы (в выбранном силовом поле), а молекулярное движение можно моделировать как колебания вокруг и взаимные преобразования между этими стабильными конформациями. Таким образом, обычным является поиск локальных методов минимизации энергии в сочетании с глобальной оптимизацией энергии, чтобы найти глобальный энергетический минимум (и другие состояния с низкой энергией). При конечной температуре молекула большую часть своего времени проводит в этих низколежащих состояниях, которые таким образом доминируют над молекулярными свойствами. [48].

Эмпирический метод разрешает изучать молекулы, которые содержат более 1000 атомов, но этот метод не имеет достаточной точности вычисления атомной структуры. Этот метод предоставляет возможность изучать изменение системы во времени, а, значит, и протекание разрушения и пластичности, но не позволяет построить электронный спектр, основываясь на котором определяют электронные свойства структуры.

Молекулярное моделирование физических или биологических структур достигается за счет введения адекватных потенциалов, (дистантных, угловых, торсионных) определяющих взаимодействия связей и внутри- и межмолекулярных степеней свободы[49].

Потенциальная энергия выглядит следующим образом:

$$U = U_{\text{ВМС}} + U_{\text{угл}} + U_{\text{торс}} + U_{\text{электростат}} + U_{\text{эсп}} \quad (2)$$

где $U_{\text{ВМС}}$ – потенциал внутримолекулярной связи, $U_{\text{угл}}$ – потенциал угловой связи, $U_{\text{торс}}$ – торсионный потенциал, $U_{\text{электростат}}$ – электростатический потенциал, $U_{\text{эмп}}$ – эмпирическая часть полного потенциала.

В молекулярно-динамических расчетах при изучении динамики биомолекул употребляют разные потенциальные функции.

Энергия не валентных короткодействующих атом-атомных (ванн-дер-вальсовых) взаимодействий представляется в виде парных потенциалов:

- потенциал Ленарда-Джонса (межмолекулярные взаимодействия)

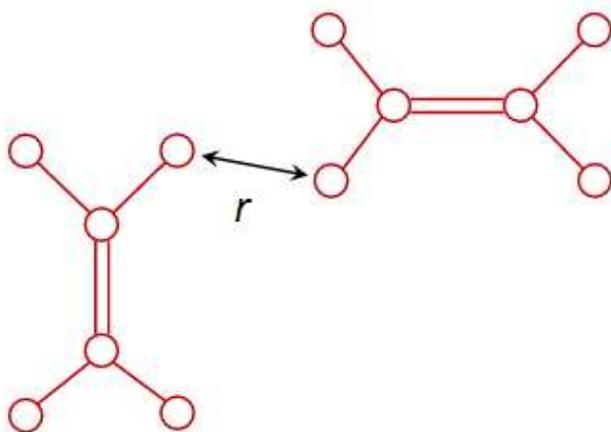


Рисунок 8 – Межмолекулярные взаимодействия

$$U_{\text{ВМС}}(r_{ij}) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right], \quad (3)$$

где σ – эффективный диаметр атома, ϵ – глубина потенциальной ямы;

- потенциал Букингема

$$U_{\text{ВМС}}(r_{ij}) = A \exp\left(\frac{-r_{ij}}{p}\right) - \frac{C}{r_{ij}^6}, \quad (4)$$

где A – амплитуда, а ρ – эффективный радиус взаимодействия;

- потенциал Борна – Хаггинса – Мейера

$$U_{\text{ВМС}}(r_{ij}) = A \exp[B(\sigma - r_{ij})] - \frac{C}{r_{ij}^6} - \frac{D}{r_{ij}^8}, \quad (5)$$

где A , B , C , D , σ – постоянные параметры, определяемые эмпирически или на основе модельных вычислений.

Энергия внутримолекулярной связей, торсионная энергия вращения вокруг одинарных связей представляются в виде следующих потенциалов:

- потенциал гармонической связи (внутримолекулярные взаимодействия)

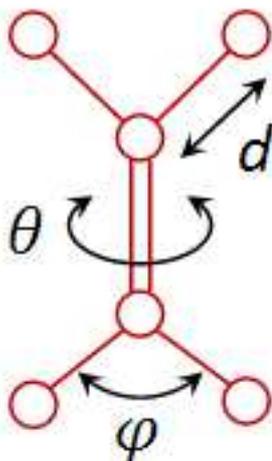


Рисунок 9 – Внутримолекулярные взаимодействия

$$U_{\text{ВМС}}(r_{ij}) = \frac{1}{2} k (r_{ij} - r_0)^2 \quad (6)$$

где k – жесткость связи;

- потенциал Морса

$$U_{BMC}(r_{ij}) = E_0 \left[\left(1 - \exp(-k(r_{ij} - r_0)) \right)^2 - 1 \right], \quad (7)$$

где E_0 – амплитуда потенциала, а k – постоянный параметр;

- потенциалы искажения углов.
- потенциал валентной угловой (гармонической) связи

$$U_{yзл}(\theta_{jik}) = \frac{k}{2} (\theta_{jik} - \theta_0)^2, \quad (8)$$

где θ_0 – равновесное значение валентного угла;

- потенциал гармонической косинусоидальной связи

$$U_{yзл}(\theta_{jik}) = \frac{k}{2} [\cos(\theta_{jik}) - \cos(\theta_0)]^2, \quad (9)$$

- потенциал торсионной угловой (гармонической) связи

$$U_{yзл}(\varphi_{ijkn}) = \frac{1}{2} k (\varphi_{ijkn} - \varphi_0)^2, \quad (10)$$

где φ_0 – равновесное значение торсионного угла;

- потенциал консинусоидальной связи

$$U_{торс}(\varphi_{ijkn}) = A \left[1 + \cos(m \varphi_{ijkn} - \delta) \right]. \quad (11)$$

Вычисление значений координат и скоростей атомов проводится с помощью молекулярно-динамических алгоритмов интегрирование уравнений движения с заданными условиями, основанных на схеме Верле, являющейся, по существу, наиболее простой и обратимой по времени:

$$r(t+\Delta t)=r(t)+\Delta tv\left(t+\frac{1}{2}\Delta t\right), \quad (12)$$

$$v\left(t+\frac{1}{2}\Delta t\right)=v\left(t-\frac{1}{2}\Delta t\right)+\Delta t\frac{f(t)}{m}. \quad (13)$$

Здесь значение силы $f(t)$, действующей на j -й атом и получаемой на базе одного из приведенных выше потенциалов, находится по формуле

$$f_j=\frac{-1}{r_{ij}}\left[\frac{\partial}{\partial r_{ij}}U(r_{ij})\right]r_{ij}. \quad (14)$$

Движение атомов должно зарождаться в заданном ансамбле, в согласии с термодинамическими условиями системы. [50].

Преимущество метода молекулярной механики перед квантово-химическими методами:

- Вычислительная эффективность, позволяющая смоделировать большие молекулярные системы;
- Качественные результаты (геометрия молекул), сравнимые с результатами, произведенными с помощью сложных методов квантовой механики[51].

Недостатками является зависимость от поля сил и пренебрежение многочисленными взаимодействиями. Эмпирический подход к описанию энергии является как преимуществом, так и недостатком данного метода.

2.2.2 Метод молекулярного докинга

Метод молекулярного моделирования, целью которого является поиск наиболее достоверной ориентации и конформации лиганда в центре связывания белка-мишени, называется молекулярным докингом[52]. Молекулярный докинг

позволяет предсказывать пространственную структуру комплекса рецептор–лиганд и свободную энергию его образования, исходя из данных о пространственной структуре рецептора, известной с разрешением в несколько ангстрем (например, полученной с помощью рентгеноструктурного анализа), и химической структуре лиганда.

Достоинства этого метода очевидны: установление ключевых аминокислотных остатков в активном центре белка, позволяющее изучать структурно-динамические основы ферментативных реакций на атомном уровне; рациональный дизайн лигандов и/или рецепторов с заранее заданными селективностью, кинетическими свойствами и т.д. [53].

Докинг также используют в процессе виртуального высокопроизводительного скрининга (сканирования) баз данных (англ. virtual high throughput screening – vHTS), который значительно снижает затраты проектов, направленных на поиск новых эффективных и селективных лигандов. Вследствие этого, развитие и оптимизация алгоритмов докинга является на данный момент областью активных научных разработок.

В общем случае здесь можно выделить две независимые (хотя и взаимосвязанные) составляющие процедуры докинга – алгоритм конформационного поиска и оценочную функцию (ОФ). Алгоритм конформационного поиска

В классическом варианте молекулярного докинга задача алгоритма конформационного поиска сводится к перебору конформационного пространства комплекса за счет варьирования торсионных углов лиганда и его перемещения как целого относительно неподвижной структуры белка-мишени.

Современные алгоритмы конформационного поиска в подавляющем большинстве случаев находят конформации, близкие к экспериментальным, за сравнительно короткое время. Тем не менее есть факторы, также влияющие на успешность докинга, которые часто не учитываются в стандартных алгоритмах. Один из таких факторов – конформационная подвижность белка-мишени, в большинстве случаев сопровождающая связывание лиганда.

Оценочные функции (ОФ), которые используются в ходе докинга, необходимы для подсчета энергии связывания лиганда и рецептора и распределения предполагаемых конформаций лиганда, связанного с белком.

ОФ демонстрирует наиболее удачную и правдоподобную ориентацию лиганда. В случае, когда сопоставляются несколько лигандов, ОФ демонстрирует, какой из лигандов имеет наилучшее сродство к рецептору[54].

В настоящее время имеется множество программ для теоретического докинга белковых молекул. Зачастую все они используют принцип, когда одна из молекул фиксируется в пространстве, а вторая молекула перемещается вокруг первой различными способами. Наряду с этим, все конфигурации перемещений рассчитываются оценочной функцией. Единственной проблемой является то, что расчеты полного конфигурационного пространства затрачивают много времени, и нечасто приводят к одному решению.

Представление о предсказанном положении лиганда в сайте связывания рецептора используются для прогнозирования устойчивости комплекса.

AutoDock — пакет программ, предназначенный для автоматизированного молекулярного докинга. В основном применяется для белок-лигандного докинга, в том числе, с учётом подвижных остатков белка, AutoDock также используется для «слепого докинга», когда активный сайт белка не известен[55].

Докинг с использованием AutoDock 4.2 разбивается на 5 этапов:

- Скачивание/создание файла .pdb с координатами атомов для каждой молекулы.
- Преобразование файлов .pdb формата в .pdbqt формат, используя программы AutoDock Tools.
- Вычисление потенциала в узлах сетки программой AutoGrid.
- Запуск AutoDock для поиска оптимальных расположений лиганда относительно белка опираясь на их энергию связи.

- Визуализация и анализ результатов с помощью программы AutoDock Tools.
- Докинг проводится в кубическую область внутри рецептора (docking box).

Используя программу AutoGrid для рецептора создается набор сеток потенциалов. Они описывают для каждого атома, который включен в docking box, его потенциал взаимодействия с пробным атомом конкретного химического элемента. На каждый вид химического элемента создается по 1-2 файла.

AutoDock, используя эти файлы, проводит докинг. Лиганд, помимо совокупности атомов, связей и зарядов, внутри AutoDock описывается расположением в docking box, поворотом всех активных торсионных углов. AutoDock наилучшим образом перечисляет все возможные комбинации этих параметров, и в конце находит самое оптимальное положение лиганда по отношению к белку исходя из их энергий связывания. В связи с этим, для docking box обычно выбирают куб со стороной 10-30 ангстрем так, чтобы он содержал в себе активный центр рецептора.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Квантово-химическое моделирование

Структура нативного кофактора лизилтирозилхинона была взята с сайта ChEBI (Chemical Entities of Biological Interest). Для проведения исследования структуры нативного кофактора лизилтирозилхинона и его конформаций с атомом фтора использовали программу HyperChem 8.0.

Оптимизацию геометрии всех молекул проводили с использованием силового поля MM+ методом молекулярной механики, алгоритма Polak-Ribiere с RMS градиентом 0.1 ккал/А*моль.

Используя полуэмпирический метод расчета MNDO, проведена Динамика Ланжевена для моделирования присутствия растворителя.

Метод Динамики Ланжевена моделирует движение молекул, подвергнутых случайным столкновениям и силам трения, и может использоваться для моделирования как сольватированных систем, так и систем без использования растворителя. Этот метод включает информацию относительно времени развития молекулярной системы.

В динамике Ланжевена были использованы следующие параметры:

- время выполнения – 1 пс
- временной шаг – 0,001 пс
- температура симуляции – 300 К

Полученные данные после расчетов приведены в таблице 1.

Таблица 1. Параметры квантово-химических моделей кофактора лизилтирозилхинона

	LTQ	LTQ1	LTQ2	LTQ3
Общая энергия, (ккал/моль)	-4480,8	-4398,4	-4153,9	-4377,2
Градиент, ккал/ (моль*Ангстрем)	23,37	19,6	18,31	20,01
Дипольный момент, Дебаи	4,592	6,182	4,436	4,595

Исходя из таблицы 1 видно, что значительных изменений в общей энергии кофактора и его конформации не наблюдается, это значит, что атом фтора не значительно влияет на конформацию кофактора.

Минимизация энергии изменяет молекулярную геометрию, чтобы снизить энергию системы и дает более стабильную конформацию. По мере того как минимизация прогрессирует, она ищет молекулярную структуру, в которой энергия не изменяется с бесконечно малыми изменениями в геометрии. Это означает, что производная от энергии по всем декартовым координатам, называемая градиентом, близка к нулю.

Самая оптимизированная структура по градиенту – LTQ2, так как значение градиента ближе к 0.

Дипольный момент – параметр, характеризующий взаимодействие между двумя молекулами. В нашем случае взаимодействие происходит между коферментом и проферментом с образованием активного фермента лизилоксидазы.

Чем выше дипольный момент, тем легче происходит адсорбция молекулы. Наивысшим дипольным моментом обладает молекула LTQ1, наименьшим

LTQ2. Наиболее близкими значениями дипольного момента к нативному кофактору обладают молекулы LTQ3, LTQ4.

3.2 Молекулярный докинг исследуемых молекул

Структура профермента LOX в формате pdb – файла была взята из банка данных о белках (Protein Data Bank) (рисунок 10).

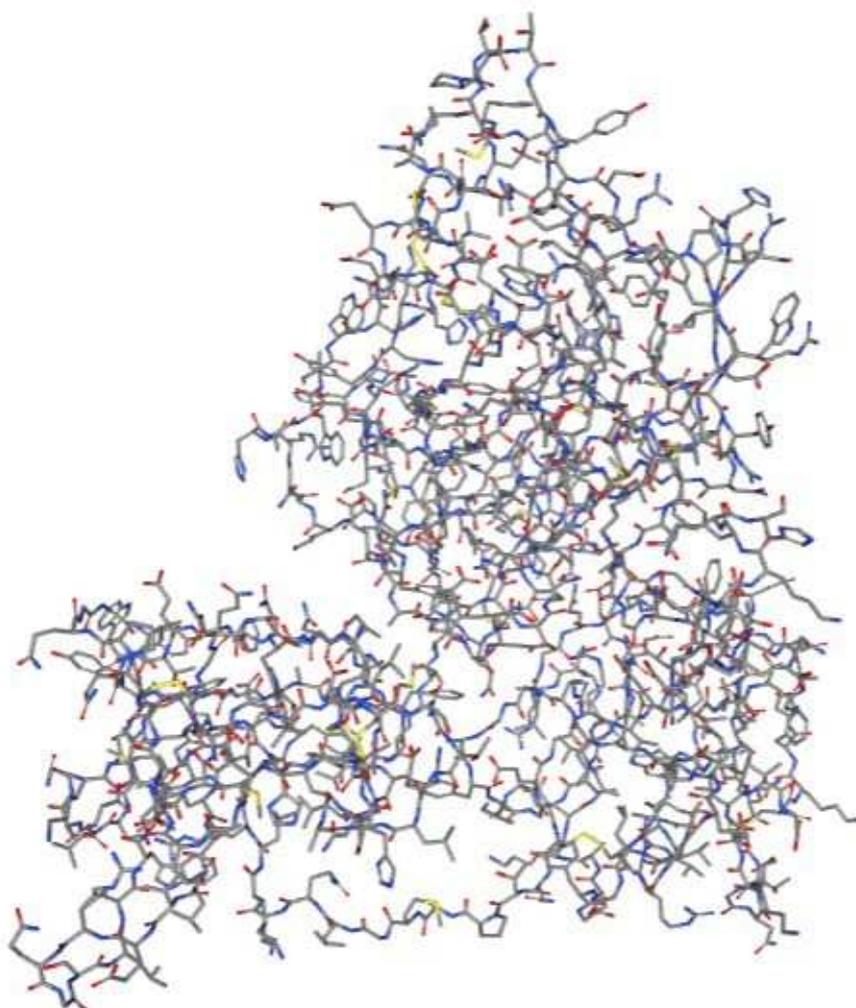


Рисунок 10 - Структура профермента LOX

Молекулярные модели лизилоксидазы, EC 1.4.3.13 были получены с помощью сервера I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement).

I-TASSER представляет собой метод биоинформатики для прогнозирования трехмерной структурной модели белковых молекул из аминокислотных последовательностей. Он обнаруживает шаблоны структуры Protein Data Bank методом, называемым fold recognition (гибкое распознавание). I-TASSER является одним из наиболее успешных методов прогнозирования структуры белка в общесистемных экспериментах CASP (Critical Assessment of protein Structure Prediction /Критическая оценка прогноза структуры белка). CASP представляет собой общесистемный всемирный эксперимент по прогнозированию структуры белка, который проводится каждые два года с 1994 года.

I-TASSER предложил по 5 вероятнейших моделей лизилоксидазы LOX, из которых на основе C-score была выбрана лучшая структура (рисунок 11). C-score это доверительная оценка для анализа качества предсказанных в I-TASSER моделей. Она рассчитывается на основе значимости выравнивания шаблонов и параметров сходимости структур сборных симуляций. C-score обычно находится в диапазоне [-5,2], где C-оценка более высокого значения означает модель с высокой степенью уверенности и наоборот.

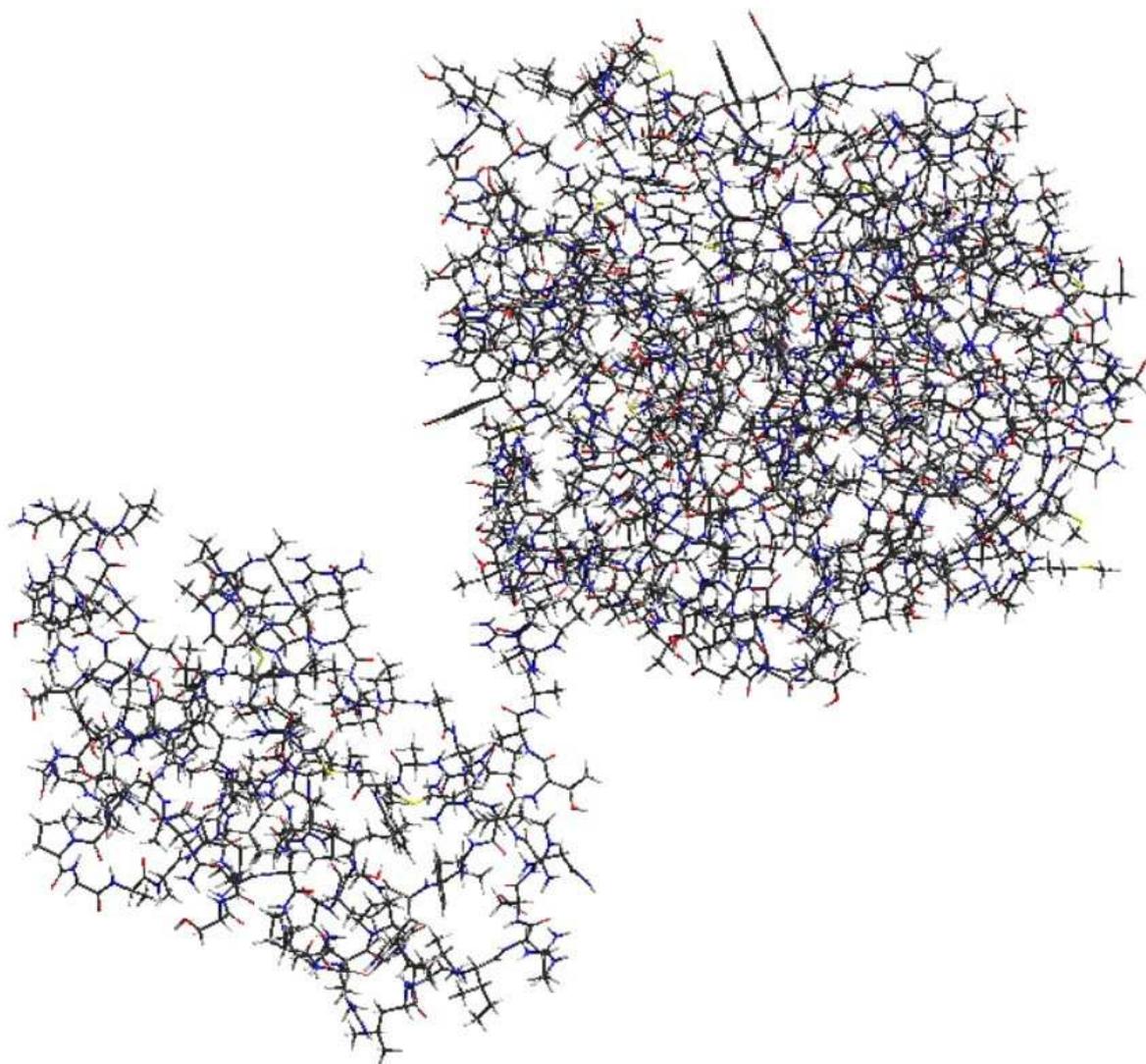


Рисунок 11 – Структура фермента LOX. C-score= -1.67

Молекулярный докинг — это метод молекулярного моделирования, который позволяет предсказать наиболее выгодную для образования устойчивого комплекса ориентацию и положение одной молекулы по отношению к другой.

Молекулярный докинг исследуемых молекул поведился с помощью пакета AutoDock 4.2 и MGTools. AutoDock 4.2 был выбран благодаря его высокой точности и скорости.

В начале преобразовали файлы молекул LTQ, LTQ1, LTQ2, LTQ3, LTQ4 и проферменту LOX из pdb- формата в pdbqt формат. После провели докинг методом Single-docking experiment с AutoDock 4.2 (стыковка одного лиганда с единственным рецептором). В данном методе фиксируются валентные углы и длины связи (также пептидные связи белка устанавливаются как не вращающиеся) изменяются только торсионные углы. Макромолекула (профермент LOX) остается неизменной, гибким является лиганд, именно его положение связей может меняться.

Далее использовали ламарковский генетический алгоритм, так как он является наиболее точным и надежным. При расчете энергии связывания учитываются ван-дер-ваальсовы и электростатические взаимодействия, водородные связи, а также вклад энергии десольватации. В качестве параметров применяются значения силового поля AMBER.

Докинг проводили, не учитывая внешнюю среду (молекулы воды были удалены). Макромолекула и лиганды были протонированы (добавлены водороды).

Полученные данные после докинга представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Энергия связывания молекул кофактора с проферментом лизилоксидазы

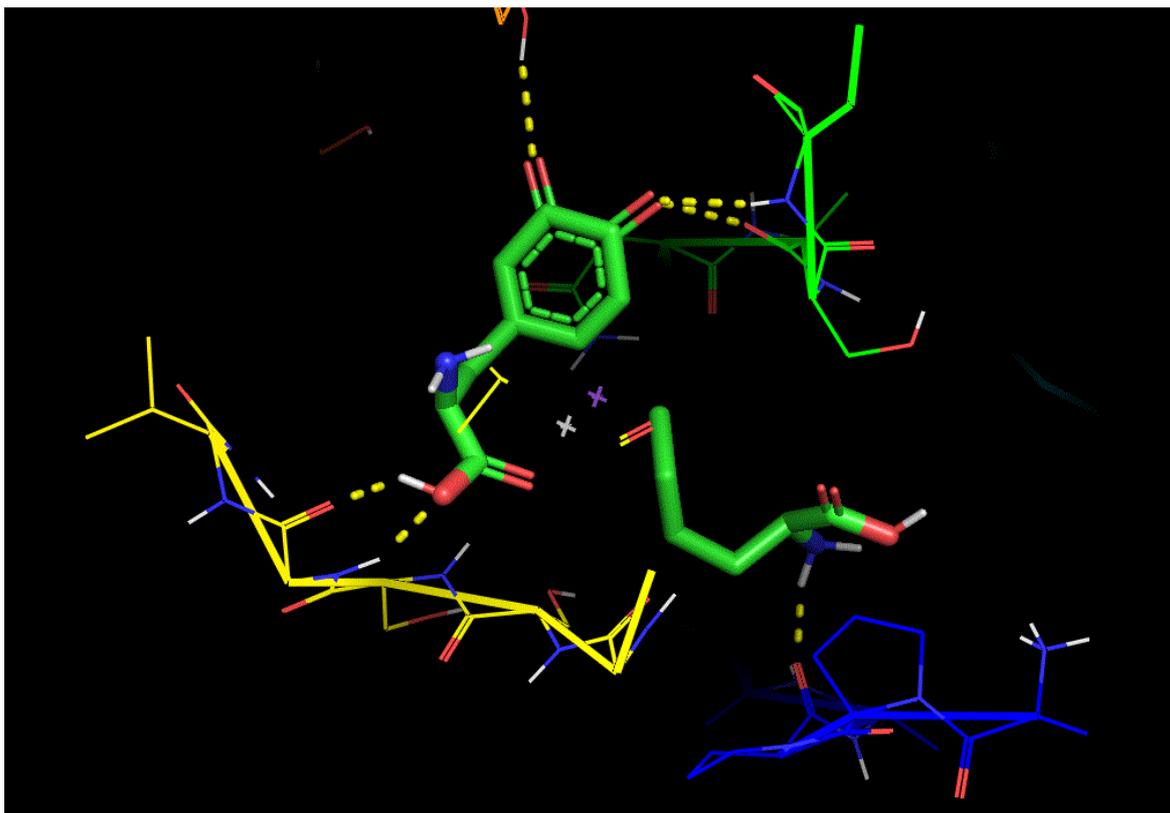
	LTQ	LTQ1	LTQ2	LTQ3
Энергия связывания (ккал/моль)	-5,75	-4,88	-5,32	-5,96
Количество образованных водородных связей	6	2	3	5

Энергия связывания кофактора LTQ значительно не изменяется с присоединением атома F в различные положения. Наиболее близкое значение

по энергии связывания к нативному кофактору занимает конформация LTQ3. Наименьшей энергией связывание обладает конформация LTQ1.

Оптимально геометрически выгодные положения квантово-химических моделей молекул кофактора LTQ и LTQ3 с проферментом лизилоксидазы LOX представлены на рисунке 12.

A)



Б)



Рисунок 12 – Место связывания пролилоксидазы и А) квантово-химической модели нативного кофактора LTQ Б) модель кофактора LTQ3, с присоединенным фтором по положению С1

В образовании водородных связей пролилоксидазы с моделью нативного кофактора LTQ, участвовали следующие аминокислотные остатки: ASN135, VAL 33, GLN7. В случае с кофактором LTQ3, присоединенный фтор на место кислорода, образует одну водородную связь и поэтому молекула кофактора LTQ3 имеет на 1 водородную связь меньше.

В образовании пяти водородных связей LTQ3 участвуют те же аминокислотные остатки, что и в комплексе пролилоксидазы с нативным кофактором LTQ.

3.3 Молекулярная механика

На языке молекулярного моделирования скрининг лигандов можно разделить на две свободно определяемые стадии: «докинг» и «оценка». Этап стыковки направлен на предсказание предпочтительной ориентации молекулы лиганда, связанной с белковым рецептором, а этап оценки нацелен на прогнозирование аффинности связывания лиганда в данной ориентации молекул.

В то время как докинг может успешно протекать с помощью эвристических упрощений (Эвристический алгоритм— это алгоритм решения задачи, правильность которого для всех возможных случаев не доказана, но про который известно, что он даёт достаточно хорошее решение в большинстве случаев.), оценка лигандов, основанная на приближенных расчётных функциях может давать существенные недостатки.

Основанные на физике подходы, такие как моделирование молекулярной динамики (FEP / MD) с использованием свободной энергии, представляют собой наиболее точный подход к количественной характеристике свободной энергии связывания малых лигандов с макромолекулами.

Расчет свободных энергий является одним из наиболее важных применений биомолекулярных симуляций. Свободная энергия связывания определяется из уравнения (15):

$$\Delta G = -RT \ln K_b = RT \ln K_d \quad (15)$$

Константа диссоциации часто используется для описания аффинности между лигандом и белком. Константа диссоциации показывает, насколько прочно лиганд связывается с белком, что зависит от нековалентных взаимодействий между ними, таких как водородные связи, электростатические взаимодействия, гидрофобные и ван-дер-Ваальсовы силы. Чем меньше значение константы

диссоциации, тем лучше аффинность между лигандом и белком. Но чем больше константа связывания, тем лучше аффинность между лигандом и белком.

Образование белок-лигандного комплекса можно описать как двунаправленный процесс:



При этом константу связывания можно выразить:

$$K_b = \frac{[L][P]}{[LP]} \quad (17)$$

Выразим константу связывания из уравнения (15), так как по уравнению (17) возможности найти ее нет:

$$K_b = K_0 e^{\frac{\Delta G}{RT}} \quad (18)$$

После докинга мы получили энергии связывания для всех молекул кофактора с атомом фтора и нативного кофактора. Разницу энергий связывания между ними можно записать в виде:

$$\Delta \Delta G = \Delta G_{LTQ} - \Delta G_{LTQ1,2,3,4} \quad (19)$$

При неизменном K_0 можно вычислить отношение констант связывания нативного кофактора к кофакторам с атомом фтора:

$$\frac{K_b^{LTQ1,2,3,4}}{K_b^{LTQ}} = \frac{K_0 e^{\frac{\Delta G_{LTQ1,2,3,4}}{RT}}}{K_0 e^{\frac{\Delta G_{LTQ}}{RT}}} = \exp\left[\frac{\Delta G_{LTQ} - \Delta G_{LTQ1,2,3,4}}{RT}\right] = e^{\frac{\Delta \Delta G}{RT}} \quad (20)$$

Если соотношение $\frac{K_b^{LTQ1,2,3,4}}{K_b^{LTQ}}$ дает больше единицы, значит эти коферменты имеют лучшую аффинность. Данные по разнице энергий связывания кофакторов с фтором и нативного $\Delta\Delta G$, а также значение соотношений их констант связывания представлены в таблице 3.

Таблица 3 Оценка аффинности квантово-химических моделей кофактора лизилтирозилхинона, меченного атомами фтора LTQ, LTQ1,2,3

	$\Delta\Delta G$, ккал/моль	K_b^i/K_b
LTQ	0	1
LTQ1	-0.87	0.99962
LTQ2	-0.43	0.99981
LTQ3	0.21	1.00009
*- константа связывания коферментов с фтором		

Как видно из таблицы 3 наиболее прочно с пролизилоксидазой связывается кофактор с атомом фтора, присоединённым в положении C1 - LTQ3. Кофакторы LTQ1,2 имеют схожие аффинности к пролизилоксидазе, значение которых ниже, чем у нативного кофермента.

3.4 Сравнение полученных данных с существующим РФП

Идентифицированный Наганом и Каганом олигопептид Ac-GGGDPKGGGGG-NH₂ является субстратом с благоприятными кинетическими свойствами для LOX-опосредованного окисления пептидил лизина.

Структура субстрата, меченного F¹⁸. была оптимизирована в программе Hyperchem 8.0.

Полученные общая энергия, дипольный момент, градиент и энергия связывания сравнивались с аналогичными параметрами молекул кофактора и представлены в таблице 4.

Таблица 4 Сравнительная характеристика субстрата ^{18}F - GGGDPKGGGGG и молекул лизилтирозилхинона LTQ, LTQ1,2,3

	LTQ	LTQ1	LTQ2	LTQ3	субстрат
Общая энергия, ккал/моль	-4480,8	-4398,4	-4153,9	-4377,12	-11946,5
Градиент, ккал/ (моль*Ангстрем)	23,37	19,6	18,31	20,01	18,34
Дипольный момент, Дебай	4,59	6,18	4,44	4,59	6,72
Энергия связывания ΔG , ккал/моль	-5,75	-4,88	-5,32	-5,96	-6,1

Энергия связывание субстрата ^{18}F - GGGDPKGGGGG и фермента лизилоксидазы сопоставима с энергией связывания молекулы лиганда LTQ3, они имеют незначительное расхождение. Значения энергии связывания остальных молекул уже более отличны от энергии связывания субстрата.

3.5 Биогенез кофактора лизилтирозилхинона

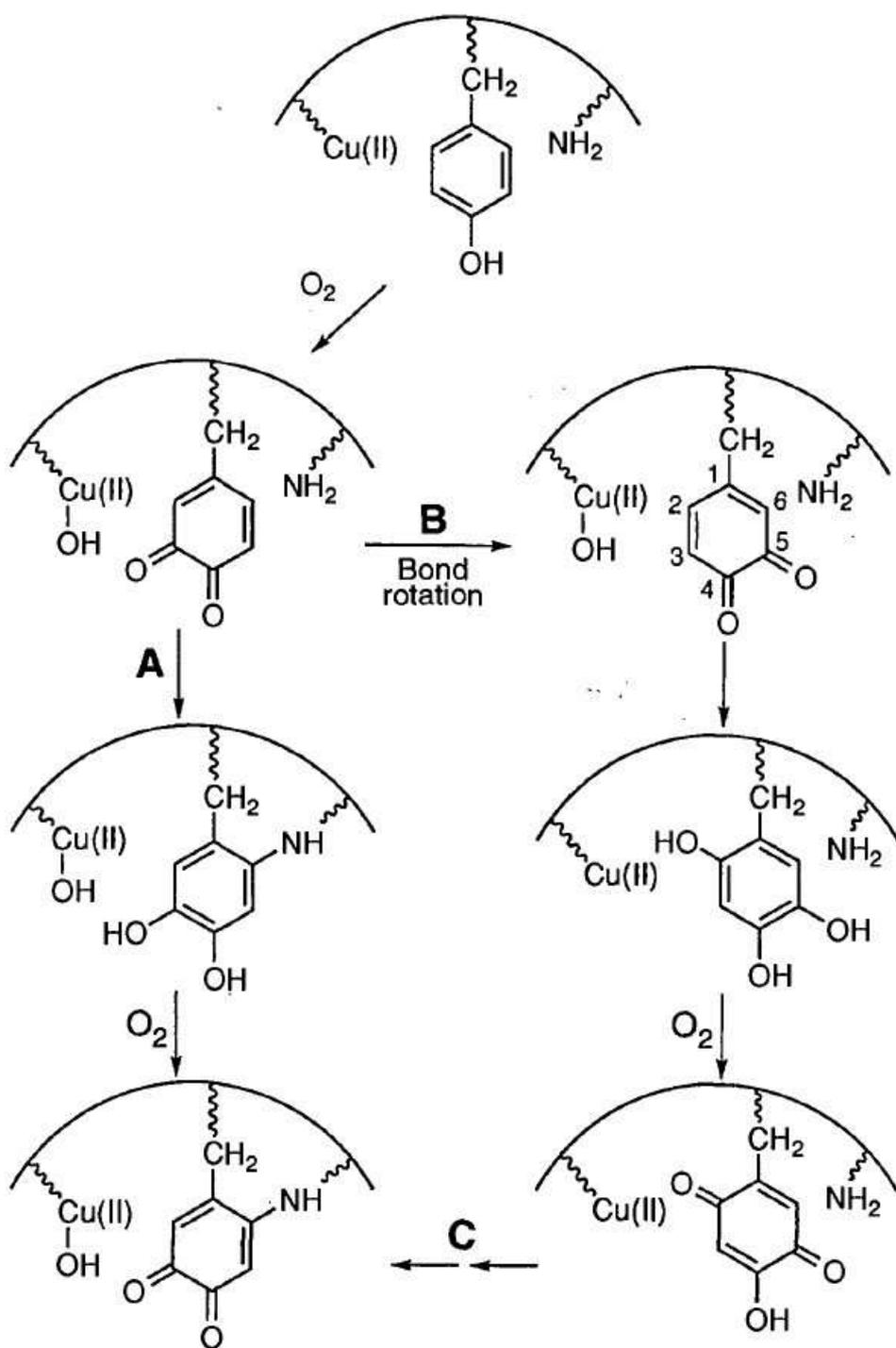


Рисунок 13 - Предполагаемый путь биогенеза кофермента лизил тирозилхинона

Возможный механизмы образования кофермента лизил тирозилхинона описан на рисунке 13. Такой структуры кофермент может возникнуть в результате гидроксирования инициала Тург с образованием 3,4-дигидроксифенилаланина (доп), с последующим окислением доп до допа

хинона и последующей нуклеофильной атаки Е-аминогруппой боковой цепи Lys, чтобы генерировать аминокхинол (рисунок 14, путь А).

По аналогии с TPQ (6-гидроксидопахинон), превращение пептидили Tug в доп предлагается от кольца гидроксирования с образованием допа хинона. В случае TPQ (путь Б) вращение связи вокруг р-углерода помещает электрофильный углерод (С-2) допа хинона в непосредственной близости к иону гидроксида меди (или воде), который расположен для нуклеофильной атаки в положении С-2. Хотя это не указано на рисунке 13, аналогичная связь может возникать в биогенезе LTQ в зависимости от геометрической ориентации Lys314 в активном месте.

На пути С показан альтернативный ход биогенеза LTQ, в котором сначала формируется TPQ, а затем происходит атака лизиловой боковой цепи на карбониле С-2 TPQ для генерации LTQ. Модельные исследования аналогов TPQ в их ионизированной анионной форме показали, что амины реагируют исключительно на карбониле С-5, что указывает на то, что путь С будет возможен только в том случае, если предшественник TPQ для LTQ протонируется при углероде С-4.

Учитывая низкую рК (около 3, где рК, - отрицательный десятичный логарифм константы диссоциации), определенная для TPQ в бычьей сывороточной аминоксидазе, мы рассматриваем этот крайне маловероятный, но благоприятный путь А на рисунке 14 для биогенеза LTQ.

3.6 Синтез кофактора лизилтирозилхинона LTQ3

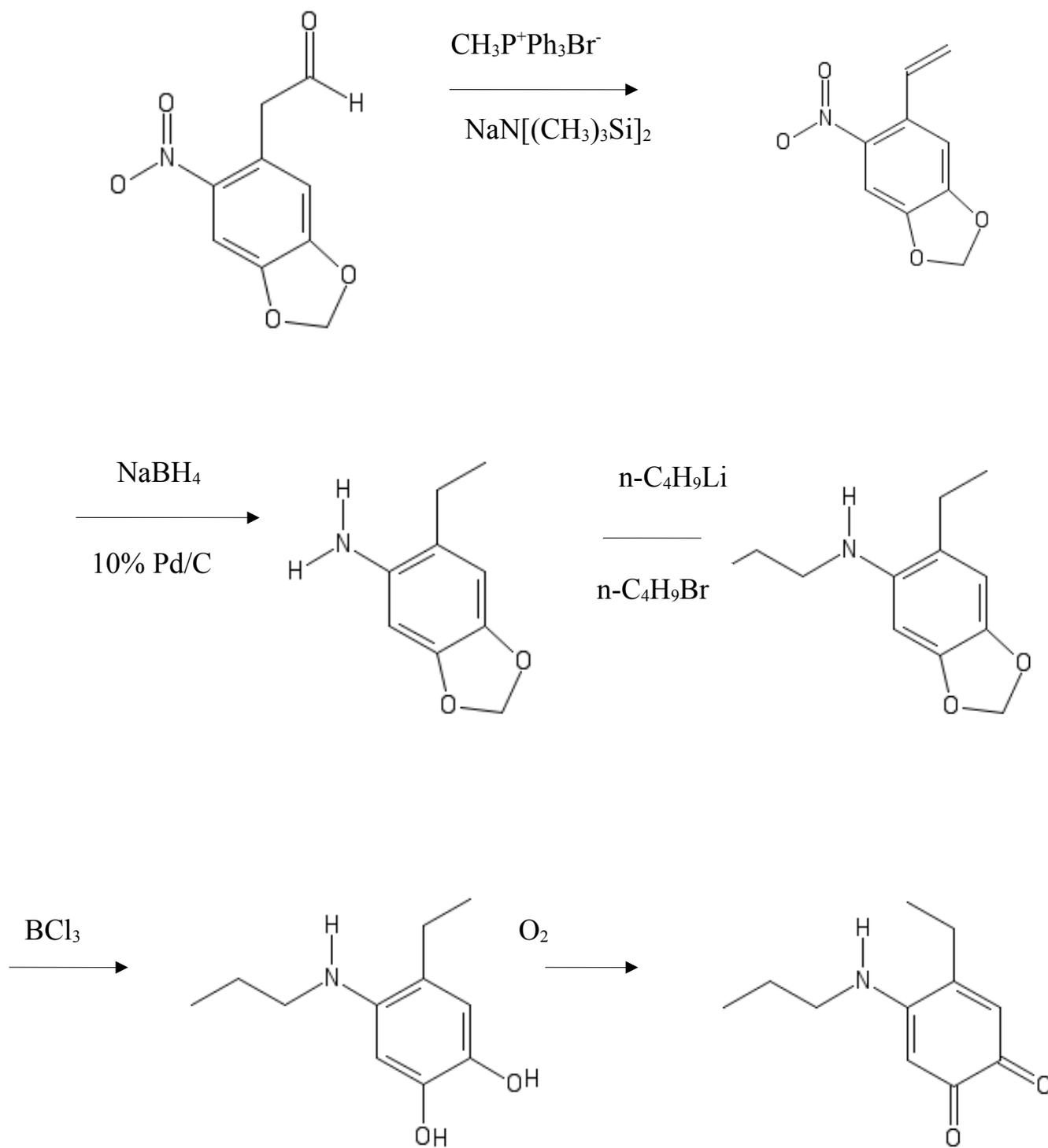
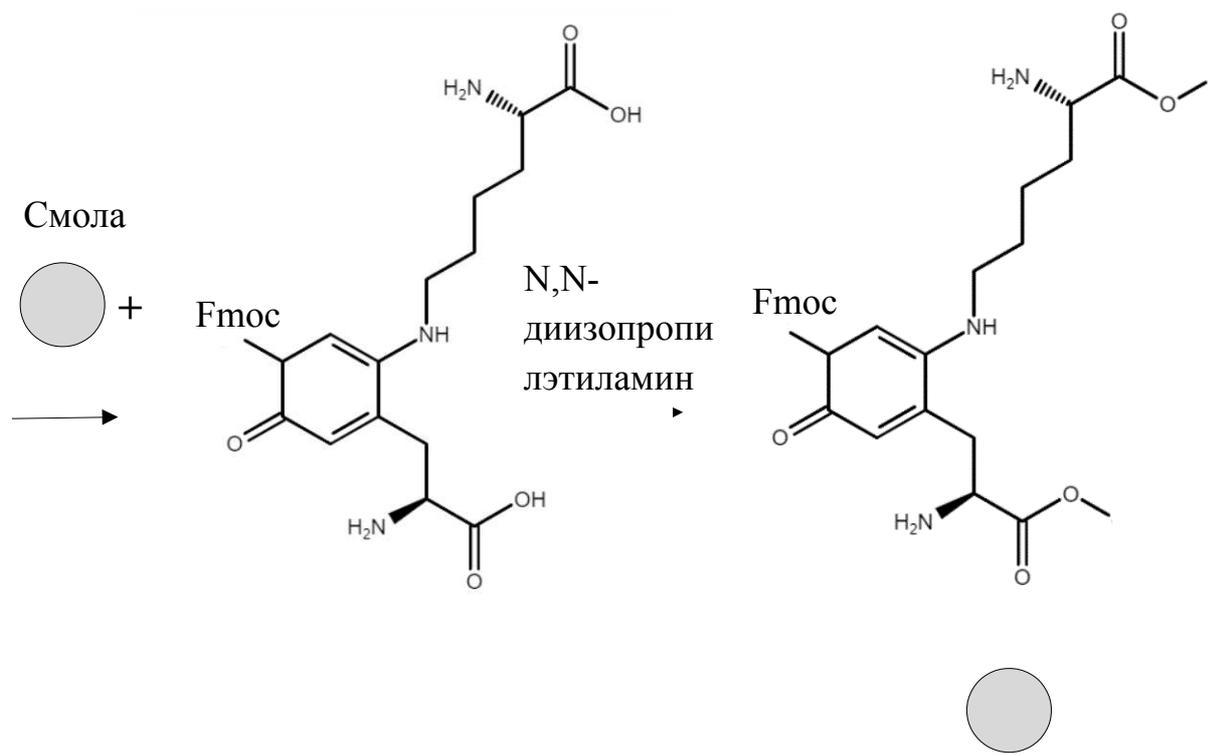


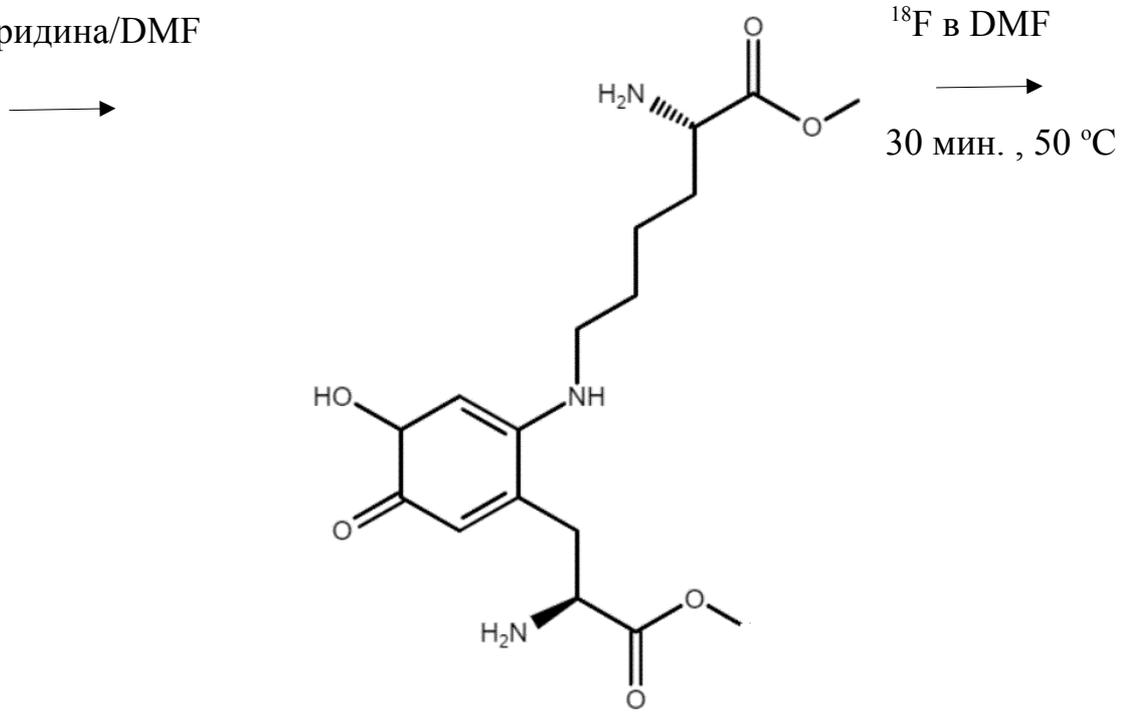
Рисунок 14 - Предполагаемый путь синтеза кофермента лизил тирозилхинона

Все подробности синтеза и сама схема представлена в статье Minae Mure (39).

3.7 Присоединение радиоактивной метки F18



HOBT в 20%
пиперидина/DMF



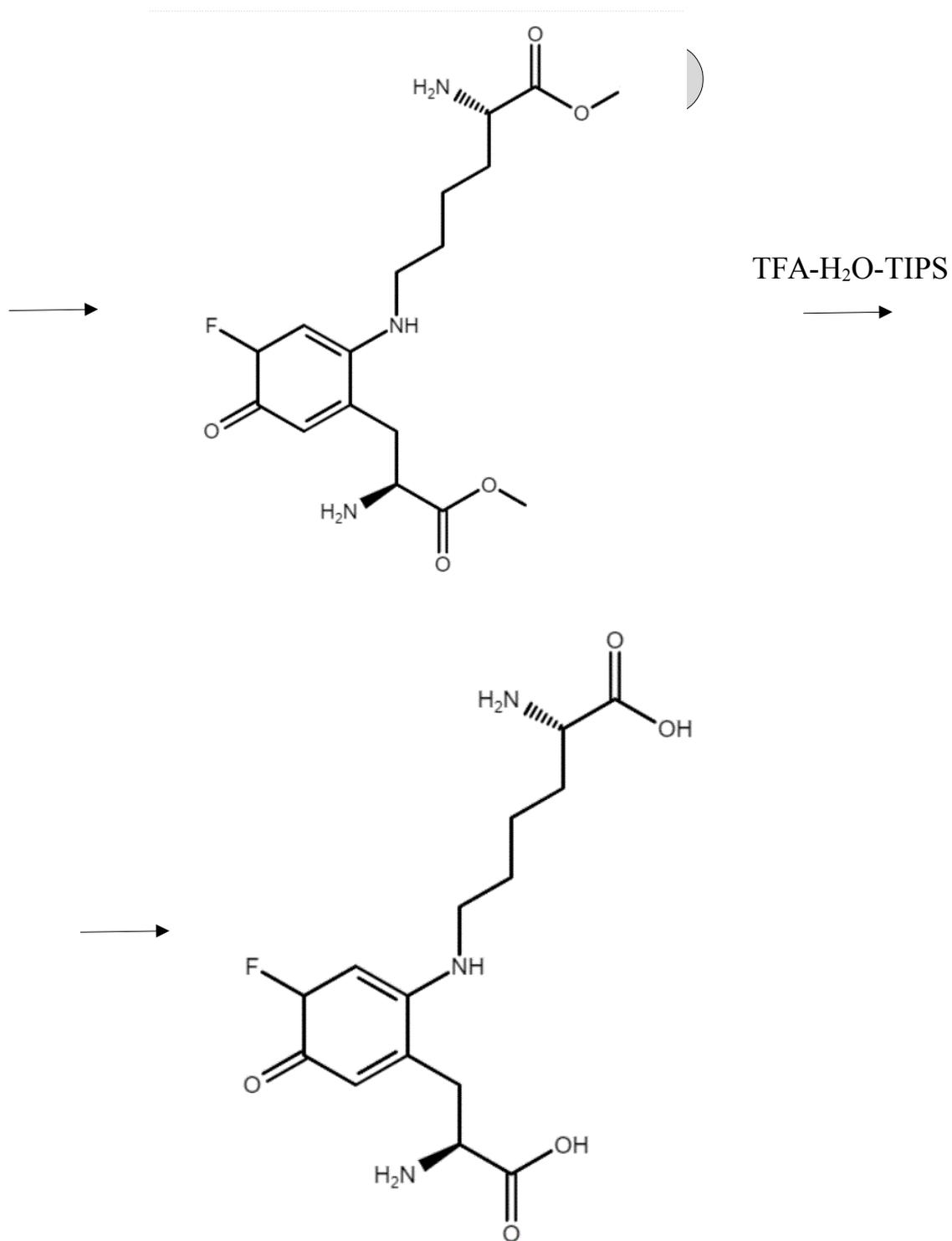


Рисунок 15 – Схема присоединения радиоактивной метки, с использованием защитной группы Fmoc и смолы Ринке [27]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования были разработаны 3 возможных квантово-химических модели кофактора лизилоксидазы – лизилтирозилхинона, меченого фтором.

В программе HyperChem 8.0 были проведены полуэмпирические расчеты квантово-химических моделей нативного кофактора лизилтирозилхинона, кофермента с атомом фтора присоединенным по положению C19 (LTQ1), по положению C9 (LTQ2), по положению C1 (LTQ3).

Рассчитали для каждой модели общую энергию, градиент и дипольный момент, используя Динамику Ланжевена, моделирующую присутствие растворителя.

По полученным значениям наиболее близка к модели нативного кофактора квантово-химическая модель LTQ3. Она обладает схожим дипольным моментом и значением общей энергии равным -4377,2 ккал/моль. Также LTQ3 обладает наибольшей аффинностью к проферменту, рассчитанной из соотношения констант диссоциации. Все это говорит о более стабильной геометрии данной модели, сравнимой с геометрией нативного кофактора.

Провели докинг всех моделей кофермента к проферменту, а также модели субстрата ^{18}F - GGGDPKGGGGG к ферменту LOX.

Среди всех квантово-химических моделей кофермента, наибольшей энергией связи обладает LTQ3 равной -5,96 ккал/моль. В образовании комплекса между проферментом и кофактором LTQ3 участвуют 5 водородных связей. Субстрат ^{18}F - GGGDPKGGGGG имеет энергию связи с LOX равную -6,1 ккал/моль.

Представили схему биогенеза кофермента лизилтирозилхинона.

Предложили возможный путь синтеза кофактора LTQ3 и реакции присоединения к нему радиоактивной метки в виде радиоизотопа ^{18}F .

Как мы можем видеть, наша квантово-химическая модель кофактора LTQ3 обладает схожим значением энергии связи с энергией связи субстрата ^{18}F -GGGDPKGGGGG. Исходя из всего вышесказанного, можно предположить, что кофермент LTQ3 покажет хорошие результаты в исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

LOX – лизилоксидаза

LTQ – лизилтирозилхинон

LTQ1 – лизилтирозилхинон с атомом F, присоединенным по положению C19

LTQ2 – лизилтирозилхинон с атомом F, присоединенным по положению C9

LTQ3 – лизилтирозилхинон с атомом F, присоединенным по положению C1

КД – Квантовая динамика

Fmoc – флуоренилметилоксикарбонил

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. CRICK, F. Central Dogma of Molecular Biology / F. CRICK // Nature. -1970. - V. 5258. - p. 561–563.
2. Кухта, В. К. Биологическая химия: учебник / В. К. Кухта, Т. С. Морозкина, Э. И. Олецкий, А. Д. Таганович; под ред. А. Д. Тагановича. – Минск: Асар, М.: Издательство БИНОМ, 2008. – 688с.
3. Комов В.П. Биохимия: учеб. для вузов. – М.: Дрофа, 2004 – 640 с.
4. Биохимическая химия: пособие для вузов / под ред. Н.И. Ковалевской. – 2-е изд., перераб. и доп. – М: издательский центр АКАДЕМИЯ, 2008. –256 с.
5. Day, H.A. i-Motif DNA: Structure, stability and targeting with ligands/ H.A. Day [and all] // Bioorganic & Medicinal Chemistry. - 2014. – V. 22. - p. 4407–4418.
6. Холонудров, Х.Т. Методы Молекулярной Динамики Для Моделирования Физических И Биологических Процессов/ Х.Т. Холонудров // Физика Элементарных Частиц и Атомного Ядра. - 2003. - Т. 34. - С. 473 – 515.
7. Кобзев, Г.И. Применение неэмпирических и полуэмпирических методов в квантово-химических расчетах: учебное пособие / Г.И. Кобзев – Оренбург: ГОУ ОГУ, 2004. – 150 с.
8. Пырков, Т.В. Молекулярный докинг. Роль не валентных взаимодействий в образовании комплексов белков с нуклеотидами и пептидами/ Т.В. Пырков, И.В. Озеров // Биоорганическая химия. – 2010. - № 4. - С. 1-29.
9. McAllister, S. The tumor-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis / S. McAllister, R. A. Weinberg // Nature Cell Biology. - 2014. - V. 16. - p. 717-727.
10. Gartland, A. The role of lysyloxidase, the extracellular matrix and the pre-metastatic niche in bone metastasis / A. Gartland [and all] // Jornal of Bone Oncology. - 2016. - V. 5. - p. 100-103.

11. Alsulaiman, M. Trackman Lysyl oxidase propeptide stimulates osteoblast and osteoclast differentiation and enhances PC3 and DU145 prostate cancer cell effects on bone in vivo/ M. Alsulaiman [and all] // J. Cell Commun. Signal. - 2015. - V. 1. - p. 17-31.
12. Cox, T. R. The hypoxic cancer secretome induce pre-metastatic bone lesions through lysyloxidase/ T. R. Cox [and all] // Nature. - 2015. - V. 522. – p. 106-110.
13. Schwaiger, M. How Many PET Tracers Do We Need? / M. Schwaiger, H. Wester // Nucl. Med. - 2011. - V. 52. - p. 36–41.
14. Кушлинский, Н.Е. Система rank/rankl/opg при метастазах и первичных новообразованиях костей / Н.Е. Кушлинский, Ю.А. Тимофеев, Е.С. Герштейн // Молекулярная медицина. - 2013. - №6. – С. 3-10.
15. Таипов, М.А. Роль каскада циклооксигеназы-2 в метастазировании рака молочной железы / М.А. Таипов [и др.] // Маммология. – 2013. - №3. – С. 12-17.
16. Аполихин, О.И. Диагностика нарушений костного метаболизма при онкологических заболеваниях/ О.И. Аполихин, Б.Я. Алексеев, А.В. Сивков // Исследования и практика в медицине. – 2015. Т. 2. - №4. – С. 88-97.
17. Plathow, C. Tumor Cell Metabolism Imaging / C. Plathow, W. A. Weber // Nucl. Med. - 2016. - V. 49. - p.43-63.
18. Erler, J. T. Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche / J. T. Erler [and all] // Cancer Cell. - 2009. - V. 15. - p. 35–44.
19. Jacobson, O. Novel Method for Radiolabeling and Dimerizing Thiolated Peptides Using ¹⁸F-Hexafluorobenzene / O. Jacobson [and all] // Bioconjugate Chemistry. - 2015. - V. 26. - p. 2016-2020.
20. Wuest, M. Targeting lysyl oxidase for molecular imaging in breast cancer / M. Wuest [and all] // Breast Cancer Research. - 2015. - V. 17. - p. 100-107.

21. Siqueira, J. Clinical and Preclinical Use of LOX-1-Specific Antibodies in Diagnostics and Therapeutics / J. De Siqueira, I. Abdul Zani, D. A. Russell // *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* - 2015. - V. 8. - p. 458-465.
22. Thomas, R. C. Lysyl Oxidase, a Targetable Secreted Molecule Involved in Cancer Metastasis / R. Cox Thomas, A. Gartland, J. T. Erler // *Cancer Research.* - 2016. - V. 76. - p. 188-192.
23. Kanagasabai, B. Multistep Modeling Strategy to Improve the Binding Affinity Prediction of PET Tracers to Amyloid A#42: A Case Study with Styrylbenzoxazole Derivatives / B. Kanagasabai [and all] // *ACS Chem Neurosci.* -2016. - V. 7. - p. 1698-1705.
24. Christelle, M. Quantification of β -aminopropionitrile, an inhibitor of lysyl oxidase activity, in plasma and tumor of mice by liquid chromatography tandem mass spectrometry / M. Christelle [and all] // *Biomed. Chromatogr.* - 2014. - V. 28. - p. 1017–1023.
25. Mure, M. Synthesis and Characterization of Model Compounds of the Lysine Tyrosyl Quinone Cofactor of Lysyl Oxidase / M. Mure, S. X. Wang, J.P. Klinman // *J. Am. Chem. Soc.* - 2003. - V. 125. - p. 6113-6125.
26. Klinman, J. P. Intrigues and Intricacies of the Biosynthetic Pathways for the Enzymatic Quinocofactors: PQQ, TTQ, CTQ, TPQ, and LTQ / J. P. Klinman, F. Bonnot // *Chem. Rev.* - 2014. - V. 114. - p. 4343–4365.
27. Mading, P. Module-assisted synthesis of the bifunctional labelling agent N-succinimidyl 4-[^{18}F] fluorobenzoate ([^{18}F] SFB) / P. Mading, F. Fuchtner, F. Wust // *Applied Radiation and Isotopes.* - 2005. - V. 63. - p. 329-332.
28. Peinado, H. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases / H. Peinado [and all] // *Nat Rev Cancer.* - 2017. - V. 17. - p. 302-317.
29. Sánchez-Morgan, N. UXT Is a LOX-PP Interacting Protein That Modulates Estrogen Receptor Alpha Activity in Breast Cancer Cells / N. Sánchez-Morgan [and all] // *Send to J Cell Biochem.* - 2017. - V. 118. - p. 2347-2356.

30. Lynch, M. Investigation into Structural Changes of the Copper Binding Site in Lysyl Oxidase upon Substrate and Inhibitor Docking / M. Lynch, F. Ryvkin // *Inorganic Chemistry*. - 2013. - V. 21. - p. 50-57.
31. Swechha, M. Structural analysis of protein lysyl oxidase: modelling and simulation study / M. Swechha, K. Puneet, S. Sangeeta // *J. of Biotech Research*. -2017. - V. 8. - p. 9-17.
32. Шадрина, М.С. Молекулярный докинг производных гуанозиннуклеотидов в гтф-связывающие белки / М.С. Шадрина [и др.] // *Вестн. Моск. Ун-та.* – 2005. - Т. 46. - № 6. - С. 363- 369.
33. Faina, R. A peptide model of the copper-binding region of lysyl oxidase / R. Faina, T.G. Frederick // *Journal of Inorganic Biochemistry*. - 2004. - V. 98. - p. 1427-1435.
34. Kufareva, I. Methods of protein structure comparison / I. Kufareva, R. Abagyan // *Methods Mol. Biol.* - 2012. - V. 857. - p. 231-257.
35. Bollinger, J. A. The Formation of Lysine Tyrosylquinone (LTQ) Is a Self-Processing Reaction. Expression and Characterization of a Drosophila Lysyl Oxidase / J. A. Bollinger, D.E. Brown, D. M. Dooley // *Biochemistry*. - 2005. - V. 44. - p. 11708-11714.
36. Minae, M. Tyrosine-Derived Quinone Cofactors / M. Minae // *Acc. Chem. Res.* - 2004. - V. 37. - p. 131-139.
37. Smith-Mungo, LI. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology / LI. Smith-Mungo, HM. Kagan // *Matrix Biol.* - 1998. - V. 16. - p. 387-98.
38. Ward, ST. Evaluation of serum lysyl oxidase as a blood test for colorectal cancer / ST. Ward [and all] // *Eur. J. Surg. Oncol.* - 2014. - V. 40. - p. 731-738.
39. Minae, M. Synthesis and Characterization of Model Compounds of the Lysine Tyrosyl Quinone Cofactor of Lysyl Oxidase / M. Minae [and all] // *J. Am. Chem. Soc.* - 2003. - V. 125. - p. 6113–6125.

40. Woo, HJ. Calculation of absolute protein-ligand binding free energy from computer simulations / HJ. Woo, B. Roux // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. - 2005. - V. 102. - p. 6825-6830.
41. Innis, RB. Consensus nomenclature for in vivo imaging of reversibly binding radioligands / RB. Innis [and all] // J. Cereb. Blood Flow. Metab. - 2007. - V. 27. - p. 1533-1539.
42. Yuqing, D. Computations of Standard Binding Free Energies with Molecular Dynamics Simulations / D. Yuqing, R. Benoit // J. Phys. Chem. B. - 2009. - V. 113. - p. 2234–2246.
43. Shokry, H. Molecular dynamics simulation and quantum chemical calculations for the adsorption of some Azo-azomethine derivatives on mild steel / H. Shokry // Journal of Mol. Structure. - 2014. - V. 1060. - p. 80-87.
44. Thanikaivelan, P. Application of quantum chemical descriptor in quantitative structure activity and structure property relationship / P. Thanikaivelan [and all] // Chemical Physics Letters. - 2000. - V. 323. - p. 59-70.
45. Zhang, X. Crystal structure of human lysyl oxidase-like 2 (hLOXL2) in a precursor state / X. Zhang [and all] // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. - 2018. - V. 115. - p. 3828-3833.
46. Garrett, M. M. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function / M. M. Garrett [and all] // Journal of Computational Chemistry. - 1998. - V. 19. - p. 1639-1662.
47. Jan, F. A New Lamarckian Genetic Algorithm for Flexible Ligand-Receptor Docking / F. Jan, Hans-Peter L., Dirk N. // J Comput. Chem. - 2010. - V. 31. - p. 1911–1918.
48. Андриенко, О.С. Практические методы введения фтора в органические соединения : изд-во НТЛ / О.С. Андриенко, В.И. Сачков, В.А. Яновский. – Томск. - 2010. - С. 176.
49. Sutcliffe-Goulden, J. L. Solid Phase Synthesis of [18F]Labelled Peptides for Positron Emission Tomography / J. L. Sutcliffe-Goulden, M. J. O'Doherty, S. S. Bansal // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. - 2000. - V. 10. - p. 1501-1503.

50. Richter, S. Re-routing the metabolic pathway of 18F-labelled peptides: The influence of prosthetic groups / S. Richter [and all] // *Bioconjugate Chem.* - 2015. - V. 26. - p. 201-212.
51. Ahn, S.G. LOXL2 expression is associated with invasiveness and negatively influences survival in breast cancer patients / S.G. Ahn [and all] // *Breast Cancer Res. Treat.* - 2013. - V. 141. - p. 89-99.
52. Wang, S. X. A Crosslinked Cofactor in Lysyl Oxidase: Redox Function for Amino Acid Side Chains / S. X. Wang [and all] // *Science.* - 2000. - V. 273. - p. 1078-1084.
53. Judith, P. K. Intrigues and intricacies of the biosynthetic pathways for the enzymatic quinocofactors: PQQ, TTQ, CTQ, TPQ, and LTQ / K.P. Judith, F. Bonnot // *Chem. Rev.* - 2014. - V.114. - p. 4343-4365.
54. Wang, T.H. Lysyl oxidase and the tumor microenvironment / T.H. Wang, S.M. Hsia, T.M. Shieh // *Int. J Mol. Sci.* - 2016. - V. 18. - p. 528-544.
55. Chang, J. Pre-clinical evaluation of small molecule LOXL2 inhibitors in breast cancer / J. Chang [et all] // *Oncotarget.* - 2017. - V. 8. - p. 26066-26078.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра медико-биологических систем и комплексов

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
А.Н. Шуваев

« 18 » июня 2018 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Молекулярное моделирование РФП для диагностики метастатического
поражения костей на основе фермента лизилоксидазы

03.04.02 Физика

код и наименование направления

03.04.02.09 Технологическое сопровождение ядерной медицины и

медицинского оборудования

код и наименование магистерской программы

Научный руководитель  к. ф.-м. н., доцент А.Н. Шуваев

подпись, дата

Выпускник

М.А. Лукшина

подпись, дата

Рецензент

 к.б.н., профессор Н.М. Титова

подпись, дата

Красноярск 2018